



SZÉNHIDROGÉNEK AEROB ÉS MIKROAEROB LEBONTÁSÁBAN RÉSZTVEVŐ MIKROBA
KÖZÖSSÉGEK ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATA KOMPLEX DÚSÍTÓ TENYÉSZETEK
SEGÍTSÉGÉVEL

Révész Fruzsina

Gödöllő

2021

A doktori iskola

Megnevezése: Környezettudományi Doktori Iskola

Tudományága: Környezettudomány

Vezetője: Csákiné Dr. Michéli Erika
Intézetigazgató, egyetemi tanár
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Környezettudományi Intézet
Talajtani és Agrokémiai Tanszék

Témavezető: Dr. Táncsics András
Tudományos főmunkatárs
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Regionális Egyetemi Tudásközpont

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
2.1. A kőolaj szerepe, felhasználása, szennyezések okai és következményei	7
2.1.1. Szénhidrogénszennyezések hazai előfordulásai	9
2.2. Kőolajat alkotó szénhidrogének fajtái, kémiai és fizikai tulajdonságai.....	10
2.3. Bioremediációs lehetőségek.....	12
2.4. Kőolajszármazékok mikrobiális lebontásának környezeti feltételei.....	14
2.4.1. A hőmérséklet hatása a szénhidrogének biológiai lebontására.....	15
2.4.2. Tápanyagszükséglet	15
2.4.3. Elektronakceptorok szerepe a szénhidrogének biodegradációjában.....	16
2.4.4. A pH hatása a szénhidrogének biológiai lebontására	17
2.5. Aromás szénhidrogének mikrobiális lebontásának folyamatai.....	18
2.5.1. Az aromás vegyületek aerob lebontásának kulcsenzimeit.....	19
2.5.2. BTEX-vegyületek oxigén-limitált környezetben történő lebontásában potenciálisan szerepet játszó funkciógenek	21
2.6. Egyenes szénláncú alkánok (n-alkánok) mikrobiális lebontásának folyamatai.....	23
2.6.1. Egyenes szénláncú alkánok (n-alkánok) aerob lebontásának kulcsenzimeit.....	23
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	25
3.1. A vizsgálatok alapjául szolgáló kárhely leírása, mintavételezés menete.....	26
3.2. Tenyésztési előkísérlet körülményei.....	28
3.3. Dúsítási kísérletek körülményei.....	28
3.4. Baktériumtörzsek izolálása és azonosítása	31
3.5. DNS izolálás	31
3.6. 16S rDNS és funkciógen PCR-ek	31
3.7. Agaróz gélelektroforézis.....	33
3.8. T-RFLP vizsgálat.....	33
3.8.1. A fluoreszcensen jelölt 16S rDNS és funkciógen PCR termékek emésztése és tisztítása	34
3.8.2. A közösségi T-RFLP analízise	35
3.9. C23O és <i>alkB</i> funkciógen klónkönyvtárak létrehozása és feldolgozása.....	35
3.9.1. A klónszekvenciák amplifikálása és a PCR termékek tisztítása.....	37
3.9.2. A közösségi T-RFLP csúcsok azonosítása	38
3.10. Szekvenáló reakció	38
3.10.1. A szekvenálás eredményének elemzése, filogenetikai analízis	38
3.11. Illumina 16S rDNS amplicon szekvenálás	39
3.12. Teljes genom szekvenálás és elemzés.....	39
3.13. Metagenom szekvenálás és genomépítés.....	40
3.14. Szénhidrogénbontó képesség meghatározása GC-MS segítségével.....	41
3.15. Új baktériumfaj leírásához szükséges vizsgálatok.....	42
3.15.1. Fenotípusos és kemotaxonómiai vizsgálatok.....	42

3.15.2. Zsírsvav analízis.....	43
3.15.3. A teljes genomi DNS guanin és citozin tartalmának meghatározása.....	43
3.15.4. Poláris lipidek és respiratórikus kinonok analízise	43
3.15.5. Filogenetikai vizsgálatok	44
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	45
4.1. Oxigénlimitáció hatása benzollal és toluollal kiegészített dúsító tenyészetek mikrobaközösségeire.....	45
4.1.1. 16S rDNS amplikon szekvenálás segítségével feltárt mikrobaközösségek összetétele	45
4.1.2. A benzollal és toluollal kiegészített dúsító tenyészetekből kimutatott, I.2.C alcsaládba tartozó klónszekvenciák diverzitása és filogenetikai elhelyezkedése	50
4.1.3. A benzollal és toluollal kiegészített dúsító tenyészetekből izolált baktériumtörzsek ismertetése	52
4.1.4. <i>Malikia spinosa</i> AB6-os törzs teljes genomjának feltárása	55
4.2. Oxigénlimitáció hatása kőolaj/gázolaj keverékkel kiegészített dúsítótenyészetek mikrobaközösségére	58
4.2.1. A kőolaj/gázolaj keverékkel kiegészített dúsító tenyészetek 16S rDNS amplikon szekvenálás segítségével feltárt mikrobaközösségének összetétele.....	58
4.2.2. A kőolaj/gázolaj keverékkel kiegészített dúsító tenyészetekből kimutatott <i>alkB</i> gének diverzitása és filogenetikai elhelyezkedése	63
4.2.3. Az ismeretlen <i>alkB</i> genotípus (AER-OPU-1) filogenetikai azonosítása metagenom asszociált genom analízis segítségével.....	66
4.3. Új, aromás szénhidrogének lebontására képes baktériumfaj (<i>Sphingobium aquiterrae</i> sp. nov.) leírása	69
4.3.1. A <i>Sphingobium</i> nemzetség jellemzése	69
4.3.2. Fenotípusos és kemotaxonómiai vizsgálatok.....	70
4.3.3. Az SKLS-A10 ^T törzs kemotaxonómiai jellemzése.....	72
4.3.4. Az SKLS-A10 ^T törzs filogenetikai elhelyezkedése	74
5. KÖVETKEZTETÉSEK.....	78
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	81
7. SUMMARY	83
8. MELLÉKLETEK.....	85
8.1. Irodalomjegyzék.....	85
8.2. számú melléklet.....	105
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	107

Rövidítések jegyzéke

BTEX: benzol, toluol, etil-benzol és xilolok

C23O: catechol 2,3-dioxigenase (katekol 2,3-dioxigenáz)

dNTP: deoxynucleotide triphosphates (dezinukleotid trifoszfátok)

OPU: operational phylogenetic unit (operatív filogenetikai egység)

PAH: polycyclic aromatic hydrocarbons (policiklikus aromás szénhidrogének)

PCR: polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)

sp.: *species* (faj)

spp.: *species pluralis* (fajok)

TPH: total petroleum hydrocarbons (összes ásványolaj eredetű szénhidrogén)

T-RF: terminal restriction fragment (restrikciós enzimmel hasított darabok terminális része)

T-RFLP: terminal restriction fragment length polymorphism (terminális restrikciós fragmenthossz polimorfizmus)

1. Bevezetés

A népesség és az emberi igények növekedésével folyamatosan nő az emberiség által felhasznált energiamennyiség is. Bár számos alternatív megoldást ismerünk, energiaellátásunkat ma még jórészt a fosszilis energiahordozók – kőszén, kőolaj, földgáz – elégetéséből nyerjük. A kőolajszármazékok ezenkívül fontos alapanyagként és oldószerként szolgálnak az iparban és a mindennapokban. Kitermelésük, szállításuk, tárolásuk és felhasználásuk során a szabályozások ellenére nagyon gyakran következnek be balesetek, illetve figyelmetlenségből adódó szennyezések. Ezek alapján nem meglepő, hogy hazánkban és a világon is a kőolajszármazékok számítanak a leggyakrabban előforduló környezetszennyező anyagoknak. A környezetbe kerülve évtizedekre hatással lehetnek a környező ökoszisztémára, teratogén és karcinogén hatásaik miatt pedig különösen veszélyesek az élővilágra, beleértve az embert is. A legjobb megoldás a szennyezések megelőzése lenne, azonban, ahogy a gyakorlat is mutatja, ez sajnos számos esetben nem valósul meg.

Ha a szennyezés már bekövetkezett, rendelkezésünkre állnak olyan módszerek, melyekkel megfékezhetjük a problémát, esetenként pedig helyre is állíthatjuk az eredeti állapotokat. Alapvetően három kármentesítési útról beszélhetünk, melyek lehetnek fizikai, kémiai, illetve biológiai, más néven bioremediációs eljárások. Utóbbiak napjainkban fokozottan előtérbe kerültek, hiszen amellett, hogy ezen eljárások jelentik környezetünkre a legkisebb veszélyt, ezek a legköltséghatékonyabb módszerek is. A bioremediációs beavatkozások során a prokarióta szervezetek xenobiotikumbontó képességét használjuk ki. A baktériumok mérhetetlen sokszínűsége és az azonosítás korlátai miatt a fajoknak csak töredékét ismerjük. Ahhoz, hogy a kármentesítési eljárásokat továbbfejlesszük, hatékonyságukat növeljük, ismereteink bővítésére van szükség. Míg az aerob körülmények között „dolgozó” mikroorganizmusokat már sikerrel alkalmazzuk a kőolajszennyezések biodegradációjában, addig a mikroaerob körülmények között is aktív mikroszervezetek kármentesítés során betöltött szerepére viszonylag kevés figyelem jutott, pedig a mélyen fekvő, oxigénlimitált talajrétegekben nagy szükség lehet rájuk. Egyes baktériumok olyan enzimrendszerrel rendelkeznek, amely lehetővé teszi számukra, hogy alacsony oldott oxigénkoncentráció mellett is hatékony anyagcserét folytassanak. Ezeknek az enzimeknek a termelését speciális funkciógének kódolják, melyek vizsgálata hatékony eszköz lehet a környezetben zajló metabolikus aktivitás, illetve egyes baktériumok anyagcseréjének vizsgálatára.

Mindezek fényében kutatásunk során szeretnénk felvilágosítani, hogy:

- faji összetétel, illetve metabolikus képességek terén milyen mértékben térnek el egymástól az aromás és alifás szénhidrogének lebontásában szerepet játszó mikroba közösségek aerob és a mikroaerob körülmények között;
- az aromás és alifás szénhidrogének lebontásában résztvevő funkciógének mely fajokhoz köthetők, illetve mely komponensek lebontásában van szerepük.

Célunk volt továbbá, hogy a kísérletek során minél több új, szénhidrogén-lebontásra képes baktérium törzset izoláljunk.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A kőolaj szerepe, felhasználása, szennyezések okai és következményei

A világ nagy része még mindig erősen függ a fosszilis energiahordozók (kőolaj, kőszén, földgáz) által nyújtott energiától. A legsúlyosabb környezeti terhelést a kőolajszármazékok hasznosítása okozza. Mivel a mikroszervezetek számára könnyen hozzáférhető vegyületekről van szó, biológiai kármentesítés szempontjából ez a legrelevánsabb. Habár nem megújuló energiaforrásról beszélünk és a hagyományosan kitermelt kőolaj mennyisége az 1980-as évek óta csökken, a felhasználás világszinten azóta is lineárisan növekszik (Sugár 2012). Globális szinten a legtöbb kőolajat – a teljes felhasználás 58%-át – a különböző szállítási formák igénylik, beleértve a közúti-, légi-, vasúti- és víziszállítást. Az energetikai célú alkalmazás mellett a szénhidrogéneknek számtalan felhasználási módját ismerjük az iparban. Mindennapi életünket körülvevő tárgyak és kemikáliák – műanyagok, gumik, műszálak, mosószeres, oldószeres, festékek, ragasztók, növényvédőszeres, kenőanyagok stb. – fontos alapanyagai. Az ipari felhasználás világszinten mintegy 27%-ot tesz ki, míg a vállalati-, lakossági- és agrárszektor körülbelül 15%-ot (OPEC 2019).

A 20. századi robbanásszerű gazdasági és technikai fejlődést lehetővé tévő és a világot ma is kiszolgáló olajmezők nagy részét az 1930-as és 1960-as évek között fedezték fel (Bridge – Le Billon 2017). Ezek hagyományos módon (konvencionálisan) kitermelhető készletek, azaz a mélyben keletkezett, és a sok tízmillió éves vándorlás során a zárórétegek között megrekedt olaj fúrólukakon keresztül termelhető ki. A nyomás hatására a nyersanyag könnyedén felszínre hozható, majd minimális feldolgozás után értékesíthető. Azonban az utóbbi évtizedekben, a hagyományos lelőhelyek kimerülése folytán a figyelem fokozatosan a nem konvencionális lelőhelyek felé fordult és előtérbe került az olajpala, valamint az olajhomok bányászata. Ebben az esetben az olaj nem vándorol a kőzetrétegből a zárórétegek közti tárolókba, így magát a kőzetréteget kell kitermelni, ami újfajta technológiák bevetését (például hidraulikus rétegrepesztést) teszi szükségessé (Német 2013, Papp – Parragh 2015). Az így kitermelt nyersanyag minősége jóval alulmarad a hagyományos módon kitermelt nyersanyagénál, csak adalékanyagok hozzáadásával, jelentős feldolgozás után válik értékesíthetővé. Összességében az olajpala és olajhomok bányászata a kitermelés nehézségei és az alacsony minőség miatt jelentős anyag- és energiaráfordítást igényelnek. További, igen komoly aggályokat vet fel a bányászat környezetre gyakorolt hatása is. Mivel a kőzetrétegben található nyersanyag csak nagyon alacsony koncentrációban van jelen, a kitermelés hatalmas területet érinthet, amely fokozott tájképpusztulással jár. A mesterségesen kialakított repedések és a rétegrepesztés során felhasznált

vegyi anyagok miatt a felszín alatti közegekre is igen nagy kockázatot jelent (Papp – Parragh 2015).

A legsúlyosabb, havária jellegű olajszennyezések általában a kitermeléshez, szállításhoz köthetőek és leggyakrabban a vizeket, tengeri ökoszisztémákat érintik látványosan. Az elmúlt évszázadban sajnos több példát is láthattunk erre. 1978-ban az Amoco Cadiz teherhajó balesete során mintegy 223 000 tonna kőolaj került a tengerbe a Bretagne-i partok közelében. A tengerpart 300-360 km hosszan szennyeződött. Nem sokkal később, 1979-ben hatalmas robbanás rázta meg az Ixtoc I nevű fúrótornyot, mely a Mexikói-öbölben végzett felderítő fúrásokat. A baleset után csaknem 10 hónapon keresztül, összesen körülbelül 475 000 tonna olaj ömlött megállíthatatlanul a tengerbe. Pár évvel az olajkatasztrófák után mikrobiológiai vizsgálatokat végeztek (Atlas 1981) a szennyezett területeken. A baktériumközösséget mindkét esetben a szénhidrogénbontó baktériumok uralták mindaddig, amíg a szennyeződés erősen jelen volt a környezetben. A Mexikói-öböl szennyeződése esetében a környezeti hatások miatt egy olyan „víz az olajban” emulzió alakult ki, ami jelentősen lelassította a tápanyagok és az oxigén utánpótlását, ezzel együtt pedig a szénhidrogének lebontását a közegben. Ezzel szemben az Amoco Cadiz teherhajó balesete után a megfelelő környezeti feltételeknek és a szénhidrogénbontó mikroorganizmusoknak köszönhetően rendkívül gyorsan csökkent a szennyezés mértéke. Egyes területeken mindössze két év kellett ahhoz, hogy visszaálljanak a szennyezés előttihez hasonló állapotok. 1989-ben az Exxon Valdez nevű tankhajó futott zátonyra Alaszka partjainál, aminek következtében 7 000 tonna nyersolaj jutott a tengerbe. Ekkor már nagy hangsúlyt fektettek a helyben élő mikroorganizmusok anyagcserefolyamatainak tápanyagokkal történő támogatására, aminek köszönhetően tíz évvel a katasztrófát követően, az egyébként nagyon lassan lebomló policiklusos aromás szénhidrogének mennyisége is az előírt határérték alá csökkent (Bragg et al. 1994, Boehm 1998). 2010. április 20-án ismét a Mexikói-öbölben történt egy olajkatasztrófa, ami minden korábbinál súlyosabbnak bizonyult. A Deepwater Horizon fúrótornyán történt robbanás következtében csaknem 700 000 tonna nyersolaj szennyezte be a környező területeket. A kiömlött olaj típusa (könnyűolaj) és a természetes szivárgásokhoz adaptálódott baktériumközösség jelenléte miatt a vártnál sokkal hamarabb megindult az ökoszisztéma rehabilitációja (Atlas 2011).

Ha kőolajszennyezésről esik szó, általában a fentebb említett ikonikus olajkatasztrófákhoz hasonló, nagy volumenű tengeri szennyezésekre gondolunk. Azonban a szennyezések jelentős része a szárazföldön következik be és olyan, kisebb léptékű balesetekből és mulasztásokból származik, mint például csővezetékek és tartályok korróziója, vagy különböző vegyszerek nem megfelelő tárolása. Ezek a szennyezések a természetvédelmi és környezetvédelmi károkon túl súlyosan veszélyeztetik a földtani közegeket, ezen belül pedig az ivóvízellátás alapját is szolgáló talajvizeket. A felszín alatti vizek fedezik a világ népességének legalább 50%-ának ivóvízigényét,

és 43%-át teszik ki az öntözéshez felhasznált vízmennyiségnek. Csaknem 2,5 milliárd ember pedig kizárólag a talajban található vízkészletektől függ, amely az alapvető napi vízszükségletet és az élelmiszerellátáshoz szükséges igényeket fedezi számukra (WWAP 2015).

2.1.1. Szénhidrogénszennyezések hazai előfordulásai

A magyarországi talajok kőolaj szennyezettségének vizsgálata az 1990-es évek elejétől került a hazai tudományos érdeklődés előterébe. Ennek egyik mozgatórugója volt, hogy a kivonuló szovjet csapatok jelentős mennyiségű szennyezést hagytak maguk után. A talajba került kőolajszármazékok becslések szerint 2,7-3,0 millió m³ talajt szennyeztek el. Ez főként a repülőterek kerozin-, és a laktanyák gázolaj szennyeződésének következménye (Endrédi 2013).

A környezetet terhelő kőolajszármazékok egy része ma a helytelenül tárolt olajtartalmú hulladékokból (fáradt olajok, gépolajok, tartályok olajiszapjai, használt transzformátorolajok, olajtartalmú mosószeres stb.) származik. Ezeknél a szennyezéseknél rendszerint számolni kell a különböző adalékanyagok (detergensok, toxikus nehézfémek) toxikus hatásaival is. Rendszeresek a vonalas infrastruktúráink mellett történő szénhidrogén szennyezések is, például kőolajszármazékokat és egyéb szerves oldószereket tartalmazó tartálykocsik meghibásodásai, vagy nagyobb kőolajvezetékeink megrongálódásából adódóan (Lauer 2006). Sajnos számos olyan esettel is találkozhatunk, amikor a keletkezett szennyezőanyagoktól úgy próbálnak megszabadulni, hogy azokat a környezetbe juttatják. 2020 decemberében mintegy hat köbméternyi, ismeretlen eredetű szénhidrogénszármazék került a ráckevei Duna-ág vizébe. A szennyezés érinti természetvédelmi törvény által védett úszóláphoz tartozó nádast és a hozzátartozó védett fajok állományát. Egy-egy ilyen szennyezésnek a kármentesítése és a természet regenerálódása évekig eltarthat (<http://>).

A környezet védelmének általános szabályairól szóló 1995. évi LIII. törvény alapján 1996-ban indult el a Nemzeti Környezetvédelmi Program, amelynek része a tartós környezetkárosodások és szennyezett területek környezeti kármentesítésére létrehozott Országos Környezeti Kármentesítési Program (OKKP). A program célja a felszín alatti víz, és a földtani közeg veszélyeztetésének, szennyezettségének, károsodásának felmérése és a szennyezettség csökkentése, ahol lehetséges, megszüntetése. Eszerint hazánkban 2015. év végéig mintegy 15.000 szennyezett és potenciálisan szennyezett területet regisztráltak. A földtani közeg leggyakoribb szennyeződései az összes ásványolaj eredetű szénhidrogének (total petroleum hydrocarbons – TPH) (40%) és a monoaromás szénhidrogének (benzol, toluol, etil-benzol, xilolok – BTEX) (20%). A policiklusos aromás szénhidrogének (polycyclic aromatic hydrocarbons – PAH) (5%) és a halogénezett alifás és aromás szénhidrogén szennyeződések előfordulása kevésbé volt gyakori.

Mivel azonban számos vegyület közülük karcinogén tulajdonságokkal rendelkezik (http2), ezek a vegyületek nagyobb figyelmet érdemelnek. Nem meglepő módon a felszín alatti vizek terhelése is hasonló módon alakult. Itt is a TPH (29%) és a BTEX (28%) előfordulása a leggyakoribb, valamint jelentős a PAH (7%) és a halogénezett alifás és aromás szénhidrogén szennyeződések jelenléte is (Baross et al. 2015).

A hazai ivóvíztermelés 88%-a származik felszín alatti vízből, melynek mintegy fele a folyók menti kavicsos vízadó rétegekből kitermelt parti szűrésű víz. Budapest vízellátása szinte teljes egészében a dunai parti szűrésű vizekre támaszkodik. Jelenleg Magyarországon több, mint 1700 felszín alatti vízbázis üzemel, melynek fele antropogén szennyezés szempontjából sérülékeny földtani környezetben helyezkedik el (http3). A hazai felszín alatti vizek jogi védelmét többek között a 6/2009. (IV. 14.) „A földtani közeg és a felszín alatti víz szennyezéssel szembeni védelméhez szükséges határértékekről és a szennyezések méréséről” című KvVM-EüM-FVM együttes rendelet hivatott biztosítani, amely tartalmazza a környezetvédelmi szempontból kockázatosnak tekintett anyagok listáját. A rendelet a 219/2004. (VII. 21.) „a felszín alatti vizek védelméről” című Kormányrendelet alapján meghatározza a kockázatosnak tekintett anyagokra vonatkozó (B) szennyezettségi határértékeket a földtani közegre és a felszín alatti vizekre vonatkozóan.

2.2. Kőolajat alkotó szénhidrogének fajtái, kémiai és fizikai tulajdonságai

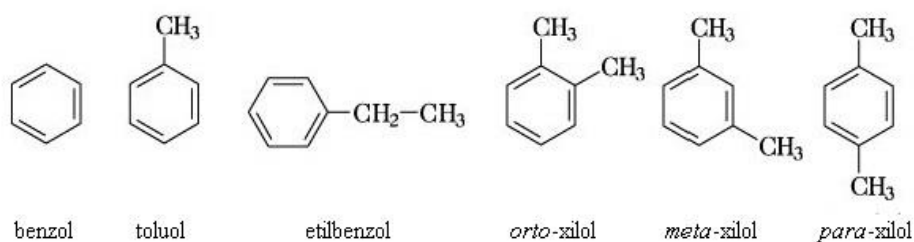
A kőolajat főként szerves vegyületek, azon belül is majdnem kizárólag szénhidrogének alkotják. Legnagyobbrészt tengeri élőlények felhalmozódott és lerakódott maradványaiból keletkeztek anaerob bomlás és átalakulás során. Ez az általában sötét színű, sűrűn folyó anyag igen sok – ezernél is több – szénhidrogén komponenset tartalmaz, mely összetevők külön-külön is ártalmasak, de sok esetben egymás hatásait felerősítve a legveszélyesebb mikroszennyezők közé sorolhatók. Az alkotóelemek aránya a földrajzi előfordulás helyének függvényében változik. A szénhidrogén molekula lehet telített vagy telítetlen, nyílt szénláncú, egy vagy több gyűrűs, melyekhez oxigén, kén- és nitrogén tartalmú vegyületek kapcsolódhatnak. A kis, C₁-C₄ szénatomszámú szénhidrogének alkotják a gáz frakciót, a C₅-C₁₆ szénatomszám közöttiek folyadékok, C₁₆ felett pedig egyre szilárdabb halmazállapotúak (Barótfi 2000; Antus – Mátyus 2005).

Hazánkban a jelenleg hatályos 6/2009. (IV. 14.) „a földtani közeg és a felszín alatti víz szennyezéssel szembeni védelméhez szükséges határértékekről és a szennyezések méréséről” szóló KvVM-EüM-FVM együttes rendelet tartalmazza a környezetvédelmi szempontból kockázatos kémiai elemek és vegyületek listáját, továbbá a rájuk vonatkozó „B” szennyezettségi

határértékeket külön a földtani közegre és a felszín alatti vizekre vonatkozólag. A kőolaj főbb alkotóelemeit a rendelet három kategóriába sorolja: összes ásványolaj eredetű szénhidrogén (TPH), benzol és alkilbenzolok (BTEX), valamint policiklusos aromás szénhidrogének (PAH). A továbbiakban e három főbb csoport tulajdonságait ismertetem röviden.

A nemzetközi környezetvédelmi szakirodalomban az **összes alifás szénhidrogének** csoportjába beletartozik minden olyan kőolaj eredetű szénhidrogén vegyület, amely C_5 és C_{40} közötti szénatomszámmal rendelkezik, míg a magyar jogszabályok csak az alifás, azaz aromás gyűrűt nem tartalmazó szénhidrogéneket sorolják ide. Az alifás vegyületek lehetnek telítettek vagy telítetlenek. A telített szénhidrogénekben a szénatomok vegyértékének megfelelő maximális számú hidrogénatom található, ennek megfelelően a szénatomok között csak egyszeres kötések (alkánok) találunk. A telítetlen szénhidrogének ezzel szemben kevesebb hidrogénatomot tartalmaznak, mint az azonos szénatomszámú, telített szénhidrogének, így tartalmazhatnak kettős (alkének) és hármas (alkinek) kötések is. Mindkét csoport tagjai lehetnek egyenes (normál), elágazó (izo) és gyűrűs (ciklo) szénláncúak. Az alifás szénhidrogénekben belül megkülönböztetünk 5-10 szénatomszámú, illékony (volatile aliphatic petroleum hydrocarbon – VALPH) és e feletti szénatomszámú kevésbé, vagy egyáltalán nem illékony (extractable petroleum hydrocarbon – EPH) vegyületeket. A megkülönböztetés rendkívül fontos a mintavétel és a kármentesítés módjának megválasztása miatt (Szoboszlai – Kriszt 2010). Az illékony szénhidrogénekre jellemző, hogy a levegő oxigénjével elegyedve tűz-, és robbanásveszélyesek. A bőrön, nyálkahártyákon és a tüdőn keresztül is felszívódhatnak, legtöbbjük irritáló és toxikus hatású.

A **monoaromás szénhidrogének** szintelen, szobahőmérsékleten többnyire folyékony anyagok. Vízen nem, szerves oldószerekben, így például más szénhidrogénekben jól oldódnak vagy korlátlanul elegyednek (Antus – Mátyus 2005). Ezek közül, az egyetlen aromás gyűrűt tartalmazó vegyületek közül, környezetvédelmi és humánegészségügyi szempontból a benzol és származékai tekinthetők a legfontosabbnak. A benzol mellett ide tartozik a toluol, az etil-benzol, illetve a xilol három izomerje, melyeket együtt BTEX vegyületeknek nevezünk (2.1. ábra). A BTEX vegyületek mind a négy tagja komoly hatással lehet az idegrendszerre. A benzol emberben karcinogén hatású, különösen a vérképző szervekre lehet veszélyes, növeli a leukémia és a csontvelőbetegségek kialakulását (ATSDR 2004, WHO-IARC 2018).



2.1. ábra: BTEX vegyületek szerkezeti képlete

A **policiklusos aromás szénhidrogének** (polycyclic aromatic hydrocarbons – PAH) molekulái két vagy több egymással közvetlenül összekapcsolódó benzolgyűrűt tartalmaznak, térbeli elrendezésükből adódóan rengeteg lehetséges vegyületük előfordulhat, ám ezek közül néhány százat ismerünk. Általában szerves anyagok tökéletlen égése következtében keletkeznek és többnyire nem önmagukban, hanem több PAH vegyület keverékeként fordulnak elő. Az Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala (United States Environmental Protection Agency – US EPA) 16 vegyületet választott ki közülük előfordulásuk gyakorisága és veszélyességük alapján. A listában gyakran előforduló rákkeltő, mutagén és teratogén anyagok szerepelnek (ATSDR 2004, [http2](http://www2.epa.gov/pah)).

2.3. Bioremediációs lehetőségek

A kármentesítési eljárások alapvető célja a talaj és a felszín alatti vizek szennyezettségének csökkentése, valamint ahol lehet, megszüntetése. Ez történhet fizikai és kémiai úton (diszperzió, kipárolgás, oldódás) vagy lebontó folyamatok (abiotikus és biotikus) útján is. Tudnunk kell, hogy a szennyezők csak az utóbbi esetben távoznak el ténylegesen a környezetből. A bioremediációs beavatkozásokat két nagyobb csoportra lehet osztani. Az egyik lehetőségnél a szennyezett közeget a helyéről kiemelve tisztítják meg, ezt nevezik *ex situ* eljárásnak, a másik lehetőségnél a talajt vagy a talajvizet az eredeti helyén kezelik, ezek az *in situ* eljárások.

Az *ex situ* eljárásokat magas költségük miatt csak ritkán alkalmazzák, de vannak esetek mikor ez a legkézenfekvőbb megoldás, például súlyos szennyezettség, ivóvízbázis veszélyeztetettsége esetén, vagy ha a sürgős használatba vétel nem engedi meg az időigényesebb technikákat. A legfiatalabb módszereknek az *in situ* kármentesítések számítanak, jelentőségük azonban igen nagy, mivel általában ezek járnak a legkisebb környezeti beavatkozással és a legkisebb anyagi ráfordítással. A biológiai *in situ* eljárások előnye a költséghatékonyságon túl, hogy a talaj és a talajvíz természetes rétegzettsége változatlan marad, így a kevesebb bolygatás miatt megmaradhat annak természetes funkciója (KVVM 2010). A szerves szennyezők mikroszervezetek általi bontása során a különböző oxidáltságú vegyületeken keresztül optimális esetben a végtermék nagy része szén-dioxid és víz lesz. A megmaradt szennyezőanyagok és a köztitermékek azonban kockázatot jelenthetnek, mivel az *in situ* eljárásoknál a szennyezett környezeti elem nincs izolálva környezetétől.

A kármentesítési eljárások közötti döntést a helyszín részletes vizsgálata kell, hogy megelőzze (KVVM 2010). A hatékony beavatkozás érdekében ismernünk kell azokat a feltételeket, melyek határt szabnak a talajban és talajvízben végbemenő mikrobiális folyamatoknak. Ilyen az oldott oxigén jelenléte az aerob lebontáshoz, vagy a megfelelő

elektronakceptorok jelenléte az anaerob bontást végző mikrobák számára, a megfelelő pH és hőmérsékleti viszonyok, valamint a szerves tápanyagok megléte a közegben. Külső beavatkozással ezek a tényezők többé-kevésbé változtathatók, azonban a talaj adottságai, textúrája adottak, mely többek között az elérhető oxigén mennyiségére is hatással van (Philp – Atlas 2005).

Bizonyos esetekben, ha a fizikai, kémiai és biológiai feltételek lehetővé teszik, hogy elfogadható időtartamon belül csökkenjen a szennyezőanyag mennyisége az érintett területen, elég a szennyezett közeg folyamatos monitoringja, tehát nincs szükség közvetlen beavatkozásra. Ez csak akkor tekinthető kármentesítési eljárásnak, ha bizonyítjuk a természetes lebomlás hatékonyságát a területen. A **spontán biodegradáció** tehát azt jelenti, hogy különösebb emberi beavatkozás nélkül, a jelenlévő mikroorganizmusok által, természetes módon csökken a szennyezők mennyisége, toxicitása, mobilitása vagy koncentrációja (KVVM 2010). Ennek az eljárásnak hátránya, hogy nagyon sok limitáló tényezője lehet. Az adott közegben a bennszülött mikrobaközösségnek rendelkeznie kell a megfelelő enzimrendszerrel, mellyel a környezetbe került szennyezőanyagokat bontani tudják. A szennyezőanyagok által biztosított szénforráson kívül a baktériumoknak szükségük lehet a megfelelő tápanyagokra és elektron-akceptorokra. Amennyiben a feltételek adottak a mikrobaközösség számára, a lebontó folyamatok így is igen sok időt vehetnek igénybe azokkal az eljárásokkal szemben, ahol aktív beavatkozás is történik. A módszert a mikrobaközösség és a szennyezőanyagok koncentrációjának, valamint tér- és időbeli változásának folyamatos monitoringja kell, hogy kiegészítse, melynek függvényében dönthetnek az esetleges aktív beavatkozás módjáról (Leahy – Colwell 1990, Korda et al. 1997, Margesin – Schinner 2001).

Stimulált biodegradációnak, más néven biostimulációnak (támogatott spontán biodegradációnak) nevezzük azokat az eljárásokat, melyek során az ökoszisztémában jelenlévő mikrobaközösség lebontó képességét használjuk ki úgy, hogy külső beavatkozással teremtjük meg számukra az optimális életfeltételeket. Leggyakrabban levegő bepumpálásával, azaz bioventillációval teremtik meg az aerob feltételeket a mikrobák számára. Klórozott szénhidrogének és friss gázolajszennyezések esetében ez az eljárás nem alkalmazható, mivel az illékony komponensek könnyen elszennyezhetnek más közeget (levegőt) is, ráadásul ezek a vegyületek meglehetősen toxikusak (Cauwenberghe – Roote 1998, Philp – Atlas 2005). Az oxigént olykor más anyagok, például hidrogén-peroxid közegbe juttatásával is biztosítják. A kockázata ennek a módszernek sem elhanyagolható, mivel könnyen előfordulhat, hogy a bejuttatott anyagok reakcióba lépnek az ott lévő szennyezőanyagokkal, vagy a talaj szerves anyagával, másrészt veszélyt jelenthet a szénhidrogénbontó mikrobapopulációra nézve. Anaerob körülmények esetén alternatív elektronakceptorok közegbe juttatása is lehetséges.

A stimulált biodegradáció során alkalmazhatnak olyan felületaktív anyagokat, melyek a vízben kevésbé oldódó szénhidrogéneket emulzióba viszik. A szennyezőanyag így megnövelt határfelülete könnyebb hozzáférhetőséget biztosít a mikrobák számára. Léteznek olyan baktériumfajok is, melyek saját maguk is képesek felületaktív anyagokat előállítani. Legismertebbek a *Rhodococcus* és a *Pseudomonas* genus által előállított vegyületek (Banat 1995).

Az **öszönös talajoltás** során a szennyezett területről vett talaj- vagy talajvízmintából a megfelelő táptalajon, laboratóriumi körülmények között szaporítják fel az ökoszisztémában megtalálható mikroorganizmusokat, majd lombikokban, tartályokban (fermentorokban) felszaporítják őket (20^5 - 10^{10} /mL élő sejt számra) és nagy mennyiségben juttatják vissza a mentesítendő közegbe. Jellemzően ezeknek a baktériumtörzseknek csak a bontási képességeit ismerik, egyéb tulajdonságaikat, például bontási spektrumukat és patogenitásukat nem. A faji szinten azonosítatlan baktériumokkal történő talajoltás rendkívül veszélyes lehet, mivel azonosítatlan patogén törzseket is felszaporíthatnak, majd visszajuttathatnak a talajba és a talajvízbe, ahonnan a csapadékkal nagy távolságra eljuthatnak (Szoboszlai et al. 2002).

A **bioaugmentáció** – más néven tudatos talajoltás – során olyan mikroorganizmusokat használunk a kármentesítéshez, melyek fajszerint azonosítottak és ismert degradációs, patogenitási és érzékenységi tulajdonságokkal rendelkeznek. Ezek származhatnak a kárhelyről, vagy laboratóriumi törzsgyűjteményből. Identifikált mikrobák alkalmazására akkor lehet szükség, ha a kárhelyen nem található meg azok a baktériumtörzsek, melyek képesek a környezetbe jutott szennyezőanyagok hatékony bontására. A beavatkozás sikeressége függ a beoltott baktériumok új közegben való viselkedésétől. Figyelembe kell venni, hogy a kijuttatott mikrobák szaporodási rátája alacsonyabb lehet a mesterséges körülmények között tapasztaltaknál. Minél jobban ismerjük a használni kívánt faj bontási spektrumát, környezeti igényeit, annál célzottabban és hatékonyabban tudjuk felhasználni őket a kármentesítés alkalmával (Vogel 1996).

2.4. Kőolajszármazékok mikrobiális lebontásának környezeti feltételei

A természetben található mikrobák enzimrendszerük segítségével képesek a szerves molekulákat széndioxidra és vízre alakítani. Ezt a teljes lebontást nevezzük összefoglalóan ásványosításnak, vagyis mineralizációnak. Bizonyos esetekben a lebontást végző enzimek a szennyezőanyagokat köztes anyagcsere-termékekké alakíthatják, melyek az esetek többségében akkumulálódnak a sejten belül. Ekkor a mineralizáció helyett biotranszformáció zajlik. A különböző szerves anyagok lebontása (katabolizmus) útján a sejtek számára felvehetővé válik a szükséges energia, valamint az új sejtek felépítésére (anabolizmus) alkalmas építőelemek. Annak érdekében, hogy a mikrobiológiai anyagcsere (metabolizmus) működőképes legyen, olyan

alapvető anyagoknak kell jelen lenniük, mint a megfelelő tápanyagok, víz, szén- és energiaforrások, elektrondonorok és elektronakceptorok (KVVM 2010).

2.4.1. A hőmérséklet hatása a szénhidrogének biológiai lebontására

A hőmérséklet közvetlen hatással van a kőolajszármazékok fizikai tulajdonságaira, így terjedésükre és biológiai bonthatóságukra is. Alacsony hőmérsékleten az olajok viszkozitása megnő, ezzel hozzáférhetőségük csökken a mikrobák számára. Az alacsony hőmérséklet az illékony komponensek kipárolgását csökkenti, így a visszamaradó, kis molekulású komponensek toxikus hatással lehetnek a mikrobákra, ami hátráltathatja a lebontást (Leahy – Colwell 1990, Atlas – Bartha 1972). A baktériumok szénhidrogénbontó képessége tág hőmérsékleti határok között mozog. Általánosságban elmondható, hogy a hőmérséklet növekedésével gyorsulnak a kémiai reakciók, gyorsul a baktériumok anyagcseréje, ezáltal a lebontás is. Ismerünk azonban hidegkedvelő (pszichrofil), közepes hőmérsékleten aktív (mezofil) és melegkedvelő (termofil) fajokat is. A gyakorlatban, vagyis egy kármentesítés esetében a hőmérsékleti tényezők általában nem az optimális határok között mozognak, ezért is fontos megismernünk olyan mikroba fajokat, melyek alacsonyabb hőmérsékleten is képesek a szénhidrogének bontására. A mentesítendő közeg hőfokának megemelése *in situ* környezetben nehezen kivitelezhető.

Sok tanulmány született már a hőmérséklet mikrobákra gyakorolt hatásáról. Dibble és Bartha (1979) egy bioremediációs kísérlet során öt különböző hőfokon vizsgálta a mikrobák aktivitását, és azt találta, hogy 5 °C-on a biodegradáció mértéke elhanyagolható volt, 13 °C-on az igen hosszúra nyúlt lag fázis, vagyis az új környezethez való alkalmazkodás után a lebomlás nem túl nagymértékben, de beindult. 13 és 20 °C között a lebontás hatékonysága megugrott, az aktivitás e fölött is nőtt, de elhanyagolható mértékben.

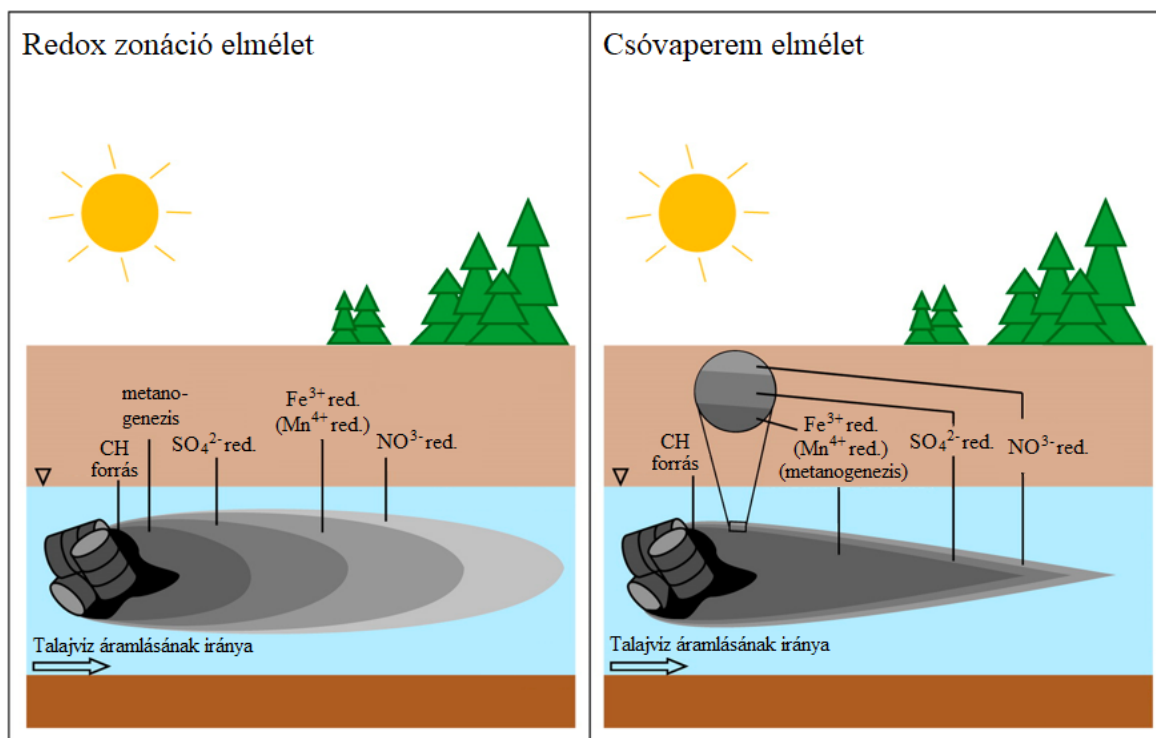
2.4.2. Tápanyagszükséglet

A mikroorganizmusok megfelelő anyagcseréjéhez elengedhetetlen az optimális C/N és C/P arány. Olyan élőhelyeken (pl. tengerek), ahol a hozzáférhető szervesanyagok (nitrogén, foszfor, kálium) koncentrációja kicsi, a szennyezőanyagok lebontásának is limitált. A kutatások rámutattak arra, hogy pl. egy szennyezés esetén a megnövekedett szervesanyag a szén irányába tolhatja el az arányokat és ez jelentősen hátráltathatja a biodegradáció folyamatát. Ennek ellensúlyozására gyakran adnak nitrogént és foszfort a közegbe (Atlas 1981, Leahy – Colwell 1990). A szénhidrogének lebontásában nagy szerepet tulajdonítanak a vasnak is, hiszen a

lebontásban szerepet játszó enzimek közül több is tartalmaz központi vas iont (Dibble – Bartha 1976).

2.4.3. Elektronakceptorok szerepe a szénhidrogének biodegradációjában

A szénhidrogének mikrobiológiai lebontásának első lépése általában a szennyező vegyületek oxigenáz enzimekkel történő oxidációja, vagyis ez a folyamat többnyire csak oxigén jelenlétében, azaz aerob úton megy végbe (Leahy – Colwell 1990). Energetikai szempontból az aerob anyagcsere a legelőnyösebb a baktériumok számára. Kőolajszenyezés esetén azonban a hirtelen, nagy mennyiségű szénforrás megnöveli a mikrobiológiai aktivitást, ami rendszerint az oldott oxigén gyors fogyását vonja maga után. A talaj mélyebb rétegeiben az oxigén utánpótlása korlátozott, így könnyen alakulhat ki először kiterjedt mikroaerob (0-0,5 mg/L oldott oxigén), majd anaerob környezet. Itt a lebontó folyamatok alternatív elektronakceptorok segítségével működhetnek, melyek a nitrát, szulfát, Fe(III), Mn(IV) és a CO₂ lehetnek. Kármentesítés szempontjából az anaerob biodegradáció hátránya, hogy az aerob lebontásánál sokkal lassabban megy végbe. Az elektronakceptorok hasznosítása redoxpotenciáljuk alapján történik, rendszerint az az elektronakceptor fogy el először a közegből, amelyből a jelenlévő mikroorganizmusok a legtöbb energiát képesek nyerni (Perei et al. 2013). Ilyen módon úgynevezett redox zónák alakulhatnak ki, ami azt jelenti, hogy a szennyezési csóva közelében és attól kifelé haladva a következő mikrobiális anyagcserefolyamatokat figyelhetjük meg: szulfátredukció, mangánredukció, vasredukció, nitrátredukció, és végül az aerob folyamatok. A klasszikus redox zonáción alapuló elméletet azonban lassan felváltja a csóvaperem elmélet, ami azt jelenti, hogy a szennyezési csóva magjában az oldott elektronakceptorok többé-kevésbé kimerülnek, itt legfeljebb metanogenezis, vas- és mangánredukció fordulhat elő. Aerob anyagcsere, nitrát- és szulfátredukció viszont a csak a szennyezési csóva szélein, egy szűk határfelületen zajlik, ahol a talajvíz mozgásával és diffúzióval vissza tudnak tölteni a szükséges elektronakceptorok (2.2. ábra).



2.2. ábra: A redox zónáció és a csóvaperem elmélet összehasonlítása (Meckenstock et al. 2015 alapján)

Erősen szennyezett (100 mg/L szénhidrogén koncentráció) közegben a megnövekedett mikrobiális aktivitás hatására a rendelkezésre álló elektronakceptorok – oxigén, nitrát, szulfát, Fe(III), Mn(IV) – rövid időn belül elfogyhatnak, mely esetekben valószínűbb, hogy az egyes elektron akceptorok elérhetősége, és nem azok termodinamikai előnyössége mozgatja a lebontási folyamatokat. Emiatt a különböző légzési folyamatok akár párhuzamosan is folyhatnak, és az alternatív elektronakceptorok felhasználása nem feltétlenül halad az energetikailag legkedvezőbbtől a legkedvezőtlenebb felé (Hansel et al. 2015, Meckenstock et al. 2015).

2.4.4. A pH hatása a szénhidrogének biológiai lebontására

A vizes élőhelyekkel szemben a talajok pH-ja igen szélsőséges határokon belül mozoghat. Ismerünk egészen savas, 2,5-ös pH értékű meddőhányókat, míg a szikes puszták kilúgozott talaja akár 11-es érték körül is lehet. Verstraete és munkatársai (1976) gázolajjal szennyezett talajban vizsgálták a szénhidrogének biodegradációját és azt találták, hogy a talaj pH-jának 4,5-ről 7,4-re történő elmozdítása megkétszerezte a szénhidrogének lebontási rátáját. A pH további emelése (8,5 fölé) azonban kedvezőtlenül hatott biodegradációra. Dibble és Bartha (1979) kutatásaik során 5-ös és 7,8-as pH között vizsgálták az olajos iszap mikrobák általi mineralizációját, és a legalkalmasabb értéket 7,8-nál határozták meg. Feltételezhető, hogy erősen savas környezetben a lebontás kezdeti lépéseit a gombák végzik el, majd a köztitermékek lebontásába bekapcsolódnak

a baktériumok is (Stapleton et al. 1998). Ismerünk extrém lúgos környezethez (pH, 7.5-10.6) adaptálódott szénhidrogén bontó baktériumokat is (Kanekar et al. 1999, Sarnaik – Kanekar 1995).

2.5. Aromás szénhidrogének mikrobiális lebontásának folyamatai

A biodegradáció során a komplex szennyezőanyagokból egyszerűbb vegyületek keletkeznek, miközben a lebontó szervezetek energiát és építőelemeket nyernek. Ezek az anyagcsere-folyamatok biokémiai reakciókkal leírható folyamatok együttese. Az aromás vegyületek, szerkezetükből adódóan igen stabilak, lebontásukra olyan mikroorganizmusok képesek, amelyek rendelkeznek az ehhez szükséges enzimrendszerrel. Ma már számos olyan mikroorganizmust ismerünk, amelyek képesek az aromás szénhidrogének bontására. Természetes körülmények között, kőolajszennyezést követően a mikrobaközösségek összehangolt munkával képesek eltávolítani a toxikus anyagokat a környezetből. Évtizedekkel ezelőtt megfigyelték, hogy az aromás szénhidrogének bontására képes baktériumok igen alacsony számban, de jelen vannak nem szennyezett területeken is. Általánosságban elmondható, hogy a természetes ökoszisztémákban ezek a baktériumok a közösségeknek körülbelül 0,1%-át teszik ki, szennyezést követően pedig a közösség adaptációjával ez az arány körülbelül 1-10%-ra növekedhet (Atlas 1991). A legfontosabb aromás szénhidrogéneket lebontó baktériumokat az *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Comamonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, és a *Sphingomonas* nemzetségekben találjuk. Nagyon változatos környezetben megtalálhatóak és rendkívül diverz metabolikus képességekkel rendelkeznek a *Pseudomonas* nemzetség tagjai (Timmis 2002). Ismertek olyan törzsei, amelyek aerob körülmények között, a BTEX-vegyületek csaknem teljes palettáját képesek lebontani (Zylstra – Gibson 1989, Alvarez – Vogel 1991, Haigler et al. 1992, Johnson – Olsen 1995, Lee – Gibson 1996, Attaway – Schmidt 2002). A szennyező anyagok szintén nagyon széles körének bontására képesek a *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó fajok is, melyeket gyakran izolálnak aromás szénhidrogénekkal szennyezett területekről (Andreoni et al. 2004, Abraham et al. 2005). Közöttük is találhatóak olyan törzsek, amelyek képesek akár három-négy monoaromás vegyület teljes mineralizációjára (Seto et al. 1995, Bickerdike et al. 1997, Jung – Park 2004, Kim et al. 2004). Kedvező tulajdonságaik miatt a *Rhodococcus* fajokat előszeretettel alkalmazzák bioremediációs eljárások során is (van der Geize – Dijkhuizen 2004).

Habár számos egyszerű aromás szénhidrogén mikrobiális biodegradációja anaerob körülmények között is végbemegy, a rákkeltő benzol, valamint a para-, és orto-xilol perzisztens vegyületeknek számítanak ilyen közegekben (Widdel et al. 2006, Foght 2008). A toluol és az etil-benzol lebontása anaerob körülmények között is végbemegy, és az abban részt vevő baktériumok

köre, valamint a lebontás kulcsenzimeit ma már jól ismertek (Chakraborty – Coates 2004). Ezzel szemben a benzol anaerob lebontása jóval bonyolultabb folyamatnak tűnik, és alig néhány baktériumtörzs ismert (pl. a *Dechloromonas aromatica* RCB törzs), amelyek oxigén hiányában is képesek egyedüli szén-, és energiaforrásként hasznosítani e vegyületet. A para-xilol anaerob lebontása még a benzolénál is nehezebb, és mindössze egyetlen tenyésztésbe vont törzs ismert, amely képes erre (Higashioka et al. 2012), de para-xilol lebontást mutató anaerob dúszító tenyészetek is alig ismertek a szakirodalomban (Häner et al. 1995, Morasch et al. 2005, Nakagawa et al. 2008).

Ismert, hogy a benzol teljes mineralizációja akár nyomnyi mennyiségű oxigén jelenlétében is végbemegy (Yerushalmi et al. 2002, Aburto et al. 2009). Ez alapján feltételezhető, hogy a szennyezett felszín alatti közegekben elegendő mikroaerob körülményeket fenntartani ahhoz, hogy a BTEX-vegyületek mindegyikének lebomlása végbemenjen, ami jelentősen csökkenthetné a szennyezett területek kármentesítésére fordított költségeket, valamint környezeti fenntarthatóság szempontjából is előnyös lenne. Ahhoz, hogy az oxigén-limitált környezetben is aktívan bontó baktériumokat a gyakorlatban is alkalmazni tudjuk, jobban meg kell ismernünk azok körét és metabolikus képességeiket. A továbbiakban az aromás vegyületek aerob lebontásának legfontosabb útvonalai kerülnek áttekintésre.

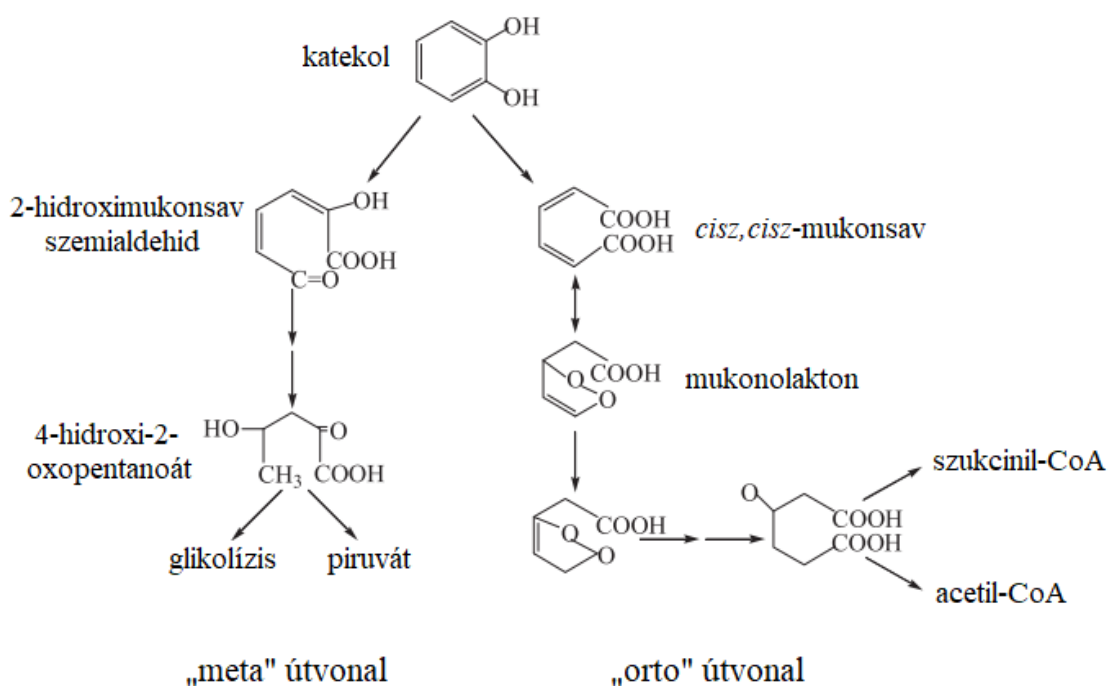
2.5.1. Az aromás vegyületek aerob lebontásának kulcsenzimeit

Az aromás vegyületek aerob lebontása során két helyen is szükség van oldott oxigén jelenlétére. Legelőször a szubsztrát kezdeti oxidációjánál, majd a légzési lánc végén, mint végső elektron-akceptor (Perei 2013). A BTEX-vegyületek lebontásában kétféle enzimszisztéma, monooxigenázok és a dioxigenázok játszanak fontos szerepet, részt vehetnek a kezdeti oxidációs lépésekben, majd az azt követő gyűrűhasításban is.

A **monooxigenáz** enzimek az aromás gyűrű metil vagy etil szubsztituenseit támadják meg úgy, hogy az O₂ egyik atomjának beépülését katalizálják a szubsztrátba, miközben a másik oxigénatom vízzé redukálódik. Ezt az útvonalat nevezik „*tol*” útvonalnak is (Tsao et al. 1998, Khan et al. 2001). A **dioxigenázok** az oxigénmolekula mindkét atomját beépítik a szubsztrátba. Két nagyobb csoportjukat különböztethetünk meg aszerint, hogy az aromás gyűrű lebontásának melyik lépésében vesznek részt. Az oxidáció egyik gyakori kezdő lépése a hidroxiláció, melynek során a dioxigenázok hidroxil csoportot építenek az aromás gyűrűre, cisz-diolok keletkezése közben. A folyamathoz redukált kofaktorok szükségesek, lebontó anyagcsere esetén NADH. A hidroxilált aromás gyűrű hasítását ezután olyan dioxigenáz enzimek végzik, melyeknek nincs szükségük kofaktorokra. Ezt az útvonalat nevezik „*tod*” útvonalnak is (Tsao et al. 1998). A toluol

és a xilol izomerek lebontása megtörténhet a „*tol*” és „*tod*” útvonalak bármelyikén, a benzolé azonban csak a „*tod*” útvonalon, mivel utóbbi nem rendelkezik oldallánccal, amely lehetővé tenné a monooxygenázok „támadását” (Mikesell et al. 1993, Fritsche – Hofrichter 2000).

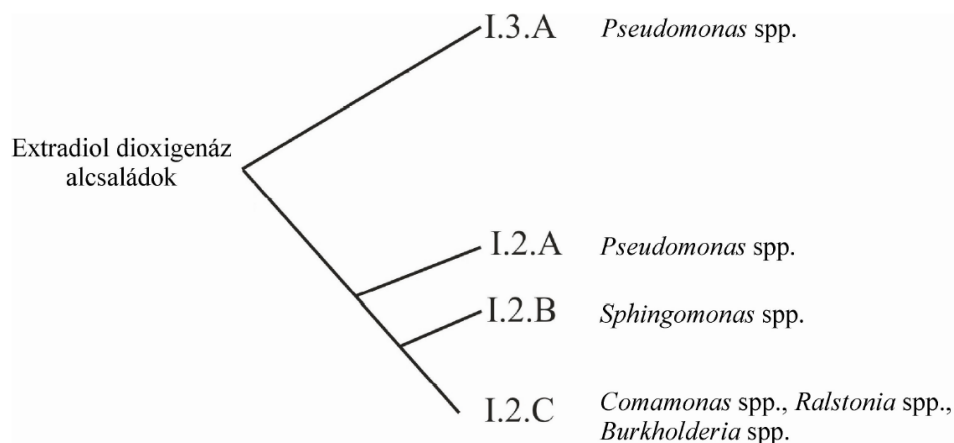
Az aromás szénhidrogének számos lebontási útvonalának nagyon gyakori közös közti termékei a katekolok. A lebontás következő lépése a katekol aromás gyűrűjének felhasítása, melyben a **katekol-dioxigenáz enzimek** vesznek részt. A gyűrű hasítása két helyen is megtörténhet. A katekol 1,2-dioxigenáz enzimek (C12O), más néven intradiol dioxigenázok nem-hem Fe(III) iont tartalmaznak kofaktorként, és a két hidroxil csoport között, azaz „*orto*” útvonalon hasítanak. A keletkező termék *cisz,cisz*-mukonsav lesz, ami a továbbiakban több lépcsőn keresztül szukcinátként lép a Szent-Györgyi – Krebs ciklusba. A katekol 2,3-dioxigenáz enzimek (C23O), vagyis az extradiol dioxigenázok azonban nem-hem Fe(II) iont tartalmaznak kofaktorként, és a két hidroxil csoport mellett, azaz „*meta*” útvonalon hasítanak. A keletkező termék ebben az esetben a 2-hidroxi-2-oxopentanoát lesz, amely több lépcsőn keresztül piruvátként lép a Szent-Györgyi – Krebs ciklusba (Perei 2013, Abbasian et al. 2015) (2.3. ábra).



2.3. ábra: Katekol intermedier lebontása „*meta*” és „*orto*” útvonalon keresztül (Ren et al. 2014 alapján)

Az intradiol és extradiol dioxigenázok, aminosav szekvenciájukat tekintve nagyon különböznek egymástól, evolúciós szempontból két különálló csoportba tartoznak. Az intradiol dioxigenázok monofiletikus csoportot alkotnak, az extradiol dioxigenázok ezzel szemben további két nagy családra (I.2. és I.3.), ezen belül négy alcsaládra bonthatók (2.4. ábra). Ezeket a csoportokat, evolúciós vizsgálatokra alapozva, Eltis és Bolin (1996) nevezte meg először. Az I.2

családon belül az I.2.A, I.2.B, I.2.C, az I.3 családon belül az I.3.A alcsaládban találhatóak meg a lebontásban szerepet játszó enzimek (Vaillancourt et al. 2006). Az I.2.A alcsaládba döntően fluoreszcens *Pseudomonas* fajok C23O génszekvenciái tartoznak, az I.2.B alcsaládba pedig döntően a *Sphingomonas* nemzetségbe tartozó fajok C23O génszekvenciái. Az I.2.C alcsaládba tartozó szekvenciák már sokkal diverzebb képet mutatnak, ide elsősorban a *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Burkholderia* és *Ralstonia* nemzetségekhez köthető C23O génszekvenciákat sorolhatjuk (Hendrickx et al. 2006).



2.4. ábra: A BTEX-vegyületek lebontásában szerepet játszó extradial dioxygenáz enzim alcsaládok filogenetikai helyzete (Táncsics 2009)

2.5.2. BTEX-vegyületek oxigén-limitált környezetben történő lebontásában potenciálisan szerepet játszó funkciógének

A hatékony bioremediáció elengedhetetlen feltétele, hogy megismerjük a lebontásban résztvevő baktériumok körét és metabolikus folyamataikat. A modern molekuláris biológiai technikák lehetővé tették a környezetben lezajló mikrobiológiai folyamatok egyszerűbb és gyorsabb nyomon követését, új baktériumfajok azonosítását és genomjuk feltérképezését. A szennyezőanyagok lebontásában szerepet játszó enzimek és az azokat kódoló gének, az úgynevezett funkciógének megismerése részletes képet adhat egy-egy közösség vagy faj metabolikus képességeiről. A hagyományos mikrobiológiai technikákkal szemben, a nukleinsavak közvetlen kivonásának egyik nagy előnye, hogy elkerülhetjük vele a tenyésztésbe vonás során fellépő torzításokat (Stapleton et al. 1998, Widada et al. 2002, Brockman 1995). Mivel az egyes gének meglehetősen konzervatívak, amellyel, hogy jelezhetik a baktériumok szerepét a szennyezőanyagok lebontásában, jelezhetik azok filogenetikai helyzetét is, vagyis az egyes baktérium csoportokat és enzimaktivitásukat együttesen tudjuk vizsgálni.

A katekol 2,3-dioxigenáz gének (C23O) kimutatását gyakran használják kőolajszármazékokkal szennyezett területek monitoringja során (Junca – Pieper 2004, Tánicsics et al. 2010, Benedek et al. 2018, Higashioka et al. 2009). Mivel ezeknek a géneknek rendkívül nagy a diverzitása, vizsgálatuk csak specifikus primerek alkalmazásával lehetséges. Hendrickx és munkatársai (2006) az I.2.A és I.2.B alcsalád enzimeit kódoló gének kimutatását célozták meg, mivel ezekkel a génekkel szinte kizárólag Gamma- és Alfa-proteobaktériumok rendelkeznek (*Pseudomonas* és *Sphingomonas*, illetve *Novosphingobium* nemzetségek). Tánicsics és munkatársai (2010, 2013) voltak az elsők, akik olyan PCR primereket terveztek, amelyekkel az I.2.C alcsaládba tartozó C23O gének széles spektruma kimutathatóvá vált. Ezeknek a géneknek az azonosítása és megismerése kulcsfontosságú információkat adhat a mélyen fekvő, BTEX-vegyületekkel szennyezett talajvizekben történő anyagcsere folyamatok megértéséhez. Kukor és Olsen (1996) figyelték meg, hogy az I.2.C típusú C23O gének által kódolt extradiol dioxigenáz enzimek megnövekedett oxigénaffinitással rendelkeznek, így feltételezhetően azok a baktériumok, amelyek rendelkeznek ezekkel a génekkel, fontos szerepet játszhatnak a BTEX-vegyületek oxigénlimitált körülmények közötti lebontásában. További kutatások azt is bizonyították, hogy ezek a gének mikroaerob körülmények között is átíródnak (Tánicsics et al. 2012).

Az aromás vegyületekkel szennyezett felszín alatti közeget rendszerint a Betaproteobacteriales rendbe (korábban Béta-proteobaktériumok osztálya), azon belül is a Comamonadaceae és Rhodocyclaceae családba tartozó nemzetségek uralják (Alfreider et al. 2002, Fahy et al. 2006, Alfreider – Vogt 2007, Nestler et al. 2007, Martínez-Lavanchy et al. 2015). Magyarországi kárhelyek részletes mikrobiológiai vizsgálatai során azt találták, hogy ezekben a közösségekben rendszerint nagy diverzitással vannak jelen az I.2.C alcsaládba tartozó C23O gének (Tánicsics et al. 2010, Tánicsics et al. 2012, Tánicsics et al. 2013, Benedek et al. 2016, Tánicsics et al. 2018). Farkas és munkatársai (2015) izoláltak egy Betaproteobacteriales rendbe tartozó baktériumfajt, amit később új fajként, *Zoogloea oleivorans* néven írtak le. Szerepét a toluol mikroaerob körülmények közötti degradációjában, stabil izotópos kísérletek bizonyították (Tánicsics et al. 2018). A baktériumfaj teljes genomjának feltárása megmutatta azt is, hogy oxigénlimitált körülmények között a toluol aromás gyűrűjének kezdeti aktivációjában (hidroxiláció) toluol-dioxigenáz enzim vesz részt, majd a gyűrű hasítását I.2.C típusú C23O enzim katalizálja. Utóbbi feltételezhetően horizontális géntranszfer útján kerülhetett a vizsgált törzs (*Zoogloea oleivorans* Buc^T) genomjába (Tánicsics et al. 2020), ami a szénhidrogén-lebontásban szerepet játszó funkciógének esetében gyakran előforduló jelenség, szerepe a – pl. szennyezés miatt – megváltozott környezethez történő sikeres adaptációban van (Burlage et al. 1989, Van der Meer et al. 1992).

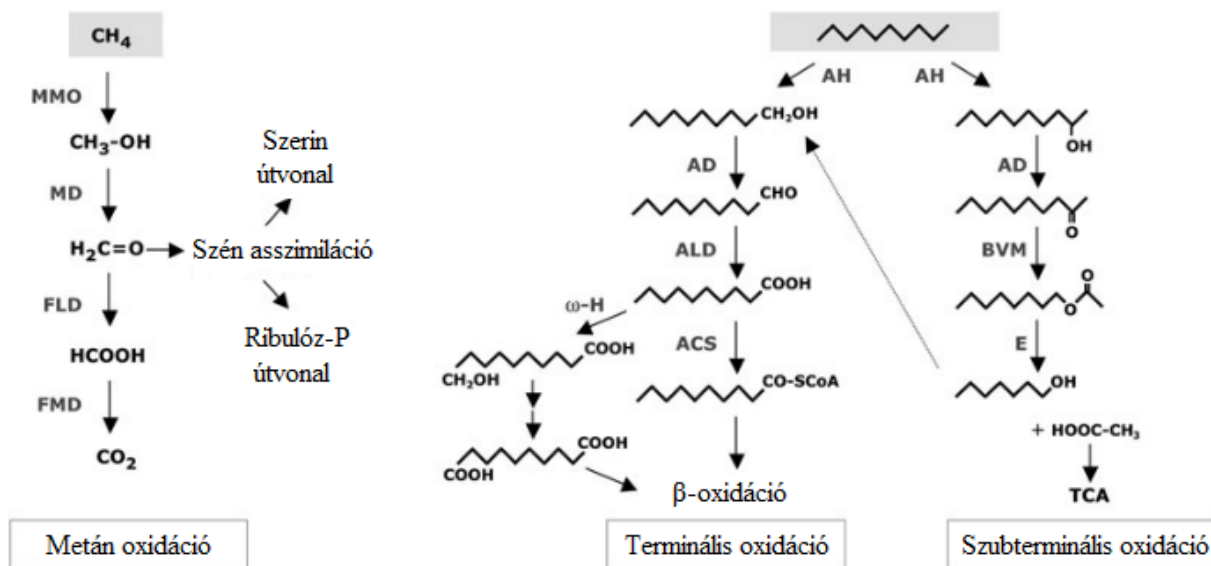
2.6. Egyenes szénláncú alkánok (n-alkánok) mikrobiális lebontásának folyamatai

A különböző alkánok (egyenes és elágazó szénláncú, valamint cikloalkánok) származási helytől függően a nyersolajnak akár 50%-át is kitehetik. Számátalan élőlény (pl. növények, zöld alga, baktériumok, rovarok) termel alkánokat, ami miatt alacsony koncentrációban, de szinte mindig kimutathatóak szárazföldi és vízi ökoszisztémákban egyaránt. Az alkánok apoláris vegyületek, kémiaiilag inerteek, azaz környezetükkel nehezen lépnek kémiai reakcióba (Labinger – Bercaw 2002), ebből kifolyólag lebontásuk adott körülmények között a mikrobáknak is kihívást jelenthetnek. A molekulaszám, vagyis a lánchosszúság növekedésével csökken a vízben való oldhatóságuk (Eastcott et al. 1988), ami nehezíti a felvételt a mikroorganizmusok számára. Ennek ellenére, ahogy az aromás szénhidrogéneket, úgy az alkánokat is számátalan mikroorganizmus képes szén- és energiaforrásként felhasználni (van Beilen et al. 2003, Wentzel et al. 2007). Ezeknek a lipofil szubsztrátoknak a felvétele kétféleképpen történhet: a mikrobiális sejtek olajcseppekhez kötődésével, vagy a mikroorganizmusok által történő felületaktív anyagok termelésével. A sejtek kötődési mechanizmusa még kevésbé feltárt terület, azonban a felületaktív anyagok mikrobák általi termelésére számátalan példát ismerünk. Jellemzően a *Rhodococcus* nemzetség tagjai között találunk olyan fajokat, amelyek felületaktív anyagok termelésével könnyítik meg a szénhidrogénekhez való hozzáférésüket (Perei et al. 2013).

2.6.1. Egyenes szénláncú alkánok (n-alkánok) aerob lebontásának kulcsenzimei

A szénlánc hosszától függően az alkánok különböző módokon bomlanak le (2.5. ábra). A mindössze egy szénatomot tartalmazó **metán oxidációja** metán monooxygenáz enzimek segítségével metanol, formaldehid, majd hangyasav keletkezése folyamán zajlik, ami aztán könnyen átalakulhat széndioxidá vá vagy felhasználásra kerülhet a sejtek bioszintézise során (Lieberman – Rosenzweig 2004). A kettő vagy több szénatomot tartalmazó alkánok esetében az aerob lebontás rendszerint az egyik **terminális** metilcsoport **oxidációjával** kezdődik, melynek során elsődleges alkohol keletkezik, ami aldehiddé, majd zsírsavvá alakul. A zsírsavak nagy része β -oxidáció után bekerül a trikarbonsav-ciklusba, egy részük pedig közvetlenül beépülhet a membránlipidekbe. A zsírsavak β -oxidációja során acetil-CoA keletkezik, ami egy igen gyakori központi intermedier (Watkinson – Morgan 1990, Ashraf et al. 1994, van Hamme et al. 2003, Wentzel et al. 2007). A lebontás történhet **szubterminális oxidációval** is, melynek során az oxygenáz enzim a szénlánc utolsó előtti szénatomjára helyezi a hidroxil csoportot. Így másodlagos alkohol keletkezik, ami később ketonná, majd Bayer-Villiger monooxygenáz segítségével észterré

alakul. Az észter elsőrendű alkohollá alakul, ami tovább oxidálódik a terminális útvonalon. Néhány mikroorganizmus képes lehet mindkét útvonalon történő lebontásra is (Rojo 2009).



2.5. ábra: Egyenes szénláncú alkánok mikrobiális lebontásának aerob útvonalai (Rojo, 2009).

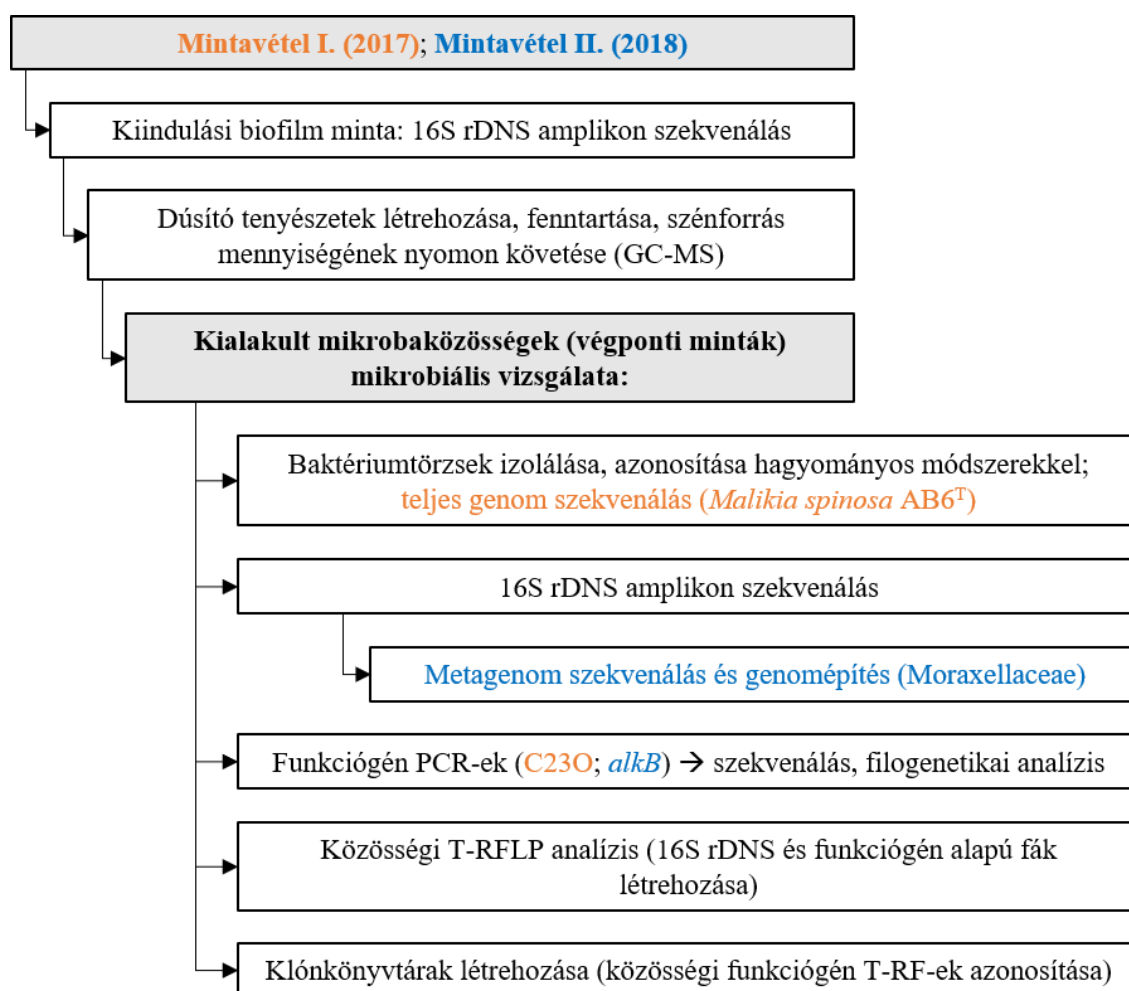
MMO, metán monooxigenáz; MD, metanol dehidrogenáz; FLD, formaldehid dehidrogenáz; FMD, formiát dehidrogenáz. AH, alkán hidroxiláz; AD, alkohol dehidrogenáz; ALD, aldehyd dehidrogenáz; ACS, acil-CoA szintetáz; ω -H, ω -hidroxiláz; BVM, Baeyer–Villiger monooxigenáz; E, észteráz; TCA, trikarbonsav ciklus.

Azok a baktériumtörzsek, amelyek a közepes (C_5 - C_{11}) és hosszú ($>C_{16}$) szénláncú alkánok biodegradációjára képesek, gyakran rendelkeznek **membránkötött nem-hem vastartalmú monooxigenázokkal** (*alkB*). Az egyik legrészletesebben kutatott alkán-degradációs útvonal a *Pseudomonas putida* GPo1 törzsben leírt anyagcsere-folyamat, amelyben az *alkB* gén által kódolt monooxigenáz enzim az alkán vegyületet annak terminális végén hidroxilálja. A monooxigenáz enzim működését két fehérje, a rubredoxin (*alkF*) és a rubredoxin reduktáz (*alkG*) segíti, melyek lehetővé teszik az elektronok áramlását, miközben az alkán alkohollá alakul (van Beilen et al. 2001).

Egyes baktériumok a **citokróm P450** fősorozatba tartozó monooxigenáz enzimekkel rendelkeznek. Ezek az enzimek általánosan elterjedtek, megtalálhatóak prokarióta és eukarióta szervezetekben is, vegyületek széles körét képesek hidroxilálni. A citokróm P450 egyik alcsaládjába tartozó, alkánok bontásában is résztvevő tag a CYP153A1, melyet az *Acinetobacter* sp. EB104 törzsében írtak le először (Maier et al. 2001), azonban hasonló enzimeket találtak a *Mycobacteria* és a *Rhodococcus* nemzetségek, valamint a Proteobaktériumok körében is (van Beilen et al. 2005, 2006, Sekine et al. 2006). Az elektronok áramlásában itt is két fehérje, a ferredoxin és a ferredoxin reduktáz játszanak alapvető szerepet.

3. Anyag és módszer

Annak érdekében, hogy a bevezetésben (1. fejezet) feltett kérdéseinkre választ kapjunk, doktori munkám során két dúsítási kísérletet végeztünk el. Első kísérletünk során aerob és mikroaerob dúsítókat hoztunk létre, melyekhez egyedüli szén- és energiaforrásként benzolt vagy toluolt adtunk. Második dúsítási kísérletünkben szintén aerob és mikroaerob dúsítókat hoztunk létre, azonban egyedüli szén- és energiaforrásként kőolaj/gázolaj keveréket alkalmaztunk. A kísérletek után megvizsgáltuk, hogy az oxigénlimitáció milyen hatással van a baktériumközösségek kialakulására, illetve a szénhidrogének lebontásában kulcsszerepet játszó funkciógének diverzitására. A dúsítási kísérletekhez kapcsolódó, anyag és módszer fejezetben tárgyalt eljárások egymásra épülését a 3.1. ábra mutatja be vázlatosan.



3.1. ábra: A dúsítási kísérletekhez kapcsolódó eljárások egymásra épülésének vázlatos ábrája (feketével szedett szövegek: mindkét kísérletben elvégzett módszer; narancssárgával szedett szövegek: csak a benzollal és toluollal kiegészített dúsító tenyészetek esetében elvégzett módszer; kézzel szedett szövegek: csak a kőolaj/gázolaj keverékkel kiegészített dúsítók esetében elvégzett módszer)

3.1. A vizsgálatok alapjául szolgáló kárhely leírása, mintavételezés menete

A kísérletek során vizsgált biofilm minták (3.2. ábra) egy kőolajszármazékokkal szennyezett, közép-magyarországi kárhelyről származtak. 2007-ben, egy kőolajvezeték törése következtében körülbelül 27 m³ gázolaj – főként alifás és monoaromás vegyületek – szivárgott a környező felszín alatti közegekbe, elszennyezve mintegy 200 tonna talajt, valamint az alatta fekvő víztani közeget is. A 3.1. táblázatban a kutatásainkat megelőző évekből származó talajvíz fizikai-kémiai és szennyezettségi paramétereit látjuk.

3.1. táblázat: A BUT18-as mintavételi kútból kinyert talajvíz fizikai-kémiai és szennyezettségi paramétereit.

Talajvíz paraméterek	2011 október	2014 április	2016 március
<i>Általános vízkémiai adatok</i>			
pH	7,8	7,5	7,26
oldott oxigén (mg/L)	2,9	1,9	nem vizsgált
nitrát (mg/L)	3	3	179
szulfát (mg/L)	66	174	190
Mn ₂₊ (mg/L)	nem vizsgált	44,3	2,3
Fe ₂₊ (mg/L)	<0,05	0,31	0,19
redox potenciál (mV)	-49,4	-19	nem vizsgált
<i>Szennyezettségi adatok</i>			
benzol (µg/L)	7050	722	0,3
toluol (µg/L)	28500	90	<0,5
etilbenzol (µg/L)	981	4	<0,5
xilolok (µg/L)	10400	505	596
alkilbenzolok	2600	224	278
TAPH (C ₅ -C ₄₀) (µg/L)	10000	1750	791

Mivel a régióban rekreációs célokat is szolgáló, felhagyott bányatavak találhatóak, elengedhetetlen volt a gyors kármentesítési beavatkozás. A területet az úgynevezett „pump and treat” technológiával kezdték el kezelni, amely az egyik leggyakrabban alkalmazott fizikai kármentesítési eljárás. Lényege, hogy a szennyezett talajvizet kitermelik, a területen megtisztítják azt, majd a tisztított talajvizet visszajuttatják az eredeti helyére, esetenként felszíni vizekbe vagy szennyvíztisztító telepekre juttatják. Gyakori jelenség, hogy a rendszert kiszolgáló csővezetékekben és szivattyúkban a szénforrásban gazdag közeg hatására intenzív biofilm képződés zajlik, amely időről-időre megakadályozza a víz megfelelő áramlását (Suthersan 1999).



3.2. ábra: A vizsgálatok alapjául szolgáló biofilm minta (saját felvétel)

Kevés kutatás született arról, hogy az ilyen módon keletkező biofilmnek a nyilvánvaló negatív hatásai mellett lehet-e pozitív szerepe a kőolajszármazékokkal szennyezett talajvizek tisztításában. Annak érdekében, hogy erre a kérdésre fényt derítsenek, Benedek és munkatársai (2016) részletes filogenetikai vizsgálatoknak vetették alá az említett kárhelyen található, szennyezett talajvizet kitermelő kút rozsdamentes acél felületén képződött biofilmet. A metagenom elemzés során több, mint 600 baktériumnemzetséget és 40 osztályt sikerült kimutatniuk, melyek túlnyomóan a Gamma-proteobaktériumokhoz, azon belül is a Betaproteobacteriales rendbe tartoztak, nagy részük ismert szénhidrogén bontó baktérium. Az aromás vegyületek lebontásában szerepet játszó kulcsenzimeket kódoló gének kimutatásával megvizsgálták a baktériumközösség funkcionális diverzitását is és azt találták, hogy az I.2.A és I.2.B alcsalád mellett rendkívül nagy diverzitással voltak jelen az I.2.C alcsaládba tartozó C23O enzimek. Egy későbbi kísérlet során (Benedek et al. 2018) aerob és mikroaerob dúsító tenyészeteket alkalmaztak az említett kárhelyről származó biofilm vizsgálatához, melyben az egyedüli szén- és energiaforrást BTEX vegyületek keveréke jelentette. Az eredmények azt mutatták, hogy az oldott oxigén mennyisége nagyon erős szelekciós hatással volt a mikrobaközösségek kialakulására. Az aerob dúsítóknál a szigorúan aerob *Malikia* nemzetség, míg a mikroaerob dúsítóknál fakultatív anaerob *Acidovorax* és *Pseudomonas* nemzetségek lettek a legdominánsabb közösségalkotók. Az elsősorban aromás szénhidrogének mikroaerob lebontásához köthető, I.2.C típusba tartozó C23O gének mind a kétféle dúsítóban jelen voltak, azonban az oxigén mennyiségétől függően teljesen más genotípusokhoz tartoztak. Mivel a dúsítókból nem sikerült izolálni a domináns nemzetségekhez tartozó törzseket, a leggyakrabban előforduló I.2.C típusú C23O gének sem köthetőek egyértelműen hozzájuk.

Mindezek fényében a dolgozat elején kitűzött kérdések megválaszolásához kézenfekvőnek tűnt – majd megfelelőnek bizonyult – az ismertetett kárhely további vizsgálata. Első dúsítási kísérletünkhöz 2017-ben, második dúsítási kísérletünkhöz 2018-ban vettük a kutatások alapjául

szolgáló biofilm mintát. A mintavételeket megelőzően a kút mindkét esetben egy hónapig érintetlen maradt, ami lehetővé tette a megfelelő biofilmképződést. Az eredetileg 5 méter mélyen fekvő, szennyezett vizet kitermelő kútból a szivattyú kiemelése után, tanszékünk egyik munkatársa annak rozsdamentes acél felületéről steril eszközökkel körülbelül 10-15 g biofilmet gyűjtött össze, majd a mintát 100 mL-es barna folyadéküvegbe helyezte. A laborban történő feldolgozásig a mintákat hűtőládában, 4 °C-on, sötétben tároltuk, majd beérkezést követően megkezdődhetett azok felhasználása.

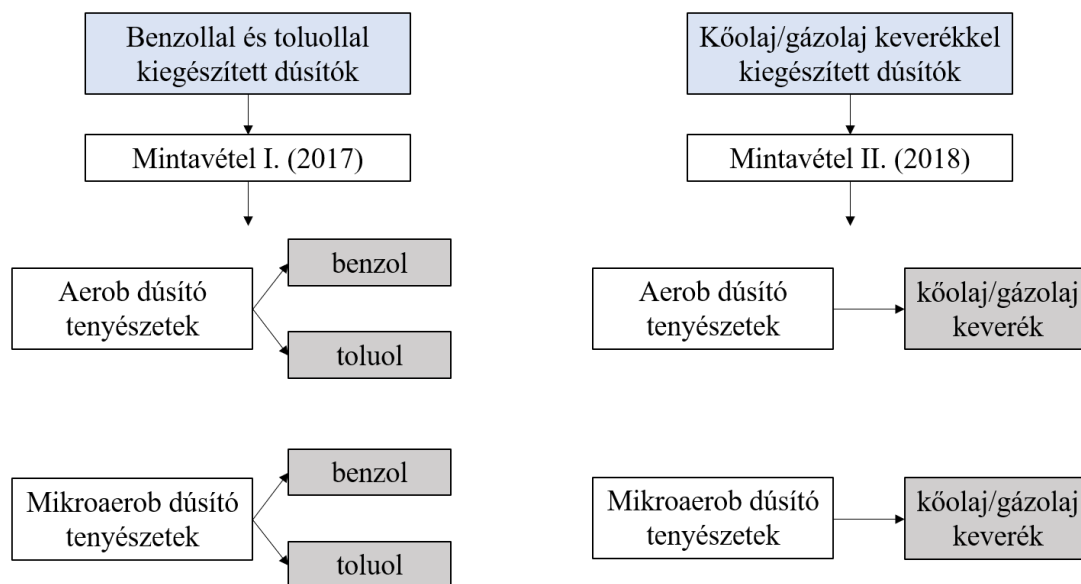
3.2. Tenyésztési előkísérlet körülményei

A dolgozatomban tárgyalt dúsítási kísérleteket megelőzően különféle táptalajok alkalmazására tettünk próbálkozást annak érdekében, hogy a lehető legtöbb fajt tudjuk majd a dúsítókból tenyésztésbe vonni. Az előkísérlet során vizsgált talajvízminták egy korábban részletesen feltárt (Táncsics et al. 2012, Táncsics et al. 2013, Táncsics et al. 2018), délnyugat magyarországi, kőolajszármazékokkal szennyezett kárhelyről származtak. A tenyésztéshez agar-aggarral vagy gellán gumival szilárdított táplemezeket használtunk, plusz szénforrásként acetátot vagy almasavat adtunk a táptalajokhoz, azonban tapasztalatunk szerint ezek nem növelték meg a lemezeken kifejlődött telepek diverzitását. Legmegfelelőbbnek a hagyományos, agar-aggarral szilárdított R2A táplemezek (0,5 g élesztő kivonat; 0,5 g proteózpepton; 0,5 g kazein hidrolizátum; 0,5 g glükóz; 0,5 g keményítő; 0,3 g K_2HPO_4 ; 0,05 g $MgSO_4 \times 7H_2O$; 0,3 g nátrium-piruvát; 20 g agar; 1 liter desztillált víz; pH 7,0) bizonyultak, így később ezt a táptalajt használtuk a dúsítókból történő tenyésztéshez. Az előkísérlet pontos részleteit dolgozatomban nem tárgyalom, azonban a vizsgálatok egyik fontos eredménye volt, hogy sikerült egy, a tudomány számára addig ismeretlen, Alfa-Proteobaktériumokhoz, azon belül pedig a *Sphingobium* nemzetséghez tartozó törzset azonosítani, melyet a továbbiakban *Sphingobium aquiterrae* néven írtunk le (Révész et al. 2018). A leíráshoz szükséges vizsgálatok menetét a 3.15. fejezetben, a törzs részletes bemutatását pedig a 4.3. fejezetben ismertetem.

3.3. Dúsítási kísérletek körülményei

Annak érdekében, hogy vizsgálni tudjuk az oxigénlimitáció hatását a szénhidrogének lebontásában résztvevő baktériumközösségek összetételére és metabolikus képességeikre, két dúsítási kísérletet végeztünk el. Mind a kettőben aerob (7-8 mg/L oldott oxigén koncentráció) és mikroaerob ($\leq 0,5$ mg/L oldott oxigén koncentráció) dúsítókat hoztunk létre. Az egyik kísérletben **aromás szénhidrogének** (toluol vagy benzol), a másik kísérletben pedig **alifás szénhidrogének**

(kőolaj/gázolaj keverék) szolgáltak egyedüli szén- és energiaforrásként a baktériumok számára (3.3. ábra).



3.3. ábra: A dúsítási kísérletek sematikus ábrája (szürke háttérű szövegdobozokban: az alkalmazott szénforrás típusa)

Minden esetben három-három párhuzamos mintával dolgoztunk. Tápoldatként a Fahy és munkatársai (2006) által kifejlesztett mesterséges talajvíz médiumot alkalmaztuk, melynek összetétele a következő alkotókból állt:

- 100 mL A oldat (5 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 1000 mL desztillált víz), az oldatot 0,2 μm -es pórusátmérőjű fecskendőszűrőn keresztül sterilizáltuk;
- 100 mL B oldat (11,1 g Na_2HPO_4 ; 2,5 g KH_2PO_4 ; 10 g NH_4NO_3 ; 1000 mL desztillált víz), az oldatot autoklávban sterilizáltuk;
- 1 mL C oldat (10 g $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,64 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 3\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g ZnCl_2 , 0,015 g H_3BO_3 ; 0,175 g $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 0,15 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$; 0,01 g $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 1000 mL desztillált víz) az oldatot 0,2 μm -es pórusátmérőjű fecskendőszűrőn keresztül sterilizáltuk.

Az így elkészült oldatokat steril körülmények között összemértük és 1 mg/L B₁ vitaminnal, 15 μL biotinnal és 20 μL B₁₂ vitaminnal (Thermo Fisher Scientific Inc.) egészítettük ki. Az elkészített tápoldatokból 50-50 mL-t osztottunk szét 100 mL-es szérumüvegekbe, melyeket butilgumidugóval és alumínium zárókupakkal légmentesen zártunk le. A következő lépésben a mikroaerob környezetet kellett megteremtenünk az egyes dúsítókbán. Ehhez az oxigént N₂/CO₂ 80:20 térfogat arányú gázkeverékkel hajtottuk ki a lezárt üvegekből. A művelet során a ki- és bevezető nyílást egy-egy steril injekciós tű képezte, melyeket a gumidugón keresztül vezettünk át.

A befelé áramló gázkeveréket sterilen, 0,2 μm -es pórusátmérőjű fecskendőszűrőn keresztül juttattuk az üvegekbe. A kívánt oldott oxigén koncentrációt ezután sterilre szűrt levegő befecskendezésével állítottuk be, melyet fecskendő segítségével, 0,2 μm -es pórusátmérőjű fecskendőszűrőn keresztül, a szeptumon átvezetett injekcióstű segítségével juttattunk az üvegekbe. Az oldott oxigén koncentrációjának változását a kísérletek során egy Fibox 3 trace v3 (PreSens, Németország) típusú száloptikás oxigén szenzorral, noninvazív módon követtük nyomon az üvegekben. Az ehhez használt oxigén érzékelő SP-PSt3-NAU-D5-YOP szpot (PreSens, Németország) a 3.4. ábrán látható. Annak érdekében, hogy fenntartsuk a mikroaerob és aerob körülményeket, a biológiai aktivitás során elfogyott oxigén mennyiségét folyamatosan pótoltuk a dúsítókból.



3.4. ábra: Az oldott oxigén koncentrációjának nyomon követésére alkalmazott érzékelő szpot (saját felvétel)

A szénforrás koncentrációja a benzol (CAS 71-43-2, tisztaság >99%, Sigma-Aldrich Ltd.) és toluol (CAS 108-88-3, tisztaság >99%, Sigma-Aldrich Ltd.) esetében 1 mM, a kőolaj/gázolaj keverék (adalékolatlan dízel üzemanyag és nyersolaj keverék 3:2 arányú keveréke; Magyar Olaj- és Gázipari Nyrt.) esetében 20 ppm volt a dúsítókból. A kiindulási mintákhoz az előző fejezetben (3.1. fejezet) ismertetett kárhelyről származó biofilm szolgált inokulumként. 1 gramm (nedves tömeg) biofilmet adtunk 99 mL fiziológiás sóoldathoz, majd ebből az oldatból 5 mL-t használtunk a kiindulási dúsítók beoltásához. Az inkubáció egy héten keresztül, rázótermosztátban történt (28 °C-on, 150 rpm-en), majd minden dúsítóból 5 mL-t újonnan előkészített, friss tápoldatokba oltottunk. A tenyészeteket ilyen módon, öt héten keresztül oltottuk át.

3.4. Baktériumtörzsek izolálása és azonosítása

A dúsító tenyészetek végponti mintáiból hagyományos módszerekkel baktériumtörzseket izoláltunk. Ehhez a mintákból fiziológias sóoldattal hígítási sort készítettünk, majd ezeket agarral szilárdított R2A táplémezre szélesztettük. Egy hetes, 28 °C fokon történő inkubációt követően a különböző morfológiájú telepeket tisztító szélesztéssel új R2A táplémezeken tartottuk fenn. A törzsek fajmeghatározása és a funkciógének azonosítása a 3.5-3.7. és 3.10. fejezetben leírtak szerint zajlott.

3.5. DNS izolálás

A laboratóriumba beérkezett biofilm mintákból a NucleoSpin Soil Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co KG) segítségével vontuk ki a DNS-t a gyártó által megadott protokoll alapján. Annak érdekében, hogy a feldúsított mikrobaközösségekről is képet kapjunk, a dúsító tenyészetekből először DNS-t kellett izolálnunk. Erre minden esetben az egyhetes inkubációt követően került sor. A biomasszát a dúsítókból centrifugálással nyertük ki. A centrifugálás 10 percen keresztül, 2360 g-n, 4 °C fokon történt (Rotanta 460 R, Hettich). A DNS izolálását a dúsítókból a DNeasy UltraClean Microbial Kit-tel (Qiagen) végeztük a megadott protokoll szerint. A tiszta tenyészetekből az UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (MoBio, USA) segítségével vontuk ki a DNS-t, a gyártó előírása szerint.

3.6. 16S rDNS és funkciógén PCR-ek

A dúsító tenyészetek baktériumközösségeinek, illetve a tiszta tenyészetek meghatározásához és a dúsítóban történő változások nyomon követéséhez az előzőleg izolált DNS mintákból PCR segítségével felszorzottuk a mikroszervezetek 16S rDNS és funkciógén (C23O vagy *alkB*) szekvenciáit. A 16S rDNS szakasz amplifikálásához a 27f 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' (Lane 1991) és 1492r 5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3' (Polz – Cavanaugh 1998) primereket használtuk.

A 16S rDNS PCR során alkalmazott hőprofil:

▪ 98 °C	5 perc	Kezdeti denaturáció	
▪ 94 °C	30 mp	Denaturáció	} 32 ciklus
▪ 52 °C	30 mp	Anelláció	
▪ 72 °C	1 perc	Elongáció	
▪ 72 °C	10 perc	Extenzió	
▪ 4 °C	∞	Hűtés	

Az I.2.C alszaládba tartozó katekol 2,3-dioxigenáz funkciógének detektálásához és vizsgálatához a Tánicsics és munkatársai (2013) által kifejlesztett XYLE3F 5'-TGY TGG GAY GAR TGG GAY AA-3' és XYLE3R 5'-TCA SGT RTA SAC ITC SGT RAA-3' primereket használtunk.

Az I.2.C típusú C23O PCR során alkalmazott hőprofil:

▪ 95 °C	3 perc	Kezdeti denaturáció	
▪ 94 °C	30 mp	Denaturáció	} 40 ciklus
▪ 50 °C	30 mp	Anelláció	
▪ 72 °C	1 perc	Elongáció	
▪ 72 °C	10 perc	Extenzió	
▪ 4 °C	∞	Hűtés	

Az *alkB* funkciógének esetében az *alkB* 1f_deg 5'-AAY ACI GCI CAY GAR CTI GGI CAY AA-3 és *alkB* 1r_deg 5'-GCR TGR TGR TCI GAR TGI CGY TG-3' primereket alkalmaztuk (Kloos et al. 2006, Pérez-de-Mora et al. 2011).

Az *alkB* PCR során alkalmazott hőprofil:

▪ 95 °C	3 perc	Kezdeti denaturáció	
▪ 94 °C	30 mp	Denaturáció	} 32 ciklus
▪ 58 °C	30 mp	Anelláció	
▪ 72 °C	1 perc	Elongáció	
▪ 72 °C	10 perc	Extenzió	
▪ 4 °C	∞	Hűtés	

A PCR-ek egy mintára (50 µL végtérfohat) számítva a következő összetevőket tartalmazták: 5µL 10x Dream Taq puffer (Thermo Fisher Scientific Inc.); 0,2 mM mind a négy dNTP-ből (Thermo Fisher Scientific Inc.), 0,3 µL a forward és a reverse primerből (Thermo Fisher Scientific Inc.), 1,25 U Taq polimeráz (Thermo Fisher Scientific Inc.), 2 µL templát DNS, majd az elegyet 50 µL végtérfohatra egészítettünk ki MQ vízzel. A PCR a fent megadott hőprofilok

alapján, ProFlex PCR System (Life Technologies™) készülékben zajlott. A PCR folyamat sikerességét a következő, 3.7. fejezetben ismertetett módon, agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

3.7. Agaróz gélelektroforézis

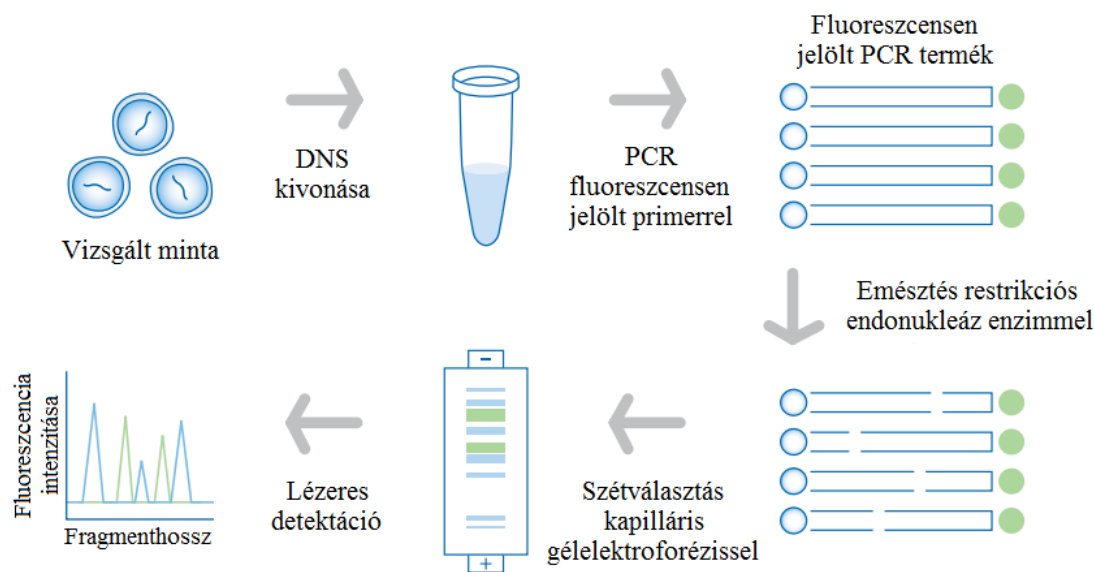
Az DNS izolálás és a PCR sikerességét agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük. A módszer alkalmas a különböző makromolekulák méret szerinti elválasztására és detektálására. Az elválasztásra szolgáló gél elkészítéséhez 100 mL 1xTBE puffert alkalmaztunk (10,8 g Tris; 10,5 g bórsav; 0,93 g EDTA-Na; 1000 cm³-re kiegészítve desztillált vízzel), amibe a hőmérséklet megemelésével 1 g agarózt oldottunk bele. Az oldathoz, annak kézmelegre hűtése után hozzáadtunk 5 µL 1%-os etidium-bromidot, mely beépülve a DNS szálba később UV fény alatt láthatóvá vált. Ezután az egészet fésűsorokkal ellátott futtatókádba öntöttük. A gél megszilárdulását követően a fésűsorokat eltávolítottuk, és az így kialakult zsebekbe 3 µL töltőpufferrel (18,6 g EDTA; 20 g sarcosyl; 600 mL glicerin; 0,5 g brómfenolkék; 1000 mL desztillált víz) összekeverve betöltöttük 5 µL-t a vizsgálni kívánt termékből (pl.: DNS, PCR termék). Minden mintasor mellé 4 µL DNS marker (ThermoScientific™ Gene Ruler Mix DNA Ladder, koncentráció: 0,5 µg/µL) került standardként. A mintákat 110 V feszültségen 30 percig futtattuk, majd UV fény alatt ellenőriztük.

3.8. T-RFLP vizsgálat

A mikrobaközösség összetételének, valamint a funkciógének diverzitásának vizsgálatára és a dúsítókból történő változások nyomon követésére a T-RFLP (terminális restrikciós fragmenthossz polimorfizmus) módszerét alkalmaztuk. A T-RFLP első lépése, hogy a vizsgálandó génszakaszt PCR segítségével megsokszorozzuk. Az amplifikáció során erre a reakcióra specifikus, fluoreszcensen jelölt (VIC jelölés, Life Technologies™, USA) forward primereket használtunk. A PCR-ekhez használt vegyszerek és a hőprofil megegyeztek a 3.5. pontban leírtakkal.

A PCR terméket restrikciós endonukleáz enzimmel emésztettük, mely képes felismerni a DNS bizonyos nukleotid szekvenciáit és adott ponton hasítani azt. A hasítási helyek jellemzőek lehetnek egyes nemzetségekre, esetleg fajokra. Az 5'-terminális végükön jelölt, majd emésztett PCR termékek kapilláris gélelektroforézissel megfuttatva, fluoreszcens detektor alkalmazása mellett láthatóvá válnak. Ennek segítségével olyan elektroferogramokat kapunk, melyen az emésztett fragmentek hosszúságát a csúcsok, mennyiségüket pedig az alattuk lévő terület jelzi. Ez

alkalmas arra, hogy összehasonlítva a már ismert hasítási hellyel rendelkező taxonokkal, képet kapjunk a vizsgált közösség diverzitásáról, faji összetételéről (3.5. ábra).



3.5. ábra: A T-RFLP folyamatának sematikus ábrája (http4 alapján)

3.8.1. A fluoreszcensen jelölt 16S rDNS és funkciógén PCR termékek emésztése és tisztítása

A PCR termékek emésztéséhez a következő restrikciós enzimeket használtunk: a 16S rDNS szakaszok vizsgálata *RsaI* (GT↓AC) enzimmel (Thermo Fisher Scientific Inc.), az I.2.C-típusú *C23O* génszakaszok vizsgálata *AluI* (AG↓CT) enzimmel (Thermo Fisher Scientific Inc.), az *alkB* génszakaszok vizsgálata *HPyCH4V* (TG↓CA) enzimmel (New England BioLabs Ltd.) történt. Az elegy összetétele: 2 µL restrikciós enzim puffer; 3 U restrikciós enzim; 10 µL templát; melyet 20 µL végtérfogatra egészítettünk ki MQ vízzel. A reakció 37 °C-on, 3 órán keresztül, ProFlex PCR System (Life Technologies™) készülékben zajlott.

Az emésztés után a PCR során, a termékben megmaradt puffert, MgCl₂-ot, *Taq* polimeráz enzimet és a be nem épült dNTP maradványokat etanolos DNS precipitációval tisztítottuk meg. Ehhez a terméket 3 µL 3M-os Na-acetát oldattal, 14,5 µL MQ vízzel és 62,5 µL 95%-os etanollal alaposan összekevertük, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az oldatban lévő alkohol hatására a DNS kicsapódik, míg a nátrium-acetát megakadályozza, hogy a megmaradt dNTP kiváljon az elegyből. Az inkubáció után a mintákat 4 °C-on 20 percig, 3300 g-n centrifugáltuk, majd a felülúszó leöntését követően 180 µL 70%-os etanolt pipettáztunk rájuk. 15 perces, 3300 g-n történő centrifugálás után a felülúszót ismét leöntöttük. Az emésztett PCR termékek hosszának

meghatározásához a tisztítása után 30 μL steril desztillált vízben szuszpendáltuk a pelletet. A tisztított és emésztett DNS-ből 0,5-1,5 μL -t adtunk 17 μL Hi-Di formamid (Promega, USA) és 0,4 μL standard meghatározott hosszúságú DNS fragment (a vizsgált génszakasz hosszától függően Genescan LIZ 500 vagy LIZ 1200 Applied Biosystems, USA) keverékéhez, végül az elegyet 5 percig 95 °C-on denaturáltuk.

3.8.2. A közösségi T-RFLP analízise

A fluoreszcensen (VIC) jelölt primerekkel amplifikált, restrikciós enzimmel megemésztett PCR termékeink készen álltak a kapilláris gélelektroforézissel történő szétválasztásra. A vizsgálat ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) segítségével történt. Az eredményként kapott elektroferogramokat GeneMapper 4.0 szoftver (Applied Biosystem) segítségével értékeltük ki. Azokat a terminális restrikciós fragment (T-RF) csúcsoakat, amelyek relatív abundanciája 1% alatt volt, vagy 50 bázispárnál kisebbek voltak, kizártuk a további elemzésből. A kutatások során mindig három-három párhuzamos mintával dolgoztunk, így a párhuzamos minták egymáshoz illesztését 0,5 bp konfidencia intervallummal a T-Align online program (Smith et al. 2005) segítségével végeztük, majd ugyanezzel a programmal megkaptuk a T-RF-ek relatív abundanciáját.

A 16S rDNS és funkciógén alapú fák dendrogramjait a Paleontological Statistics szoftver segítségével készítettük (Hammer et al. 2001) Bray-Curtis, illetve Jaccard hasonlósági indexeket alkalmazva.

3.9. C23O és *alkB* funkciógén klónkönyvtárak létrehozása és feldolgozása

Ahhoz, hogy a T-RFLP elektroferogramon megjelenő T-RF-eket azonosítani tudjuk, vagyis a közösségi PCR termékünket szétválasszuk unikális egységekre, klónkönyvtárak létrehozására volt szükség. Az eljáráshoz a felsokszorozni kívánt DNS szakaszt (inzert), esetünkben az I.2.C típusú C23O és az *alkB* génszakaszokat a gazdasejtbe, vagyis a vektorba építettük.

A klónkönyvtár létrehozásához először a közösségi DNS-ből PCR segítségével amplifikáltuk az I.2.C típusú C23O és az *alkB* funkciógén szakaszokat (3.6. fejezet). Az klónozást a TOPO® TA Cloning® Kittel (Invitrogen, USA) végeztük. A PCR elkészítése után a következő lépés a ligáló reakció összemérése volt. A ligálás két nukleinsav fragmentum végeinek összekapcsolását jelenti, melyek között foszfodiészter-kötés keletkezik. A reakciót ligáz enzim

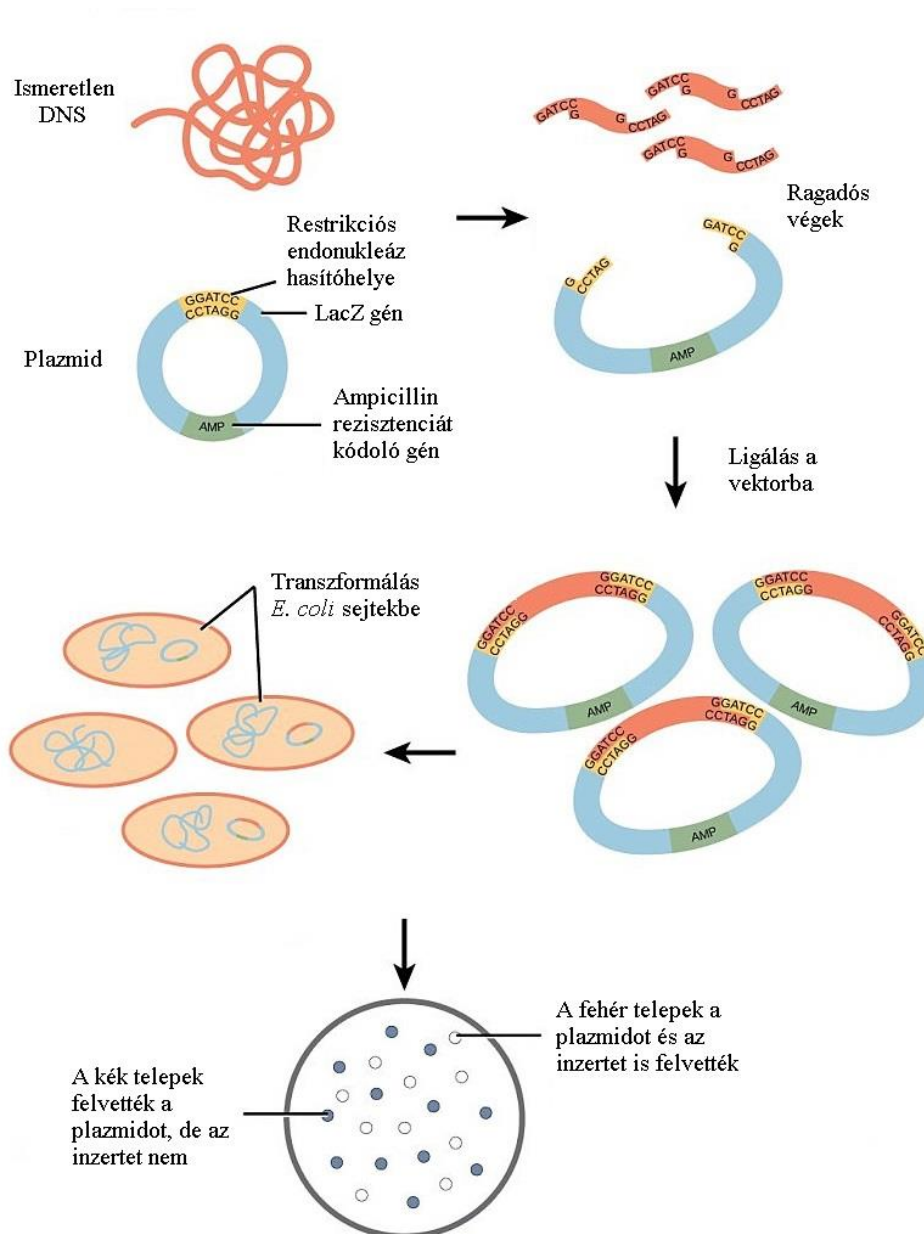
katalizálja. A reakció összetétele a következő volt: 1 µL 10x ligáló puffer; 2 µL pCR®2.1-TOPO® klónozó vektor; 3 µL PCR termék; 1 µL T4 DNS ligáz enzim; 3 µL MQ víz.

A ligálási reakciómixből 3 µL-t adtunk 50 µL kompetens TOP10 *Escherichia coli* sejthez, majd az elegyet 20 percig jégen, utána 1 percig 42 °C-on, végül 3 percig ismét jégen inkubáltuk. A hőmérséklet szélsőséges váltakoztatása a plazmid vektorba való beépülését segíti elő. A sejteknek ezután regenerálódniuk kell, melyhez SOC médiumot használtunk. Ehhez 0,5 µL-t mértünk a transzformálási reakciómixbe, majd 1 órán keresztül, 37 °C-on, 180 rpm-en rázótermosztátban inkubáltuk azt. A SOC médium összetétele: 20 g tripton; 5 g élesztő-kivonat; 0,5 g NaCl; 2,5 mL (1M) KCl; 1000 mL-re kiegészítve desztillált vízzel. A sejteket ezután IPTG-vel, X-Gal-lal és ampicillinnel kezelt LB táplemezekre szélesztettük, majd egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk.

Az LB táplemez és az alkalmazott vegyületek összetevői:

- IPTG: 100mM, 100 µL/Petri-csésze, izopropil-tio-galaktozid;
- X-Gal: 20 µg/mL; 20 µL/Petri-csésze 5-bróm-4-klór-3-indolin-β-D-galaktozid;
- ampicillines LB táplemez: 100 µg/mL ampicillin, 1000 mL vízben: 5 g élesztő, 10 g tripton, 9 g NaCl, 20 g agar (pH 7,0).

Az egy éjszakai inkubációt követően láthatóvá váltak a kék-fehér telepek. A fehér telepeket alkotják azok a sejtek, amelyekbe sikeresen beépültek az inzertet tartalmazó vektorok. Ezeket a pozitív, fehér telepeket steril fogpiszkálóval egyenként átoltottuk egy új, ampicillines LB táplemezre, majd ezt is egy napig 37 °C-on inkubáltuk. Annak érdekében, hogy minimum 48 darab klónszekvenciával dolgozhassunk, az újonnan kinőtt, unikális egységeket alkotó telepekből minden esetben 60-60 darabot szedtünk le steril fogpiszkálóval, majd mindegyiket 30 µL MQ vizet tartalmazó Eppendorf csövekben szuszpendáltuk. Ezt követően 5 percig, 98 °C-on inkubáltuk a sejteket, majd 5 percig 3300 g-n centrifugáltuk. Az így nyert felülúszó tartalmazta az inzertet hordozó plazmid DNS-t (3.5. ábra).



3.6. ábra: A klónkönyvtár létrehozásának lépései (http5 alapján)

3.9.1. A klónszekvenciák amplifikálása és a PCR termékek tisztítása

A sikeres klónozást követően a beépült inzertek amplifikálása következett minden egyes mintában. Ehhez M13f 5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3' és M13r 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3' primereket használtunk, melyek az inzertet közrefogó vektorszekvenciákhoz illeszkednek. A PCR menete és a hőprofil megegyezett a 3.6. fejezetben leírtakkal, az eredményt agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük (3.6. fejezet).

A következő lépésben az M13 PCR terméket megtisztítottuk a továbbiakban szükségtelen alkotóktól (pl.: primer dimerek, maradék dNTP). Az eljáráshoz a NucleoSpin Extract II. kitet

(Macherey-Nagel, Németország) használtuk a gyártó által megadott protokoll szerint. A tisztított terméket agaróz gélelektroforézissel ismét ellenőriztük a 3.7. fejezetben leírtak szerint.

3.9.2. A közösségi T-RFLP csúcsok azonosítása

A T-RFLP elektroferogramok csúcsainak azonosításához a klónkönyvtárakban szereplő azonos szekvenciákat csoportokba rendeztük és a csoportok egy-egy tagját T-RFLP analízisnek vetettük alá. A klónok restriktív endonukleáz enzimmel történő emésztése után a kapott csúcsokat összevetettük a közösségi T-RFLP csúcsaival.

3.10. Szekvenáló reakció

A szekvenáló reakcióelegy összetétele egy mintára számítva: 1 μ L BigDye, 1,5 μ L BigDye Buffer, 0,5 μ L forward primer; 1-7 μ L templát DNS, MQ víz 10 μ L végtérfogatra kiegészítve. A reakció hőprofilja a következő: először 10 másodpercen keresztül, 94 °C-on denaturáljuk a DNS mintát, utána 50 °C-ra hűtve 5 másodperc alatt a primer a templátokhoz hibridizál, végül 60 °C-on, 4 perc alatt végbemegy a DNS szál szintézise. A három szakaszból álló ciklus 28-szor ismétlődik, majd a gép 4 °C-ra hűti a mintákat.

A szekvenáló reakció termékét a további feldolgozáshoz etanol-precipitálással tisztítottuk meg a 3.8.1. fejezetben leírtak szerint. A szekvenálás, vagyis a különböző hosszúságú DNS fragmentek szétválasztása poliakrilamid gélen, ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) géppel történt.

3.10.1. A szekvenálás eredményének elemzése, filogenetikai analízis

A szekvenálás eredményeként kapott elektroferogramokat MEGA 7.0 szoftver (Tamura et al. 2007) segítségével értékeltük ki, majd a BLAST keresőprogram használatával eredményeinket összevetettük a GenBank adatbázisban megtalálható 16S rDNS, C23O és *alkB* szekvenciákkal. A szekvenálás során leolvasott kb. 1500 bázispárnyi 16S rDNS szakasz alapján a prokarióta mikrobák nagy biztonsággal azonosíthatók, akár faji szinten is, ennek érdekében összevetettük azokat az EzTaxon (<https://www.ezbiocloud.net/>) adatbázisban található 16S rDNS gén bázissorrendjével is.

A filogenetikai fák a MEGA 7.0 szoftverrel készültek, melyekhez távolság alapú „neighbor-joining” (Saitou – Nei 1987), vagy „maximum-likelihood” (Felsenstein 1981)

algoritmust alkalmaztunk. A távolságértékek pontosságát 1000 ismétlésen alapuló bootstrap analízissel vizsgáltuk.

3.11. Illumina 16S rDNS amplikon szekvenálás

A 16S rDNS amplikon szekvenálást elvégeztük a kiindulási biofilm mintákon, valamint az ötödik heti, végponti minták párhuzamosainak egy-egy reprezentatív tagjából. A V3 és V4 régiók amplifikálása a Bact 341F_Overhang 5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG-3' és Bact 785R_Overhang 5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C-3' primerekkel (Klindworth et al. 2013) történt. A PCR-hez KAPA HiFi HotStart Ready Mix-et (KAPA Biosystems) használtunk az Illumina által megadott útmutató szerint. A paired-end fragmentek szekvenálása a Seqomics Kft. által, Illumina MiSeq platformon, MiSeq Reagent Kit v3 (600 ciklus) segítségével történt.

Az elsődleges adatelemzés (base-calling) a Bbcl2fastq^ szoftver segítségével történt (v2.17.1.14, Illumina). A kapott szekvenciaadatok további elemzése (minőségi ellenőrzés és trimmelés) a CLC Genomics Workbench Tool 9.5.1-es verziójával történt (minimum szekvenciahossz 50 nukleotid). A filogenetikai adatelemzés MEGAN6 szoftver (Huson et al. 2007) vagy MOTHUR szoftver (v1.41.1, Schloss et al. 2009) segítségével történt. A MOTHUR szoftverrel történő adatelemzés során a MiSeq Standard Operation Procedure (SOP) lépéseit követtük (http://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP) (Kozich et al. 2013). A szekvenciák illesztése a SILVA 132 SSURef NR99 adatbázis segítségével történt (Quast et al. 2013). A kiméra szekvenciák detektálása a "uchime" algoritmussal történt (Edgar et al. 2011), majd a "split.abund" paranccsal távolítottuk el az egy példányban jelenlévő szekvenciákat (Kunin et al. 2010). A szekvenciák taxonómiai azonosítását a SILVA adatbázis segítségével végeztük. A szekvenciák OTU-kba (Operational Taxonomic Unit) rendezése 97%-os szekvencia hasonlósági érték alapján történt (Tindall et al. 2010).

3.12. Teljes genom szekvenálás és elemzés

Teljes genom szekvenálást végeztünk az aromás szénhidrogén-lebontást vizsgáló kísérlet során, az aerob benzol-lebontó dúsítóból izolált *Malikia spinosa* AB6-os törzsön (az eredmények ismertetése a 4.1.4. fejezetben található). A teljes bakteriális genom szekvenálás első lépésében a bakteriális DNS-t felhasználva (3.5. fejezet) mate-paired könyvtárat hoztunk létre a Nextera Mate Pair Sample Preparation Kit (Illumina) segítségével, a gyártó által megadott „gel-plus” protokoll

kismértékben módosított változata szerint: 13 μ L Mate Pair Tagment Enzyme reagens felhasználásával 7-11 kb nagyságú DNS fragmenteket hozunk létre. Ezt a „smear” régiót tartalmazó gél részletet kivágtuk, majd a Zymoclean Large Fragment DNA Recovery Kit (Zymo Research) segítségével visszaizoláltuk. A cirkularizált DNS-t Covaris S2 típusú ultrasonikátor (Covaris) segítségével daraboltuk fel. A fent leírt folyamat során a DNS minőségi ellenőrzéséhez TapeStation 2200 (Agilent) készüléket használtunk. A DNS szekvenálás előtti utolsó mennyiségi ellenőrzéséhez Qubit (Thermo Fisher Scientific Inc.) készüléket használtunk, majd a szekvenálás Illumina MiSeq platformon történt MiSeq Reagent Kit v2 (500 ciklus) felhasználásával (SeqOmics Kft.). A genom *de novo* összeszerelése és a scaffold-ok létrehozása CLC Genomics Workbench Tool v11 (Qiagen) szoftver segítségével történt. A genom annotációját az NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAP) szoftver (v.4.5; Tatusova et al. 2016) segítségével végeztük el. További annotációs elemzésekhez a RAST szervert (RASTtk) és a SEED adatbázist használtuk (Aziz et al. 2008, Overbeek et al. 2014, Brettin et al. 2015). A vizsgált gén klaszterek vizuális megjelenítéséhez a SnapGene szoftvert (v4.3.4) használtuk. A digitális DNS-DNS hibridizációt az online elérhető Genome-to-Genome Distance Calculator szoftver (GGDC, version 2.1) segítségével végeztük el (<http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>, Meier-Kolthoff et al. 2013a). Az OrthoANI (Orthologous Average Nucleotide Identity) érték kiszámításához az OAT (v.0.90) szoftvert használtuk (Lee et al. 2016). Az összehasonlító genomikai vizsgálatokat az OrthoVenn 2 szoftver (Xu et al. 2019) segítségével végeztük el.

3.13. Metagenom szekvenálás és genomépítés

A teljes genomépítéshez végzett metagenom szekvenálás („genome-resolved metagenomics”) Illumina MiSeq platformon történt a SeqOmics Kft. által. A szekvenáláshoz használt közösségi DNS minőségének és integritásának vizsgálata Agilent 2200 TapeStation berendezéssel történt. A „paired-end” fragmentek (2x250 nukleotid) létrehozása MiSeq Reagent Kit v2 (500 ciklus) segítségével történt. Az elsődleges adatelemzés (base-calling) a Bbcl2fastq^ szoftver segítségével történt (v2.17.1.14, Illumina). A nyers szekvenciaadatok minőség ellenőrzése a BBDuk szoftver (v. 37.09; <https://sourceforge.net/projects/bbmap>) és a SICKLE szoftver (<https://github.com/najoshi/sickle>) segítségével történt. Ezt követően a scaffold-okba rendezés a metaSPADES szoftver (v 3.13, Nurk et al. 2017) segítségével történt. Az 1 kb-nál nagyobb scaffold-ok esetén a gének meghatározása a Prodigal szoftver (Hyatt et al. 2010) segítségével történt, míg a gének annotációja diamond blast (Buchfink et al. 2015) segítségével történt az UniRef100 (Suzek et al. 2007) adatbázist használva. A scaffold-okon lévő gének taxonómiája alapján minden egyes taxon esetében megállapítottuk azok konszenzus taxonómiai

besorolását (Schulze-Makuch et al. 2018). Az egyes scaffold-ok lefedettségét a bowtie2 szoftver (Langmead – Salzberg 2012) segítségével állapítottuk meg. A célszervezet genomjának felépítése tetranukleotid frekvenciák alapján történt, az “emergent self organizing map” módszert használva (Dick et al. 2009). A célszervezet abundanciáját a S3 riboszómális fehérjét tartalmazó scaffoldok lefedettsége alapján határoztuk meg. A taxonómiai meghatározásához 16 riboszómális fehérje (L2, L3, L4, L5, L6, L14, L16, L18, L22, L24, S3, S8, S10, S17 és S19) szekvenciáját válogattuk ki a célszervezet genomjából (Hug et al. 2016), majd egy Probst és munkatársai (2018) által létrehozott adatbázis szekvenciával illesztettük őket a MUSCLE szoftver (v3.8.31, Edgar, 2004) segítségével. A bizonytalanul illeszkedő terminális régiókat a Geneious szoftver (11.0.5) segítségével távolítottuk el. A 16 különböző fehérje illesztést ezután összefűztük, majd csak azokat a szekvenciákat tartottuk meg, ahol az aminosav pozíciók több, mint 50%-ban átfedtek. A fennmaradó szekvenciákat használtuk arra, hogy filogenetikai fát hozunk létre, a maximum-likelihood becslés alapján (Price et al. 2010). A fa megjelenítéséhez a Dendroscope szoftvert (v.3.5.10) használtuk.

3.14. Szénhidrogénbontó képesség meghatározása GC-MS segítségével

Az aromás szénhidrogének fogyasztását a dúsító tenyészetekben, illetve az izolátumok szénhidrogénbontó képességét GC-MS műszer (Thermo Fisher Scientific Inc.) segítségével mértük. A dúsítók esetében az ötödik heti átoltásokat követően, a dúsítók gázterében, egy héten keresztül monitoroztuk a szénforrás mennyiségét. Az izolátumok esetében ehhez 100 mL-es szérumüvegeket alkalmaztunk, melybe 50 mL – a dúsítók esetében is alkalmazott – mesterséges talajvíz médiumot (3.3. fejezet) töltöttünk. Az üvegekbe minden esetben egyedi BTEX komponensek kerültek szénforrásként, 5 mg/L koncentrációban. A vizsgálandó baktériumtörzsekből OD (600 nm) 0,5-ös szuszpenziót készítettünk steril fiziológiás sóoldat segítségével, majd ebből 100 µL-t mértünk a tápoldatokba. Az üvegeket ezután rázótermosztátban, 150 rpm-en, 28 °C-on inkubáltuk. Minden esetben három-három párhuzamos mintával dolgoztunk és további három abiotikus mintát is alkalmaztunk negatív kontrollként. A szénforrás fogyasztását egy héten keresztül, 24 óránként mértük az üvegek gázterében, ISQ Single Quadruapole GC-MS műszerrel (Thermo Fisher Scientific Inc.), SLB-5ms kapillárist alkalmazva (Supleco Analytical). A műszert 3 perces 40 °C indulási hőmérsékletét percenként 20 °C-al növeltük 190 °C-ig, a tömeg spektrométert (MS) 250 °C full scan módban üzemeltettük.

3.15. Új baktériumfaj leírásához szükséges vizsgálatok

A kutatások során mindvégig célunk volt olyan fajok izolálása (3.12. fejezet), amelyek képesek egyes szénhidrogénvegyületek lebontására. Ez egyrészt lehetővé teszi metabolikus képességeik alapos vizsgálatát, így később akár potenciálisan alkalmazhatóak bioremediációs célokra is. Ahhoz, hogy igazolni tudjuk, hogy az általunk izolált törzs valóban új fajhoz tartozik, számos vizsgálatot kell elvégezni. Szükség van a fenotípusos bélyegek meghatározására, valamint molekuláris biológiai és kemotaxonómiai vizsgálatokra. Ezek elvégzéséhez elsősorban J. B. Tindall és munkatársai (2010) előírásait vettük alapul.

3.15.1. Fenotípusos és kemotaxonómiai vizsgálatok

A telepek megjelenésének meghatározása szabad szemmel, a sejtek méretének és morfológiájának meghatározása pedig transzmissziós elektron mikroszkóppal (H-7100; Hitachi), Ohad és munkatársai (1963) által leírtak alapján, shadow-casting technikával történt. Gram festést Claus és munkatársai (1992) által leírt módszereknek megfelelően végeztünk. A következő fiziológiai és biokémiai tesztek elvégzésénél Barrow és Feltham (2004) előírásait követtük: nitrát redukció nitritté vagy nitrogénné, ureáz és foszfátáz aktivitás mérése, hidrogén-szulfid keletkezése ciszteiből, indol keletkezése triptofánból, illetve kazein, zselatin, eszkuilin és Tween 80 hidrolízise. A kataláz aktivitás meghatározása 3%-os (v/v) hidrogén peroxid oldat, az oxidáz aktivitás meghatározása 1%-os (w/v) tetrametil-p-fenilén-diamin-oxalát felhasználásával történt (Barrow – Feltham 2004).

A hőmérsékleti optimum meghatározásához a tenyészeteket agarral szilárdított R2A táplemezekon, 4 és 50 °C fok közötti hőmérsékleti értékeken inkubáltuk. Az pH toleranciát folyékony R2A tápoldatban, 4 és 12 közötti tartományban vizsgáltuk. A törzs sótűrését NaCl-dal kiegészített, folyékony R2A tápoldatban, 0-12%-os (w/v) sókoncentrációra kiegészítve határoztuk meg. A pH és a NaCl tolerancia vizsgálata során a baktériumok növekedését az optikai denzitás (OD) rendszeres mérésével (600 nm-en) követtük nyomon.

A további fiziológiai és biokémiai jellemzőket a következő API tesztek segítségével határoztuk meg: API 50CH, API 20NE és API ZYM (bioMérieux) a gyártó által megadott módokon. Az anaerob körülmények közötti növekedést folyékony R2A tápoldatban mértük, melyet az anaerob légzés lehetővé tétele érdekében 0,15%-os (w/v) koncentrációban kálium-nitráttal egészítettünk ki. Ahhoz, hogy biztosítsuk az anaerob körülményeket, az 50 mL R2A tápoldatot tartalmazó üvegeket steril módon, nitrogén gázzal mostuk át, majd 28 °C fokon inkubáltuk a tenyészeteket.

Megvizsgáltuk, hogy a törzs mely aromás komponensek (BTEX) lebontására képes. A vizsgálatot a 3.14. fejezetben ismertetett módon végeztük el.

3.15.2. Zsírsvanalízis

A sejtmembrán zsírsvanalízisét a Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Németország) végezte. Ehhez a vizsgálandó törzset agarral szilárdított R2A táplemezen, 28 °C fokon inkubálva felszaporítottuk és továbbítottuk számukra. A zsírsvanetil-észterek kinyerése 30 mg biomasszából történt szaponifikálással, metilációval és extrakcióval (Miller 1982, Kuykendall et al. 1988), majd szétválasztásuk láng-ionizációs detektorral felszerelt gázkromatográf segítségével történt, a Sherlock Microbial Identification System (MIDI Inc.) eljárása szerint. A zsírsavak azonosítása a Sherlock szoftver (v.6.1) segítségével történt.

3.15.3. A teljes genomi DNS guanin és citozin tartalmának meghatározása

A teljes genomi DNS guanin és citozin tartalmának meghatározását szintén a DSMZ végezte, Constant Systems TS 0.75 KW (IUL Instruments) berendezés segítségével. A DNS tisztítása Cashion és munkatársai által (1977) leírtak szerint, hidroxipatit oszlopkromatográfias módszerrel történt. A DNS-t ezután P1 nukleázzal és szarvasmarhából származó alkalikus foszfatázzal történő emésztéssel nukleotidokra bontották (Mesbah et al. 1989). A nukleotid alkotókat ezután reverz fázisú HPLC-vel választották szét Tamaoka és Komagata (1984) módszere szerint. A guanin és citozin tartalom kiszámítása a deoxiguanozin és timidin arányából történt (Mesbah et al. 1989).

3.15.4. Poláris lipidek és respiratórikus kinonok analízise

A poláris lipidek és légzési kinonok analízisét szintén a DSMZ végezte. A poláris lipidek kivonása 200 mg liofilizált biomasszából történt kloroform:metanol:0,3%-os NaCl oldat keverékével, ahol a poláris lipidek a kloroform fázisban koncentrálnak (Bligh – Dyer 1959). Az oldatból a poláris lipidek elválasztása 2-dimenziós szilika vékonyréteg kromatográfiával történt, ahol az első elválasztás kloroform:metanol:víz elegyével, míg a második elválasztás kloroform:metanol:ecetsav:víz elegyével történt. A teljes lipidtartalom meghatározása foszformolibdénsav használatával történt, míg az egyes specifikus lipidcsoportok meghatározása csoportspecifikus reagensek használatával történt (Tindall et al. 2007).

A respiratórikus- és lipokininok elválasztása 200 mg fagyasztva szárított biomasszából metanol-hexán keverékkel, Tindall (1990a, 1990b) által leírt módszerrel történt. A lipokininok későbbi szeparációját hexánban, míg a respiratórikus lipokininok (menakinonok, ubikinonok stb.) elválasztását szilikagélen (Macherey-Nagel Art. NO. 805 023) végezték vékonyréteg kromatográfia segítségével. A vékonyréteg lemezről izolálták a különböző kinon típusoknak megfelelő UV elnyelő sávokat, majd ezeket HPLC készülékkel analizálták. A mérést LDC Analytical (Thermo Separation Products) HPLC készülékhez kapcsolt reverz fázisú kolonnán (Macherey-Nagel, 2 mm x 125 mm, 3 mm, RP18) végezték, eluensként metanol és heptán 9:1 arányú keveréket használtak. A respiratórikus lipokininokat 269 nm hullámhosszon detektálták.

3.15.5. Filogenetikai vizsgálatok

Az újonnan izolált törzs filogenetikai elhelyezését a 16S rDNS szekvenciája alapján tettük meg. A filogenetikai fához felhasználtuk a legközelebbi rokon törzsek 16S rDNS szekvenciáit is, melyeket az NCBI GenBank adatbázisából töltöttük le. A filogenetikai fa elkészítése a 3.10.1. fejezetben leírtak szerint történt.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Oxigénlimitáció hatása benzollal és toluollal kiegészített dúsító tenyészetek mikrobaközösségeire

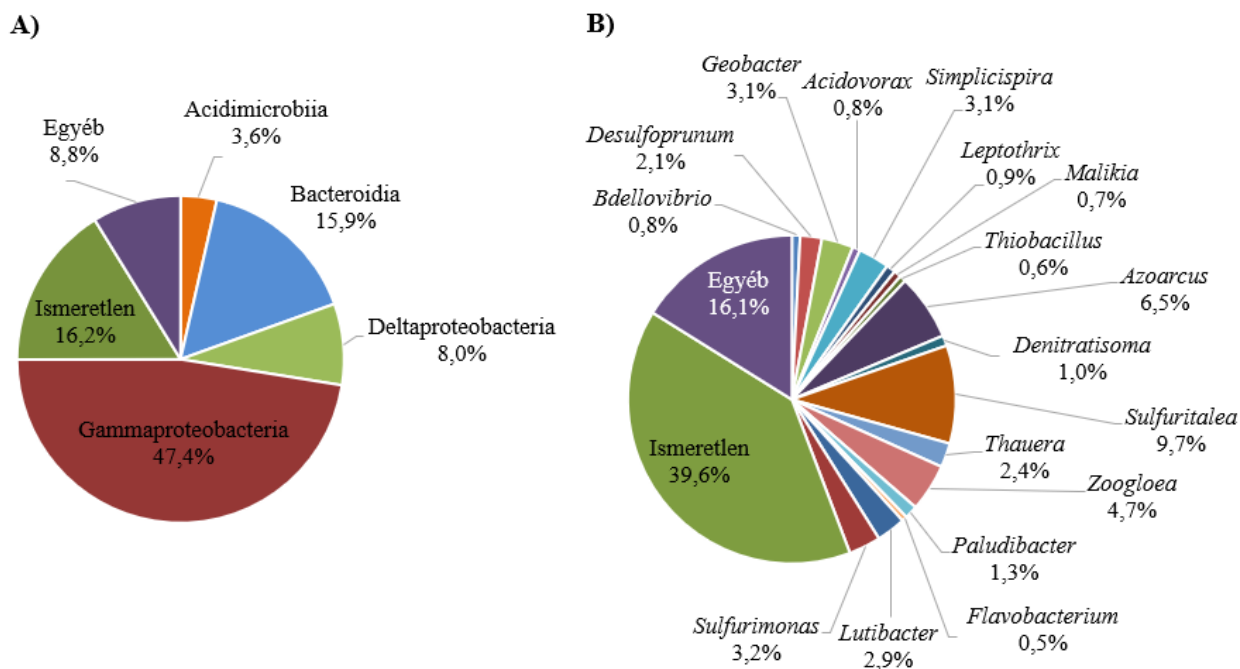
Első dúsítási kísérletünkben szeretnénk volna megvizsgálni, hogy benzol és toluol lebontás mellett milyen baktériumközösségek alakulnak ki aerob és mikroaerob körülmények között. Ahogy a módszerek leírásánál (3.1. fejezet) ismertettem, biofilm mintáink egy korábban már alaposan feltárt kárhelyről származtak. Mivel a szennyezett talajvízben oxigénlimitált körülmények uralkodtak és a korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy az I.2.C típusú C23O gének nagy diverzitással vannak jelen a területen, érdemesnek találtuk további kísérletek elvégzését. További célunk volt, hogy a korábban sikerrel feldúsított *Malikia* nemzetségbe tartozó baktériumokat ismét feldúsítsuk, és kísérletet tegyünk azok izolálására is, mely lehetővé teszi anyagcseréjük alaposabb megismerését.

Annak érdekében, hogy felfedjük mely I.2.C típusú C23O gének játszanak kulcsszerepet a mikroaerob benzol- és toluol-lebontásban, olyan aerob és mikroaerob dúsító tenyészeteket állítottunk össze, melyekben egyedüli szénforrásként toluolt vagy benzolt alkalmaztunk, majd a kialakult baktériumközösségeket a dolgozat *Anyag és módszer* részében (3. fejezet) ismertetett módokon, mikrobiális genetikai vizsgálatoknak vetettük alá.

4.1.1. 16S rDNS amplikon szekvenálás segítségével feltárt mikrobaközösségek összetétele

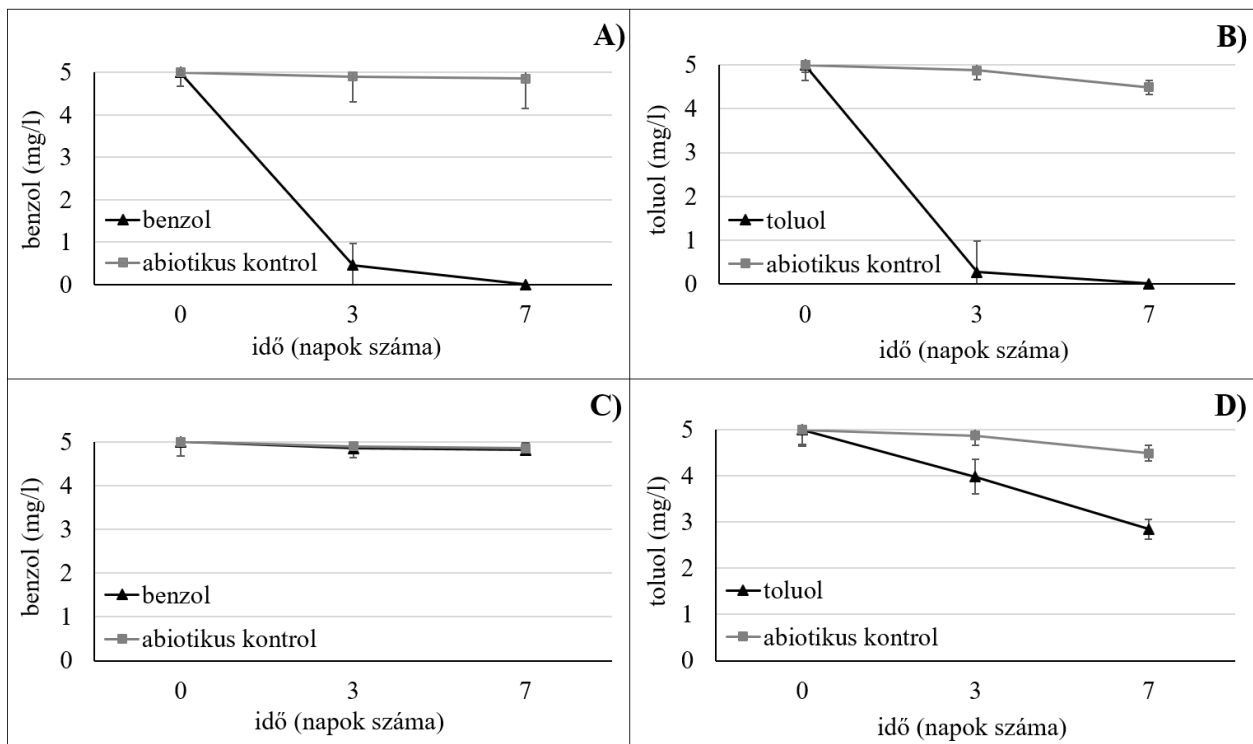
Az Illumina 16S rDNS szekvenálás eredményeként a kiindulási biofilm mintában (BUT18) 33 820 db, az aerob benzol-lebontó dúsító tenyészetben (AB1) 33 778 db, az aerob toluol-lebontó dúsító tenyészetben (AT2) 29 721 db, a mikroaerob benzollal kiegészített dúsító tenyészetben (MB1) 33 056 db, a mikroaerob toluol-lebontó dúsító tenyészetben (MT3) pedig 33 823 db 16S rDNS szekvenciát tudtunk azonosítani. A filogenetikai kiértékelés során kapott eredmények alapján megállapítottuk, hogy a **kiindulási biofilm minta** mikrobaközösségét döntően a Gamma-proteobaktériumok uralták, az amplikonok 47%-a volt idesorolható (4.1. ábra). Ezen belül a Betaproteobacterales rendbe tartozó nemzetségek voltak uralkodóak, úgymint a *Sulfuritalea* (9,7%), *Azoarcus* (6,5%), *Zoogloea* (4,7%), *Simplicispira* (3%), *Thauera* (2,4%), *Denitratisoma* (1%), *Leptothrix* (0,9%), *Acidovorax* (0,8%) és a *Malikia* (0,7%) nemzetségek. Ezek közül számos nemzetségben, például az *Azoarcus*, *Zoogloea*, *Thauera* és *Acidovorax* nemzetségben találhatóak olyan fajok, melyek jól ismert lebontói az aromás szénhidrogéneknek (Prince et al. 2018), egy részüket pedig gyakran kimutatják szénhidrogénnel szennyezett felszín alatti környezetben,

ilyenek a *Sulfuritalea*, a *Simplicispira* és a *Denitratisoma* nemzetségekhez tartozó fajok (Sperfeld et al. 2018). Mindezek fényében a biofilmből előállított inokulum megfelelőnek bizonyult a benzol- és toluol-lebontó dúsító tenyészetek létrehozásához.



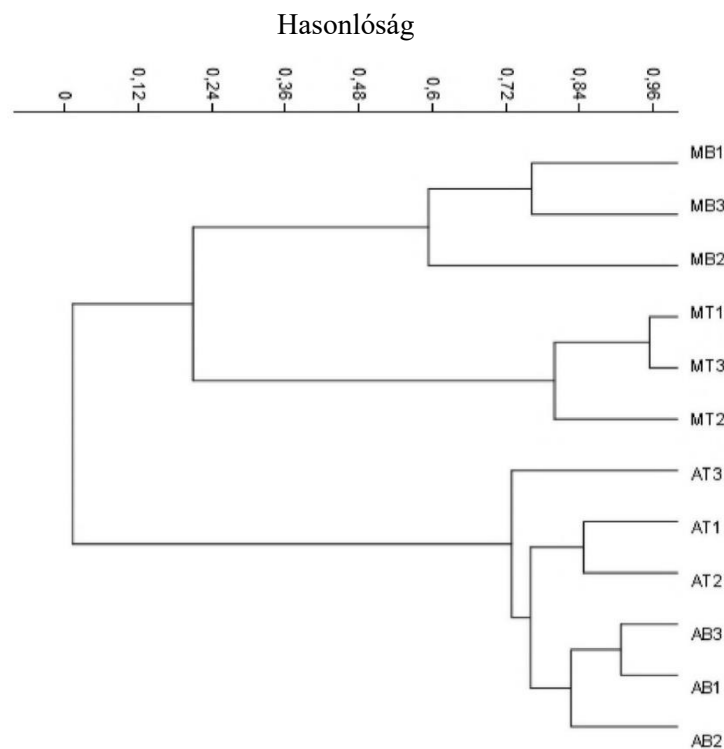
4.1. ábra: Az inokulumként szolgáló biofilm minta mikroba közösségének összetétele az Illumina paired-end 16S rDNS amplicon szekvenálás eredményei alapján A) osztály és B) nemzetség szinten. Az „Egyéb” kategóriába a 0,5% alatti abundanciával rendelkező taxonok kerültek.

Az ötödik heti átoltást követően a dúsítók gázterében egy héten keresztül monitoroztuk a szénforrás mennyiségét (4.2. ábra). Az aerob dúsítóknban mind a benzol-, mind a toluol-lebontó tenyészetek esetében gyors fogyást tapasztaltunk, a harmadik napon a hozzáadott aromás vegyületeknek kevesebb, mint 10%-át lehetett kimutatni; a hetedik napon pedig már nem voltak kimutathatóak a dúsítókból. Mikroaerob lebontást ezzel szemben csak a toluollal kiegészített dúsítóknban tudtunk megfigyelni, az aerob körülményekhez képest a lebontás itt jóval lassabban zajlott, a hetedik napon mindössze 40%-os fogyást tapasztaltunk. A mikroaerob, benzollal kiegészített dúsítóknban nem történt jelentős mértékű lebontás.



4.2. ábra: Szénforrás fogyása az aerob, benzollal A) vagy toluollal B) kiegészített, valamint a mikroaerob, benzollal C) vagy toluollal D) kiegészített, ötödik heti dúsítóknban, GC-MS mérési eredmények alapján. A feltüntetett értékek a párhuzamos dúsító tenyészetek átlagai.

A végponti minták baktériumközösségeit 16S rDNS alapú T-RFLP vizsgálatnak vetettük alá, majd a kapott eredményekből Bray-Curtis hasonlósági indexet alkalmazva dendrogramot hoztunk létre (4.3. ábra). Az így létrehozott fán jól látszik, hogy a párhuzamos dúsítók mikrobaközösségei valóban párhuzamosak, tehát nagy hasonlóságot mutatnak egymással. Az aerob és mikroaerob dúsítók mikrobaközösségei jól elkülönülnek egymástól, valamint e két fő csoporton belül is jól elkülöníthetőek a mikrobaközösségek aszerint, hogy milyen szénforrást adtunk a dúsítókhoz. A mikroaerob dúsítók esetében a szénforrás fajtája nagyobb szelekciós nyomást eredményezett a közösségek összetételére. Mindezek alapján a párhuzamos mintákból egyet-egyét választottunk ki, hogy amplikon szekvenálással részletes képet kapjunk a közösség összetételéről.

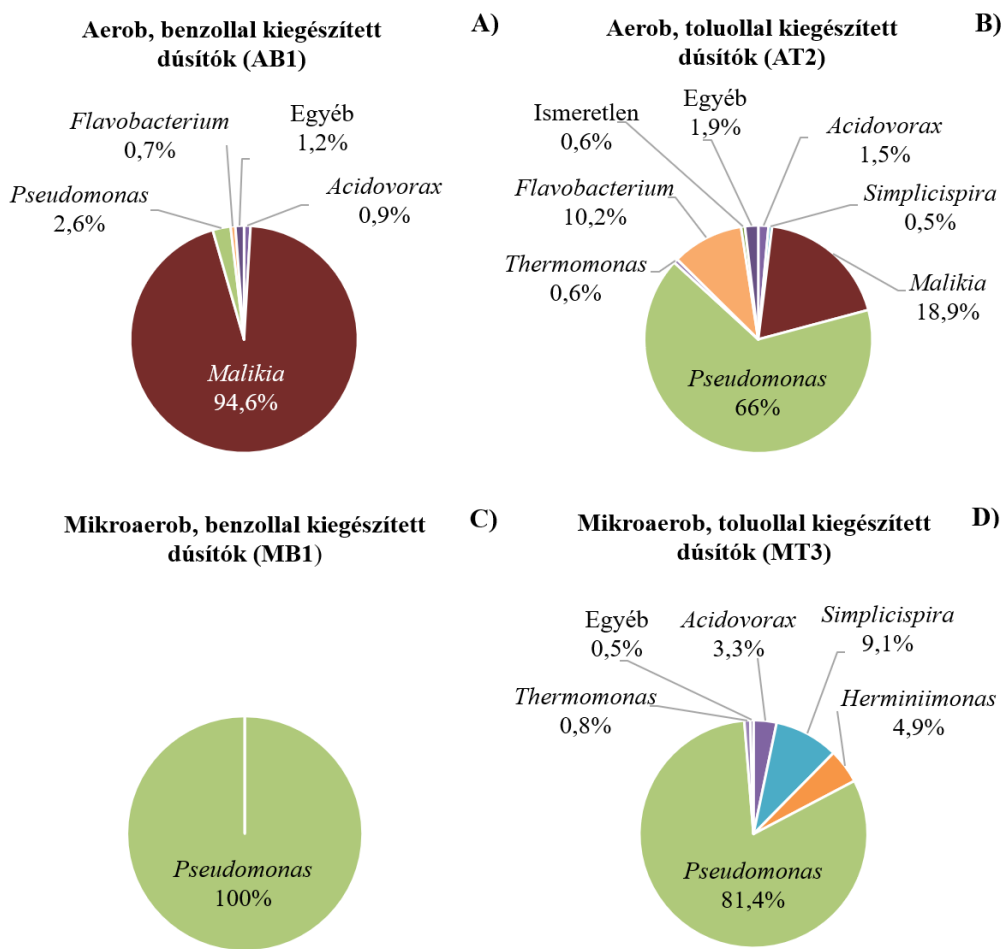


4.3. ábra: Párhuzamos dúsító tenyészetek 16S rDNS alapú T-RFLP elektroferogramjainak klaszter analízise. A számítás során a Bray-Curtis hasonlósági indexet alkalmaztunk. MB: mikroaerob, benzollal kiegészített dúsító tenyészetek; MT: mikroaerob, toluol-lebontó dúsító tenyészetek; AB: aerob, benzol-lebontó dúsító tenyészetek; AT: aerob, toluol-lebontó dúsító tenyészetek.

Az **aerob, benzol-lebontó dúsítótenyészetben** (AB1, 4.4./A ábra) azonosított 16S rDNS szekvenciák 94%-a a *Malikia* nemzetséghez volt köthető (4.4. ábra). E csoporton kívül 0,5%-nál magasabb abundanciával mindössze a *Pseudomonas*, az *Acidovorax* és a *Flavobacterium* nemzetségek voltak jelen. Jelenleg a *Malikia* nemzetségnek két leírt fajt ismerjük, az egyik a *M. granosa*, melyet egy szennyvíztisztító elveniszapjából izoláltak. Jellemző tulajdonsága, hogy polihidroxiálkanoát és polifoszfát akkumulációjára képes, amely tartalék szén- és energiaforrásként szolgálhat számára. A nemzetség másik tagját folyóvízből izolálták és *Pseudomonas spinosa* néven írták le 1962-ben (Leifson 1962), majd később *M. spinosa* néven átsorolták a *Malikia* nemzetségbe (Spring et al. 2005). Habár a nemzetséget gyakran kimutatják BTEX-vegyületekkel szennyezett felszín alatti közegekben (Aburto – Ball 2009, Tácsics et al. 2010), izolálni ez idáig egyetlen törzsét sem sikerült szennyezett kárhelyről, így pontos szerepük a szénhidrogének lebontásában ismeretlen volt. Legközelebbi rokonaik, a *Hydrogenophaga* nemzetség tagjai között azonban ismerünk kiváló BTEX-lebontó baktériumokat (Fahy et al. 2008, Jechalke et al. 2013).

Az **aerob, toluol-lebontó dúsító tenyészetek** (AT2, 4.4./B ábra) mikrobaközösségét döntően a *Pseudomonas* nemzetség (66%) uralta, mellette nagy számban voltak kimutathatóak a

Malikia (18,9%), a *Flavobacterium* (10,2%) és az *Acidovorax* (1,5%) nemzetségek. A *Pseudomonas* fajok szerepe az aerob toluol-lebontásban jól ismert, széleskörben alkalmazzák őket modellszervezetként a toluol aerob körülmények közötti lebontásának vizsgálatára. A *Malikia* nemzetséghez köthető szekvenciák nagy száma arra enged következtetni, hogy ezeknek a baktériumoknak szintén szerepük lehet a toluol aerob körülmények közötti lebontásában. A *Flavobacterium* és *Acidovorax* nemzetségek gyakran vannak jelen szénhidrogénnel szennyezett területeken (Kaplan – Kitts 2004, Aburto et al. 2009, Singleton et al. 2018).



4.4. ábra: Ötödik heti, végponti minták (AB1, AT2, MB1, MT3) mikrobaközösségeinek összetétele Illumina paired-end 16S rDNS amplikon szekvenálás eredményei alapján. Az „Egyéb” kategóriába a 0,5% alatti abundanciával rendelkező taxonok kerültek.

A **mikroaerob, benzollal kiegészített dúsító tenyészetek** (MB1, 4.4./C ábra) 16S rDNS szekvenciái szinte kizárólag egyetlen filotípushoz tartoztak, amely a *Pseudomonas* nemzetséghez volt köthető. Mivel a dúsítókban a benzol fogyasztását nem lehetett kimutatni, feltételezhető, hogy ezek a baktériumok csupán a kismennyiségű sejttermékek és másodlagos anyagcsere termékek lebontásával maradhattak fenn. A **mikroaerob, toluol-lebontó dúsítók** (MT3, 4.4./D ábra)

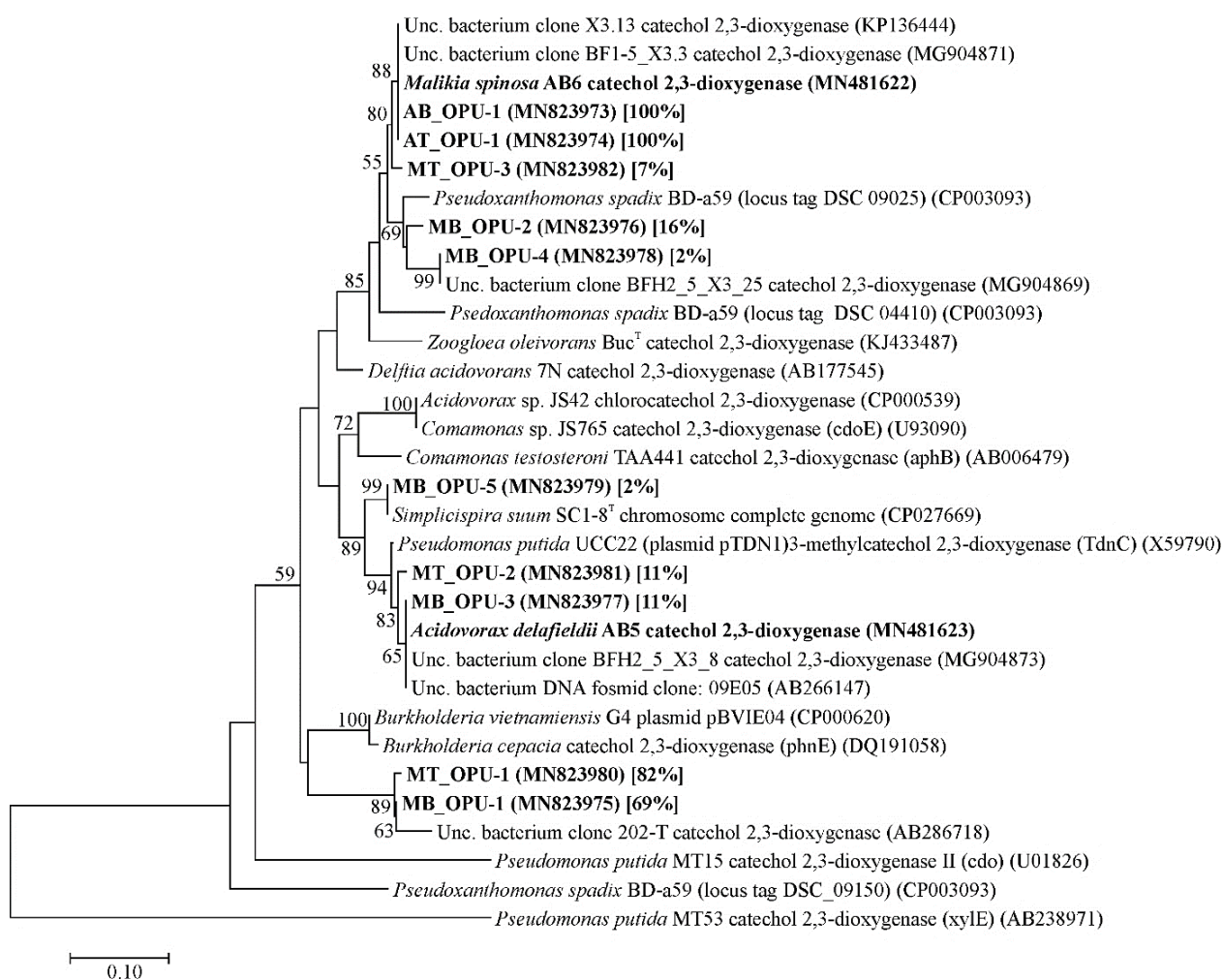
mikrobaközössége némileg diverzebb képet mutatott, habár túlnyomó többségben itt is a *Pseudomonas* nemzetség volt az uralkodó (81%), melyet a *Simplicispira* (9,1%), a *Herminiimonas* (4,9%) és az *Acidovorax* (3,3%) nemzetségek követték. Kim és munkatársai (2014) stabil izotópos kísérlettel bizonyították egy *Herminiimonas* nemzetséghez köthető baktériumfaj toluolbontó képességét nitrátredukáló körülmények között. A baktériumban megtalálható a benzilszukcinát szintáz gén is, amely az anaerob toluol-lebontás egyik kulcsenzimét kódolja (Leuthner et al. 1998). Lehetséges, hogy a mikroaerob dúsítókban időnként előforduló oxigénhiányos (anaerob) periódusokban a *Herminiimonas*-rokon baktériumoknak szerepük volt a toluol fogyasztásában. A *Simplicispira* és *Acidovorax* nemzetség tagjait gyakran mutatják ki szénhidrogén-lebontó, oxigénlimitált dúsítókban (Keller et al. 2018), így feltételezzük, hogy kísérletünk során is szerepük volt a toluol mikroaerob körülmények közötti hasznosításában.

4.1.2. A benzollal és toluollal kiegészített dúsító tenyészetekből kimutatott, I.2.C alcsaládba tartozó klónszekvenciák diverzitása és filogenetikai elhelyezkedése

Azokban a dúsítókban, melyeket 16S rDNS amplikon szekvenálás alá vetettünk, klónozás segítségével megvizsgáltuk az I.2.C típusú C23O génszekvenciák diverzitását is. Az **aerob benzol-lebontó dúsító** (AB1) esetében ezek a szekvenciák egyetlen operatív filogenetikai egységbe (Operational Phylogenetic Unit – OPU) voltak sorolhatók (AB_OPU-1). Egy ezzel 100%-os hasonlóságot mutató szekvenciát korábban Benedek és munkatársai (2018) BTEX-lebontó dúsítási kísérleteik során azonosítottak és feltételelesen a *Malikia* nemzetséghez kötötték. Meglepő módon ugyanez a szekvencia volt megfigyelhető az **aerob toluol-lebontó dúsító** (AT2) mikrobaközösségében is.

Annak ellenére, hogy a **mikroaerob benzollal kiegészített dúsító tenyészetben** (MB1) nem volt megfigyelhető szignifikáns mértékű benzol-lebontás és a diverzitás is itt volt a legkisebb, mégis ebben a mintában volt a legdiverzebb az I.2.C típusú C23O gének jelenléte; a szekvenciák öt különböző OPU-t alkottak. Feltételezhető tehát, hogy a *Pseudomonas* nemzetségen kívül igen kis mennyiségben, de más baktériumok is jelen voltak a dúsítókban. A szekvenciák 69%-át kitevő MB_OPU-1 egy ismeretlen baktériumfajhoz volt köthető. Az MB_OPU-2 és MB_OPU-4 szekvenciákhoz Benedek és munkatársai (2018) által, mikroaerob BTEX-lebontó dúsítókban kimutatott C23O génszekvenciák álltak legközelebb. Az MB_OPU-3 szintén nagy hasonlóságot mutatott az előbb említett dúsítóban dominánsan jelenlévő szekvenciával, melyet abban a kísérletben feltételelesen az *Acidovorax* nemzetséghez kötötték. Az MB_OPU-5 szinte teljes mértékben megegyezett a *Simplicispira suum* SC1-8-as törzs I.2.C típusú C23O génszekvenciájával.

A mikroaerob toluol-lebontó dúsítóban (MT3) az I.2.C típusú C23O klónszekvenciáknak három csoportját tudtuk megfigyelni. A dominánsan jelen lévő MT_OPU-1 100%-os hasonlóságot mutatott a benzollal kiegészített mikroaerob dúsítóban is domináns MB_OPU-1 szekvenciákkal. Az MT_OPU-2 szekvenciák az MB_OPU-3 szekvenciákkal állnak közeli rokonságban, míg az MT_OPU-3 szekvenciák nagy átfedésben voltak az aerob toluol-lebontó dúsítóban is megtalálható szekvenciákkal. Ezek alapján elmondható, hogy az oldott oxigén koncentrációjának alakulása nagyobb hatással volt az I.2.C típusú C23O gén diverzitására, mint az aromás szénhidrogének (ez esetben a benzol és toluol) típusa.



4.5. ábra: A dúsítók és izolátumok I.2.C típusú C23O génszekvenciáinak filogenetikai elhelyezkedését bemutató „neighbor-joining” algoritmus alkalmazásával készült fa. A távolságértékek pontosságának vizsgálata 1000 ismétlésen alapuló bootstrap analízissel történt.

4.1.3. A benzollal és toluollal kiegészített dúsító tenyészetekből izolált baktériumtörzsek ismertetése

Az Illumina 16S rDNS amplikon szekvenálással vizsgált végponti mintákból hagyományos tenyésztési módszerekkel törzseket izoláltunk. Mindössze négy nemzetség nyolc fajához tartozott az a 22 darab törzs, amelyet azonosítani sikerült (4.1. táblázat). Az aerob, benzol-lebontó dúsítókból (AB1) a *Pseudomonas*, az *Acidovorax* és a *Malikia* nemzetséghez tartozó fajokat tudtunk azonosítani. Sikerült két, *Malikia spinosa* 83^T típusú törzsszel 99,7% és 99,9%-os hasonlóságot mutató baktériumot izolálni, melyeket megvizsgálva kiderült, hogy rendelkeznek az I.2.C típusú C23O génnel is. Ezek a génszekvenciák 100%-ban megegyeznek az AB1-es és AT2-es jelölésű, aerob dúsítókból megtalálható egyetlen C23O genotípussal. Megvizsgáltuk, hogy az AB6-os jelölésű, *Malikia spinosa*-val közeli rokon törzs mely aromás vegyületek aerob lebontására képes és azt találtuk, hogy hatékonyan bontja a benzolt, a toluolt és az etilbenzolt (4.6. ábra), míg a xilolok izomerjeit nem képes lebontani.

4.1. táblázat: Ötödik heti dúsítókból izolált baktériumtörzsek megnevezése és az I.2.C alcsaládba tartozó C23O funkciógén jelenlétének vizsgálata.

Törzs jelölése	Legközelebbi rokon (típustörzs)	16S rDNS hosszúsága (bp)	hasonlóság (%)	I.2.C alcsaládba tartozó C23O gén
Aerob, benzol-lebontó dúsító tenyészet AB1				
AB1	<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i> CECT 7543 ^T	1437	99,4	-
AB2	<i>Malikia spinosa</i> ATCC 14606 ^T	1432	99,7	+
AB3	<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i> CECT 7543 ^T	1437	99,4	-
AB4	<i>Pseudomonas veronii</i> DSM 11331 ^T	1434	99,8	-
AB5	<i>Acidovorax delafieldii</i> DSM 64 ^T	1444	99,9	+
AB6	<i>Malikia spinosa</i> ATCC 14606 ^T	1428	99,9	+
Aerob, toluol-lebontó dúsító tenyészet AT2				
AT1	<i>Pseudomonas umsongensis</i> DSM 16611 ^T	1436	99,9	-
AT2	<i>Pseudomonas veronii</i> DSM 11331 ^T	1435	99,7	-
AT3	<i>Pseudomonas moorei</i> RW10 ^T	1437	99,9	-
AT4	<i>Flavobacterium oncorhynchi</i> CCUG 59446 ^T	1411	99,6	-
AT5	<i>Flavobacterium oncorhynchi</i> CCUG 59446 ^T	1392	99,6	-
AT6	<i>Pseudomonas umsongensis</i> DSM 16611 ^T	1435	99,9	-

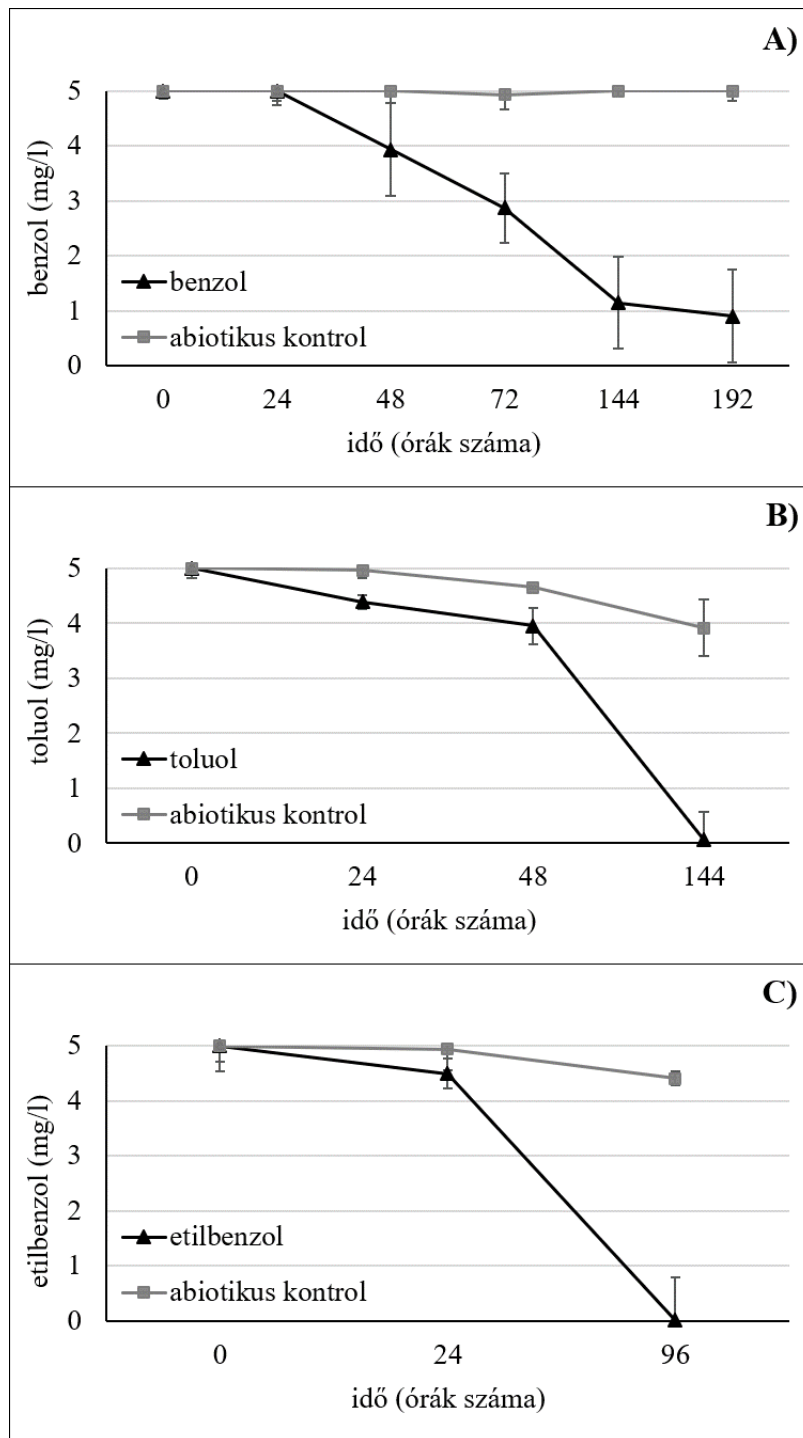
Mikroaerob, benzollal kiegészített dúsító tenyészet MB1

MB1	<i>Pseudomonas veronii</i> DSM 11331 ^T	1437	99,8	-
MB2	<i>Pseudomonas veronii</i> DSM 11331 ^T	1435	99,8	-
MB3	<i>Pseudomonas veronii</i> DSM 11331 ^T	1436	99,8	-
MB4	<i>Pseudomonas veronii</i> DSM 11331 ^T	1411	99,8	-
MB6	<i>Pseudomonas extremaustralis</i> 14-3 ^T	1330	99,6	-

Mikroaerob, toluol-lebontó dúsító tenyészet MT3

MT1	<i>Pseudomonas veronii</i> DSM 11331 ^T	1438	99,8	-
MT2	<i>Pseudomonas veronii</i> DSM 11331 ^T	1438	99,8	-
MT3	<i>Pseudomonas veronii</i> DSM 11331 ^T	1439	99,8	-
MT4	<i>Pseudomonas veronii</i> DSM 11331 ^T	1438	99,7	-
MT5	<i>Pseudomonas veronii</i> DSM 11331 ^T	1451	99,8	-

A szakirodalomban ez idáig nem volt található olyan eset, melyben bizonyítást nyert volna, hogy egy *Malikia spinosa* fajhoz tartozó törzs képes egyes aromás szénhidrogének lebontására. Eredményeink azonban magyarázatot adnak arra, hogy a *Malikia* nemzetség miért lehet domináns a BTEX-vegyületekkel szennyezett, aerob közegekben. Az általunk izolált AB6-os törzset transzmissziós elektronmikroszkóppal is megvizsgáltuk, és a képeken azt láttuk, hogy a sejtek és a flagellumok morfológiája megegyezik a *M. spinosa* 83^T típusú törzs esetében dokumentáltakkal (Spring et al. 2005) (8.2. sz. melléklet). Az *Acidovorax delafieldii*-ként azonosított AB5-ös törzs szintén rendelkezik az I.2.C típusú C23O génnel, melynek szekvenciája 100%-os egyezést mutatott a Benedek és munkatársai (2018) által, ugyanerről a kárhelyről már korábban is kimutatott szekvenciával (4.5. ábra). Ennél a törzsnél is megvizsgáltuk, hogy mely BTEX-vegyületek lebontására képes és azt találtuk, hogy a hat aromás vegyület közül egyedül a benzolt hasznosította. Az *Acidovorax* nemzetségbe tartozó egyes törzseknek már korábbról is ismert ez a képessége (Fahy et al. 2006, Aburto – Peimber 2011).



4.6. ábra: *Malikia spinosa* AB6-os törzs aerob körülmények között mért benzol- (A), toluol- (B) és etilbenzol-lebontási (C) képessége GC-MS mérési eredmények alapján.

Az aerob, toluol-lebontó dúsítóból a *Pseudomonas* és *Flavobacterium* nemzetséghez tartozó törzseket tudtunk izolálni, melyek közül egyik sem rendelkezett az I.2.C típusú C23O génnel. Mivel a *Pseudomonas* nemzetséghez tartozó fajok toluol-lebontási képessége jól ismert, így ezeket a törzseket nem vetettük alá további vizsgálatoknak. Az AT4-es, *Flavobacterium oncorhynchi*-ként azonosított törzs egyik BTEX-vegyületet sem tudta hasznosítani.

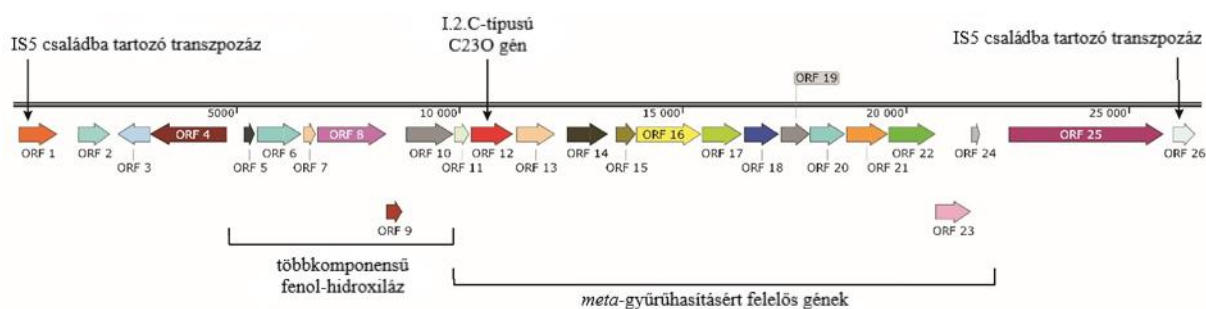
A mikroaerob dúsítókból kizárólag a *Pseudomonas veronii* és *P. extremaustralis* fajokhoz köthető törzseket sikerült izolálnunk, melyek közül egyik sem rendelkezett az I.2.C típusú C23O génnel, továbbá nem voltak képesek a benzol lebontására. A korábban, ugyanerről a kárhelyről származó mintából, mikroaerob körülmények között feldúsított *P. veronii* izolátumok szintén nem bontották le a benzolt, azonban a toluolt, a *meta*- és *para*-xilolt hatékonyan degradálták (Benedek et al. 2018). Feltételezzük, hogy mikroaerob dúsítóinkban ezek a *Pseudomonas veronii*-hoz köthető baktériumok voltak felelősek a toluol fogyásáért. Annak ellenére, hogy nem rendelkeznek az I.2.C típusú C23O génnel, úgy tűnik sikeresen adaptálódtak az oxigénlimitált körülményekhez. A *P. veronii*-hoz igen közeli rokonságban álló *P. extremaustralis* például bizonyítottan képes az alkánok mikroaerob körülmények közötti lebontására (Tribelli et al. 2018).

4.1.4. *Malikia spinosa* AB6-os törzs teljes genomjának feltárása

Mivel ez idáig nem született egyetlen olyan kutatásról szóló publikáció sem, amiben a *Malikia* nemzetséghez tartozó törzset sikerült volna szénhidrogénekkal szennyezett területről izolálni, érdekesnek tartottuk alaposan megvizsgálni az általunk izolált *Malikia spinosa* AB6-os törzsének teljes genomját. A 4 110 698 bázispár nagyságú genom 3614 fehérjekódoló gént tartalmaz, G+C aránya 65,2%. A teljes genomszekvenciát a GenBank adatbázisában a VYSB00000000 számon tettük elérhetővé (Bioproject: PRJNA572590; Biosample: SAMN12796314). Mivel a faj típustörzsének (*Malikia spinosa* 83^T) teljes genomja szabadon hozzáférhető, lehetőségünk nyílt arra, hogy összevessük azt az általunk izolált *M. spinosa* AB6-os törzssel. Utóbbi genomja körülbelül 300 kilobázissal nagyobbnak bizonyult, mint a 83^T jelölésű típustörzsé. Első lépésként digitális DNS-DNS hibridizációval és OthoANI vizsgálattal megnéztük, hogy a két törzs valóban egyazon fajhoz tartozik-e. Az eredmények 79,4% és 97,7%-os hasonlóságot mutattak, tehát a két törzs egyértelműen ugyanannak a fajnak a képviselője. A két genomot az OrthoVenn2 eszköz segítségével hasonlítottuk össze és meglepő módon jelentős különbségeket találtunk a kettő között. Legalább 148 olyan fehérjét tudtunk azonosítani, amellyel kizárólag az AB6-os törzs rendelkezik és ezeknek sem ortológjuk sem paralógjuk nem volt megtalálható a 83^T törzsben. Ezen fehérjék jelentős része az aromás vegyületek lebontó folyamataihoz kapcsolható.

Az AB6-os törzs részletes elemzése során kiderült, hogy az I.2.C típusú C23O gén egy olyan klaszter része, amely a fenol lebontásában játszik szerepet. Ez a klaszter egy többkomponensű fenol hidroxiláz rendszer enzimeit, valamint a *meta* típusú gyűrűhasítás enzimeit kódolja (4.7. ábra). Figyelemre méltó, hogy a klasztert transzpozonok, azaz mozgékony genetikai elemek határolják, melyből arra következtethetünk, hogy az általunk izolált AB6-os törzsbe

horizontális géntranszfer (HGT) útján kerülhetett. Azonban a génklaszter eredetét nem tudjuk pontosan meghatározni, mivel az általa kódolt fehérjék aminosavszekvenciája meglehetősen alacsony hasonlóságot mutatnak az ismert baktériumok által kódolt homológ fehérjékkel. A genomon ezen kívül nem találtunk benzol- vagy toluol-lebontásban szerepet játszó mono- és dioxigenázokat, tehát nagy valószínűséggel az általunk azonosított génklaszter felelős e két vegyület lebontásáért. Hasonló megfigyelést tettek Oosterkamp és munkatársai (2013) a Comamonadaceae családba tartozó, benzol- és toluol-lebontó *Alicyclophilus denitrificans* BC és K601-es törzs esetében is. A benzolgyűrű fenol monooxigenázok általi hidroxilációja (Pérez-Pantoja et al. 2010), továbbá ezen enzimek szerepe a toluol biodegradációjában jól ismert folyamat (Cafaro et al. 2004, Martínez-Lavanchy et al. 2015).



4.7. ábra: A *Malikia spinosa* AB6-os törzsben azonosított, fenol-lebontásban szerepet játszó klaszter sematikus ábrája.

Annak ellenére, hogy AB6-os törzs kitűnően bontja az etilbenzolt, a genomjában nem találtuk meg az erre utaló etilbenzol dioxigenáz géneket. A vegyület lebontása végbemehet azonban az etilcsoport oxidációjával is, melyben a naftalin dioxigenázok vesznek részt (Lee – Gibson 1996, Lee et al. 2019). Átkutatva a genomot, egy teljes génklasztort (*nag* operon) találtunk, amely a naftalin dioxigenázok mellett a szalicilát-5-hidroxiláz és gentizát 1,2-dioxigenáz enzimeket kódoló régiókat is tartalmazza. Utóbbiakat a *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2 és *Ralstonia* sp. U2 törzsekben, mint a naftalin-lebontás kulcsenzimeit írták le (Park et al. 2007; Pumphrey – Madsen 2007, Zhou et al. 2001). Mindezek alapján feltételezzük, hogy az AB6-os törzs a *nag* operonnak köszönhetően képes az etilbenzol lebontására, továbbá rendelkezhet a naftalin-lebontás képességével is.

Új tudományos eredmény a 4.1. fejezet alapján:

I. tézis: Először sikerült szénhidrogénekkal szennyezett területről a *Malikia* nemzetséghez tartozó törzset izolálni. A *Malikia spinosa* AB6-os törzsről kimutattuk, hogy I.2.C-típusú C23O génnel rendelkezik, és képes a benzolt, a toluolt és az etilbenzolt egyedüli szén-, és energiaforrásként hasznosítani tisztán aerob körülmények között. Megerősítést nyert, hogy e baktériumok, annak ellenére, hogy I.2.C-típusú extradiol dioxigenáz enzimet kódolnak, csak tisztán aerob körülmények között válnak domináns szervezetekké aromás szénhidrogént lebontó dúsító tenyészetekben.

A 4.1. fejezet eredményeit az alábbi publikációban adtuk közre:

Révész, F., Farkas, M., Kriszt, B., Szoboszlay, S., Benedek, T., Táncsics, A. (2020): Effect of oxygen limitation on the enrichment of bacteria degrading either benzene or toluene and the identification of *Malikia spinosa* (Comamonadaceae) as prominent aerobic benzene-, toluene-, and ethylbenzene-degrading bacterium: enrichment, isolation and whole-genome analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 27: 31130-31142.

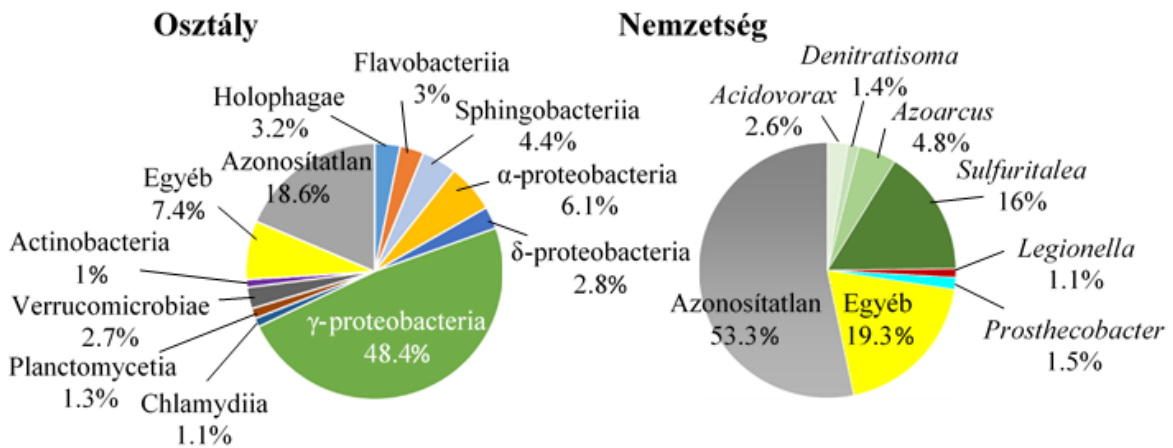
4.2. Oxigénlimitáció hatása kőolaj/gázolaj keverékkel kiegészített dúsítótenyészetek mikrobaközösségére

Az aromás vegyületekhez hasonlóan, az alkánok lebontása is a megfelelő oldott oxigén jelenlétében, azaz aerob környezetben zajlik le a leggyorsabban és így a legteljesebb. A telített szénhidrogének a kőolajszármazékoknak jellemzően igen nagy részét teszik ki (Mbadinga et al. 2011) és oxigénlimitált körülmények közötti alkán-lebontásról ez idáig mindössze néhány tanulmány született (Cyplik et al. 2011, Liu et al. 2018, Tribelli et al. 2018). Emiatt elengedhetetlennek találtuk, hogy megvizsgáljuk a mikroaerob körülmények közötti lebontási folyamatokat. Ezek alapján célunk volt megvizsgálni, hogy az alacsony oldott oxigén koncentráció ($\sim 0,5 \text{ g mL}^{-1}$) milyen hatással van a jelen lévő baktériumközösség összetételére és metabolikus képességeire. Vizsgálataink során, az előző dúsítási kísérletünkhöz hasonlóan, ugyanarról a közép-magyarországi kárhelyről származó biofilm mintát vettük kiindulópontnak (3.1. fejezet; Benedek et al. 2016, 2018). A szennyezett talajvízben oxigén-limitált körülmények uralkodtak és a korábbi kísérletek során az I.2.C típusú C23O gének nagy diverzitása volt megfigyelhető.

4.2.1. A kőolaj/gázolaj keverékkel kiegészített dúsító tenyészetek 16S rDNS amplikon szekvenálás segítségével feltárt mikrobaközösségének összetétele

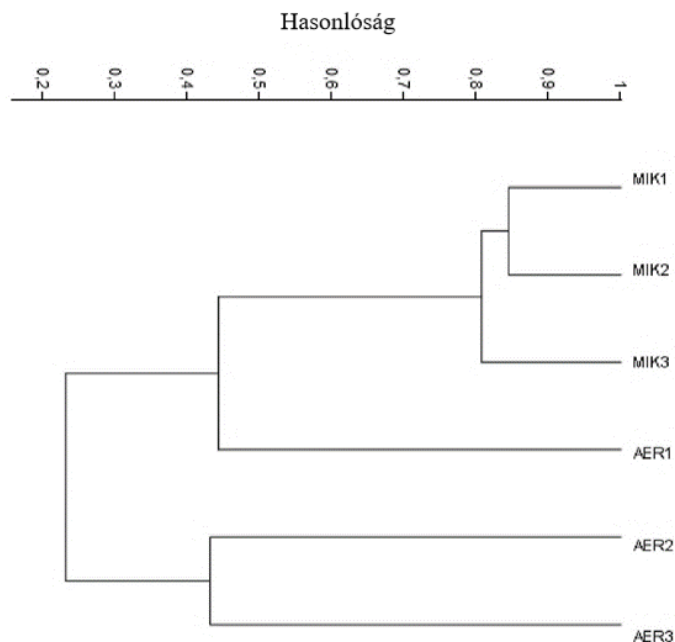
Illumina 16S rDNS amplikon szekvenálás segítségével feltártuk a kárhelyről származó, újonnan mintavételezett **kiindulási biofilm mikrobaközösségét** (222 988 db 16S rDNS szekvencia), melyet továbbra is a Gamma-proteobaktériumok körébe tartozó Betaproteobacteriales rend uralt (4.8. ábra). A legnagyobb számban azonosított 16S rDNS szekvenciák a *Sulfuritalea* (16%), az *Azoarcus* (4,8%), az *Acidovorax* (2,6%), a *Simplicispira* (0,9%), a *Thiobacillus* (0,9%), a *Hydrogenophaga* (0,7%), a *Thauera* (0,6%), a *Zoogloea* (0,6%) és a *Rhodoferrax* (0,5%) nemzetségek voltak. Habár az Alfa-proteobaktériumok és a Gamma-proteobaktériumokhoz tartozó Pseudomonadales rend tagjait viszonylag nagy számban tudtuk kimutatni a mintában, az olyan tipikus szénhidrogén-bontó nemzetségek, mint a *Novosphingobium*, a *Sphingobium* és a *Pseudomonas*, kis számmal, jellemzően 0,05% alatti abundanciával voltak csak jelen a közösségben. Összességében a baktériumközösség összetétele hasonlóan alakult, mint ami szénhidrogénekkal szennyezett, felszín alatti, oxigénlimitált környezetben általánosságban megfigyelhető.

Inokulum (biofilm)



4.8. ábra: Kiindulási biofilm minta mikrobaközösségének összetétele Illumina paired-end 16S rDNS amplicon szekvenálás eredményei alapján. Az „Egyéb” kategóriába a 0,5% alatti abundanciával rendelkező taxonok kerültek.

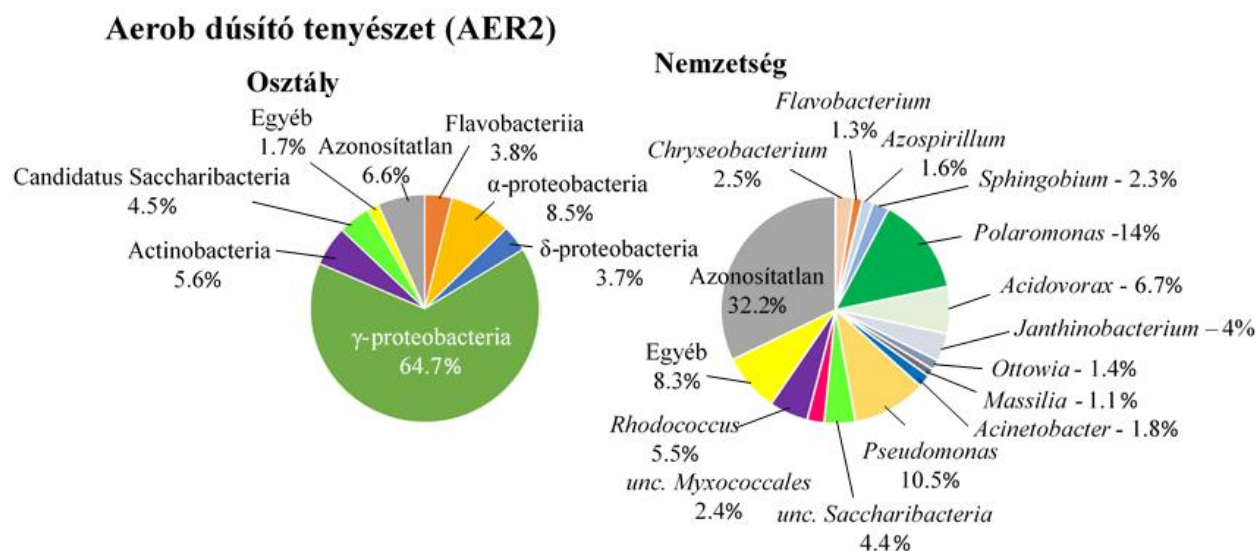
Ahhoz, hogy képet kapjunk a dúsító tenyészetek egymáshoz való viszonyáról és ellenőrizzük, hogy a párhuzamos minták valóban párhuzamosak, 16S rDNS alapú T-RFLP vizsgálatot végeztünk, majd Bray-Curtis hasonlósági indexet alkalmazva klaszter analízist készítettünk (4.9. ábra).



4.9. ábra: Párhuzamos, kőolaj/gázolaj keverékkel kiegészített dúsító tenyészetek 16S rDNS alapú T-RFLP elektroferogramjainak klaszter analízise. A számítás során a Bray-Curtis hasonlósági indexet alkalmaztunk. (MIK1-3: párhuzamos mikroaerob dúsító tenyészetek; AER1-3: párhuzamos aerob dúsító tenyészetek)

A ábrán (4.9. ábra) jól látható, hogy a mikroaerob dúsító tenyészetek mikrobaközösségei igen nagy hasonlóságot mutattak egymással. A három párhuzamos aerob dúsító tenyészet nagyobb változatosságot mutat, az egyik dúsító kissé különbözik is a többitől. Lehetséges, hogy a levegőztetéssel járó zavarás okozza az aerob dúsító tenyészetek mikrobaközösségei közötti nagyobb eltérést.

A 16S rDNS amplikon szekvenálási eredmények alapján elmondható, hogy a vizsgálatra kiválasztott, **kőolaj/gázolaj keverékkel kiegészített, aerob dúsító (AER2) mikrobaközösségét** (195 745 db 16S rDNS szekvencia alapján) a Betaproteobacteriales rendhez tartozó baktériumok uralták, a leolvasott szekvenciák 36,5%-a sorolható ide (4.10. ábra). A leggyakoribb nemzetség a Betaproteobacteriales rendbe tartozó *Polaromonas* (14%) volt, a renden belül jelen voltak még az *Acidovorax* (6,7%) és a *Janthinobacterium* (4%) nemzetségek. A *Polaromonas* nemzetségnek több olyan tagját ismerjük, amely képes a szénhidrogének, például a benzol és a toluol lebontására (Sun et al. 2010, Xie et al. 2011), valamint dominanciájukat kimutatták már benzollal szennyezett talajvízből is (Aburto et al. 2009). Hasonlóan, az *Acidovorax* nemzetség is gyakran domináns tagja a szénhidrogén-lebontó baktériumközösségeknek (Popp et al. 2006, Daghigho et al. 2015). A fenantrén és klórbenzol *Acidovorax* törzsek általi lebontása jól dokumentált folyamat (Nestler et al. 2007, Singleton et al. 2018). A *Janthinobacterium* nemzetség is gyakran van jelen alifás szénhidrogénekkal szennyezett környezetben, azonban feltételezhetően csak jól tolerálja a szénhidrogének jelenlétét, lebontásukban viszont nem vesz részt (Giebler et al. 2013, Pham et al. 2014).



4.10. ábra: Aerob, kőolaj/gázolaj keverékkel kiegészített dúsító tenyészet (AER2) mikrobaközösségének összetétele Illumina paired-end 16S rDNS amplikon szekvenálás eredményei alapján. Az „Egyéb” kategóriába a 0,5% alatti abundanciával rendelkező taxonok kerültek.

Nemzetség szinten, a dúsítóban a második leggyakoribb (10,5%) nemzetség a *Pseudomonas* volt, melynek szerepét a szénhidrogének lebontásában már jól ismerjük. Az Alfa-proteobaktériumok közül a *Sphingobium* nemzetséget (2,3%) érdemes kiemelni, mivel több olyan tagját ismerjük, amelynek szerepe van a szénhidrogének aerob körülmények közötti lebontásában (Lloyd-Jones – Lau 1997, Pinyakong et al. 2003, Liang – Lloyd-Jones 2010, Révész et al. 2018). A leolvasott 16S rDNS szekvenciák 5,5%-át tette ki a *Rhodococcus* nemzetség (Aktinobaktériumok osztálya), melynek alkán-lebontásban is résztvevő tagjait jól ismerjük. A nemzetségnek szinte minden tagja rendelkezik *alkB* génnel, az úgynevezett “*erythropolis*” klád tagjai pedig aerob környezetben igen hatékony alkán-lebontó baktériumok (Táncsics et al. 2015). A klád tagjai a szénhidrogénnel szennyezett talajok generalista fajainak tekinthetők, mivel a talajféleség és a szénhidrogénszennyezés típusától függetlenül megtalálhatóak szinte minden kárhelyen (Hamamura et al. 2006, 2013). Néhány közülük több, mint három *alkB* géntípussal rendelkezik (Whyte et al. 2002), továbbá képesek lehetnek felületaktív anyagok termelésére is (Lang – Philp 1998).

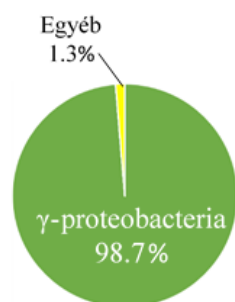
Érdekes módon, az aerob dúsítóban viszonylag nagy abundanciával (4,5%) voltak jelen a *Candidatus Saccharibacteria* törzshöz tartozó 16S rDNS szekvenciák. Egészen a közelmúltig ennek a baktériumcsoportnak nem ismertük tenyésztésbe vont képviselőjét, csupán a 16S rDNS szekvenciája alapján lehetett azonosítani (He et al. 2015). Korábban egy bizonyos csoportjukat (3. szubdivízió) nagy számban mutatták ki szénhidrogénnel szennyezett talajban (Winsley et al. 2014), továbbá stabil izotópos kísérletekkel bizonyították szerepüket a toluol és a benzol aerob körülmények közötti lebontásában (Luo et al. 2009, Xie et al. 2011). Említésre méltó még a Flavobacteriia osztályba tartozó *Chryseobacterium* (2,3%) és *Flavobacterium* (1,3%) nemzetség jelenléte az aerob dúsítóban. Mindkettőben található olyan fajok, melyeket szénhidrogénnel szennyezett környezetből izoláltak (Szoboszlay et al. 2008, Chaudhary – Kim 2018).

A **mikroaerob dúsító tenyészet (MIK1) baktériumközössége** (174 767 db 16S rDNS szekvencia) nem volt annyira diverz, mint az aerob dúsító tenyészeteké, 98,8%-ban a Gamma-proteobaktériumok uralták (4.11. ábra). Nemzetség szinten az *Acinetobacter*-hez köthető 16S rDNS szekvenciákat tudtuk legnagyobb számban (66,3%) kimutatni a dúsítóból. A nemzetség tagjai között találhatóak olyan fajok, amelyek aerob körülmények között képesek az alkánok és az aromás vegyületek lebontására (Lal – Khanna 1996, Di Cello et al. 1997, Margesin et al. 2003, Czarny et al. 2019), némelyikük pedig a nem elágazó, hosszú szénláncú alkánok lebontásához adaptálódott (Tani et al. 2001, Rojo 2009). Az *Acinetobacter* nemzetséghez tartozó fajok igen gyakoriak lehetnek a felszín alatti kőolaj rezervoároknál, mely jelenségről azt feltételezik, hogy a kitermelés során bejuttatott vízzel kerülhetnek ezekbe a közegekbe (Orphan et al. 2000, Zhao et al. 2012). A felszínhez közel fekvő kőolaj tartalmú rétegekbe a csapadékvíz leszivárgásával

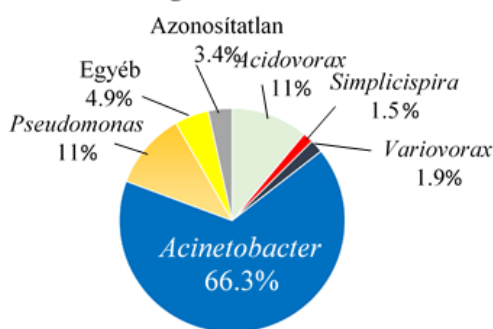
kerülhet némi oxigén is (Jones et al. 2007), ahogyan a mélyen fekvő rezervoárokba is, csak ebben az esetben a kitermelés közben befecskendezett vízzel. Feltételezik tehát, hogy az anaerob folyamatok mellett aerob folyamatok is szerepet játszanak ezeken az olaj lelőhelyeken (da Cruz et al. 2011). Lehetséges, hogy egyes *Acinetobacter* nemzetségbe tartozó fajok azért fordulhatnak elő nagy számban a felszín alatt fekvő kőolaj rezervoárokban, mert képesek voltak adaptálódni az oxigénhiányos környezethez.

Mikroaerob dúsító tenyészet (MIK1)

Osztály



Nemzetség

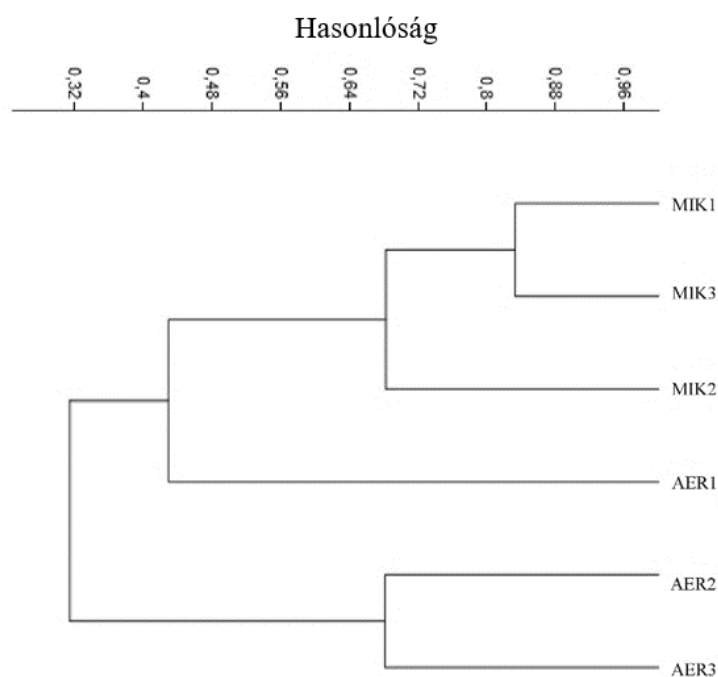


4.11. ábra: Mikroaerob, kőolaj/gázolaj keverékkel kiegészített dúsító tenyészet (MIK1) mikrobaközösségének összetétele Illumina paired-end 16S rDNS amplikon szekvenálás eredményei alapján. Az „Egyéb” kategóriába a 0,5% alatti abundanciával rendelkező taxonok kerültek.

A Gamma-proteobaktériumokhoz tartozó *Pseudomonas* nemzetséget is igen nagy számban (11%) lehetett kimutatni a mikroaerob dúsítókban. Ismert olyan *Pseudomonas* törzs (*P. extremaustralis* 14-3^T), amely hatékonyan alkalmazkodott az alkánok mikroaerob körülmények közötti lebontásához (Tribelli et al. 2018). A Betaproteobacteriales rendet az *Acidovorax* (11%), a *Variovorax* (1,9%) és a *Simplicispira* (1,5%) nemzetség képviselte a dúsítókban. Az *Acidovorax* és a *Variovorax* nemzetségnek ismertek olyan tagjai, melyek képesek az aromás szénhidrogének lebontására (Sydow et al. 2016, Posman et al. 2017, Singleton et al. 2018). Benedek és munkatársai (2018) dúsítási kísérletében egy *Acidovorax* nemzetséghez tartozó baktérium jelentősen fel tudott szaporodni BTEX-vegyületekkel kiegészített, mikroaerob dúsítókban. Habár a *Simplicispira* nemzetség jelenlétét kimutatták már szénhidrogénekkal szennyezett felszín alatti közegekben (Benedek et al. 2016) és benzol-lebontó, nitrát redukáló dúsító tenyészetekben (Keller et al. 2018), szerepük a szénhidrogének lebontásában ez idáig ismeretlen.

4.2.2. A kőolaj/gázolaj keverékkel kiegészített dúsító tenyészetekből kimutatott *alkB* gének diverzitása és filogenetikai elhelyezkedése

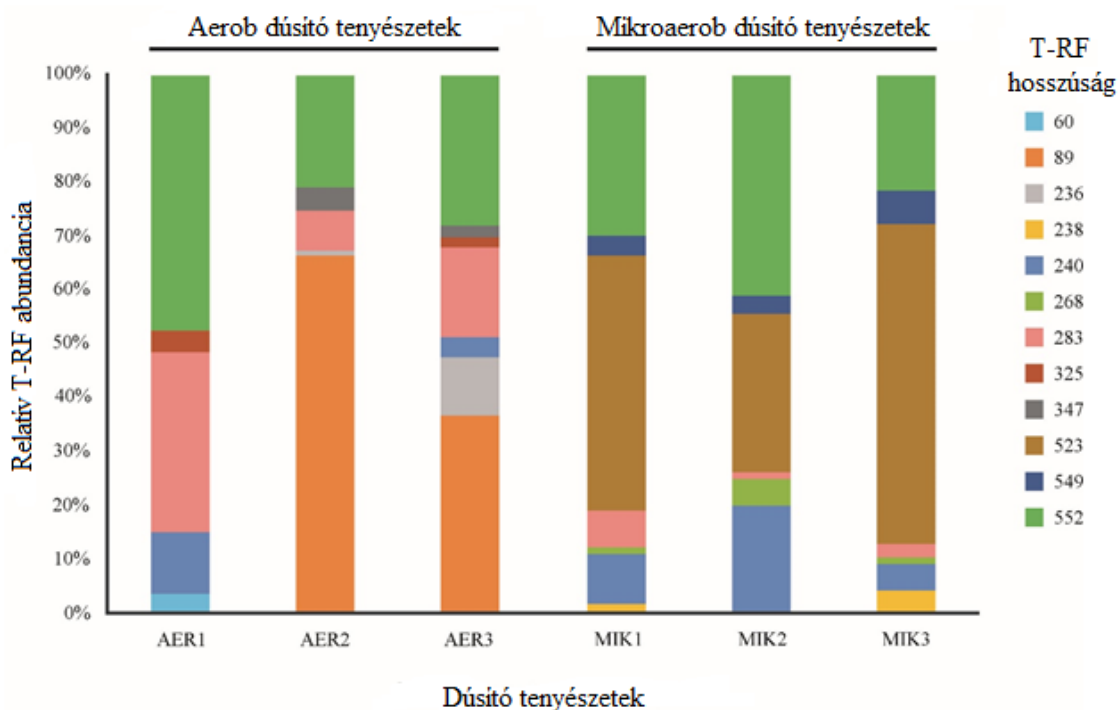
Annak érdekében, hogy vizsgálni tudjuk az *alkB* gének diverzitását az aerob és mikroaerob dúsító tenyészetekben, Giebler és munkatársai (2014) által leírt módon T-RFLP analízist végeztünk, majd a kapott eredményekből a Bray-Curtis hasonlósági indexet alkalmazva dendrogramot készítettünk. Hasonlóan a 16S rDNS alapú elemzéshez, a három párhuzamos mikroaerob dúsító nagyobb hasonlóságot mutatott egymással, mint a három párhuzamos aerob dúsító (4.12. ábra).



4.12. ábra: Párhuzamos, kőolaj/gázolaj keverékkel kiegészített dúsító tenyészetek *alkB* gén alapú T-RFLP elektroferogramjainak klaszter analízise. A számítás során a Bray-Curtis hasonlósági indexet alkalmaztunk. (MIK1-3: párhuzamos mikroaerob dúsító tenyészetek; AER1-3: párhuzamos aerob dúsító tenyészetek)

A három-három párhuzamos dúsítóban azonosított *alkB* T-RF-ek abundanciáit a 4.12. ábrán látjuk. A mikroaerob dúsítóban az 523 bázispár hosszúságú T-RF volt a leggyakoribb, míg az aerob dúsítóban azt figyelhettük meg, hogy az AER2 és AER3 jelzésű mintában igen domináns 89 bázispár hosszúságú T-RF a harmadik – AER1 jelzésű – mintából teljes egészében hiányzik. Annak érdekében, hogy a kimutatott fragmenteket konkrét szekvenciákhoz tudjuk kötni, az AER2 és MIK1 dúsítókból *alkB* gén klónkönyvtárakat hoztunk létre.

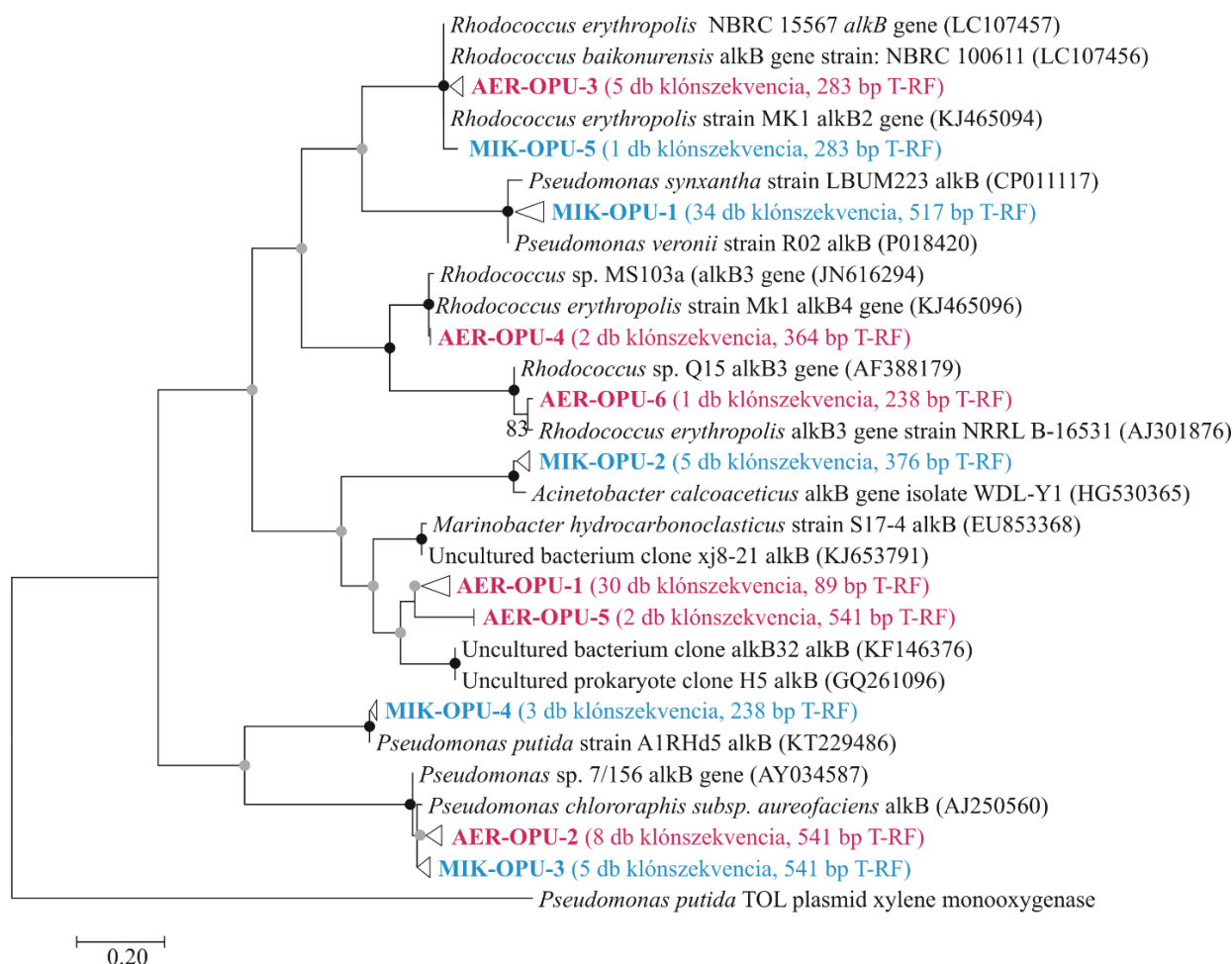
Az **aerob dúsítóban** (AER2) az *alkB* **génszekvenciáknak** hat csoportját (OPU) tudtuk elkülöníteni (4.14. ábra). A klónok 63%-át kitevő és ezzel a legnagyobb klaszter (AER-OPU 1) igen kis hasonlóságot mutatott az idáig ismert *alkB* genotípusokkal, így nem sikerült azt ismert, kitenyésztett baktériumfajhoz kötni. Legközelebbi hasonlóságot (76-80%) az *Agitococcus lubricus* DSM 5822^T törzs *alkB* génjével mutatott, valamint kőolajjal szennyezett, tengeri környezetből származó szekvenciákkal (Powell et al. 2010; Wang et al. 2014). Ezt a klónt a 89 bázispár hosszúságú, dominánsan kimutatott T-RF-hez lehetett kötni. A többi klasztert alkotó *alkB* génszekvenciák nagy része (AER-OPU 2,3,4 és 6 jelölésű) a *Pseudomonas* (*P. putida* és *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens*) és *Rhodococcus* nemzetségekhez voltak köthetőek. Kivételt képez az AER-OPU 5 csoportja, mely szekvenciák közeli rokonságot mutattak az AER-OPU 1-es csoportba tartozókkal.



4.13. ábra: A kőolaj/gázolaj keverékkel kiegészített dúsító tenyészetekből kimutatott *alkB* gén T-RF-ek relatív abundanciája az ötödik heti, végponti dúsító tenyészetek mikrobaközösségeiben.

A **mikroaerob dúsító** (MIK1) *alkB* **génszekvenciáit** öt csoportba lehet osztani (4.14. ábra). A legnagyobb (71%) csoportot az 523 bázispár hosszúságú T-RF-ek alkották, melyek nagy hasonlóságot (98,4%) mutattak *Pseudomonas veronii* törzsek *alkB* szekvenciáival. A *P. veronii* legközelebbi rokona, a *P. extremaustralis* képes az alifás szénhidrogének mikroaerob körülmények közötti lebontására (Tribelli et al. 2018). Van információnk arról is, hogy egyes *P. veronii* törzsek képesek a BTEX-vegyületek és alkil-metil-keetonok lebontására, azonban az alkánok lebontásában betöltött szerepükről ez idáig keveset tudunk (Morales et al. 2016, Onaca et

al. 2007). Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a *P. extremaustralis* rokon baktériumoknak is szerepe lehet az alkánok mikroaerob körülmények közötti lebontásában.



4.14. ábra: A kőolaj/gázolaj keverékkel kiegészített aerob (AER2, piros színnel) és a mikroaerob (MIK1, kék színnel) dúsító tenyészetekben kimutatott *alkB* gén szekvenciák filogenetikai elhelyezkedését bemutató „maximum-likelihood” algoritmus alkalmazásával készült fa. A távolságvértékek pontosságának vizsgálata 1000 ismétlésen alapuló bootstrap analízissel történt.

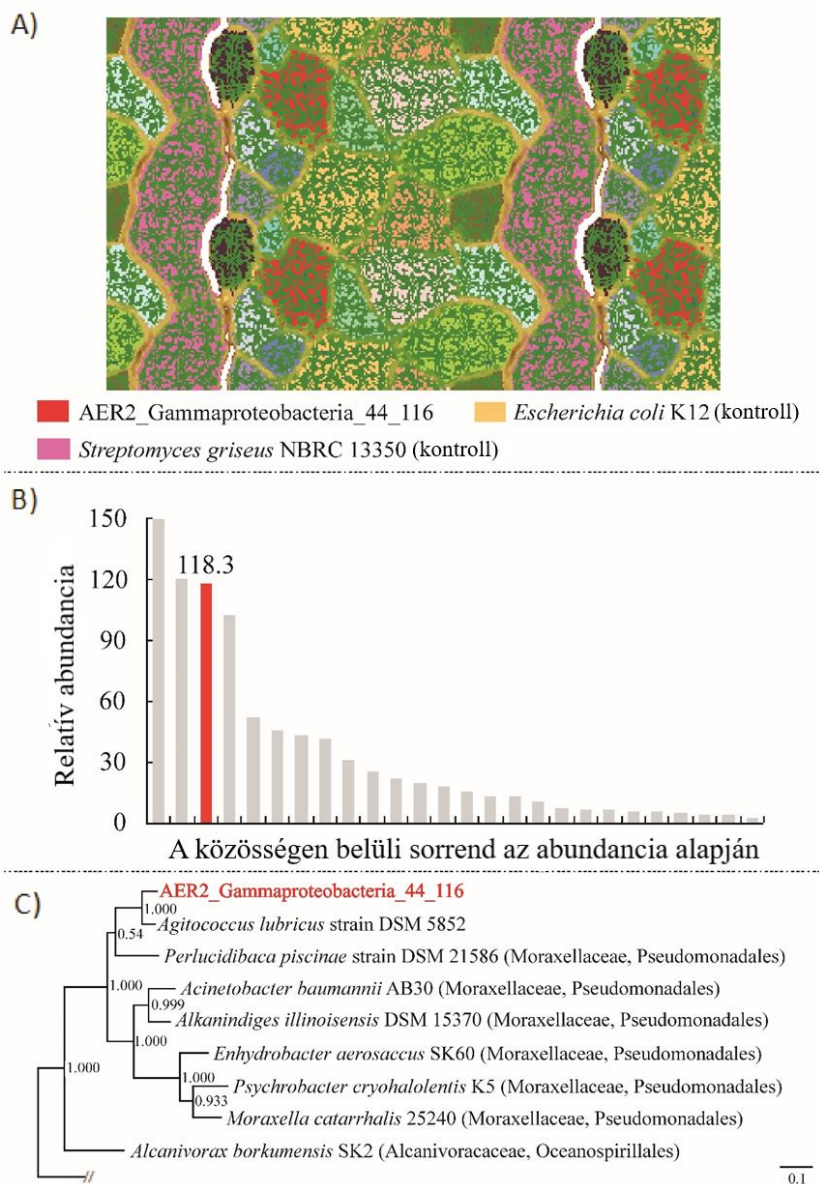
Annak ellenére, hogy a 16S rDNS szekvenciák alapján a mikroaerob dúsítóban (MIK1) az *Acinetobacter* nemzetséghez köthető baktériumok voltak dominánsak, az ugyanide köthető *alkB* szekvenciák a klónoknak mindössze 10%-át tették ki (MIK-OPU 2). Ezek, a 376 bázispár hosszúságú T-RF-ek legközelebbi hasonlóságot (97,8%) az *A. calcoaceticus* CA16-os törzs *alkB* génszekvenciájával mutatták. Meg kell azonban jegyezni, hogy a kutatás során használt PCR primerek nem amplifikálják az *Acinetobacter* fajok által kódolt *alkB* gének minden típusát (Jurelevicius et al. 2013). Továbbá, számos alkán-lebontó *Acinetobacter* törzs *alkM* típusú alkán hidroxilázokat kódol és nem *alkB* típusúakat. A MIK-OPU 3-as és 4-es csoportba tartozó klónszekvenciák a *Pseudomonas* nemzetséghez köthetőek (10% és 6%-a a szekvenciáknak, 548 és 238 bázispár hosszúságú T-RF-ek). A MIK-OPU3 és az AER-OPU 2 csoportok szekvenciái

teljes egészében azonosak voltak, tehát megtalálhatóak voltak a mikroaerob és az aerob dúsítókból egyaránt. Mindössze egyetlen szekvenciát számlál a MIK-OPU 5-ös klaszter, amely a *Rhodococcus* nemzetséghez köthető *alkB* génnel, valamint az AER-OPU 3 csoporttal mutatta a legnagyobb hasonlóságot.

4.2.3. Az ismeretlen *alkB* genotípus (AER-OPU-1) filogenetikai azonosítása metagenom asszociált genom analízis segítségével

A klónkönyvtár segítségével feltárt *alkB* genotípusok közül az AER-OPU 1 és AER-OPU 5 jelölésű klasztereket nem sikerült baktériumokhoz kötni. Mivel az AER-OPU 1-be tartozó *alkB* gén szekvenciákat tudtuk a legnagyobb számban kimutatni az aerob dúsító tenyészetben (AER2), fontosnak tartottuk a minta további vizsgálatát. Ehhez az úgynevezett metagenom adatok alapján történő genom összeszerelést („genome-resolved metagenomics”) választottuk, melynek során az aerob dúsító tenyészetek metagenomjából sikeresen felépítettük a számunkra ismeretlen *alkB* genotípust hordozó baktérium genomját. A szekvenálás és a tetranukleotid eloszláson alapuló genom-építés (4.15./A ábra) eredményeként a genomnak csaknem a teljes (>99%) összeszerelése sikerült, ami alapján egy ezidáig ismeretlen Gamma-proteobaktériumokhoz tartozó baktérium genomját kaptuk meg (AER2_Gammaproteobacteria_44_116), azonban a 16S rRNS génszakaszt nem sikerült hozzárendelnünk a genomhoz.

Az S3 riboszómális fehérje génje alapján kiderült, hogy ez a harmadik leggyakoribb baktérium az AER2-es aerob dúsító tenyészetben (4.15./B ábra). A baktérium filogenetikai helyzetét 16S rRNS gén hiányában a riboszómális fehérjék alapján állapítottuk meg, mely szerint az *Agitococcus lubricus* (Franzmann – Skerman 1981) áll hozzá legközelebbi rokonságban. A baktériumot az NCBI (National Center for Biotechnology Information – Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ) a Firmicutes törzsbe sorolja, azonban a teljes genom alapján az valójában a Gammaproteobacteria osztály Moraxellaceae családjába tartozik. Az általunk azonosított baktérium filogenetikai elhelyezkedését a 4.14./C ábrán látjuk.



4.15. ábra: Az AER2 (aerob kőolaj/gázolajos) dúsító tenyészetből kimutatott, ismeretlen *alkB* genotípus baktériumhoz rendelése metagenomikai adatok alapján: (A) az AER2-es dúsító ESOM ábrája, piros színnel jelölve azt a „bin”-t, amely tartalmazza az új *alkB* gént; (B) az ismeretlen *alkB* gént tartalmazó baktérium relatív abundanciája a közösségben az S3-as riboszómális fehérje alapján (piros oszlop);. (C) az új *alkB* génnel rendelkező Gammaproteobacteria_44_116-jelű baktérium filogenetikai helyzetét bemutató fa, amely 16 db riboszómális fehérje génjének összefűzése és filogenetikai vizsgálata alapján készült.

Az *alkB* gént tartalmazó génklaszter vizsgálata feltárta, hogy az *alkB* géntől upstream helyzetben, ellentétes orientációval megtalálható egy *AraC* családba tartozó transzkripciós regulátort kódoló gén is (4.16. ábra). E gént *alkR* néven írták le az *Acinetobacter* sp. ADP1-es törzs esetében, és azt találták, hogy jelenléte esszenciális fontosságú az alkán-lebontás képességéhez. Ez alapján joggal feltételezhetjük, hogy az AER2_Gammaproteobacteria_44_116-

jelű baktérium egy jelentős alkán-lebontó baktérium szerepét töltötte be az AER2-es aerob dúsító tenyészetben.



4.16. ábra: Az *alkB* gént tartalmazó klaszter az AER2_Gammaproteobacteria_44_116-jelű baktérium genomjában. ORF1: tRNA (citidin(34)-2'-O)-metiltranszferáz, ORF2: alfa/béta hidroláz, ORF3: alkán-1 monooxigenáz, ORF4: AraC családba tartozó transzkripció regulátor, ORF5: dehidrogenáz, ORF6 oxigéntől független koproporfirinogén III oxidáz.

Új tudományos eredmény a 4.2. fejezet alapján:

II. tézis: A kőolaj/gázolaj keveréket tartalmazó dúsító tenyészetekkel folytatott molekuláris genetikai vizsgálatok rámutattak arra, hogy a kiváló alifás szénhidrogén-lebontó képességgel rendelkező *Rhododoccus* nemzetségbe tartozó baktériumok az általunk vizsgált dúsító tenyészetekben kizárólag tisztán aerob körülmények között váltak abundáns közösségalkotókká. Ezzel szemben mikroaerob körülmények között inkább az *Acinetobacter* és a *Pseudomonas* nemzetségbeli mikroszervezetek váltak dominánssá.

III. tézis: Metagenom szekvenálás és metagenom asszociált genom analízis segítségével sikerült a tudomány számára eddig ismeretlen és kitenyésztetlen, Moraxellaceae családba tartozó baktériumfajt azonosítani, amely rendelkezik az alkánok lebontásában kulcsszerepet játszó alkán-1 monooxigenáz génnel.

A 4.2. fejezet eredményeit az alábbi publikációban adtuk közre:

Révész, F., Figueroa-Gonzalez, P. A., Probst, A. J., Kriszt, B., Banerjee, S., Szoboszlay, S., Maróti, G., Tánicsics, A. (2019): Microaerobic conditions caused the overwhelming dominance of *Acinetobacter* spp. and the marginalization of *Rhodococcus* spp. in diesel fuel/crude oil mixture-amended enrichment cultures. *Archives of Microbiology* 202: 329-342.

4.3. Új, aromás szénhidrogének lebontására képes baktériumfaj (*Sphingobium aquiterrae* sp. nov.) leírása

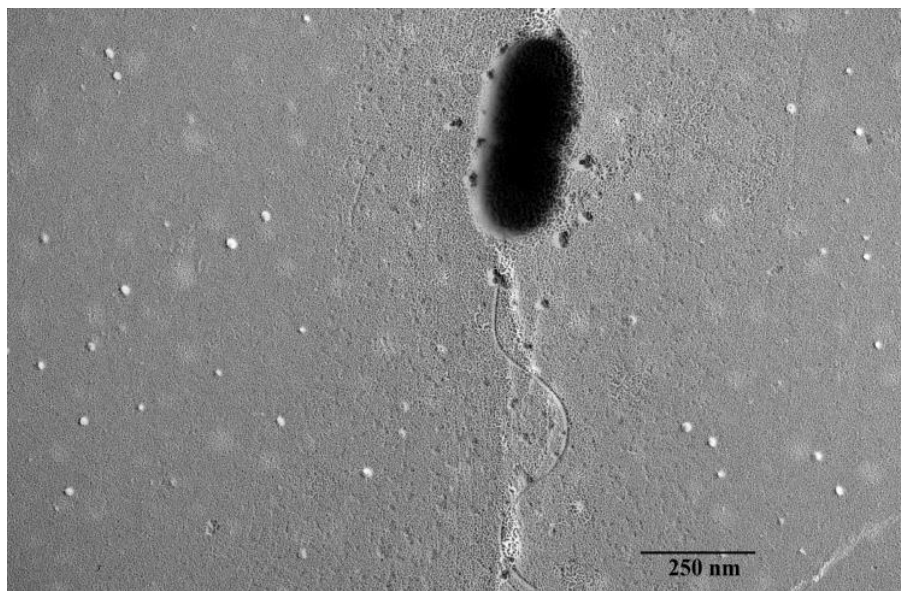
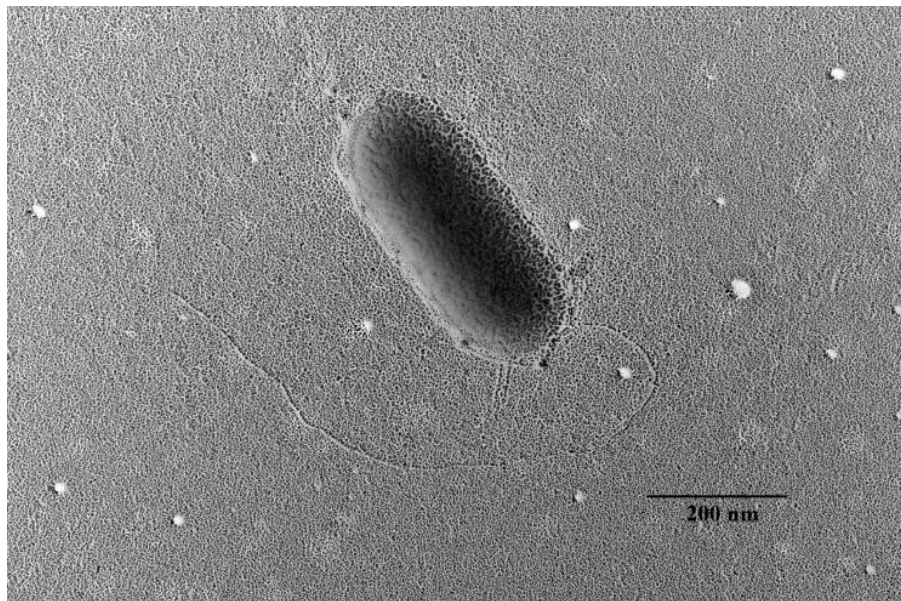
Általánosságban elmondható, hogy kutatásaink folyamán mindig igyekszünk a kőolajszármazékokkal szennyezett területekről érkező mintákból „megfogni”, azaz laborkörülmények között tenyésztésbe vonni a potenciálisan szénhidrogén-lebontó baktériumtörzseket. Ez lehetővé teszi metabolikus képességeik alaposabb megismerését, valamint egyes törzsek bioremediációs célokra történő felhasználását. Az általunk újonnan leírt baktériumtörzset (SKLS-A10^T) előkísérleteink során, egy kőolajszármazékokkal szennyezett, délnyugat magyarországi kárhelyről (Siklós) sikerült izolálnunk. A fő szennyezőforrások a területen a benzol, a xilolok, az etil-benzol és egyéb alkilbenzol vegyületek. Előzetes, 16S rDNS szekvencia alapú vizsgálataink alapján e törzs a *Sphingobium* nemzetség egy új fajaként volt azonosítható. A továbbiakban e törzs új fajként történő leírásához szükséges polifázikus vizsgálatsor eredményeit részletezem.

4.3.1. A *Sphingobium* nemzetség jellemzése

A *Sphingobium* nemzetség az Alfa-proteobaktériumok osztályába, azon belül pedig a Sphingomonadaceae családba tartozik. A molekuláris biológia fejlődésének köszönhetően a rokon fajok köre az elmúlt évtizedekben számos névváltoztatáson és átcsoportosításon ment keresztül. Az utolsó módosítás során filogenetikai és kemotaxonómiai vizsgálatokra alapozva a *Sphingomonas* nemzetséget a következő négy, különálló nemzetségre osztották: *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium*, *Sphingopyxis* (Takeuchi et al. 2001; Yabuuchi et al. 2002). A *Sphingobium* nemzetségnek minden tagja aerob, Gram-negatív, pálcika alakú, kemoorganotróf baktérium. Jellemző kemotaxonómiai vonásuk, hogy külső sejtmembránjuk lipopoliszacharid helyett glikoszfinbolipidet tartalmaz, melynek szerepe a sejtmembrán védelmében van. Sokféle környezetben megtalálhatóak, talajokban, óceánokban, tengeri üledékekben, sarkvidéki talajokban és növényi szövetekben is (Kertesz – Kawasaki 2010). A dolgozat megírásakor a nemzetség az általunk leírt fajjal együtt 42 hivatalosan közölt fajt tartalmazott. Számos közülük képes a szénhidrogének, például naftalin (Liang – Lloyd-Jones 2010), bifenil, meta-xilol, benzoát (Lloyd-Jones – Lau 1997), fenantrén (Pinyakong et al. 2003), néhány herbicid és peszticid (Önneby et al. 2014; Sipilä et al. 2010; Cai et al. 2015) lebontására.

4.3.2. Fenotípusos és kemotaxonómiai vizsgálatok

Az általunk izolált SKLS-A10^T törzs Gram-negatív, szigorúan aerob baktérium. Pálcika alakú sejtjei 0,4 µm szélesek és 0,7-1,1 µm hosszúságúak, egyetlen poláris flagellumukkal képesek a mozgásra (4.17. ábra). 3-4 napos, 25 °C fokon történő inkubációt követően R2A táplemezen halványsárga, kör alakú, sima szélű telepeket képez.



4.17. ábra: Transzmissziós elektronmikroszkóppal készült képek az újonnan izolált, SKLS-A10^T jelű törzsről, melyeken megfigyelhetők az általános morfológiai tulajdonságai és a poláris flagellum. A képek 24 órás inkubációt (28 °C fokon, R2A táplemezen) követően készültek (a képeket az ELTE Növény szervezettani Tanszékén Dr. Bóka Károly készítette).

Az SKLS-A10^T törzs hőmérséklet és pH tűrése igen tág határok között mozog, folyékony R2A tápoldatban 4 és 40 °C fok között, illetve 5 és 11 közötti pH tartományon volt képes a növekedésre. 1% (w/v), vagy afeletti NaCl koncentráció mellett nem növekedett. A leggyorsabb szaporodást 30 °C fokon, 7-es pH-n és a tápoldathoz adott NaCl hiányában tapasztaltunk.

Az oxidáz próbán negatív, a kataláz próbán pozitív reakciót mutatott. A további vizsgálatok során az SKLS-A10^T törzs metabolikus tulajdonságait a hozzá legközelebbi rokon fajok típus törzseivel hasonlítottuk össze. A legnagyobb 16S rDNS szekvencia hasonlóságot a *Sphingobium phenoxybenzoativorans* KCTC 42448^T (Cai et al. 2015), a *Sphingobium abikonense* DSM 23268^T és a *Sphingobium lactosutens* DSM 23389^T (Kumari et al. 2009) törzsekkel mutatta. Az SKLS-A10^T törzs az API ZYM teszten nagyfokú enzimatis aktivitást mutatott, ezzel szemben a 21-féle biokémiai szubsztrát lebontási képességét vizsgáló API 20NE teszten mindössze a D-glükóz hasznosítását tudtuk megfigyelni. A szénhidrátok lebontását vizsgáló API 50CH teszten az SKLS-A10^T törzs csak a *S. phenoxybenzoativorans* KCTC 42448^T típus törzsnél mutatott szélesebb körű bontási képességet. Ezeknek a fenotípusos és biokémiai jellemzőket vizsgáló teszteknek az eredményeit a 4.2. táblázatban látjuk összesítve.

4.2. táblázat: Az (1) SKLS-A10^T törzs és a legközelebbi rokon típus törzsek, (2) *Sphingobium phenoxybenzoativorans* KCTC 42448^T, (3) *Sphingobium abikonense* DSM 23268^T és (4) *Sphingobium lactosutens* DSM 23389^T fenotípusos és biokémiai tulajdonságainak összehasonlítása. (+: pozitív; -: negatív; gy: gyenge pozitív)

Fenotípusos tulajdonságok	1	2	3	4
Telep színe	Halvány sárga	Sárga	Sárga	Sárga
Hőmérséklet tolerancia (°C)	4-40	15-40	20-37	20-37
pH tolerancia	5-11	6-9	6-10	6-10
NaCl tolerancia (w/v)	0%	0,5%	5%	5%
Enzimaktivitás (API ZYM):				
Észteráz (C4)	+	+	-	+
Észteráz lipáz (C8)	+	+	-	+
Cisztin-arilamidáz	+	-	-	-
α-kimotripszin	+	-	-	-
β-galaktózidáz	-	-	+	+
β-glükuronidáz	-	-	-	+
α-glükózidáz	-	+	-	+
β-glükózidáz	+	+	-	-
Biokémiai szubsztrátok hasznosítása (API 20NE):				
Eszkulin-vas-citrát	-	+	+	+
L-arabinóz	-	-	+	+
D-maltóz	-	-	+	+

Kálium-glükonát	-	-	+	-
Almasav	-	+	+	+
Trinátrium-citrát	-	-	+	+
Fenilecetsav	-	+	-	-
Szénhidrát hasznosítás (API 50CH):				
L-arabinóz	+	-	+	+
D-xilóz	+	-	+	+
L-ramnóz	+	-	+	-
Amigdalín	gy	-	+	-
Cellobióz	-	+	+	+
Maltóz	-	-	+	+
Trehalóz	-	+	+	+
Keményítő	-	-	+	+
Fukóz	-	-	+	+

Mivel az SKLS-A10^T jelű törzset BTEX-vegyületekkel szennyezett talajvízből izoláltuk, megvizsgáltuk, hogy mely monoaromás vegyületek lebontására képes. A vizsgálat során a BTEX komponenseket külön-külön, egyedileg alkalmaztuk egyedüli szénforrásként. Azt találtuk, hogy hatékonyan képes lebontani a toluolt, a *meta*- és *para*-xilolt (8.3. számú melléklet).

4.3.3. Az SKLS-A10^T törzs kemotaxonómiai jellemzése

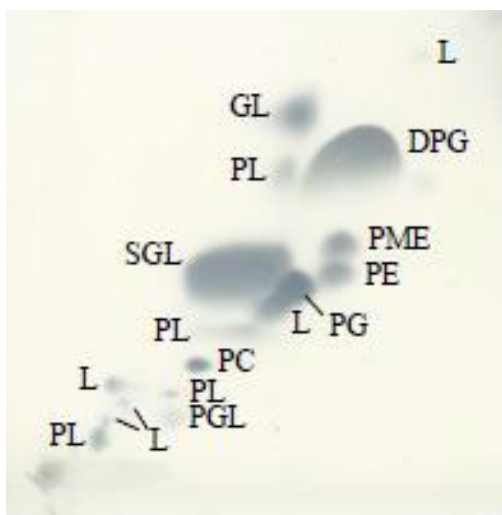
Hasonlóan a *Sphingobium* nemzetség többi tagjához, az SKLS-A10^T törzs sejtmembránja a következő fő zsírsavakat tartalmazza: C_{18:1}ω_{7c}, C_{14:0} 2-OH, C_{16:1}ω_{7c}/iso C_{15:0} 2-OH, C_{17:1}ω_{6c} és C_{16:0} (4.3. táblázat). Összehasonlítva a legközelebbi rokon fajok típustörzseivel, különbségek a zsírsavak mennyiségében adódtak. Az SKLS-A10^T törzs a többi törzshöz képest többet tartalmazott a C_{14:0} 2-OH zsírsavból, míg a C_{18:1}ω_{7c} zsírsavból kevesebbet.

4.3. táblázat: Az (1) SKLS-A10^T törzs és a legközelebbi rokon típus-törzsek, (2) *Sphingobium phenoxybenzoativorans* KCTC 42448^T, (3) *Sphingobium abikonense* DSM 23268^T és (4) *Sphingobium lactosutens* DSM 23389^T zsírsavprofiljának összehasonlítása. (Az adatok százalékos megoszlást fejeznek ki. -, Nem detektált.)

Zsírsav	1	2	3	4
Telített zsírsavak				
C _{16:0}	6,3	7,3	6,8	8,5
Telítetlen zsírsavak				
C _{16:1} ω5c	1,5	1,5	2,0	1,5
C _{17:1} ω6c	6,6	3,1	2,7	5,7
C _{18:1} ω7c	55,7	66,0	65,8	60,4
C _{18:1} ω5c	0,8	1,4	1,4	1,7
Hidroxi zsírsavak				
C _{14:0} 2-OH	12,8	9,7	6,5	8,5
C _{15:0} 2-OH	1,5	-	0,3	0,9
Methyl				
C _{18:1} ω7c 11-methyl	1,9	1,8	2,7	2,3
Nem elváló zsírsavak*				
3	9,0	8,9	10,4	8,0

*A nem elváló zsírsavak olyan zsírsav együttesek, amelyek olyan két vagy három zsírsavat tartalmaznak, amelyek a gázkromatográfiás mérés során nem különíthetők el egymástól a kromatogramon. A "3"-as jelű csoport összetétele: C_{16:1}ω7c és/vagy iso-C_{15:0} 2-OH.

A sejtmembránban előforduló fő poláris lipidek a szfingoglikolipid és a difoszfátidil-glicerin voltak (4.18. ábra).

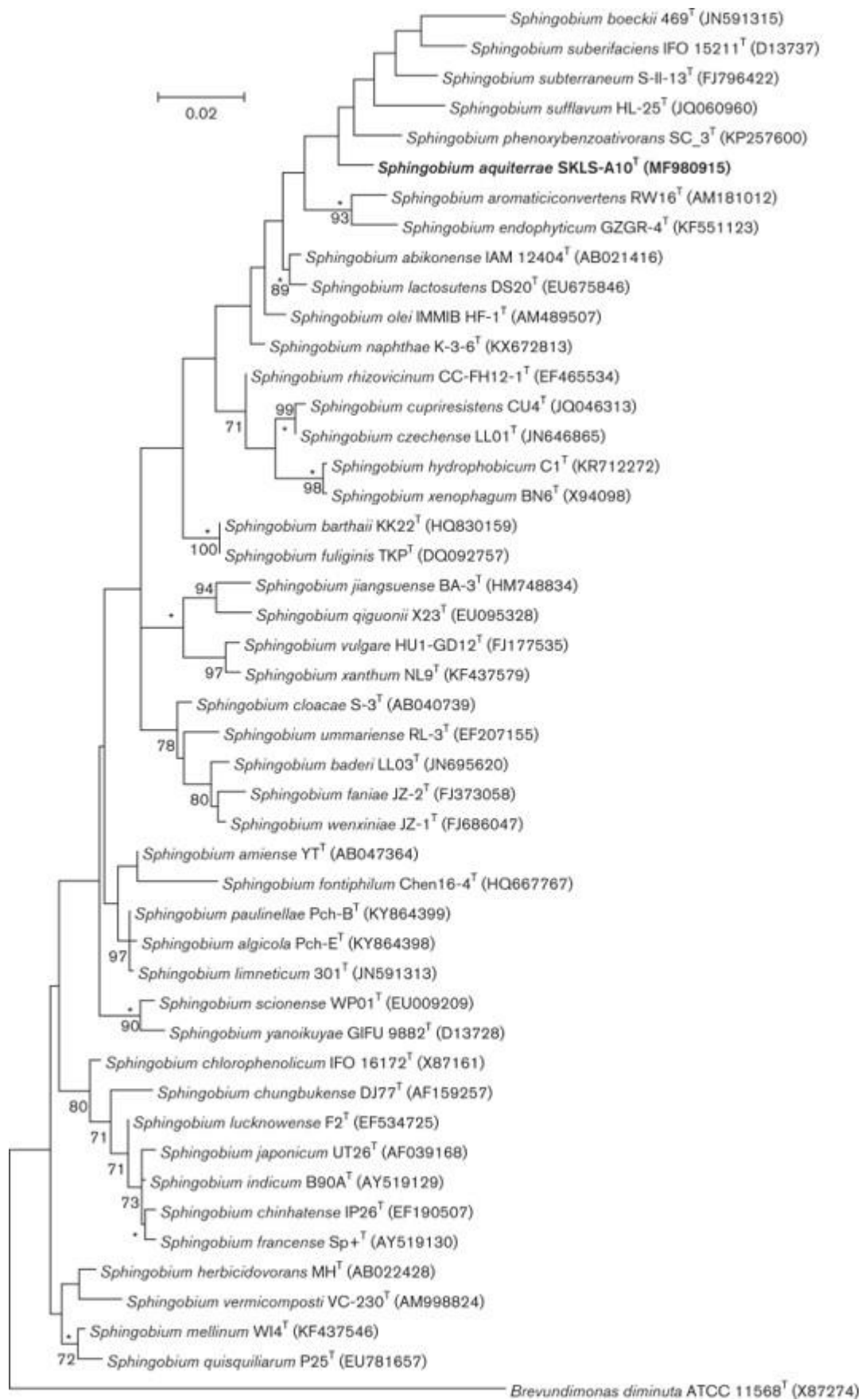


4.18. ábra: Az SKLS-A10^T sejtmembránjában előforduló fő poláris lipidek: SGL, szfingoglikolipid; DPG, difoszfátidil-glicerin; PG, foszfátidil-glicerin; GL, glikolipid, L, lipid; PL, foszfolipid; PC, foszfatidilkolin; PE, foszfatidil-etanol-amin; PGL, foszfoglikolipid; PME, foszfatidil-monometil-etanol-amin.

Az SKLS-A10^T törzs DNS-ének guanin és citozin tartalma 65,9 mol% volt. A poliamin mintázatot megvizsgálva az találtuk, hogy a fő vegyület a spermidin, illetve tartalmazott nyomnyi mennyiségű spermint, ami a nemzetség tagjainak jellemző vonása (Takeuchi et al. 2001; Busse et al. 1999). Összességében a kemotaxonómiai eredmények megegyeztek a *Sphingobium* nemzetség többi tagjának értékeivel (Takeuchi et al. 2001).

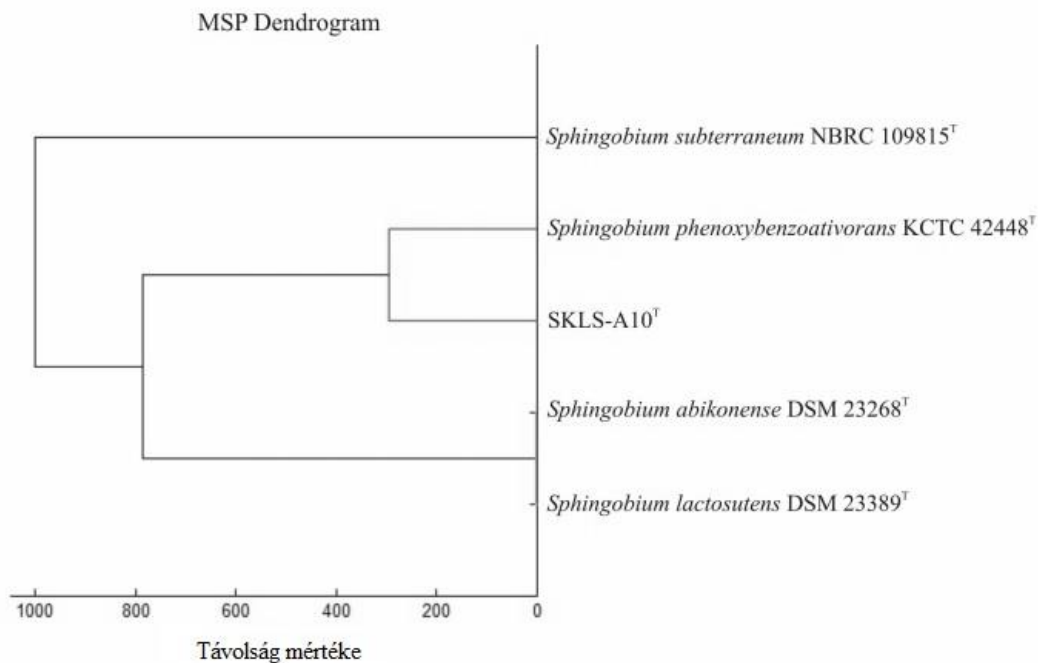
4.3.4. Az SKLS-A10^T törzs filogenetikai elhelyezkedése

Az SKLS-A10^T törzs 1409 bázispár hosszúságban feltárt 16S rRNS gén szekvenciája alapján legnagyobb hasonlóságot a *S. abikonense* (97,29%), ezt követően a *S. lactosutens* (97,23%) és a *S. phenoxybenzoativorans* (97,16%) fajok típus törzseivel mutatta. A *Sphingobium* nemzetségbe tartozó összes többi baktériummal 97% alatti volt a hasonlóság. A „maximum-likelihood” módszerrel készült filogenetikai fán az általunk izolált törzs jól elkülönül a nemzetség többi fajától (4.19. ábra). Proteobaktériumok esetében, ha a leírandó faj a legközelebbi rokon fajokkal 98,7%, vagy afeletti hasonlóságot mutat, DNS-DNS hibridizációra van szükség (Meier-Kolthoff et al. 2013b). Az SKLS-A10^T esetében ez 97,2% körül adódott, így a vizsgálttól eltekintettünk.



4.19. ábra: Az SKLS-A10^T törzs filogenetikai elhelyezkedését mutató, „maximum-likelihood” módszerrel készült fa. Az adatok a nemzetségbe tartozó fajok típusörzseinek 16S rDNS szekvenciáin alapulnak.

Mátrix által segített, lézereszorpciós ionizáció repülési időn alapuló analizátorral, tömegspektrometriás technológiát alkalmazva (MALDI-TOF MS) Tóth és munkatársai (2008) által leírt módon fehérje analízist végeztünk. Az eredményül kapott dendrogramon jól látszik, hogy az SKLS-A10^T törzs és a vele legközelebbi rokon típus törzsek jól elkülönülnek egymástól (4.20. ábra).



4.20. ábra: Az SKLS-A10^T és a vele legközelebbi rokon típus törzsek fő spektrumprofilokon (main spectra profile, MSP) alapuló dendrogramja. Az izolátumok közötti relatív távolság jelölése az ábrán: a 0 jelenti a teljes hasonlóságot, az 1000 a teljes eltérést.

A filogenetikai és kemo-taxonómiai vizsgálatok eredményeiből jól látszik, hogy az SKLS-A10^T jelű törzs a *Sphingobium* nemzetségen belül egy új fajt képvisel, melynek a *Sphingobium aquiterrae* nevet adtuk.

Új tudományos eredmény a 4.3. fejezet alapján:

IV. tézis: Sikertült egy, a tudomány számára új, *Sphingobium* nemzetséghez tartozó baktériumtörzset izolálnunk, melynek leírásához szükséges vizsgálatokat a nemzetközi követelményeknek megfelelően elvégeztük. Gázkromatográffal kapcsolt tömegspektrometria (GC-MS) segítségével igazoltuk, hogy aerob körülmények között a törzs képes a toluol, a *meta*- és *para*-xilol teljes lebontására. Az új fajnak a *Sphingobium aquiterrae* nevet adtuk.

A 4.3. fejezet eredményeit az alábbi publikációban adtuk közre:

Révész, F., Tóth, E.M., Kriszt, B., Bóka, K., Benedek, T., Sárkány, O., Nagy, Zs., Tánicsics, A. (2018): *Sphingobium aquiterrae* sp. nov., a toluene-, meta- and para-xylene degrading bacterium isolated from BTEX-contaminated groundwater. *Int J Syst Evol Microbiol*, 68:2807-2812.

5. Következtetések

A szénhidrogének lebontása megfelelő mennyiségű (7-8 mg/L) oldott oxigén jelenlétében megy végbe leggyorsabban és így a legteljesebb. Azonban a szennyezett felszín alatti közegekben a mikrobiális aktivitás megnövekedése miatt gyakran alakul ki mikroaerob ($\leq 0,5$ mg/L oldott oxigén koncentráció) vagy akár anaerob környezet. Az úgynevezett „csóvaperem” elmélet (eredeti nyelven „plume fringe concept”, Meckenstock et al. 2015) szerint jelentős mértékű lebontás csak a szennyezési csóva széleit övező rétegben figyelhető meg. A talajvíz mozgása csupán ezen a pár centiméteren biztosítja a mikrobák anyagcseréjéhez szükséges elektronakceptorokat (oxigén, nitrát, szulfát). A csóva belsejében ezzel szemben jellemzően erősen redukált zónák alakulnak ki, ahol vasredukáló és metanogén mikroszervezetek találják meg életfeltételeiket, azonban ezek a mikrobák a szénhidrogének lebontásában igen kis szerepet játszanak. Emberi léptékkal mérve, oldott oxigén hiányában a lebontás rendkívül lassú folyamat. Ma már ismert, hogy a benzol aerob lebontása akár nyomnyi mennyiségű oxigén jelenlétében is végbemegy (Yerushalmi et al. 2002; Aburto et al. 2009), illetve hogy egyes, a lebontásban kulcsszerepet játszó enzimek génjei mikroaerob körülmények között is átíródnak (Táncsics et al. 2012). Táncsics és munkatársai (2010) kimutatták, hogy az I.2.C alcsaládba tartozó katekol 2,3-dioxigenáz (C23O) enzimek nagy diverzitással vannak jelen a szénhidrogénekkal szennyezett felszín alatti közegekben. 2013-ban pedig egy olyan I.2.C alcsaládra specifikus, többszörösen degenerált primerpárt terveztek (Táncsics et al. 2013), melynek segítségével további genotípusok kimutatása vált lehetővé.

Számos kutatás bizonyította, hogy a szénhidrogénekkal szennyezett közegek mikrobaközösségét jellemzően a Betaproteobacteriales rend tagjai, azon belül is a Comamonadaceae és Rhodocyclaceae család nemzetségei uralják (Alfreider et al. 2002; Fahy et al. 2006; Alfreider – Vogt, 2007; Nestler et al. 2007, Martínez-Lavanchy et al. 2015). A szénhidrogének lebontásában résztvevő funkciógéneket azonban nem sikerült egyértelműen ismert baktériumfajokhoz kötni, illetve kérdéses volt az is, hogy az I.2.C típusú C23O gének megléte a genomban egyértelműen bizonyítja-e, hogy az adott törzs képes a mikroaerob körülmények közötti szénhidrogén-lebontásra. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy faji összetétel, illetve metabolikus képességek terén milyen mértékben térnek el egymástól az aromás és alifás szénhidrogének lebontásában szerepet játszó mikroba közösségek aerob és a mikroaerob körülmények között.

Dúsítási kísérleteink során jelentős különbségeket tudtunk felfedezni az aerob és a mikroaerob dúsítók mikrobaközösségének összetételében és a vizsgált funkciógének diverzitásában. Első kísérletünk során aerob és mikroaerob dúsítókat hoztunk létre, melyekhez egyedüli szén- és energiaforrásként benzolt vagy toluolt adtunk, kiindulási mintaként egy

korábban is vizsgált, szénhidrogénnel szennyezett területről származó biofilm minta szolgált. Az aerob, benzollal kiegészített dúsítókat főként a Betaproteobacterales rendbe tartozó *Malikia* nemzetség uralta, melynek két, *Malikia spinosa*-hoz köthető törzsét (99,7% és 99,9%-os 16S rDNS szekvencia hasonlóság) izolálni is sikerült a mintákból. Annak ellenére, hogy a nemzetség tagjai igen gyakori képviselői a szénhidrogénnel szennyezett területek mikrobaközösségének, a szakirodalomban nem találtunk olyan adatot, amelyben szennyezett területről sikerült volna tenyésztésbe is vonni őket. Az általunk izolált *M. spinosa* AB6 jelű törzs képes volt a benzol, a toluol és az etilbenzol aerob biodegradációjára. Feltárva a törzs teljes genomját lehetőségünk adódott alaposabban megvizsgálni annak metabolikus képességeit, illetve összevetni tulajdonságait a faj típustörzsével. A típustörzshöz képest az AB6-os törzs genomja 300 kilobázissal nagyobbnak bizonyult, amely elsősorban az aromás szénhidrogének lebontásában szerepet játszó gének feldúsulásának köszönhető. Az általunk izolált törzs rendelkezik az I.2.C típusú C23O génnel is, amely a fenol lebontásában szerepet játszó génklaszterben helyezkedik el. A klasztert mozgékony genetikai elemek határolják, melyből arra következtethetünk, hogy a törzsbe horizontális géntranszfer útján kerülhetett. Bár az AB6-os törzs rendelkezik az I.2.C típusú C23O génnel, a *M. spinosa*-t csak az aerob dúsítókból tudtuk kimutatni. A törzs nem rendelkezik olyan génnel, amellyel a benzolgyűrűt képes lenne mikroaerob körülmények között hidroxilálni, mely nélkül az aromás vegyületek mikroaerob lebontása sem kezdődhet meg. A kutatás alátámasztotta a korábbi feltételezéseket (Táncsics et al. 2010, Benedek et al. 2018), miszerint a *Malikia* nemzetségbe tartozó baktériumok a szénhidrogénnel szennyezett területeken részt vesznek a BTEX-vegyületek lebontásában, azonban kizárólag aerob környezetben. Fény derült arra is, hogy az I.2.C típusú C23O gén megléte nem jelenti feltétlenül azt, hogy az adott baktérium képes a monoaromás vegyületek mikroaerob körülmények közötti lebontására. Ráadásul, a *Malikia spinosa* AB6-os törzs teljes genomjának elemzése alapján elmondhatjuk, hogy az I.2.C típusú C23O gének horizontális géntranszfer útján könnyedén terjedhetnek a Betaproteobacterales rend tagjai között.

Mikroaerob körülmények között a benzollal és a toluollal kiegészített dúsítókat is a *Pseudomonas* nemzetséghez köthető baktériumok uralták. A benzollal kiegészített dúsítókból a közösség nem volt képes a szénforrás lebontására, azonban a toluol fogyasztását sikerült kimutatni. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a *Pseudomonas* nemzetségnek egy köre (a *P. veronii/extremaustralis* leszármazási vonal) sikeresen adaptálódott az oxigénlimitált körülményekhez.

Második dúsítási kísérletünkben ismét aerob és mikroaerob dúsító tenyészeteket hoztunk létre, azonban egyedüli szén- és energiaforrásként kőolaj/gázolaj keveréket alkalmaztunk. Megvizsgáltuk, hogy az oxigénlimitáció milyen hatással van a baktériumközösségek

kialakulására, illetve az alkánok lebontásában kulcsszerepet játszó alkán-1 monooxygenáz gének (*alkB*) diverzitására.

Az aerob és mikroaerob dúsító tenyészetek mikrobaközösségeinek kutatásunk során feltárt különbségei a jövőben hasznos információval szolgálhatnak a szénhidrogénekkal szennyezett közegek bioremediációja során. Láttuk, hogy a *Rhodococcus* nemzetséghez tartozó baktériumok kizárólag aerob környezetben tudtak jelentősen felszaporodni. Ez a megfigyelés azért is fontos, mivel diverz metabolikus képességeik miatt a nemzetség tagjait előszeretettel alkalmazzák szénhidrogénekkal szennyezett területek kármentesítésére (Kuyukina – Ivshina 2010, Kis et al. 2017). Ezzel szemben a mikroaerob környezet az *Acinetobacter* és *Pseudomonas* nemzetségek képviselőinek kedvezett. A mikroaerob dúsító tenyészetekben a dominánsan jelenlévő *alkB* gének a *Pseudomonas* nemzetséghez, azon belül is a *P. veronii*-hoz köthetőek. Mivel tudjuk, hogy az igen közeli rokon *P. extremaustralis* az alkánokat mikroaerob körülmények között bontja, feltételezhető, hogy a *Pseudomonas* fajok egy bizonyos csoportja ezekhez az oxigénlimitált körülményekhez adaptálódott, így fontos szerepük lehet az alkánok felszín alatti közegekben történő lebontásában. Az aerob dúsító tenyészetek közül kettőben olyan *alkB* gén vált dominánssá, amelyet nem lehetett ismert baktériumfajhoz kötni. Metagenom szekvenálással és bioinformatikai alkalmazások segítségével sikerült egy Moraxellaceae családba tartozó, ez idáig kitenyésztetlen baktériumfaj genomját felépíteni, így fény derült arra is, hogy az eddig ismeretlen, domináns *alkB* gén ehhez a baktériumfajhoz tartozik. A jelen kutatás rávilágított arra, hogy ismereteink az alkán-lebontó baktériumokról még mindig hiányos.

Kutatásaink során mindig szem előtt tartjuk, hogy lehetőleg minél több olyan baktériumfajt vonjunk tenyésztésbe, amely képes a szénhidrogének lebontására. Tenyésztéses előkísérletünk során sikerült is egy, a tudomány számára új, *Sphingobium* nemzetséghez tartozó baktériumtörzset izolálnunk, melyről igazoltuk, hogy aerob körülmények között a törzs képes a toluol, a *meta*- és *para*-xilol teljes lebontására. Az új fajnak a *Sphingobium aquiterrae* nevet adtuk.

6. Összefoglalás

Az egyszerű aromás szénhidrogének, mint a rákkeltő benzol, illetve a toluol, az etil-benzol és a xilolok (összefoglalóan BTEX-vegyületek), valamint az alifás szénhidrogének a leggyakoribb szennyezők közé tartoznak a világon és hazánkban egyaránt. A talajvízbe jutva veszélyeztethetik ivóvízbázisainkat és komoly károkat okozhatnak a helyi ökoszisztémában. Biodegradációjuk aerob módon megy végbe a leggyorsabban, azonban a mélyen fekvő, szennyezett földtani közegekben az anyagcseréhez szükséges oldott oxigén mennyisége általában limitáltan van jelen. Ezekben az esetekben a lebontásban azok a baktériumok játszhadják a kulcsszerepet, amelyek speciális enzimszisztémájuk révén képesek alkalmazkodni a szénhidrogének hipoxikus körülmények közötti lebontásához. Kutatásunk során azt vizsgáltuk, hogy az oxigénlimitáció milyen hatással van a baktériumközösségek kialakulására, valamint a lebontásban szerepet játszó funkciógének diverzitására. Ehhez két kísérletet végeztünk el, egyikben monoaromás, a másikban alifás szénhidrogének lebontását vizsgáltuk aerob és mikroaerob dúsító tenyészetek segítségével.

Első kísérletünkben az aerob és mikroaerob dúsítókhoz benzolt vagy toluolt adtunk egyedüli szén- és energiaforrásként a baktériumok számára. A mikrobaközösséget minden esetben a Gamma-proteobaktériumok, azon belül is a Betaproteobacteriales rend tagjai uralták. Az aerob, benzollal kiegészített dúsítókat főként a *Malikia* nemzetség uralta, melynek egyik tagját izolálni is sikerült a mintákból. Vizsgálataink alapján a *M. spinosa*-hoz köthető törzs aerob körülmények között képes a benzol, a toluol és az etilbenzol biodegradációjára. Teljes genomjának feltárásával kiderült, hogy a szénhidrogének lebontásáért felelős gének horizontális géntranszfer útján kerülhettek a baktériumba. Habár a törzs rendelkezik az I.2.C alcsaládba tartozó katekol 2,3-dioxigenáz (C23O) génnel, csak az aerob dúsítóknál lehetett e baktériumot kimutatni. Ezzel egyértelművé vált, hogy az I.2.C alcsaládba tartozó C23O gének meglétéből nem következik egyértelműen, hogy az adott baktérium képes az aromás vegyületek mikroaerob körülmények közötti lebontására. Mikroaerob körülmények között mind a benzol- mind a toluol-lebontó dúsítókat a *Pseudomonas* nemzetség uralta. A nemzetségnek egyes tagjai képesek voltak alkalmazkodni a toluol oxigénlimitált körülmények közötti lebontásához is.

Az alifás szénhidrogének aerob és mikroaerob körülmények közötti lebontásának vizsgálatához a dúsítókhoz egyedüli szén- és energiaforrásként kőolaj/gázolaj keveréket adtunk. A mikrobaközösséget ez esetben is a Betaproteobacteriales rend tagjai uralták mind az aerob, mind a mikroaerob dúsítóknál. Az aerob dúsítóknál olyan nemzetségek voltak a leggyakoribbak, mint a *Polaromonas*, a *Pseudomonas*, az *Acidovorax* és a *Rhodococcus*. A széleskörű metabolikus képességekkel rendelkező *Rhodococcus* nemzetség a mikroaerob dúsítóknál jelentősen visszaszorult, helyette az *Acinetobacter* nemzetség vált uralkodóvá. Megvizsgáltuk az alkánok

lebontását katalizáló alkán-1 monooxigenáz gének (*alkB*) diverzitását is és azt találtuk, hogy a mikroaerob dúsítókban az *alkB* gének nagy része a *Pseudomonas veronii* baktériumfajhoz köthető. Közele rokonáról, a *P. extremaustralis*-ről tudjuk, hogy mikroaerob körülmények között képes az alkánok lebontására. Egyes aerob dúsítókban olyan *alkB* genotípust sikerült kimutatni, melyet kezdetben nem lehetett ismert baktériumfajhoz kötni. Metagenom szekvenálással és bioinformatikai alkalmazások segítségével kiderült, hogy ez a genotípus egy ez idáig ismeretlen és kitenyésztetlen, Moraxellaceae családba tartozó baktériumfajhoz köthető. Látjuk tehát, hogy a molekuláris biológiai és bioinformatikai alkalmazások fejlődésével eddig ismeretlen területek feltárására nyílik lehetőségünk a környezeti mikrobiológia kutatásában.

Kutatásaink közben mindig igyekszünk olyan baktériumokat tenyésztésbe vonni, amelyek alkalmasak lehetnek bioremediációs célokra. Vizsgálataink során egy szénhidrogénnel szennyezett kárhelyről sikerült is egy, a tudomány számára ismeretlen, *Sphingobium* nemzetségbe tartozó baktériumfajt izolálni, amely képes a toluol, a meta- és para-xilol teljes biodegradációjára. A fajt *Sphingobium aquiterrae* néven írtuk le.

7. Summary

Simple aromatic hydrocarbons such as carcinogenic benzene, toluene, ethylbenzene and isomers of xylene (BTEX), or aliphatic hydrocarbons are among the most common pollutants in the world, as well as in Hungary. Released into the environment, they may threaten drinking water supplies and can cause serious damage to the local groundwater ecosystems. The most rapid biodegradation can be observed under aerobic conditions; however, in polluted subsurface environments, the availability of dissolved oxygen is often limited. Certain groups of bacteria that could adapt to these environments via their special enzyme system may play a key role in the decomposition of hydrocarbons under hypoxic conditions. The aim of the present study was to reveal the effect of oxygen limitation on the formation of bacterial communities and the diversity of functional genes involved in degradation. Accordingly, aerobic and microaerobic bacterial enrichments amended with monoaromatic or diesel fuel/crude oil mixture were established and investigated.

In our first experiment, aerobic and microaerobic enrichments were set up and amended with benzene or toluene as sole carbon and energy source for bacteria. The overwhelming dominance of Gammaproteobacteria, including members of the order Betaproteobacteriales was observed in every case. Aerobic enrichments amended with benzene were dominated mainly by the *Malikia* genus, and members of this genus were successfully isolated. Our investigations revealed that the *M. spinosa* AB6 strain can degrade benzene, toluene and ethylbenzene under clear aerobic conditions. Whole-genome analysis of *M. spinosa* strain AB6 revealed that genes responsible for the biodegradation of hydrocarbon was acquired by the strain through a horizontal gene transfer event. Despite harboring a subfamily I.2.C-type catechol 2,3-dioxygenase (C23O) gene, *M. spinosa* was found only in the aerobic enrichments. This observation revealed that bacteria encoding subfamily I.2.C-type extradiol dioxygenase enzyme will not be automatically able to degrade monoaromatic hydrocarbons under microaerobic conditions. Under microaerobic conditions, both benzene- and toluene-degrading microcosms were dominated by the genus *Pseudomonas*. Some members of the genus were able to adapt to the degradation of toluene under oxygen-limited conditions.

To reveal the effect of oxygen limitation on the structure of oil-degrading bacterial communities, fully aerobic and microaerobic enrichment microcosms were set up. The microbial community was dominated by Betaproteobacteriales in both aerobic and microaerobic enrichments. The most abundant genera in aerobic enrichments were *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Acidovorax* and *Rhodococcus*. The genus *Rhodococcus*, which has enormous metabolic diversity,

has been significantly repressed in microaerobic enrichments, and the genus *Acinetobacter* became dominant. Investigating the diversity of alkane-1 monooxygenase (*alkB*), it was revealed that the vast majority of *alkB* gene sequences could be linked to *Pseudomonas veronii*. It is known that its close relative, the *P. extremaustralis*, can degrade alkanes under microaerobic conditions. A yet unknown but abundant *alkB* genotype was recovered from the aerobic enrichment and was linked to a yet uncultivated member of the family Moraxellaceae by genome binning. Thus, we see that with the development of molecular biology and bioinformatics applications, we have the opportunity to explore previously unknown areas in the research of environmental microbiology.

During our research, the permanent goal was to collect bacterial strains that may be suitable for bioremediation purposes. In our preliminary experiment, we successfully isolated an unknown species of bacteria belonging to the genus *Sphingobium* from a hydrocarbon-contaminated site. This strain was able to degrade toluene, *meta*- and *para*-xylene. The species was described as *Sphingobium aquiterrae*.

8. Mellékletek

8.1. Irodalomjegyzék

1995. évi LIII. törvény a környezet védelmének általános szabályairól
219/2004. (VII. 21.) Kormányrendelet a felszín alatti vizek védelméről
6/2009. (IV. 14.) „A földtani közeg és a felszín alatti víz szennyezéssel szembeni védelméhez szükséges határértékekről és a szennyezések méréséről” című KvVM-EüM-FVM együttes rendelet
- Abbasian, F., Lockington, R., Megharaj, M., Naidu, R. (2015): A review on the genetics of aliphatic and aromatic hydrocarbon degradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 178:224–250.
- Abraham, W. R., Wenderoth, D. F., Glasser, W. (2005): Diversity of biphenyl degraders in a chlorobenzene polluted aquifer. *Chemosphere* 58:529-33.
- Aburto, A., Ball, A. S. (2009): Bacterial population dynamics and separation of active degraders by stable isotope probing during benzene degradation in BTEX-impacted aquifer. *Rev Int Contam Ambient* 25: 147–156.
- Aburto, A., Fahy, A., Coulon, F., Lethbridge, G., Timmis, K.N., Ball, A.S., McGenity, T.J. (2009): Mixed aerobic and anaerobic microbial communities in benzene-contaminated groundwater. *J Appl Microbiol* 106(1): 317-328.
- Aburto, A., Peimbert, M. (2011): Degradation of a benzene-toluene mixture by hydrocarbon-adapted bacterial communities. *Ann Microbiol* 61: 553–562.
- Alfreider, A., Vogt, C. (2007): Bacterial diversity and aerobic biodegradation potential in a BTEX-contaminated aquifer. *Water Air and Soil Pollution* 183:415–426.
- Alfreider, A., Vogt, C., Babel, W. (2002): Microbial diversity in an in situ reactor system treating monochlorobenzene contaminated groundwater as revealed by 16S ribosomal DNA analysis. *Syst Appl Microbiol* 25:232–40.
- Alvarez, P. J., Vogel, T. M. (1991): Substrate interactions of benzene, toluene, and paraxylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. *Appl Environ Microbiol* 57:2981-2985.
- Atlas, R. M. (1981): Fate of oil from two major oil spills: role of microbial degradation in removing oil from the Amoco Cadiz and IXTOC I spills. *Environ Int* 5:33-38.
- Atlas, R. M. (1991): Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills. *J Chem Technol Biotechnol* 52:149-156.

- Atlas, R. M., Bartha, R. (1972): Biodegradation and Mineralization of Petroleum in Seawater at Low Temperature. *Can J Microbiol* 18:1851-1855.
- Atlas, R. M., Hazen, T. C. (2011): Oil biodegradation and bioremediation: A tale of the two worst spills in U.S. history. *Environ Sci Technol* 45:6709-6715.
- ATSDR (2004): Interaction profile for: Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes (BTEX). 154 p., 68. p. (<https://www.atsdr.cdc.gov/interactionprofiles/ip05.html>)
- Attaway, H., Schmidt, M. (2002): Tandem biodegradation of BTEX components by two *Pseudomonas* sp. *Current Microbiology* 45: 30-6.
- Andreoni, V., L. Cavalca, M. A. Rao, G. Nocerino, S. Bernasconi, E. Dell'Amico, M. Colombo és L. Gianfreda (2004): Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere* 57:401-12.
- Antus, S., Mátyus, P. (2005): Szénhidrogének. In: Szerves kémia II. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 443 p. 137-207. p.
- Ashraf, W., Mihdhir, A., Murrell, J. C. (1994): Bacterial oxidation of propane. *FEMS Microbiol Lett*, 122: 1-6. p.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formosa, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G. D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., Zagnitko, O. (2008): The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9:75.
- Czarny, J., Staninska-Pięta, J., Piotrowska-Cyplik, A., Juzwa, W., Wolniewicz, A., Marecik, R., Ławniczak, Ł., Chrzanowski, Ł. (2019): *Acinetobacter* sp. as the key player in diesel oil degrading community exposed to PAHs and heavy metals. *J Hazard Mater* 383:121168. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121168>
- Banat, I.M. (1995): Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. *Bioresource Technology*, 51: 1-12.
- Baross, N., Bata, K., Béres, A., Berndt, M., Bíró, M., Cser, G. V., Csiffáry, N., Csóka, Gy., Danyik, T., Deák, G., Szalóki, J., Farkas, A., Hollósy, M., Horváth, M., Ilyés, E., Jánossy, L., Kemencei, Z., Kiss, G., Koplányi, N., Korbély, B., Kovács, G. P., Laczkó, B., Marsi, E., Márton, B., Márton, Zs., Máta, B., Mózer, L., Nagy, G. G.r, Nyári, E., Páldy, A., Papp, M., Balogh, I., Prommer, M., Riesz, L., Szelényi, B., Szóráth, Z., Tar, Gy., Tóth, K., Váczi, O., Weiperth, A. (2015): Magyarország Környezeti Állapota 2015. *Herman Ottó Intézet*, Budapest, 19-25. p.
- Barótfi, I. (2000): Környezettechnika. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 571-588. p.

- Barrow, G. I., Feltham, R. K. A. (2004): Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, 3rd ed. Cambridge: *Cambridge University Press*
- van Beilen, J. B., Panke, S., Lucchini, S., Franchini, A. G., Röthlisberger, M., Witholt, B. (2001): Analysis of *Pseudomonas putida* alkane degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the *alk*-genes. *Microbiology* 147: 1621-1630. p.
- van Beilen, J. B., Li, Z., Duetz, W. A., Smits, T. H. M., Witholt, B. (2003): Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil Gas Sci Technology*, 58: 427-440. p.
- van Beilen, J. B., Holtackers, R., Luscher, D., Bauer, U., Witholt, B., Duetz, W. A. (2005): Biocatalytic production of perillyl alcohol from limonene by using a novel *Mycobacterium* sp. cytochrome P450 alkane hydroxylase expressed in *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* 71, 1737-1744. p.
- van Beilen, J. B., Funhoff, E. G., van Loon, A., Just, A., Kaysser, L., Bouza, M., Holtackers, R., Röthlisberger, M., Li, Z., Witholt, B. (2006): Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases. *Appl Environ Microbiol* 72, 59-65. p.
- Benedek, T., Szentgyörgyi, F., Szabó, I., Kriszt, B., Révész, F., Radó, J., Maróti, G., Tácsics, A. (2018): Aerobic and oxygen-limited enrichment of BTEX-degrading biofilm bacteria: dominance of *Malikia* versus *Acidovorax* species. *Environ Sci Pollut Res Int* 25: 32178-32195.
- Benedek, T., Tácsics, A., Szabó, I., Farkas, M., Szoboszlay, S., Fábrián, K., Maróti, G., Kriszt, B. (2016): Polyphasic analysis of an *Azoarcus-Leptothrix*-dominated bacterial biofilm developed on stainless steel surface in a gasoline-contaminated hypoxic groundwater. *Environ Sci Pollut Res* 23: 9019-9035.
- Bickerdike, S. R., Holt, R. A., Stephens, G. M. (1997): Evidence for metabolism of o-xylene by simultaneous ring and methyl group oxidation in a new soil isolate. *Microbiology* 143: 2321-2329.
- Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911-917.
- Boehm, P. D., Page, D. S., Gilfillan, E. S., Bence, A. E., Burns, W. A., Mankiewicz, P. J. (1998): Study of the fates and effects of the Exxon Valdez oil spill on benthic sediments in two bays in Prince William Sound, Alaska. 1. Study design, Chemistry, and source fingerprinting. *Environ. Sci. Technol.* 32: 567-576.
- Bragg, J. R., Prince, R. C., Harner, E. J., Atlas, R. M. (1994): Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. *Nature* 368: 413-418.

- Brettin, T., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Olsen, G. J., Olson, R., Overbeek, R., Parrello, B., Pusch, G. D., Shukla, M., Thomason, J. A., Stevens, R., Vonstein, V., Wattam, A. R., Xia, F. (2015): RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci Rep* 5:8365.
- Bridge, G., Le Billon, P. (2017): The condition of the resource: growing uncertainty, declining quality. In: Bridge, G., Le Billon, P.: Oil. 18-26. p.
- Brockman, F. J. (1995): Nucleic-acid-based methods for monitoring the performance of *in situ* bioremediation. *Mol. Ecol.* 4:567-578.
- Buchfink, B., Xie, C., Huson, D. H. (2015): Fast and sensitive protein alignment using Diamond. *Nat Methods* 12:59-60.
- Burlage, R. S., S. W. Hooper és G. S. Saylor (1989): The TOL (pWW0) catabolic plasmid. *Appl Environ Microbiol* 55: 1323-8.
- Busse, H. J., Kämpfer, P., Denner, E. B. (1999): Chemotaxonomic characterisation of *Sphingomonas*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 23:242-251.
- Cafaro, V., Izzo, V., Scognamiglio, R., Notomista, E., Capasso, P., Casbarra, A., Pucci, P., di Donato, A. (2004): Phenol hydroxylase and toluene/o-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1: interplay between two enzymes. *Appl Environ Microbiol* 70:2211–2219.
- Cai, S., Shi, C., Zhao, J. D., Cao, Q., He, J., Chen, L. W. (2015): *Sphingobium phenoxybenzoativorans* sp. nov., a 2-phenoxybenzoic-acid-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:1986-1991.
- Cashion, P., Holder-Franklin, M. A., McCully, J., Franklin, M. (1977): A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. *Anal Biochem* 81:461–466.
- Cauwenberghe, L.V., Roote, D.S. (1998): In Situ Bioremediation. Technology Overview Report, TO-98-01, Groundwater Remediation Technologies Analysis Center, Pittsburgh, PA
- Chakraborty, R., Coates, J. D. (2004): Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 437-446.
- Chaudhary, D. K., Kim, J. (2018): *Flavobacterium naphthae* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 68:305-309.
- Claus, D. (1992): A standardized Gram staining procedure. *World J Microbiol Biotechnol* 8:451-452.
- da Cruz, G. F., de Vasconcellos, S. P., Angolini, C. F. F., Dellagnezze, B. M., Garcia, I. N. S., de Oliveira, V. M., dos Santos Neto, E. V., Marsaioli, A. J. (2011): Could petroleum

- biodegradation be a joint achievement of aerobic and anaerobic microorganisms in deep sea reservoirs? *AMB Express* 1:47.
- Cyplik, P., Schmidt, M., Szulc, A., Marecik, R., Lisiecki, P., Heipieper, H. J., Owsianiak, M., Vainshtein, M., Chrzanowski, Ł. (2011): Relative quantitative PCR to assess bacterial community dynamics during biodegradation of diesel and biodiesel fuels under various aeration conditions. *Bioresour Technol* 102:4347-4352.
- Daghio, M., Tatangelo, V., Franzetti, A., Gandolfi, I., Papacchini, M., Careghini, A., Sezenna, E., Saponaro, S., Bestetti, G. (2015): Hydrocarbon degrading microbial communities in bench scale aerobic biobarriers for gasoline contaminated groundwater treatment. *Chemosphere* 130:34-39.
- Dibble, J. T., R. Bartha (1976): Effect of iron on the biodegradation of petroleum in seawater. *Appl Environ Microbiol*, 31: 544-50.
- Dibble, J., Bartha, R. (1979): Effect of environmental parameters on the biodegradation of oilsludge, *Applied and Environmental Microbiology*, 37(4): 729–739. p.
- Di Cello, F., Pepi, M., Baldi, F., Fani, R. (1997): Molecular characterization of an n-alkane-degrading bacterial community and identification of a new species, *Acinetobacter venetianus*. *Res Microbiol* 148:237-249.
- Dick, G. J., Andersson, A. F., Baker, B. J., Simmons, S. L., Thomas, B. C., Yelton, A. P., Banfield, J. F. (2009): Community-wide analysis of microbial genome sequence signatures. *Genome Biol* 10: R85.
- Eastcott, L., Shiu, W. Y., Mackay, D. (1988): Environmentally relevant physical-chemical properties of hydrocarbons: a review of data and development of simple correlations. *Oil Chem Pollut*, 4: 191-216. p.
- Edgar, R. C. (2004): MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792-1797.
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., Knight, R. (2011): UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27:2194-2200.
- Eltis, L. D., J. T. Bolin (1996): Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases. *J Bacteriol* 178: 5930-7.
- Endrédi, I. (2013): A szovjet csapatok kivonása Magyarországról és a környezeti károk felszámolásának története. Palásthy Kiadó. 75-84. pp.
- Fahy, A., Ball, A. S., Lethbridge, G., Timmis, K. N., McGenity, T. J. (2008): Isolation of alkali-tolerant benzene-degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Lett Appl Microbiol* 47:60-66.

- Fahy, A., McGenity, T. J., Timmis, K. N., Ball, A. S. (2006): Heterogeneous aerobic benzene-degrading communities in oxygen-depleted groundwaters. *FEMS Microbiol Ecol* 58:260–270.
- Farkas, M., Táncsics, A., Kriszt, B., Benedek, T., Tóth, E. M., Kéki, Z., Veres, P. G., Szoboszlai S. (2015): *Zoogloea oleivorans* sp. nov., a floc-forming, petroleum hydrocarbon-degrading bacterium isolated from biofilm. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:274-279.
- Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: maximum likelihood approach. *J Mol Evol*, 17:368-376.
- Foght, A. (2008): Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: pathways and prospects. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15: 93-120.
- Franzmann, P. D., Skerman, V. B. D. (1981): *Agitococcus lubricus* gen. nov. sp. nov., a lipolytic, twitching coccus from freshwater. *Int J Syst Bacteriol* 31:177-183.
- Fritsche, W., Hofrichter, M. (2000): Aerobic degradation by microorganisms: principles of bacterial degradation. *Biotechnology*, Wiley-VCH Verlag, pp. 145-167.
- van der Geize, R., Dijkhuizen, L. (2004): Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. *Curr Opin Microbiol* 7:255–261.
- Giebler, J., Wick, L. Y., Chatzinotas, A., Harms, H. (2013): Alkane-degrading bacteria at the soil-litter interface: comparing isolates with T-RFLP-based community profiles. *FEMS Microbiol Ecol* 86:45-58.
- Giebler, J., Wick, L. Y., Harms, H., Chatzinotas, A. (2014): Evaluating T-RFLP protocols to sensitively analyze the genetic diversity and community changes of soil alkane degrading bacteria. *Eur J Soil Biol* 65:107-113.
- Haigler, B. E., Pettigrew, C. A., Spain, J. C. (1992): Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* sp. strain JS150. *Appl Environ Microbiol* 58: 2237–2244. p.
- Hamamura, N., Olson, S. H., Ward, D. M., Inskeep, W. P. (2006): Microbial population dynamics associated with crude-oil biodegradation in diverse soils. *Appl Environ Microbiol* 72:6316-6324.
- Hamamura, N., Ward, D. M., Inskeep, W. P. (2013): Effects of petroleum mixture types on soil bacterial population dynamics associated with the biodegradation of hydrocarbons in soil environments. *FEMS Microbiol Ecol* 85:168-178.
- van Hamme, J. D., Singh, A., Ward, O. P. (2003): Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67: 503-549. p.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., Ryan, P. D. (2001): PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron* 4:1-9.

- Häner, A., Hohener, P., Zeyer, J. (1995): Degradation of p-xylene by a denitrifying enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3185–3188.
- Hansel, C. M., Lentini, C. J., Tang, Y., Johnston, D. T., Wankel, S. D., Jardine, P. M. (2015): Dominance of sulfur-fueled iron oxide reduction in low-sulfate freshwater sediments. *ISME J*, 9, 2400-2412. pp.
- He, X., McLean, J. S., Edlund, A., Yooseph, S., Hall, A. P., Liu, S. Y., Dorrestein, P. C., Esquenazi, E., Hunter, R. C., Cheng, G., Nelson, K. E., Lux, R., Shi, W. (2015): Cultivation of a human-associated TM7 phylotype reveals a reduced genome and epibiotic parasitic lifestyle. *PNAS* 112:244-249.
- Hendrickx, B., H. Junca, J. Vosahlova, A. Lindner, I. Ruegg, M. Bucheli-Witschel, F. Faber, T. Egli, M. Mau, M. Schlomann, M. Brennerova, V. Brenner, D. H. Pieper, E. M. Top, W. Dejonghe, L. Bastiaens és D. Springael (2006): Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. *J Microbiol Methods* 64, 250-65.
- Higashioka, Y., Kojima, H., Fukui, M. (2012): Isolation and characterization of novel sulphate-reducing bacterium capable of anaerobic degradation of p-xylene. *Microbes and Environments* 27: 273-277.
- Higashioka, Y., Kojima, H., Sato, S., Fukui, M. (2009): Microbial community analysis at crude oil-contaminated soils targeting the 16S ribosomal RNA, xylM, C23O and bcr genes. *Journal of Applied Microbiology* 107: 126–135.
- Hug, L. A., Baker, B. J., Anantharaman, K., Brown, C. T., Probst, A. J., Castelle, C. J., Butterfield, C. N., HERNSDORF, A. W., Amano, Y., Ise, K., Suzuki, Y., Dudek, N., Relman, D. A., Finstad, K. M., Amundson, R., Thomas, B. C., Banfield, J. F. (2016): A new view of the tree of life. *Nat Microbiol* 1:16048.
- Huson, D. H., Auch, A. F., Qi, J., Schuster, S. C. (2007): MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Res* 17:377-386.
- Hyatt, D., Chen, G. L., Locascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., Hauser, L. J. (2010): Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 11:119.
- Jechalke, S., Franchini, A. G., Bastida, F., Bombach, P., Rosell, M., Seifert, J., von Bergen, M., Vogt, C., Richnow, H. H. (2013): Analysis of structure, function, and activity of a benzene-degrading microbial community. *FEMS Microbiol Ecol* 85:14–26.

- Johnson, G. R., Olsen, R. H. (1995): Nucleotide sequence analysis of genes encoding a toluene/benzene-2- monooxygenase from *Pseudomonas* sp. strain JS150. *Appl Environ Microbiol* 61:3336–3346.
- Jones, D. M., Head, I. M., Gray, N. D., Adams, J. J., Rowan, A. K., Aitken, C. M., Bennett, B., Huang, H., Brown, A., Bowler, B. F.J., Oldenburg, T., Erdmann, M., Larter, S. R. (2007): Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs. *Nature* 451:176-180.
- Junca, H., Pieper, D. H. (2004): Functional gene diversity analysis in BTEX contaminated soils by means of PCR-SSCP DNA fingerprinting: comparative diversity assessment against bacterial isolates and PCR-DNA clone libraries. *Environ Microbiol* 6: 95–110.
- Jung, I-G, Park, C-H. (2004): Characteristics of *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1 for the biodegradation of benzene, toluene, m-xylene (BTX), and their mixtures. *J Biosci Bioeng* 97:429–431.
- Jurelevicius, D., Alvarez, V. M., Peixoto, R., Rosado, A. S., Seldin, L. (2013): The use of combination of alkB primers to better characterize the distribution of alkane-degrading bacteria. *PLoS ONE* 8:e66565
- Kanekar, P. P., Sarnaik, S. S., Kelkar, A. S. (1999): Bioremediation of phenol by alkaliphilic bacteria isolated from alkaline lake of Lonar, India. *J Appl Microbiol* 85:128S–133S
- Kaplan, C. W., Kitts, C. L. (2004): Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Appl Environ Microbiol* 70:1777–1786
- Keller, A. H., Kleinstaub, S., Vogt, C. (2018): Anaerobic benzene mineralization by nitrate-reducing and sulfate-reducing microbial consortia enriched from the same site: comparison of community composition and degradation characteristics. *Microb Ecol* 75:941–953.
- Kertesz, M., Kawasaki, A. (2010): Hydrocarbon-degrading *Sphingomonads*: *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium*, and *Sphingopyxis*. In: Timmis KN (ed) Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. *Springer*, Berlin, pp. 1693-1075.
- Khan, A. A., Wang, R. F., Cao, W. W., Doerge, D. R., Wennerstrom, D., Cerniglia, C. E. (2001): Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology* 67:3577–85.
- Kim, D., Chae, J-C., Zylstra, G. J., Kim, Y-S., Kim, K-S., Nam, M. H., Kim, Y. M., Kim, E. (2004): Identification of a novel dioxygenase involved in metabolism of o-xylene, toluene, and ethylbenzene by *Rhodococcus* sp. strain DK17. *Appl Environ Microbiol* 70:7086–7092.

- Kim, S. J., Park, S. J., Jung, M. Y., Kim, J. G., Madsen, E. L., Rhee, S. K. (2014): An uncultivated nitrate-reducing member of the genus *Herminiimonas* degrades toluene. *Appl Environ Microbiol* 80:3233–3243.
- Kis, Á. E., Laczi, K., Zsíros, S., Kós, P., Tengölics, R., Bounedjoum, N., Kovács, T., Rákhely, G., Perei, K. (2017): Characterization of the *Rhodococcus* sp. MK1 strain and its pilot application for bioremediation of diesel oil-contaminated soil. *Acta Microbiol Immunol Hung* 64:463–482.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F. O. (2013): Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 41:e1.
- Kloos, K., Munch, J. C., Schloter, M. (2006): A new method for the detection of alkane-monooxygenase homologous genes (*alkB*) in soils based on PCR-hybridization. *J Microbiol Methods* 66(3):486–496.
- Korda, A., Santas, P., Tenete A., Santas R. (1997): Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, 677-686.
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., Schloss, P. D. (2013): Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol* 79:5112-5120.
- Kukor, J. J., R. H. Olsen (1996): Catechol 2,3-dioxygenases functional in oxygen-limited (hypoxic) environments. *Appl Environ Microbiol* 62:1728-40.
- Kunin, V., Engelbrektson, A., Ochman, H., Hugenholtz, P. (2010): Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environ Microbiol* 12:118-123.
- Kumari, H., Gupta, S. K., Jindal, S., Katoch, P., Lal, R. (2009): *Sphingobium lactosutens* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site and *Sphingobium abikonense* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2291-2296.
- Kuykendall, L. D., Roy, M. A., O'Neill, J. J., Devine, T. E. (1988): Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *Int J Syst Bacteriol* 38:358-361.
- Kuyukina, M. S., Ivshina, I. B. (2010): Application of *Rhodococcus* in bioremediation of contaminated environments. In: Alvarez, H. M. (ed.) *Biology of Rhodococcus*. Springer, Berlin, pp 231–262.
- KVVM (2010): Kármentesítési kézikönyv 5. Bioremediáció: Mikrobiológiai kármentesítési eljárások. *Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium*, Budapest. 85 p.

- Labinger, J. A., Bercaw, J. E. (2002): Understanding and exploiting C-H bond activation. *Nature*, 417, 507-514. p.
- Lal, B., Khanna, S. (1996): Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*. *J Appl Microbiol* 81:355-362.
- Lane, D. J. (1991): 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.) Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Wiley, New York, pp. 115-147.
- Langmead, B., Salzberg, S. L. (2012): Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9:357-359.
- Lang, S., Philp, J. C. (1998): Surface-active lipids in rhodococci. *Antonie Van Leeuwenhoek* 74:59-70.
- Lauer, J. (2006): Szénhidrogénekkkel, szénhidrogén-származékokkal szennyezett területek havária mentesítése az elsődleges beavatkozó tűzoltó egységek aspektusából. Doktori (PhD) értekezés, Zrínyi Miklós Nemzetvédelmi Egyetem, Budapest, 6. p.
- Leahy, J. G., Colwell, R. R. (1990): Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, 54, 305-315. p.
- Lee, K., Gibson, D. T. (1996): Toluene and ethylbenzene oxidation by purified naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816-4. *Appl Environ Microbiol*, 62, 3101-3106. p.
- Lee, I., Kim, Y. O., Park, S. C., Chun, J. (2016): OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:1100-1103.
- Lee, Y., Lee, Y., Jeon, C. O. (2019): Biodegradation of naphthalene, BTEX, and aliphatic hydrocarbons by *Paraburkholderia aromaticivorans* BN5 isolated from petroleum-contaminated soil. *Sci Rep* 9:860
- Leifson, E. (1962): *Pseudomonas spinosa* n. sp. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon* 12:89–92
- Leuthner, B., Leutwein, C., Schulz, H., Hörth, P., Haehnel, W., Schiltz, E., Schägger, H., Heider, J. (1998): Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glyceryl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Mol Microbiol* 28:615–628.
- Liang, Q., Lloyd-Jones, G. (2010): *Sphingobium scionense* sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from contaminated sawmill soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:413-416.
- Lieberman, R. L., Rosenzweig, A. C. (2004): Biological methane oxidation: regulation, biochemistry, and active site structure of particulate methane monooxygenase. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 39: 147-164. p.

- Liu, Y. F., Galzerani, D. D., Mbadinga, S. M., Zaramela, L. S., Gu, J. D., Mu, B. Z., Zengler, K. (2018): Metabolic capability and in situ activity of microorganisms in an oil reservoir. *Microbiome* 6:5
- Lloyd-Jones, G., Lau, P. C. (1997): Glutathione S-transferase-encoding gene as a potential probe for environmental bacterial isolates capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* 63:3286-3290.
- Luo, C., Xie, S., Sun, W., Li, X., Cupples, A. M. (2009): Identification of a novel toluene-degrading bacterium from the candidate phylum TM7, as determined by DNA stable isotope probing. *Appl Environ Microbiol* 75:4644-4647.
- Margesin, R., Labbé, D., Schinner, F., Greer, C. W., Whyte, L. G. (2003): Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. *Appl Environ Microbiol* 69:3085-3092.
- Margesin, R., Schinner, F. (2001): Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an Alpine glacier skiing area. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3127-3133 p.
- Martínez-Lavanchy, P. M., Chen, Z., Lünsmann, V., Marin-Cevada, V., Vilches-Vargas, R., Pieper, D. H., Reiche, N., Kappelmeyer, U., Imperato, V., Junca, H., Nijenhuis, I., Müller, J. A., Kusch, P., Heipieper, H. J. (2015): Microbial toluene removal in hypoxic model constructed wetlands occurs predominantly via the ring monooxygenation pathway. *Appl Environ Microbiol* 81:6241–6252.
- Maier, T., Forster, H. H., Asperger, O., Hahn, U. (2001): Molecular characterization of the 56-kDa CYP153 from *Acinetobacter* sp. EB104. *Biochem Biophys Res Commun* 286, 652-658. p.
- Mbadinga, S. M., Wang, L. Y., Zhou, L., Liu, J. F., Gu, J. D., Mu, B. Z. (2011): Microbial communities involved in anaerobic degradation of alkanes. *Int Biodeterior Biodegrad* 65:1-13.
- Meckenstock, R. U., Elsner, M., Griebler, C., Lueders, T., Stumpp, C., Aamand, J., Agathos, S. N., Albrechtsen, H.-J., Bastiaens, L., Bjerg, P. L., Boon, N., Dejonghe, W., Huang, W. E., Schmidt, S. I., Smolders, E., Sørensen, S. R., Springael, D., van Breukelen B. M. (2015): Biodegradation: Updating the concepts of control for microbial cleanup in contaminated aquifers. *Environ Sci Technol* 49: 7073–7081.
- Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H. P., Göker, M. (2013a): Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 14:60.

- Meier-Kolthoff, J. P., Göker, M., Spröer, C., Klenk, H. P. (2013b): When should a DDH experiment be mandatory in microbial taxonomy? *Arch Microbiol* 195:413-418.
- Mesbah, M., Premachandran, U., Whitman, W. B. (1989): Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* 39: 159-167.
- Mikesell, M., Kukor, J. és Olsen, R. (1993): Metabolic diversity of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from a petroleum-contaminated aquifer. *Biodegradation* 4(4), 249-259.
- Miller, L. T. (1982): A single derivatization method for bacterial fatty acid methyl esters including hydroxy acids. *J Clin Microbiol* 16: 584-586.
- Morales, M., Sentchilo, V., Bertelli, C., Komljenovic, A., Kryuchkova-Mostacci, N., Bourdilloud, A., Linke, B., Goesmann, A., Harshman, K., Segers, F., Delapierre, F., Fiorucci, D., Seppely, M., Trofimenko, E., Berra, P., Taher, A. E., Loiseau, C., Roggero, D., Sulfiotti, M., Etienne, A., Buendia, G. R., Pillard, L., Escoriza, A., Moritz, R., Schneider, C., Alfonso, E., Jeddou, F. B., Selmoni, O., Resch, G., Greub, G., Emery, O., Dubey, M., Pillonel, T., Robinson-Rechavi, M., van der Meer, J. R. (2016): The genome of the toluene-degrading *Pseudomonas veronii* strain 1YdBTEX2 and its differential gene expression in contaminated sand. *PLoS ONE* 11:e0165850
- Morasch, B., Meckenstock, R. (2005): Anaerobic degradation of p-xylene by a sulfate-reducing enrichment culture. *Curr. Microbiol.* 51: 127–130.
- Nakagawa, T., Sato, S., Fukui, M. (2008): Anaerobic degradation of p-xylene in sediment-free sulfate-reducing enrichment culture. *Biodegradation* 19: 909–913.
- Német, B. (2013): Energiahordozók nem hagyományos bányászata, előállítása (palaolaj, homokolaj, palagáz). In: Német, B.: Ipari technológiák. Pécsi Tudományegyetem, 61-71. p.
- Nestler, H., Kiesel, B., Kaschabek, S. R., Mau, M., Schlömann, M. (2007): Biodegradation of chlorobenzene under hypoxic and mixed hypoxic-denitrifying conditions. *Biodegradation* 18:755-767.
- Nurk, S., Meleshko, D., Korobeynikov, A., Pevzner, P. A. (2017): metaSPAdes: a new versatile metagenomics assembler. *Genome Res* 27:824-834.
- Ohad, I., Danon, D., Hestrin, S. (1963): The use of shadow-casting technique for measurement of the width of elongated particles. *J Cell Biol* 17:321-326.
- Oosterkamp, M. J., Veuskens, T., Saia, F. T., Weelink, S. A., Goodwin, L. A., Daligault, H. E., Bruce, D. C., Detter, J. C., Tapia, R., Han, C. S., Land, M. L., Hauser, L. J., Langenhoff, A. A., Gerritse, J., van Berkel, W. J., Pieper, D. H., Junca, H., Smidt, H., Schraa, G., Davids, M., Schaap, P. J., Plugge, C. M., Stams, A. J. (2013): Genome analysis and

- physiological comparison of *Alicyclophilus denitrificans* strains BC and K601T. *PLoS One* 8:e66971
- OPEC, 2019 World Oil Outlook (2019): Long-term oil demand outlook by sector. Organization of the Petroleum Exporting Countries, Vienna, Austria. 93-96. p.
- Onaca, C., Kieninger, M., Engesser, K. H., Altenbuchner, J. (2007): Degradation of alkyl methyl ketones by *Pseudomonas veronii* MEK700. *J Bacteriol* 189:3759-3767.
- Önneby, K., Hakansson, S., Pizzul, L., Stenström, J. (2014): Reduced leaching of the herbicide MCPA after bioaugmentation with a formulated and stored *Sphingobium* sp. *Biodegradation* 25:291-300.
- Orphan, V. J., Taylor, L. T., Hafenbradl, D., Delong, E. F. (2000): Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. *Appl Environ Microbiol* 66:700-711.
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A. R., Xia, F., Stevens, R. (2014): The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res* 42:D206-D2014.
- Papp, K., Parragh, D. (2015): Magyarországi palagáz-forradalom az USA-beli sikerek nyomán? A környezetvédelmi felvetések mérlegelése és vizsgálata. In: Ádám, J. (szerk.): Nem konvencionális szénhidrogének – magyarországi lehetőségek. *Magyar Tudomány*, 176: 1322-1329. p.
- Park, M., Jeon, Y., Jang, H. H., Ro, H. S., Park, W., Madsen, E. L., Jeon, C. O. (2007): Molecular and biochemical characterization of 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase from *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2. *Appl Environ Microbiol* 73:5146–5152.
- Perei, K., Pernyeszi, T., Lakatos, Gy. (2013): Bioremediáció. In: Bioremediáció. Szegedi Tudományegyetem, 60-70. p.
- Pérez-de-Mora, A., Engel, M., Schloter, M. (2011): Abundance and diversity of n-alkane-degrading bacteria in a forest soil co-contaminated with hydrocarbons and metals: a molecular study on *alkB* homologous genes. *Microb Ecol* 62:959-972.
- Pérez-Pantoja, D., González, B., Pieper, D. H. (2010): Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons. In: Timmis, K. N., editor. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Berlin, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 799–837.
- Pham, V. H. T., Kim, J., Jeong, S. W. (2014): Enhanced isolation and culture of highly efficient psychrophilic oil-degrading bacteria from oil-contaminated soils in South Korea. *J Environ Biol* 35:1145-1149.

- Philp, J. C., Atlas, R. M. (2005): Bioremediation of contaminated soils and aquifers. Bioremediation: applied microbial solutions for real-world environmental cleanup. Washington, D. C., ASM Press.
- Pinyakong, O., Habe, H., Yoshida, T., Nojiri, H., Omori, T. (2003): Identification of three novel salicylate 1-hydroxylases involved in the phenanthrene degradation of *Sphingobium* sp. strain P2. *Biochem Biophys Res Commun* 301:350-357.
- Polz, M. F., Cavanaugh, C. M. (1998): Bias in template to product ratios in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol* 64:3724-3730.
- Popp, N., Schlömann, M., Mau, M. (2006): Bacterial diversity in the active stage of a bioremediation system for mineral oil hydrocarbon-contaminated soils. *Microbiology* 152:3291-3304.
- Posman, K. M., DeRito, C. M., Madsen, E. L. (2017): Benzene degradation by a *Variovorax* species within a coal tar-contaminated groundwater microbial community. *Appl Environ Microbiol* 83:e02658–e2716
- Powell, S. M., Bowman, J. P., Ferguson, S. H., Snape, I. (2010): The importance of soil characteristics to the structure of alkane-degrading bacterial communities on sub-Antarctic Macquarie Island. *Soil Biol Biochem* 42:2012-2021.
- Price, M. N., Dehal, P. S., Arkin, A. P. (2010): FastTree 2 – approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE* 5:e9490
- Prince, R. C., Amade, T. J., McGenity, T. J. (2018): Prokaryotic hydrocarbon degraders. In: McGenity T (ed) Taxonomy, genomics and ecophysiology of hydrocarbon-degrading microbes. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. *Springer*, Berlin, Heidelberg, 1669 - 1692. p.
- Probst, A. J., Ladd, B., Jarett, J. K., Geller-McGrath, D. E., Sieber, C. M. K., Emerson, J. B., Anantharaman, K., Thomas, B. C., Malmstrom, R. R., Stieglmeier, M., Klingl, A., Woyke, T., Ryan, M. C., Banfield, J. F. (2018): Differential depth distribution of microbial function and putative symbionts through sediment-hosted aquifers in the deep terrestrial subsurface. *Nat Microbiol* 3:328-336.
- Pumphrey, G. M., Madsen, E. L. (2007): Naphthalene metabolism and growth inhibition by naphthalene in *Polaromonas naphthalenivorans* strain CJ2. *Microbiology* 153:3730–3738.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F. O. (2013): The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41:D590–D596
- Ren, Y.; Peng, L.; Zhao, G.; Wei, C. (2014) Degradation of m-cresol via the ortho cleavage pathway by *Citrobacter farmeri* SC01. *Biochemical Engineering Journal* 88: 108-114. p.

- Révész, F., Tóth, E. M., Kriszt, B., Bóka, K., Benedek, T., Sárkány, O., Nagy, Z., Tánicsics, A. (2018): *Sphingobium aquiterrae* sp. nov., a toluene, meta- and paraxylene- degrading bacterium isolated from petroleum hydrocarbon-contaminated groundwater. *Int J Syst Evol Microbiol* 68:2807-2812.
- Rojo, F. (2009): Degradation of alkanes by bacteria. *Environ Microbiol*, 11:2477-2490. p.
- Saitou, N., Nei, M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4:406-425.
- Sarnaik, S., Kanekar, P. (1995): Bioremediation of colour of methyl violet and phenol from a dye-industry waste effluent using *Pseudomonas* spp. isolated from factory soil. *J Appl Bacteriol* 79:459–469.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J., Weber, C. F. (2009): Introducing mothur: open-source platform-independent community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75:7537-7541.
- Schulze-Makuch, D., Wagner, D., Kounaves, S. P., Mangelsdorf, K., Devine, K. G., de Vera, J. P., Schmitt-Kopplin, P., Grossart, H. P., Parro, V., Kaupenjohann, M., Galy, A., Schneider, B., Airo, A., Frösler, J., Davila, A. F., Arens, F. L., Cáceres, L., Cornejo, F. S., Carrizo, D., Dartnell, L., DiRuggiero, J., Flury, M., Ganzert, L., Gessner, M. O., Grathwohl, P., Guan, L., Heinz, J., Hess, M., Keppler, F., Maus, D., McKay, C. P., Meckenstock, R. U., Montgomery, W., Oberlin, E. A., Probst, A. J., Sáenz, J. S., Sattler, T., Schirmack, J., Sephton, M. A., Schloter, M., Uhl, J., Valenzuela, B., Vestergaard, G., Wörmer, L., Zamorano, P. (2018): Transitory microbial habitat in the hyperarid Atacama Desert. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 115:2670-2675.
- Sekine, M., Tanikawa, S., Omata, S., Saito, M., Fujisawa, T., Tsukatani, N., Tajima, T., Sekigawa, T., Kosugi, H., Matsuo, Y., Nishiko, R., Imamura, K., Ito, M., Narita, H., Tago, S., Fujita, N., Harayama, S. (2006): Sequence analysis of three plasmids harboured in *Rhodococcus erythropolis* strain PR4. *Environ Microbiol* 8, 334-346. p.
- Seto, M., Kimbara, K., Shimura, M., Hatta, T., Fukuda, M., Yano, K. (1995): Novel transformation of polychlorinated biphenyls by *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl Environ Microbiol* 61:3353–3358.
- Singleton, D. R., Lee, J., Dickey, A. N., Stroud, A., Scholl, E. H., Wright, F. A., Aitken, M. D. (2018): Polyphasic characterization of four soil-derived phenanthrene-degrading *Acidovorax* strains and proposal of *Acidovorax carolinensis* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 41:460–472.

- Sipilä, T. P., Väisänen, P., Paulin, L., Yrjälä, K. (2010): *Sphingobium* sp. HV3 degrades both herbicides and polyaromatic hydrocarbons using ortho- and meta-pathways with differential expression shown by RT-PCR. *Biodegradation* 21:771-784.
- Smith, C. J., Danilowicz, B. S., Clear, A. K., Costello, F. J., Wilson, B., Meijer, W. G. (2005): T-Align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment length polymorphism profiles. *FEMS Microbiology Ecology* 54:375-380.
- Sperfeld, M., Diekert, G., Studenik, S. (2018): Anaerobic aromatic compound degradation in *Sulfuritalea hydrogenivorans* sk43H. *FEMS Microbiol Ecol* 95:fiy199
- Spring, S., Wagner, M., Schumann, P., Kampfer, P. (2005): *Malikia granosa* gen. nov., sp. nov., a novel polyhydroxyalkanoate- and polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge, and reclassification of *Pseudomonas spinosa* as *Malikia spinosa* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:621–629.
- Stapleton, R. D., S. Ripp, L. Jimenez, S. Cheol-Koh, J. T. Fleming, I. R. Gregory, and G. S. Saylor. (1998): Nucleic acid analytical approaches in bioremediation: site assessment and characterization. *J. Microbiol. Methods* 32:165–178
- Sugár, A. (2012): Változik-e a kőolaj szerepe a világ gazdaságban és Magyarországon? *Közgazdaság*, Budapesti Corvinus Egyetem. 2012/2, 79-94. p.
- Sun, W. M., Xie, S. G., Luo, C. L., Cupples, A. M. (2010): Direct link between toluene degradation in contaminated-site microcosms and a *Polaromonas* strain. *Appl Environ Microbiol* 76:956-959.
- Suzek, B. E., Huang, H., McGarvey, P., Mazumder, R., Wu, C. H. (2007): UniRef: comprehensive and non-redundant UniProt reference clusters. *Bioinformatics* 23:1282-1288.
- Sydow, M., Owsianiak, M., Szczepaniak, Z., Framski, G., Smets, F. B., Ławniczak, Ł., Lisiecki, P., Szulc, A., Cyplik, P., Chrzanowski, Ł. (2016): Evaluating robustness of a diesel-degrading bacterial consortium isolated from contaminated soil. *New Biotechnol* 33:852-859.
- Suthersan, S. S. (1999): Pump and treat systems. In: Suthersan, S. S. (editor): Remediation engineering: design concepts. *CRC Press LLC*, Boca Raton, 265-298. p.
- Szoboszlay, S., Atzél, B., Kukolya, J., Tóth, E. M., Márialigeti, K., Schumann, P., Kriszt, B. (2008): *Chryseobacterium hungaricum* sp. nov., isolated from hydrocarbon-contaminated soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:2748-2754.
- Szoboszlay, S., Kriszt, B. (2010): Környezeti elemek védelme. Szent István Egyetemi Kiadó, Gödöllő, 107 p., 48-59, 81-89. p.

- Szoboszlay, S., Solymosi, J., Kriszt, B. (2002): The biodegradation of hydrocarbon compounds concerning to environmental safety. *Academic and Applied Research in Military Science*, 1, 103-106. p.
- Takeuchi, M., Hamana, K., Hiraishi, A. (2001): Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1405-1417.
- Táncsics, A. (2009): Aromás szénhidrogének lebontásában résztvevő mikrobaközösségek vizsgálata a funkciógének alapján. Doktori (PhD) értekezés, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest, 135 p.
- Táncsics, A., Benedek, T., Szoboszlay, S., Veres, P. G., Farkas, M., Márialigeti, K., Kukolya, J., Lányi, S., Kriszt, B. (2015): The detection and phylogenetic analysis of the alkane 1-monooxygenase gene of members of the genus *Rhodococcus*. *Syst Appl Microbiol* 38:1-7.
- Táncsics, A., Farkas, M., Horváth, B., Maróti, G., Bradford, L. M., Lueders, T., Kriszt, B. (2020): Genome analysis provides insights into microaerobic toluene-degradation pathway of *Zoogloea oleivorans* Buc^T. *Arch Microbiol* 202:421–426.
- Táncsics, A., Farkas, M., Szoboszlay, S., Szabó, I., Kukolya, J., Vajna, B., Kovács, B., Benedek, T., Kriszt, B. (2013): One-year monitoring of meta-cleavage dioxygenase gene expression and microbial community dynamics reveals the relevance of subfamily I.2.C extradiol dioxygenases in hypoxic, BTEX-contaminated groundwater. *Syst. Appl. Microbiol.* 36: 339-350.
- Táncsics, A., Szabó, I., Baka, E., Szoboszlay, S., Kukolya, J., Kriszt, B., Márialigeti, K. (2010): Investigation of catechol 2,3-dioxygenase and 16S rRNA gene diversity in hypoxic, petroleum hydrocarbon contaminated groundwater. *Syst. Appl. Microbiol.* 33: 398 – 406.
- Táncsics A, Szalay AR, Farkas M, Benedek T, Szoboszlay S, Szabó I, Lueders T (2018): Stable isotope probing of hypoxic toluene degradation at the Siklós aquifer reveals prominent role of Rhodocyclaceae. *FEMS Microbiol Ecol* 94:fiy088
- Táncsics, A., Szoboszlay, S., Szabó, I., Farkas, M., Kovács, B., Kukolya, J., Mayer, Z., Kriszt, B. (2012): Quantification of subfamily I.2.C catechol 2,3-dioxygenase mRNA transcripts in groundwater samples of an oxygen-limited BTEX-contaminated site. *Environ Sci Technol* 46:232-240.
- Tamaoka, J., Komagata, K. (1984): Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett* 25:125–128.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007) MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 24, 1596-1599.

- Tani, A., Ishige, T., Sakai, Y., Kato, N. (2001): Gene structures and regulation of the alkane hydroxylase complex in *Acinetobacter* sp. strain M-1. *J Bacteriol* 183:1819-1823.
- Tatusova, T., DiCuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E. P., Zaslavsky, L., Lomsadze, A., Pruitt, K. D., Borodovsky, M., Ostell, J. (2016): NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res* 44:6614-6624.
- Timmis, K. N. (2002): *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence, *Environmental Microbiology* 4: 779–81.
- Tindall, B. J. (1990a): A comparative study of the lipid composition of *Halobacterium saccharovorum* from various sources. *Syst Appl Microbiol* 13:128-130.
- Tindall, B. J. (1990b): Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiol Letts* 66:199-202.
- Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H. J., Ludwig, W., Kämpfer, P. (2010): Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:249-266.
- Tindall, B. J., Sikorski, J., Smibert, R. M., Kreig, N. R. (2007) Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. In: Reddy, C. A., Beveridge, T. J., Breznak, J. A., Marzluf, G., Schmidt, T. M. et al. (editors). *Methods for General and Molecular Microbiology*, 3rd ed. Washington, DC, USA: *ASM Press* pp. 330-393.
- Tóth, E. M., Schumann, P., Borsodi, A. K., Kéki, Z., Kovács, A. L., Márialigeti, K. (2008): *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica* gen. nov., sp. nov., a new gammaproteobacterium isolated from *Wohlfahrtia magnifica* (Diptera: Sarcophagidae). *Int J Syst Evol Microbiol* 58:976-981.
- Tribelli, P. M., Rossi, L., Ricardi, M. M., Gomez-Lozano, M., Molin, S., Raiger Iustman, L. J., Lopez, N. I. (2018): Microaerophilic alkane degradation in *Pseudomonas extremaustralis*: a transcriptomic and physiological approach. *J Ind Microbiol Biotechnol* 45:15–23.
- Tsao, C. W., Song, H. G., Bartha, R. (1998): Metabolism of benzene, toluene, and xylene hydrocarbons in soil, *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4924–9.
- Vaillancourt, F. H., J. T. Bolin és L. D. Eltis (2006): The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 41, 241-67.
- van der Meer, J. R., W. M. de Vos, S. Harayama, and A. J. B. Zehnder (1992) Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* 56:677–694.
- Verstraete, W., R. Vanlooche, R. DeBorger es A. Verlinde (1976): Modelling of the breakdown and the mobilization of hydrocarbons in unsaturated soil layers. 3rd International Biodegradation Symposium, Applied Science Publishers Ltd., London.

- Vogel, T. (1996): Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Current opinion in biotechnology*, 7: 311-316.
- Wang, W., Zhong, R., Shan, D., Shao, Z. (2014): Indigenous oil-degrading bacteria in crude oil-contaminated seawater of the Yellow sea, China. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:7253-7269.
- Watkinson, R. J., Morgan, P. (1990): Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Biodegradation*, 1: 79-92. p.
- Wentzel, A., Ellingsen, T. E., Kotlar, H. K., Zotchev, S. B., Throne-Holst, M. (2007): Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76: 1209-1221. p.
- WHO-IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2018): Vol. 120. Benzene. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Whyte, L. G., Smits, T. H., Labbé, D., Witholt, B., Greer, C. W., van Beilen, J. B. (2002): Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus*. *Appl Environ Microbiol* 68:5933-5942.
- Widada, J., Nojiri, H., and Omori, T. (2002): Recent developments in molecular techniques for identification and monitoring of xenobioticdegrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:45-59
- Widdel, F., Botius, A., Rabus, R. (2006): Anaerobic biodegradation of hydrocarbons including methane. Chapter 1.33. The Prokaryotes, Vol. 2 (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., eds), *Springer-Verlag, New York*. pp. 1028–1049.
- Winsley, T. J., Snape, I., McKinlay, J., Stark, J., van Dorst, J. M., Ji, M., Ferrari, B. C., Siciliano, S. D. (2014): The ecological controls on the prevalence of candidate division TM7 in polar regions. *Front Microbiol* 5:345.
- WWAP (World Water Assessment Programme) 2015. The United Nations World Water Development Report (2015): Water for a Sustainable World. Paris, UNESCO. 12-13. p.
- Xie, S., Sun, W., Luo, C., Cupples, A. M. (2011): Novel aerobic benzene degrading microorganisms identified in three soils by stable isotope probing. *Biodegradation* 22:71-81.
- Xu, L., Dong, Z., Fang, L., Luo, Y., Wei, Z., Guo, H., Zhang, G., Gu, Y. Q., Coleman-Derr, D., Xia, Q., Wang, Y. (2019): ORthoVenn2: a web server for whole-genome comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. *Nucleic Acid Res* 47:W52-W58.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Fujiwara, N., Naka, T., Matsunaga, I., Ogura, H., Kobayashi, K. (2002): Emendation of the genus *Sphingomonas* Yabuuchi et al. 1990 and junior objective synonymy of the species of three genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, in conjunction with *Blastomas ursincola*. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 1485-1496.

- Yerushalmi, L., Lascourreges, J. F., Guiot, S. R. (2002): Kinetics of benzene biotransformation under microaerophilic and oxygen-limited conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 79: 447-355.
- Zhao, L., Ma, T., Gao, M., Gao, P., Cao, M., Zhu, X., Li, G. (2012): Characterization of microbial diversity and community in water flooding oil reservoirs in China. *World J Microbiol Biotechnol* 28:3039-3052.
- Zhou, N. Y., Fuenmayor, S. L., Williams, P. A. (2001): *nag* genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. *J Bacteriol* 183:700–708.
- Zylstra, G. J., Gibson, D. T. (1989): Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1: nucleotide sequence of the *todC1C2BADE* genes and their expression in *E. coli*. *J Biol Chem* 264:14940–14946.

A felhasznált ábrák forrásai

http1: <https://ng.24.hu/fold/2020/12/21/harmadfoku-vizminosegi-karelharitas-a-rackevei-duna-agnal/>

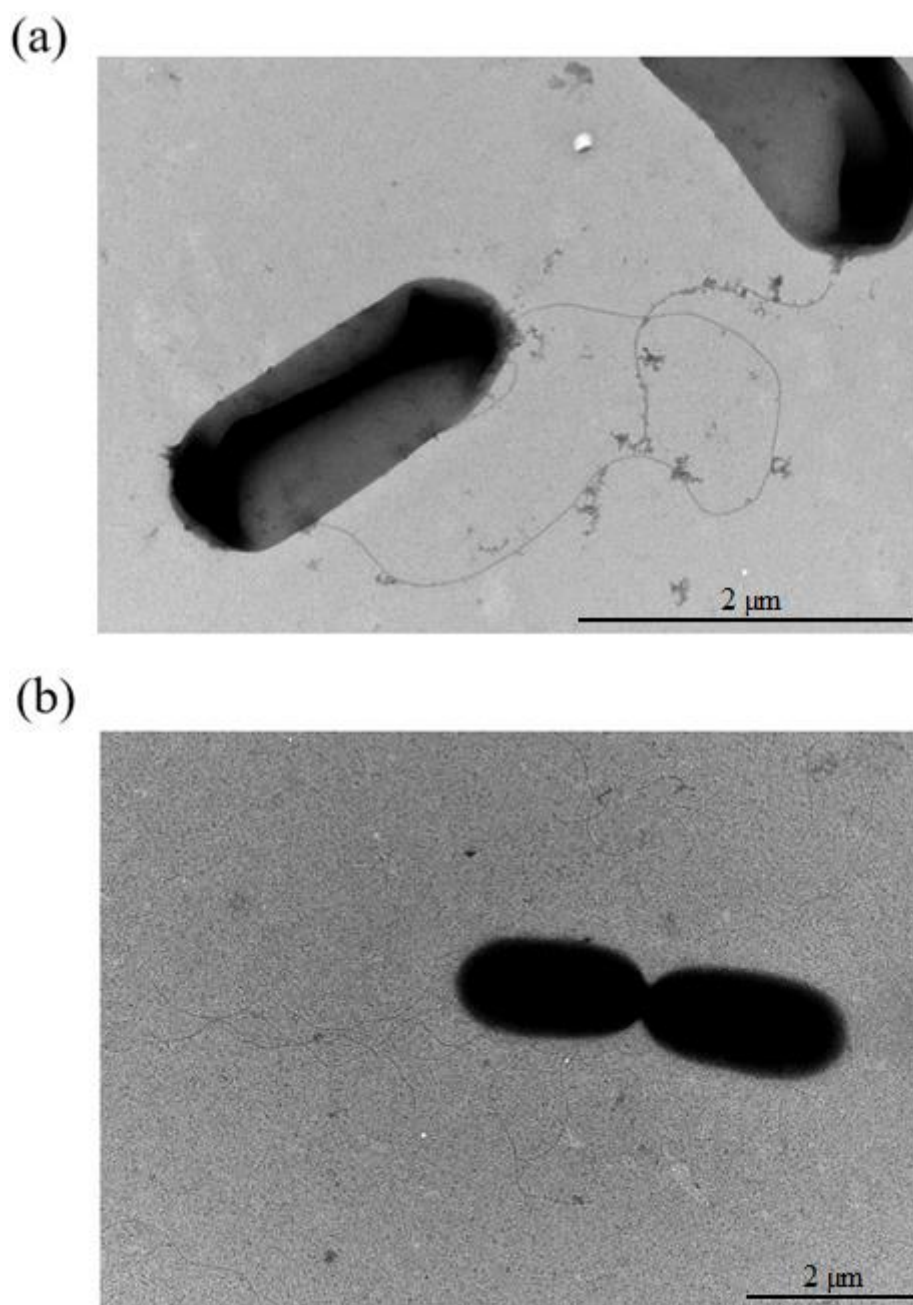
http2: <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/>

http3: Nemzeti Vízstratégia (2017): <https://www.vizugy.hu/vizstrategia/documents/997966DE-9F6F-4624-91C5-3336153778D9/Nemzeti-Vizstrategia.pdf>

http4: <http://www.lifetechnologies.com/hu/en/home/life-science/sequencing/fragment-analysis/restriction-fragment-length-polymorphism-rflp-analysis.html>

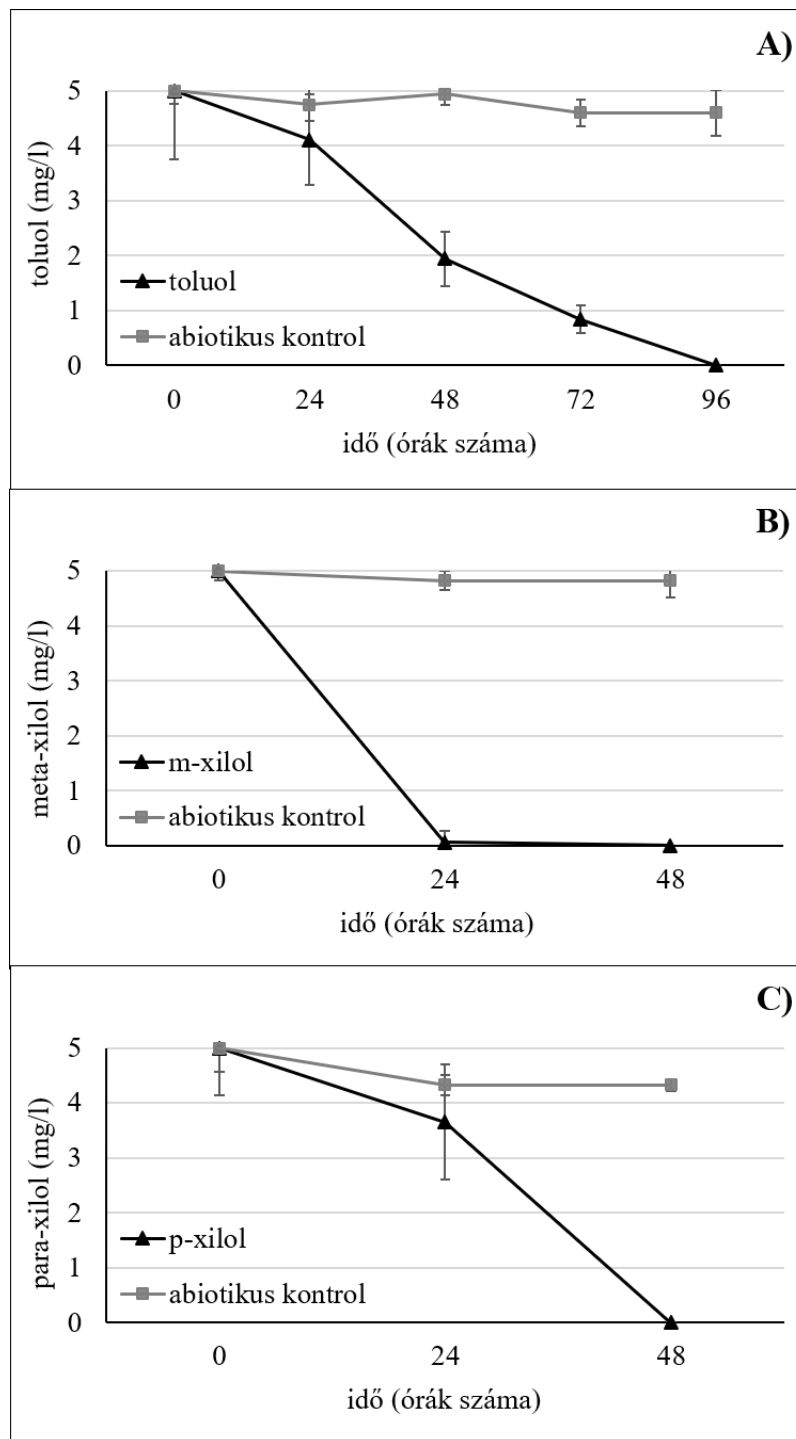
http5: <http://voer.edu.vn/c/cloning-and-genetic-engineering/a64457a4/31f96093>

8.2. számú melléklet



8.2. sz. melléklet: Transzmissziós elektronmikroszkóppal, negatív festési eljárással (a) és „shadow-casting” technikával (b) készült képek a *Malikia spinosa* AB6-os törzséről.

8.3. számú melléklet



8.3. sz. melléklet: *Spingobium aquiterrae* SKLS-A10^T törzs toluol (A), meta-xilol (B) és para-xilol (C) lebontási képessége GC-MS mérési eredmények alapján.

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Tácsics Andrásnak, hogy doktori munkám során egy színvonalas kutatási munkába kapcsolódhattam be. Köszönöm az évek alatt nyújtott segítségét, szakmai tanácsait és útmutatásait.

Hálával tartozom Dr. Farkas Milánnak, hogy bármikor fordulhattam hozzá kérdéseimmel és hogy bátorító szavaival mindig segített túllendülni a nehézségeken.

Köszönöm Dr. Kriszt Balázs intézetigazgatónak, hogy lehetőséget teremtett a munka megvalósulásához.

Köszönöm a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék, illetve a Regionális Egyetemi Tudásközpont munkatársainak, hogy segítségükkel, támogatásukkal és barátságukkal hozzájárultak munkám elkészüléséhez.

Hálával tartozom férjemnek végtelen türelméért és biztató szavaiért. Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom családtagjaimnak és barátaimnak, mert nélkülük ez a munka nem születhetett volna meg.