

SZENT ISTVÁN EGYETEM

MONOAROMÁS SZÉNHIDROGÉNEK MIKROBIÁLIS LEBONTÁSA
OXIGÉNLIMITÁLT KÖZEGEK BEN

FARKAS MILÁN

GÖDÖLLŐ

2017

A doktori iskola**Megnevezése:** Környezettudományi Doktori Iskola**Tudományága:** Környezettudomány**Vezetője:** Csákiné Dr. Michéli Erika
Tanszékvezető, egyetemi tanár
Szent István Egyetem
Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar
Környezettudományi Intézet
Talajtani és Agrokémiai Tanszék**Témavezetők:** Dr. Tánicsics András
Tudományos főmunkatárs
Szent István Egyetem
Regionális Egyetemi TudásközpontDr. Szoboszlay Sándor
Egyetemi docens
Szent István Egyetem
Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet
Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszék

.....

.....

Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezetők jóváhagyása

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Bevezetés.....	7
2. Irodalmi áttekintés.....	9
2.1 A felszín alatti víz jelentősége.....	9
2.2 Szénhidrogén szennyezések	10
2.3 A kőolajalkotó szénhidrogének jellemzése	12
2.3.1 Összes alifás szénhidrogének – TPH (Total Petroleum Hydrocarbon).....	12
2.3.2 Aromás szénhidrogének	13
2.4 Kármentesítési technológiák.....	14
2.5 A mikroorganizmusok szerepe a szénhidrogénbontásban.....	15
2.6 Környezeti tényezők hatása a szénhidrogén biodegradációra	16
2.6.1 A hőmérséklet hatása a szénhidrogének biológiai lebontására	16
2.6.2 Tápanyagellátás	17
2.6.3 A pH hatása a kőolajszármazékok biodegradációjára.....	17
2.6.4 Az oxigén és alternatív elektron akceptorok szerepe a szénhidrogének biodegradációjában.....	17
2.7 Az aromás szénhidrogének aerob lebontásában kulcsszerepet játszó enzimek..	20
2.7.1 A katekol 2,3-dioxigenáz gének diverzitása	21
2.8 A BTEX-vegyületek anaerob lebontása	22
2.8.1 A benzol anaerob biodegradációja	23
2.8.2 A toluol anaerob biodegradációja	24
2.8.3 Az etil-benzol anaerob biodegradációja	25
2.8.4 A xilolok anaerob biodegradációja	26
3. Anyag és módszertan	27
3.1 Mintavételezés.....	27
3.2 DNS és RNS izolálás.....	28
3.3 Agaróz gélelektroforézis.....	28
3.4 Az RNS átírása komplementer DNS-sé.....	29
3.5 PCR (Polimeráz láncreakció)	29
3.6 Terminális restrikciós fragmethossz polimorfizmus vizsgálat (T-RFLP).....	29
3.6.1 DNS szakaszok felszaporítása PCR segítségével a közösségi T-RFLP.....	29
3.6.2 A közösségi PCR termék emésztése restrikciós endonukleázzal.....	31
3.6.3 Az emésztett PCR termék tisztítása és analízise	31
3.7 DNS klónkönyvtárak létrehozása és feldolgozása.....	32
3.7.1 A klónkönyvtárak létrehozása.....	32
3.7.2 Az inzert visszanyerése a klónokból PCR segítségével	34
3.8 Sanger-féle dideoxi szekvenálás.....	34
3.9 Bázissorrend és filogenetikai elemzés	35
3.10 Csoportreprezentáns klónok terminális fragment (T-RF) hosszának meghatározása	35
3.11 Katekol 2,3-dioxigenáz és benzil szukcinát szintáz gének kimutatása a közösségi mintákból.....	35
3.12 Differenciált dideoxi primerhosszabítás - Single Nucleotid Primer Extension..	37
3.13 Stabil izotópos jelölés (SIP)	38
3.14 Újgenerációs DNS-szekvenálási módszerek	40
3.14.1 Piroszekvenálás	40

3.14.2	Félvezető alapú szekvenálás	41
3.15	Új baktériumfaj leírásához szükséges vizsgálatok	42
3.15.1	DNS-DNS hibridizáció	43
3.15.2	A guanin és citozin százalékos arányának meghatározása	44
3.15.3	Fenotípusos és kemotaxonomiai vizsgálatok	44
3.15.4	Sejtmembrán zsírsav analízis	45
3.15.5	Respiratórikus és lipokionok analízise.....	45
3.15.6	Poláris lipidek meghatározása.....	45
3.15.7	Szénhidrogénbontó képesség meghatározása	45
4.	Eredmények	47
4.1	A siklósi BTEX-vegyületekkel szennyezett, hipoxikus talajvíz mikrobaközösségének hosszútávú monitoringja	47
4.1.1	A mintavételi terület jellemzése.....	47
4.1.2	Az ST2-es kút mikroba közösségének feltárása 16S rDNS klónkönyvtárak segítségével	50
4.1.3	A klónkönyvtárak statisztikai elemzése, összehasonlítása	55
4.1.4	A mikroba közösség dinamikájának vizsgálata T-RFLP segítségével	55
4.1.5	A szennyezés lebontásában szerepet játszó katekol 2,3-dioxigenáz	57
4.1.6	Összefüggések vizsgálata a mikrobaközösség összetétele és az I.2.C alcsaládba tartozó C23O gének expressziója között	63
4.1.7	Diszkusszió	64
4.2	A siklósi mikrobaközösség stabil izotópos toluol lebontó vizsgálata hipoxikus körülmények között.....	68
4.2.1	A stabil izotópos dúsítás körülményei	68
4.2.2	A toluol fogyása a mikrokozmoszokban, valamint az egyes DNS frakciók elkülönítése	69
4.2.3	A mikrobaközösség diverzitása	70
4.2.4	Az I.2.C típusú C23O dioxigenázok kimutatása a SIP frakciókból.....	72
4.2.5	Diszkusszió	75
4.3	Vasredukáló mikroorganizmusok dúsítása a siklósi, BTEX-vegyületekkel szennyezett kárhelyről.....	77
4.3.1	A mikrokozmosz kísérlet körülményei	78
4.3.2	A kiindulási minta bakteriális diverzitása	80
4.3.3	A dúsítást követő mikrobiális diverzitás	81
4.3.4	A I.2.C típusú C23O és <i>bssA</i> gének detektálása és diverzitása.....	84
4.3.5	Diszkusszió	86
4.4	Az új baktériumfaj - <i>Zoogloea oleivorans</i> sp. nov.- leírásának bemutatása.....	87
5.	Következtetések	91
6.	Összefoglalás	93
7.	Summary	95
8.	Mellékletek.....	97
8.1	Irodalomjegyzék.....	97
8.2	Az éves monitoring során tervezett SNUpe primerek	117
8.3	A kísérletek során használt speciális táptalajok	117
8.3.1	A stabil izotópos dúsításnál használt tápoldat összetétele	117
	A SIP kísérlet során használt tápoldat az alábbi összetevőkből áll:	117
8.3.2	A vasredukáló mikroorganizmusok dúsítására használt tápoldatok	118
	összetétele	118
9.	Köszönetnyilvánítás	119

Rövidítések jegyzéke

BamB-I: ATP independent benzoyl-CoA reductase subunits (ATP független benzoil-CoA reduktáz alegységek)

BcrA-D: ATP-dependent benzoyl-CoA reductase subunits (ATP függő benzoil-CoA reduktáz alegységek)

Bss: benzylsuccinate synthase (benzil szukcinát szintáz)

BTEX: benzol, toluol, etil-benzol és xilolok

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

CCA: canonical-correlation analysis (kanonikus korreláció elemzés)

dNTP: deoxynucleotide triphosphates (dezoxinukleotid trifoszfátok)

OTU: operational taxonomic unit (operatív rendszertani egység)

PAH: polycyclic aromatic hydrocarbon (policiklikus aromás szénhidrogének)

PCA: principal component analysis (főkomponens elemzés)

PCR: polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)

SIP: stable isotope probing (stabil izotópos jelölés)

SNuPE: single nucleotide primer extension (differenciált dideoxi primerhosszabítás)

sp.: species (faj)

spp.: species (fajok)

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

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

1. Bevezetés

Napjainkra elértük az olajkitermelés csúcsát, valószínű, hogy a szárazföldön már nem fognak újabb óriásmezőket feltárni. Azonban a kitermelés, feldolgozás radikális csökkenése még évtizedeket várthat magára, és amíg kőolaj van, addig az általa okozott szennyezésekkel is számolnunk kell. A legtöbb környezeti szennyezést, akárcsak a világon, hazánkban is az kőolajszármazékok okozzák (Barótfi 2000). A kőolaj és származékai számos olyan komponenst tartalmaznak, amelyek károsak az emberi egészségre, karcinogén, teratogén és mutagén hatásúak lehetnek. Szennyezés esetén a szénhidrogének közvetlenül vagy a földtani közegen keresztül elérhetik a felszín alatti vizet, majd azzal együtt mozogva nagy távolságokra is eljuthatnak, elszennyezve az addig tiszta területeket, ivóvízkészleteket. Hazánkban a szénhidrogén szennyezéseket főleg tárolás és szállítás során bekövetkező hibák okozzák, csak az Országos Környezeti Kármentesítési Program Volt Szovjet Ingatlan alprogramja során 2,7-3,0 millió m³ talaj és 1,0-1,2 millió m³ felszín alatti vízkészlet elszennyeződését mutatták ki (OKKP 2005). Amennyiben a kárhely és a szennyezés tulajdonságai lehetővé teszik, a bioremediációs technológiák alkalmazása környezetkímélő és költséghatékony megoldás lehet a szénhidrogén szennyezések felszámolására.

Annak ellenére, hogy a BTEX-vegyületek aerob és anaerob körülmények közti biodegradációja széleskörűen kutatott, a hipoxikus közegekben lejátszódó lebontási folyamatokról igen kevés információ áll a rendelkezésünkre. Mivel a mélyen fekvő talaj illetve talajvíztáblák oldott oxigén koncentrációja legtöbb esetben alacsony, szükségszerű azon mikroba közösségek vizsgálata, melyek anyagcsere-útvonalai a hipoxikus körülményekhez adaptálódtak.

Ennek megfelelően célul tűztük ki:

- egy BTEX-vegyületekkel szennyezett hipoxikus kárhely mikroaerob mikrobaközösségének valamint az általuk hordozott aromás szénhidrogének bontásában résztvevő egyes funkciógenek hosszútávú monitorozását.
- stabil izotópos módszert alkalmazva a kárhely mikroaerob toluol biodegradációjában részt vevő baktériumok, valamint funkciógenek azonosítását,
- továbbá a lebontó mikroszervezetek feldúsítását és izolálását ökológiai szerepük pontosabb megértése érdekében.

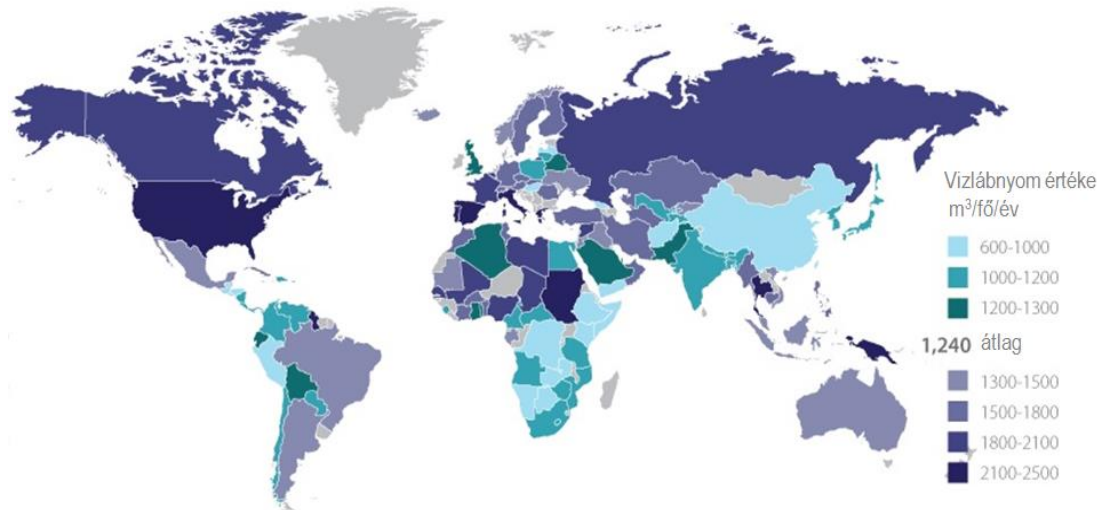
2. Irodalmi áttekintés

2.1 A felszín alatti víz jelentősége

A felszín alatti vizek fontossága az emberiség számára megkérdőjelezhetetlen, leszámítva a sarki jégsapkákat és gleccsereket, ezek adják az édesvíz készletek 97%-át. E vízkészletek emberek milliárdjai számára szolgáltatnak ivóvizet; az Európai Unió polgárainak közel 75%-a fedezi talaj- és rétegvízből mindennapi szükségleteit. A vízügyi nyilvántartás szerint hazánk 1771 ivóvízbázisából 1663 felszín alatti, melyeknek közel fele a szennyeződéssel szembeni veszélyeztetettség szempontjából sérülékenynek tekinthető (M-VGT 2009). A felszín alatti vizek ipari (hűtővízként és oldószerként), valamint mezőgazdasági (öntözővízként és állattartásban) felhasználása is jelentős. Az elmúlt 40 évben a talaj- és rétegvizek ökológiai és társadalom-gazdasági megítélése sokat változott, napjainkban egyre nyilvánvalóbbá válik, hogy e rétegekre, nemcsak mint édesvízforrásra kell tekintenünk, hanem természeti értéként is védenünk kell azokat. Fontos szerepet töltenek be a hidrológiai ciklusban, mocsaras-, lápos területek és folyók puffereként szolgálva a száraz periódusokban. Világszerte számos folyó éves vízhozamának több mint fele származik felszín alatti vizekből.

A környezeti hatások, legfőképpen az antropogén eredetűek nagymértékben befolyásolják a talaj- és rétegvizek minőségét és mennyiségét, e hatások várhatóan még évtizedekig fennmaradnak. Napjainkban elsősorban a harmadik világ országaiban közel másfél milliárd ember nem jut megfelelő mennyiségű vagy minőségű ivóvízhez és még többen élnek nem megfelelő higiénés körülmények között. Fertőzött, szennyezett víz fogyasztása és az azzal való tisztálkodás következtében közel négymillió ember hal meg évente. A népességnövekedésen túl az urbanizáció okozta koncentrált vízhasználat szintén jelentős terhet ró az egyes vízadókra (2.1. ábra). Míg két évszázaddal ezelőtt csupán a népesség 3-5 %-a élt városokban, az ezredfordulóra ez az arány 47%-ra növekedett, 2030-ban az ENSZ előrejelzései szerint a teljes népesség legalább 60% lesz városlakó. Egyes nagyvárosok koncentrált vízigényét már napjainkban sem képesek kielégíteni a közeli vízadókból, például Szingapúr ivóvíz szükségletének közel 40%-át malajziai importból fedezi.

Az ipari szennyezés, mezőgazdasági termésközelítő anyagok, kemikáliák valamint a nem megfelelő módon kezelt szennyvíz mind-mind veszélyeztethetik a talajvizek tisztaságát, míg a demográfiai növekedés, a klímaváltozás okozta hatások drasztikusan csökkenthetik mennyiségét (Szalkai 2009, Gleeson et al. 2012, Danielopol et al. 2003, McDonald et al. 2014).



2.1. ábra Az egyes országok vízlábnyom értékei (Mekonnen és Hoekstra 2011)

2.2 Szénhidrogén szennyezések

Hazánkban, akárcsak világszerte a szénhidrogének okozzák a legtöbb környezeti szennyezést. Az emberiség energiafelhasználásának közel egyharmadát a nyersolaj szolgáltatja, 2013-ban naponta több mint 9 millió tonna nyersolajat termeltek ki világszerte, ehhez hazánk 1638 tonnával járult hozzá (ksh.hu alapján). Az olajipar közvetlenül a világ GDP-jének 2,5%-ért felelős, hazai vállalatok közül a MOL állítja elő a hazai GDP 2%-át, ezzel az országos lista első helyén szerepel, ezen túl a GDP hatodát előállító transzport szektor működése szinte teljes mértékben a nyersolajra épül (Carlyle 2013, portfolio.hu). Az elmúlt 20 évben a szénhidrogén szennyezések mértéke és gyakorisága nagymértékben lecsökkent. A biztonsági intézkedések szigorítása és azok következetes betartása sajnálatosan többnyire világszintű haváriákhoz köthető. Az 1989-es Exxon Valdez katasztrófát követően az Amerikai Egyesült Államokban (USA) megalkották az Oil Pollution Act jogszabályt, mely szerint a szennyező kötelezhető az általa okozott károk teljes megtérítésére. A katasztrófa nemcsak az USA-ban, hanem a nemzetközi szabályozásban is nagy visszhangot váltott ki. Az elővigyázatosság ellenére az ásványolaj termékek feldolgozása, szállítása, tárolása és használata során továbbra is bekövetkezhetnek technológiai hibák, emberi mulasztások, anyagfáradások, így az általuk okozott szennyezések megjelenésével sajnos szinte mindenhol számolnunk kell (Etkin 2001, Carlyle 2013). Globálisan, átfogó tanulmányok hiányában, a földtani közegben és felszín alatti vizekben hátramaradt szennyeződések gyakoriságát még megbecsülni is nehéz. Az Amerikai Egyesült Államokban 1984 óta közel 1,5 millió -elsősorban szénhidrogéneket tartalmazó- földalatti tartály lett felszámolva (Global Soil Forum 2012). Az Európai Környezetvédelmi

Ügynökség 39 tagországában a kárhelyek száma megközelítheti a 2,5 milliót, a 2013-as JRC (Joint Research Center) jelentés időpontjában az azonosított szennyezőterületek száma 342 ezer körül alakult, melyből csupán 80 ezren végezték el a remediációt. A remediációs projektek legtöbb esetben 50 és 500 ezer euró közötti költségtartományba esnek, de előfordultak már 50 millió eurót meghaladó kármentesítések is. A szennyezések több mint felét nyersolaj, BTEX és klórozott szénhidrogén vegyületek okozzák. Hazánkban az Országos Környezeti Kármentesítési Program (OKKP) 2005-ös jelentése alapján a szennyezett területek és szennyezőforrások száma 30 ezer körül alakul. A károk mérséklésének, felszámolásának költségigénye összességében több mint 1.000 milliárd Ft-ra, időtartama 30-40 évre becsülhető. Az állam éves költségvetésből 10-20 milliárd Ft közötti összeget biztosít évente az OKKP működtetésére. A Nemzeti Kármentesítési Prioritási Lista alapján 2012-ig 500 területen közel 150 milliárd forint értékben valósult meg kármentesítés.

Hazánk felszín alatti vízkészleteinek védelmét a 219/2004. (VII. 21.) Kormányrendelet szabályozza. „A rendelet célja a felszín alatti vizek:

- a) jó állapotának biztosításával és annak fenntartásával,
- b) szennyezésének fokozatos csökkentésével és megelőzésével,
- c) hasznosítható készleteinek hosszú távú védelmére alapozott fenntartható vízhasználattal,
- d) a földtani közeg kármentesítésével összefüggő feladatok, jogok és kötelezettségek megállapítása.”

A 2004-es rendeletet kiegészíti a 6/2009. (IV. 14.) KvVM-EüM-FVM együttes rendelet a földtani közeg és a felszín alatti víz szennyezéssel szembeni védelméhez szükséges határértékekről és a szennyezések méréséről.

A szénhidrogén szennyezések négyféle állapotban fordulhatnak elő a felszín alatti közegben:

- szabad fázisban a talajban
- felszín alatti vízben oldva (illetve az oldhatósági határt meghaladva felülúszó fázist képezve)
- talajszemcsék felszínéhez kötötten
- gázfázisként a talaj szabad pórusaiban

A talajfelszínre kiömlött olaj szétterül, majd a nehézségi erő hatására egyre mélyebbre hatol a földtani közegben. Végül, amennyiben a beszivárgó szénhidrogén mennyisége nagyobb, mint a közeg olajvisszatartó képessége, a felszín alatti vízbe kerülhet, elszennyezve azt. A talajvíz vertikális és horizontális mozgásával a szénhidrogének továbbterjedhetnek, illetve kipárolgással átkerülhetnek más, addig nem érintett közegekbe. A hazai jogi szabályozásnak megfelelően, a szennyezés bekövetkezése után elsődleges a szennyezéssel kapcsolatos információk összegyűjtése és környezetvédelmi célú értékelése. A tervezési és kivitelezési szakaszban a helyi

adottságoknak megfelelően kell eljárni, hogy a szennyezés felszámolása minél hatékonyabban menjen végbe. A szennyezés veszélyességének meghatározása és az alkalmazandó kármentesítési technológia kiválasztása szempontjából tehát fontos az alábbi tényezők ismerete:

- a szennyezőanyag kémiai és fizikai tulajdonságai
- az érintett terület hidrogeológiai adottságai
- a környezeti, egészségügyi kockázat nagysága
- a hatályos környezetvédelmi követelményrendszer
- a rendelkezésre álló anyagok, források
- hatósági és lakossági akceptálhatóság, szakvélemény
- területi jelleg, távlati funkció (Anton et al. 2006, Barótfi 2000)

2.3 A kőolajalkotó szénhidrogének jellemzése

A kőolaj összetétele rendkívül heterogén, paraffinok (egyszeres kötést tartalmazó, nyílt szénláncú vegyületek), olefinek (egy vagy több kettős kötést tartalmazó szénhidrogének), naftének (kettős kötés nélküli, telített gyűrűs vegyületek, cikloalkánok) és aromás szénhidrogének alkotják, melyeknek aránya nagymértékben változhat a származási helytől és a feldolgozás technológiájától függően. A több száz, esetenként ezer vegyület főbb alkotóelemeit a szén (81-87%), hidrogén (10-14%), oxigén (0-7%), kén (0-7%) és a nitrogén (0-2%) adja. Megkülönböztetünk paraffin dús (pl.: amerikai), nafténbázisú (pl.: orosz) és átmeneti jellegű (pl.: román, francia) elegyeket. Az olajipari termékek előállításának lényege ezeknek az összetevőknek az elválasztása, vagyis a finomítás. A kőolaj finomítás elsősorban frakcionált desztillációval történik. A folyamat során felhevített kőolajat vezetnek a frakcionáló oszlopba, ún. kolonnába. A szénhidrogének közti forráspontkülönbségek alapján a különböző hosszúságú szénláncú vegyületek elkülönülnek egymástól, és az adott kolonna megfelelő hőmérsékletű tálcáin kiválnak. Az illékony anyagok (mint pl.: metán, etán, propán, bután) eltávoznak a kolonna felső részén (gáz frakció C_1-C_4). A további főbb termékeket szénatom szám szerint a nyers és könnyűbenzin C_4-C_{10} , a kerozin C_9-C_{16} , a gázolaj $C_{15}-C_{25}$, a kenő és fűtőolaj $C_{20}-C_{70}$ frakció alkotja, végül a maradékot az aszfalt képezi (Bruckner 1952, Furka 1991).

2.3.1 Összes alifás szénhidrogének – TPH (Total Petroleum Hydrocarbon)

A külföldi gyakorlatban a C_5-C_{40} -ig minden kőolaj eredetű szénhidrogént, míg a hazai jogszabályokban csak az alifás, 5-40 szénatomot tartalmazó vegyületeket sorolják e csoportba. A fent említett vegyületeket mind a kőolajban, mind annak származékaiban megtalálhatjuk. Kémiailag telítettekre (a szénatomok között csak egyszeres kötés található) és telítetlenekre

(kettes, hármas kötéseket is tartalmaznak) oszthatjuk őket, ezen belül lehetnek egyenes, elágazó és gyűrűs láncúak.

A TPH csoporton belül elkülönítünk VALPH (Volatile Aliphatic Petroleum Hydrocarbon) - illékony alifás/alciklusos szénhidrogén vegyületeket, melyek 5-10 szénatomot tartalmaznak és nagy mennyiségben megtalálhatóak gázolinban, benzinben, valamint a kerozinban.

A másik csoportot az EPH (Extractable Petroleum Hydrocarbon) - extrahálható szénhidrogének, kevésbé vagy nem illékony vegyületek alkotják, amelyek pl.: a gázolaj, fűtőolajok, kenőolajok fő alkotórészei (Szoboszlai és Kriszt 2008).

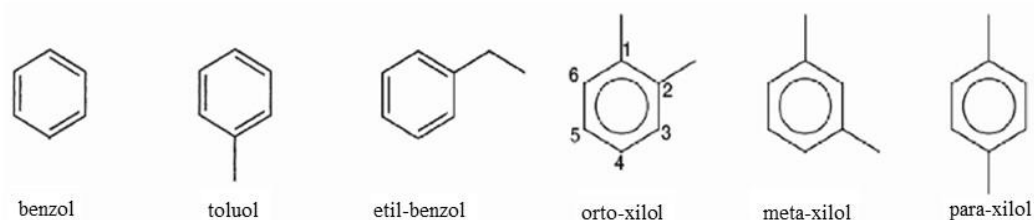
2.3.2 Aromás szénhidrogének

Telítetlen gyűrűs, konjugált kettős kötést tartalmazó vegyületek. Egyes benzolszármazékokat régebben illatos növényi gyantákból, balzsamokból nyerték ki, innen kapta a csoport az elnevezését (Furka 1991).

2.3.2.1 BTEX-vegyületek - Benzol és alkilbenzolok

Illékony, monoaromás vegyületek, melyek közül a legjelentősebbek a csoport névadói: benzol, toluol, etil-benzol és xilol (2.2. ábra). Természetben megtalálhatóak a nyersolajban 4 g/l-es koncentrációban, kis mennyiségben (0,8 ppb) kimutathatóak tengerek, óceánok vizéből a gáz- és olajmezők közelében.

A BTEX-vegyületek a leggyakrabban előállított vegyi anyagok között szerepelnek, éves szinten világszerte 8-10 millió tonna benzolt, 5-10 millió tonna toloult, valamint etil-benzolt és 10-15 millió tonna xilolt termelnek. Felhasználásuk széles területen (pl.: oldószerként, festékek, lakkok, gumitermékek, benzinek adalékanyagaiként, szerves szintéziseknél, gyógyszergyártásban) történhet. A BTEX-vegyületek legfőképpen autók, repülőgépek emissziójából, és különböző olajipari balesetektől kerülnek környezetünkbe. A csoport vegyületei már kis koncentrációban mérgezőek, ezen felül a benzol emberben bizonyítottan rákkeltő hatású.



2.2. ábra A BTEX-vegyületek szerkezeti képlete

Mind a négy összetevő az idegrendszer károsodását okozhatja, továbbá a benzol káros hatással lehet a csontvelő vérképző sejteire és akut myeloid típusú leukémiát okozhat (ATSDR 2004). Egy Kínában készített átfogó tanulmány alapján a 100 000 főre vetített leukémiás halálozások száma a benzollal érintkező munkavállalók esetében 14, míg a benzolt nem alkalmazó üzemek dolgozói között 2 fő volt.

Azon munkavégzők között, akik korábban átestek benzolmérgezésen, a tapasztalt leukémiás halálozási ráta 701/100 000 fő (Yin et al. 1987). A B szennyezettségi határértéket (a jogszabály által meghatározott kockázatos anyag koncentráció) benzol esetében felszín alatti vizekre 1 µg/l, míg a toluol, etil-benzol és xilolok esetében 20 µg/l koncentrációban határozza meg a 6/2009. (IV. 14.) KvVM-EüM-FVM együttes rendelet.

2.3.2.2 PAH-vegyületek - Policiklikus aromás szénhidrogének

Kőolaj képződése, növényi, állati szervezetek bomlása, tökéletlen égés során keletkező vegyületek. Ebbe a csoportba 19, több (2-7) aromás gyűrűt tartalmazó szénhidrogén tartozik, melyek a naftalinok kivételével nem illékonyak. A PAH-vegyületekből 7 bizonyítottan rákkeltő hatású (WHO 2010).

2.4 Kármentesítési technológiák

A szénhidrogének és egyéb szennyezők közegből való eltávolítására ma már sokféle technológia ismert. Ezek a kármentesítési módszerek lehetnek fizikai, kémiai, termikus, izolációs, illetve biológiai eljárásokon alapulók. A biológiai módszerek esetében az egyes élő szervezetek, legtöbb esetben mikroorganizmusok, szénhidrogén bontó képességét kihasználva lehetőség nyílik arra, hogy az emberi tevékenység során kijuttatott szennyezőanyagokat környezetkímélő módon elimináljuk, a szennyezéseket megszüntessük. Az amerikai Környezetvédelmi Hivatal (EPA – Environmental Protection Agency) a biológiai módszerek alkalmazását részesíti előnyben minden olyan esetben, ahol az lehetséges (Szoboszlai et al. 2002). A kármentesítést végezhetjük *in situ*, vagy *ex situ* módszerekkel. Az *in situ* technológiákról akkor beszélünk, amikor az elszennyezett közeget olyan módszerekkel tisztítják meg, mely során azt nem termelik ki, valamint a tisztított felszín alatti vizet visszanyeletik, szikkasztják a területen belül. Az *ex situ* technológiák esetében a szennyezett közeget, illetve felszín alatti vizet kitermelik, és csak kitermelés után általában jó kontrolálható körülmények között mentesítik a szennyezőanyag(ok)tól. (Vidali 2001, Khan et al. 2004).

2.5 A mikroorganizmusok szerepe a szénhidrogénbontásban

A felszín alatti közegek általában tápanyagszegénynek tekinthetők, mivel a felszínről korlátozott mennyiségű szerves vegyület jut el a mélyebben fekvő rétegekbe. Így nem meglepő, hogy a mikroorganizmusok száma és aktivitása nagyságrendekkel alacsonyabb, mint a felszíni vizekben, vagy talajrétegekben (Goldscheider et al. 2006, Griebler és Lueders 2009). A szerves szennyezőanyagok bemosódásukkal tápanyagot visznek a közegbe és az általuk okozott szelekciós nyomásra a mikrobaközösség összetétele megváltozik, a szennyezők degradációjára képes organizmusok válnak dominánssá. A szénhidrogén bontási képesség széles körben elterjedt a mikroszervezetek között, több különböző baktérium- és gombacsoport is rendelkezik ezzel a tulajdonsággal. Azonban meg kell jegyeznünk, hogy egyik mikroszervezet sem képes a szennyezőanyagok teljes spektrumának bontására, ezért a komplex szennyezések, mint például nyersolajszennyezés, teljes degradációjára csak többtagú, különféle enzimrendszerekkel rendelkező mikrobaközösség lehet képes. Atlas már 1981-ben 22 baktérium, egy alga és 14 gomba nemzetséget említ, melyek mind vízi környezetből lettek izolálva és szénhidrogén bontási képességgel rendelkeznek. Az általa említett legjelentősebb szénhidrogén bontó taxonok: *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Candida*, *Rhodotorula* és *Sporobolomyces* (Atlas 1981). Austin és munkatársai (1977) az előző mikroszervezeteken kívül még a *Bacillus*, *Comamonas*, *Rhodococcus*, illetve *Sphingomonas* nemzetségeket tartja szénhidrogének bontására képesnek. Ma már jóval több nemzetségről ismert, hogy képes e vegyületek lebontására, pl. a Deepwater Horizon okozta szennyezés eliminációja mögött egy, az Oceanospirillales rendbe tartozó mikrobát gyanítanak a kutatók (Hazen et al. 2010).

A szennyezőanyagok lebontásában szerepet játszó enzimek gyakran plazmidokon kódoltak, így a mikrobaközösség gyors adaptációjában szerepet játszhat azok horizontális géntranszfer útján történő terjedése. A *Pseudomonas* nemzetség tagjai körében számos ilyen plazmid ismert, és nagymértékben kutatott. Az egyik, működésében legjobban feltárt plazmid, az ún. TOL plazmid, amely szinte kizárólag *Pseudomonas*okban található meg, és a toluol lebontás enzimeit kódolja (Burlage et al. 1989). E plazmid 115 kilobázis nagyságú és mivel transzpozon eredetű szekvenciákat is tartalmaz, könnyen átadódik, nagy mobilitással rendelkezik. A horizontális géntranszfer *in situ* megfigyelése azonban sok nehézségbe ütközik és emiatt ritkán dokumentált folyamat (Thomas és Nielsen 2005). Továbbá a *Pseudomonas*ok más fajokkal egyetemben felületaktív anyagokat is termelnek, melyek növelik a hidrofób szénhidrogén szennyezők vízoldhatóságát. Többek között egyes *P. fluorescens* és *Bacillus* sp. törzsek lipopeptideket, a *P. aeruginosa* rhamnolipideket míg a *Rhodococcus* fajok glikolipideket és poliszacharidokat

termelhetnek (Banat 1995). Vasredukáló baktériumok körében kimutatták, hogy egyes fajok vas(III)-kelátorokat bocsájtanak a közegbe, ezáltal a számukra hasznosíthatatlan oldatlan vasoxidok elérhetővé válnak, így közvetve stimulálva a szennyezőanyagok anaerob lebontását (Lovley 2003).

A felszín alatti közegek bioremediációja során a legtöbb kutatás a baktérium közösségek összetételére, és azon belül az egyes fajok funkcióira összpontosít, az elmúlt évtizedben kezdték csak feltárni a protozoák és a bakteriofágok szerepét ezen ökoszisztémákban. Noha számos protozoa baktériumokkal táplálkozik, az általuk kibocsájtott vegyületek képesek lehetnek a bakteriális metabolizmust stimulálni, továbbá a szénhidrogének biológiai hozzáférhetőségét növelni. A pozitív példák mellett, azonban számos esetben semleges vagy negatív hatást is megfigyeltek a kutatók (Griebler et al. 2014, Biagini et al. 1998, Strauss és Dodds 1997). Mattison és munkatársai által beállított kísérletben (2005) a *Heteromita globosa* nevű protozoa ugyan lecsökkentette a kísérletben alkalmazott *Pseudomonas* törzs csíraszámát, azonban ez a kisebb populáció is ugyanannyi idő alatt képes volt a benzol biodegradációjára, mint az, amely nem állt protozoa „szabályzás” alatt. Cunningham és munkatársai (2009) eredményei alapján a triklór-etilén biodegradációját a protozoák jelenléte meggátolta, de ha a szennyezőanyag koncentrációja elérte a protozoákra nézve toxikus értéket, vagy azokat szűréssel eltávolították a rendszerből a biodegradáció végbement. A bakteriofágok szennyezett ökoszisztémákban betöltött szerepének vizsgálatára csak néhány kutatás irányult, a „killing the winner” hipotézis szerint bizonyos esetekben a fágok lehetnek felelősek a mikrobaközösségben bekövetkezett dominanciaviszonyok megváltozásáért (Griebler et al. 2014).

2.6 Környezeti tényezők hatása a szénhidrogén biodegradációra

2.6.1 A hőmérséklet hatása a szénhidrogének biológiai lebontására

A különböző környezeti feltételek nagymértékben befolyásolják a kőolajkomponensek biodegradációját. A hőmérséklet egyrészt direkt hatással van a szennyezőanyagok fizikai állapotára, megváltoztatja az olaj viszkozitását, valamint az illékony komponensek kipárolgását, másrészt hat a közegben élő mikrobaközösségre és annak diverzítására. A mikrobák széles hőmérsékleti tartományban (-5°C - $+120^{\circ}\text{C}$) képesek szaporodásra. Megkülönböztetünk hidegkedvelő (pszihrofil), közepes hőmérsékletet preferáló (mezofil) és hőkedvelő (termofil) mikroszervezeteket. Noha a szennyező szénhidrogének biodegradációjáról a legtöbb információt a mezofil mikrobák szolgáltatják a tudomány számára, a fent említett mindhárom csoportból kimutattak szénhidrogének degradációjára képes fajokat. A legtöbb kutatás eredménye azt igazolja, hogy a $20-30^{\circ}\text{C}$ közötti értékek tekinthetőek optimálisnak (Atlas 1981, Okoh 2006).

Kármentesítés során azonban a közeg hőmérsékletének megváltoztatására csak *ex situ* alkalmazások során nyílik lehetőség, könnyen belátható, hogy egy 10-16 C° hőmérsékletű talajvíztábla felmelegítése szinte lehetetlen vállalkozás.

2.6.2 Tápanyagellátás

Az enzimek megfelelő működéséhez, a szénforráson kívül makro- mikro- és nyomelemekre is szükség van. Fontos limitáló tényező lehet a nitrogén, foszfor, kálium jelenléte. Ezen makroelemek arányának helyes megválasztásával (pl.: C:N=10:1, C:P=100:1), illetve a szennyezett közegbe történő keverésével a degradáció jelentősen meggyorsítható. A tápanyagok felvételéhez, azok lebontásához, transzformációjához a víz biztosítja a reakcióközeget. A kísérletek szerint a talajban zajló lebontó folyamatok számára 50-70%-os víztartalom a legmegfelelőbb (Dibblef és Bartha 1979).

2.6.3 A pH hatása a kőolajszármazékok biodegradációjára

A közeg pH-ja befolyásolja a tápanyagok mobilizálhatóságát, ezen keresztül a mikroszervezetek anyagcseréjét. Szélsőséges kémhatás esetén az érzékeny enzimreakciók lelassulnak, illetve leállnak (Anton et al. 2006). A vizes élőhelyek és talajok pH-ja széles spektrumban alakulhat, míg egyes bánya meddők pH-ja 2,5, addig a szikes puszták, tavak pH értéke akár a 11-et is elérheti. A legtöbb baktérium a semleges körüli pH értéket preferálja, a mikroszkopikus gombák toleránsabbak a savas irányba elmozduló pH-val szemben. Verstraete és munkatársai (1976) kutatásaiban kimutatta, hogy a gázolaj lebontásának mértéke megkétszereződött, miután a szennyezett talaj pH értékét 4,5-ről 7,4-re emelték, 8,5-ös pH fölött azonban a biodegradáció ismét lelassult. Dibblef és Bartha (1979) az olajos iszap biodegradációjának optimális pH értékét 7,8-nál határozta meg.

2.6.4 Az oxigén és alternatív elektron akceptorok szerepe a szénhidrogének biodegradációjában

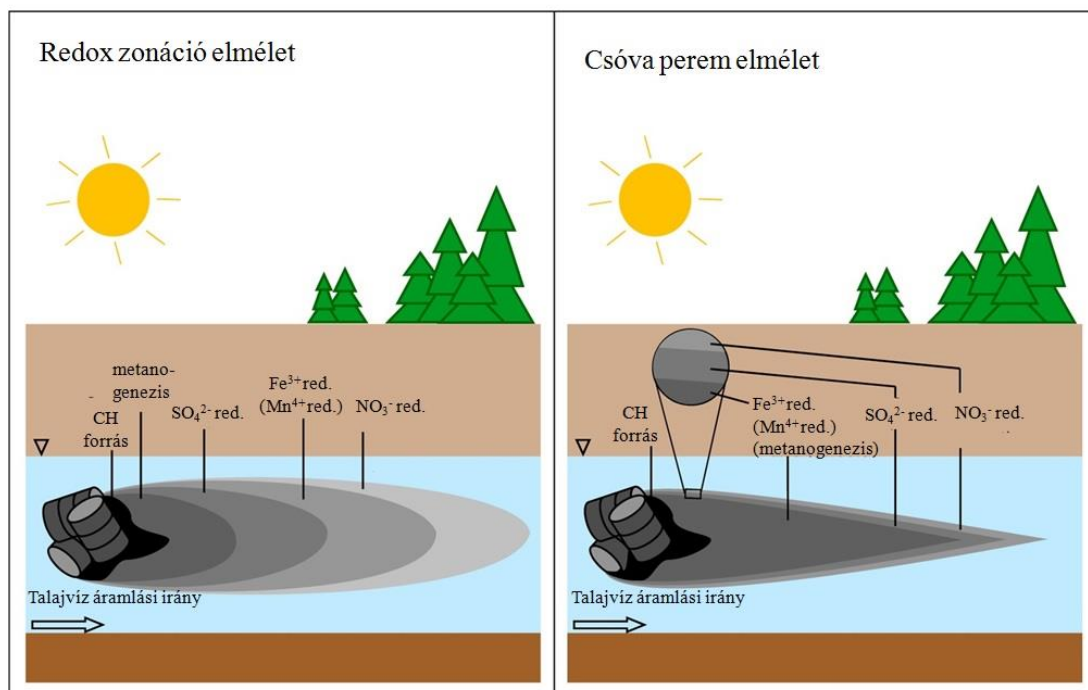
A többi szénhidrogén származékkal szemben a BTEX-vegyületek vízdékonysága magasnak tekinthető, így a talajvíz táblában a szennyezési csóva gyorsan kialakul (Chakraborty és Coates 2004). E szennyezők biodegradációja során az elektron akceptor elsődlegesen az oxigén, mivel a lebontásuk legfőbb lépése, az aromás gyűrű hasítása legtöbbször oxigenáz enzimekkel valósul meg (Harayama et al. 1992). Noha a szénhidrogének lebontása megvalósulhat anaerob körülmények között is, az aerob degradáció sebessége jóval meghaladja azt (Anton et al. 2006). A nagy mennyiségben jelen lévő szennyezőanyag azonban gátolhatja az oxigén beoldódását a vizekbe, ezzel párhuzamosan a szennyeződés lebontása miatt a mikroszervezetek oxigénigénye

jelentősen megnövekszik. Az oxigénszegény, mikroaerofil környezetben a fakultatív anaerob mikroszervezetek kerülnek előtérbe, hiszen megfelelő mennyiségű O_2 jelenlétében aerob lebontási utakat használnak, de az oxigénszint lecsökkenése esetén átváltanak az alternatív elektron akceptorokra. A biodegradációs folyamatok gyorsítása érdekében, hiánya esetén az oxigén mennyiségét a kármentesítési eljárások során olyan fizikai beavatkozásokkal növelik, mint a talajlazítás, átforgatás, befűvés, áramoltatás vagy a nyeletés. Mindazonáltal e módszerek igen sok energiát igényelnek, legfőképpen a felszín alatti szennyezések esetében, ahol gyakorta anaerob körülmények és az azok által meghatározott mikrobaközösségek dominálnak. Az oxigén jelentős hányada ilyen esetekben az anaerob üledékben található redukált állapotú szulfid, vas és egyéb ionokkal fog először reakcióba lépni. Klórozott szénhidrogének, vagy friss gázolajszennyezés esetén az *in situ* bioventillációs eljárás nem alkalmazható, mivel az az illékony, sok esetben toxikus komponenseket kihajtja a szennyezett közegből a levegőbe (Philp és Atlas 2005, KVVM 2010). Egyes kármentesítési eljárások során a közegbe hidrogén-peroxidot kevernek az oxigénszint növelése érdekében, azonban e vegyület könnyen reagálhat az ott található szerves anyagokkal, szennyezőkkel. Szélsőséges esetekben akár a szénhidrogén bontására képes mikroszervezetek populációméretét is lecsökkentheti, így is veszélyeztetve a biodegradáció sikerességét (Maier 2000).

Vastag agyag vízzáró rétegek, vagy szénforrásban gazdag talajok hatására természetesen is előfordulhatnak anaerob talajvízrétegek, azonban legtöbbször mégis valamilyen szennyeződés hatására alakulnak ki oxigénhiányos közegek. Az erősen szennyezett talajvizek esetében (akár 100 mg/l szénhidrogén koncentráció), az elektron donor szénhidrogének mennyisége jóval meghaladhatja a rendelkezésre álló elektron akceptorok szintjét, ilyen esetekben a szennyezés természetes úton történő biodegradációjára sajnos csekély az esély. Egyes modellek szerint az ilyen nagymértékű szerves szennyezések hatására a vízadókban redox zónák alakulnak ki (2.3. ábra). A redox zonáció elmélet lényege az, hogy az alternatív elektron akceptorok hasznosítása redoxpotenciáljuk alapján történik, így a szennyezési csóva középpontjában leggyakrabban metanogén kondíciók, majd a csóva pereme felé haladva szulfát-, majd vas- és mangánredukáló, végül denitrifikáló zónákat figyelhetünk meg. Azaz a nitrát-, vas- és mangánredukáló közeg általában közepesen, míg a szulfátredukció és metanogenezis erősen redukáló körülmények között alakul ki. Az uralkodó redox kondíciók meghatározása szennyezett felszín alatti közeg esetében nehézkes. Amennyiben a nitrát koncentráció meghaladja a 0,5 mg/l-es értéket, nitrátredukció valószínűsíthető. Alacsony nitrát valamint magas redukált vas (Fe(II)) és mangán (Mn(II)) koncentrációk esetében mangán- és vas-redukáló körülményekről beszélhetünk. Továbbá ha a hidrogén-szulfid koncentráció meghaladja a 0,05 mg/l-t szulfátredukáló, 0,2 mg/l szén-dioxid koncentráció felett pedig metanogén körülmények valószínűsíthetőek. Egyes

elektron akceptorok, mint például a vas vagy mangán, könnyen bemosódhatnak a felszíni rétegekből, valamint elvándorolhatnak talajvíz áramlásával, így megnehezítve az egyes zónák határainak meghatározását (Wiedemeier és Chappelle 1998, Christensen et al. 2000, 2001).

Az újabb csóva perem (plume-fringe) elmélet alapján az oldott elektron akceptorok a szennyezési csóva középpontjában nagy koncentrációjú szennyezés hatására gyorsan kimerülnek, és a talajvíz áramlás irányában lévő területeken nem, vagy csak nagyon lassan tudnak visszatöltődni, hiszen a keresztirányú diszperzió mértéke igen alacsony (2.3. ábra). Ennek megfelelően a szennyezés középpontjában és az az alatt elhelyezkedő területeken metanogén degradáció, oldatlan vas(III)-, valamint mangán(IV)-redukció képzelhető el. Az elektron akceptorok ilyen jellegű kimerülését a közelmúltban történt vizsgálatok igazolják (Anneser et al. 2008, 2010). Amennyiben a szennyezőanyag koncentrációja csekély és nem meríti ki a rendelkezésre álló elektron akceptorokat, az áramlás irányában kialakulhat bizonyos mértékű zonáció, ahol először nitrát- és szulfátredukció, majd metanogenezis jelenhet meg (Tischer et al. 2013, Fahrenfeld et al. 2014).



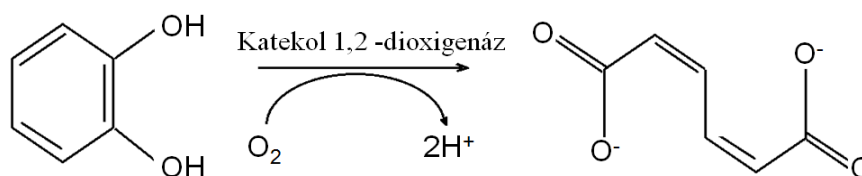
2.3. ábra A redox zónáció és csóva perem elméletek modellezése (Meckenstock et al. 2015)

Azonban a nagymértékben szennyezett talajvizek esetében az elektron donorok mennyisége jóval meghaladja az elektron akceptorok oxidációs kapacitását. Ezen esetekben valószínűbb, hogy az egyes elektron akceptorok elérhetősége, és nem azok termodinamikai előnyösége mozgatja a lebontási folyamatokat. A csóva perem elmélet alapján az oxigénnel, nitráttal és szulfáttal történő biodegradáció elsősorban a szennyezési csóva peremén valósul meg, ahol a

környező tiszta talajvízből ezen anyagok diffúzióval és diszperzióval bekerülhetnek. Azon a területen pedig, ahol az oldott elektron akceptorok kimerültek a biogradációs folyamatokat a vas- és mangán redukció, valamint a metanogenezis mozgatja (Meckenstock et al. 2015)

2.7 Az aromás szénhidrogének aerob lebontásában kulcsszerepet játszó enzimek

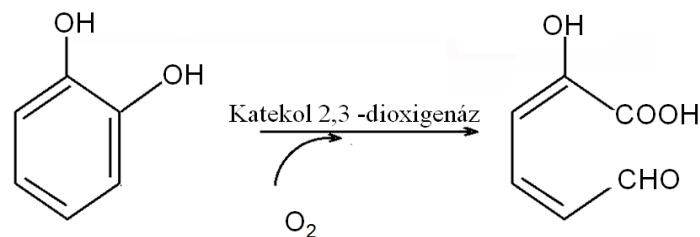
Az aerob lebomláshoz szükséges anyagcsere útvonalakat kétféle enzim: a monooxygenázok és a dioxigenázok rendszere biztosítja. A monooxygenázok, melyek az úgynevezett „tol” útvonalhoz kapcsolhatóak, a metil és etil szubsztitúciós csoportokat támadják (Tsao et al. 1998, Khan et al. 2001). A dioxigenázok, melyek az úgynevezett „tod” útvonalhoz kapcsolhatóak, az aromás gyűrű támadása során 2-hidroxi csoportot hoznak létre azon (Tsao et al. 1998, Jindrová et al. 2002, Khan et al. 2001). A metabolizmus során minden esetben katekol intermedierek keletkeznek. A benzol lebontása csak a „tod” útvonalon ismert és fő közti terméke a katekol. A toluol és etil-benzol más-más útvonalakon bomlanak le, mely útvonalak fő köztitermékei a 3-metilkatekol, illetve 3-etilkatekol (Tsao et al. 1998, Johnson et al. 2003, Zhang et al. 2013). A xilolok metabolizmusa során mono-metilált katekolok keletkeznek, például a m-xilol bontása során 3-metilkatekol (Stephens 2011). A katekol köztitermékek aromás gyűrűje a lebontás következő lépésben felhasad, ezt a reakciót katalizálják a katekol-dioxigenáz enzimek, melyek mononukleáris, nem-hem vas-tartalmú enzimek. Ebben a gyűrűhasító reakcióban résztvevő dioxigenáz enzimek két fő csoportba sorolhatók aszerint, hogy a szubsztrátként funkcionáló katekol, illetve katekol-származék aromás gyűrűjét melyik szénatom mellett hasítják. Az intradiol dioxigenázok a katekol gyűrűjét a hidroxilcsoportot hordozó két szénatom között hasítják („*orto*”-típusú hasítás), valamint nem-hem Fe(III) iont tartalmaznak kofaktorként (Vaillancourt et al. 2006). A katekolból így létrejövő termék a *cisz,cisz*-mukonsav (2.4. ábra). Ebbe a csoportba tartoznak például a katekol 1,2-dioxigenáz enzimek is.



2.4. ábra A katekol 1,2-dioxigenáz enzim „*orto*” típusú gyűrűhasítása (saját ábra)

Az extradiol dioxigenázok ugyanakkor nem-hem Fe(II) iont (esetleg más kétértékű fémiont) tartalmaznak kofaktorként, és a katekol aromás gyűrűjét a hidroxil-szubsztituensektől meta irányban hasítják (Siegbahn és Haeffner 2004). A reakció során létrejövő termék katekol

szubsztrát esetén a 2-hidroximukonsav-félaldehyd (2.5. ábra). Ebbe a csoportba tartoznak például a katekol 2,3-dioxigenáz enzimek.



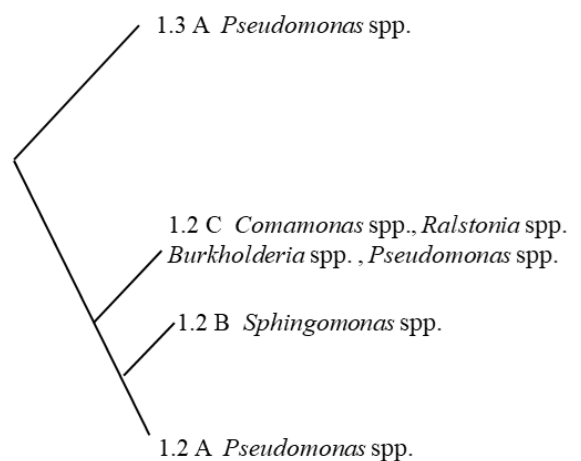
2.5. ábra A katekol 2,3-dioxigenáz enzim „meta” típusú gyűrűhasítása (saját ábra)

Az intradiol és extradiol dioxigenáz enzimek strukturális szempontból, illetve az aminosav szekvenciájukat tekintve nagyban különböznek egymástól, és evolúciós szempontból is két külön csoportba tartoznak. Míg az intradiol dioxigenázok monofiletikus csoportot alkotnak, addig az extradiol dioxigenázok polifiletikus eredetűek, és több alcsoportjukat lehet elkülöníteni (Eltis és Bolin 1996, Vaillancourt et al. 2006).

2.7.1 A katekol 2,3-dioxigenáz gének diverzitása

Azok az enzimek, amelyek a BTEX-vegyületek aerob lebontásában játszanak szerepet, az aminosav-szekvenciák alapján négy alcsoportba oszlanak meg: az I.2 családon belül az I.2.A, I.2.B és I.2.C, míg az I.3 családon belül az I.3.A alcsoportban találhatók meg.

Az I.2.A alcsoportban kizárólag a Gamma-proteobaktériumok közé sorolt *Pseudomonas* nemzetség egyes tagjaihoz köthető C23O (katekol 2,3-dioxigenáz) enzimek szekvenciái találhatók, míg I.2.B alcsoport szekvenciái nagy részben *Sphingomonas* baktériumokhoz köthetőek. Ezzel szemben az I.2.C alcsoport C23O szekvenciái számos taxonhoz kapcsolhatóak, így a Béta-proteobaktériumokhoz tartozó *Comamonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia* és a Gamma-proteobaktériumokhoz sorolt *Pseudomonas* nemzetség egyes fajai által kódolt C23O szekvenciák egyaránt megtalálhatóak ebben az alcsoportban (2.6. ábra).



2.6. ábra Az extradiol dioxigenáz enzimek filogenetikai helyzete (Táncsics 2009 alapján)

Az I.2.C alcsoportba tartozó C23O enzimekről Kukor és Olsen (1996) kimutatta, hogy megnövekedett oxigén affinitással rendelkeznek, így a BTEX-vegyületek hipoxikus közegben

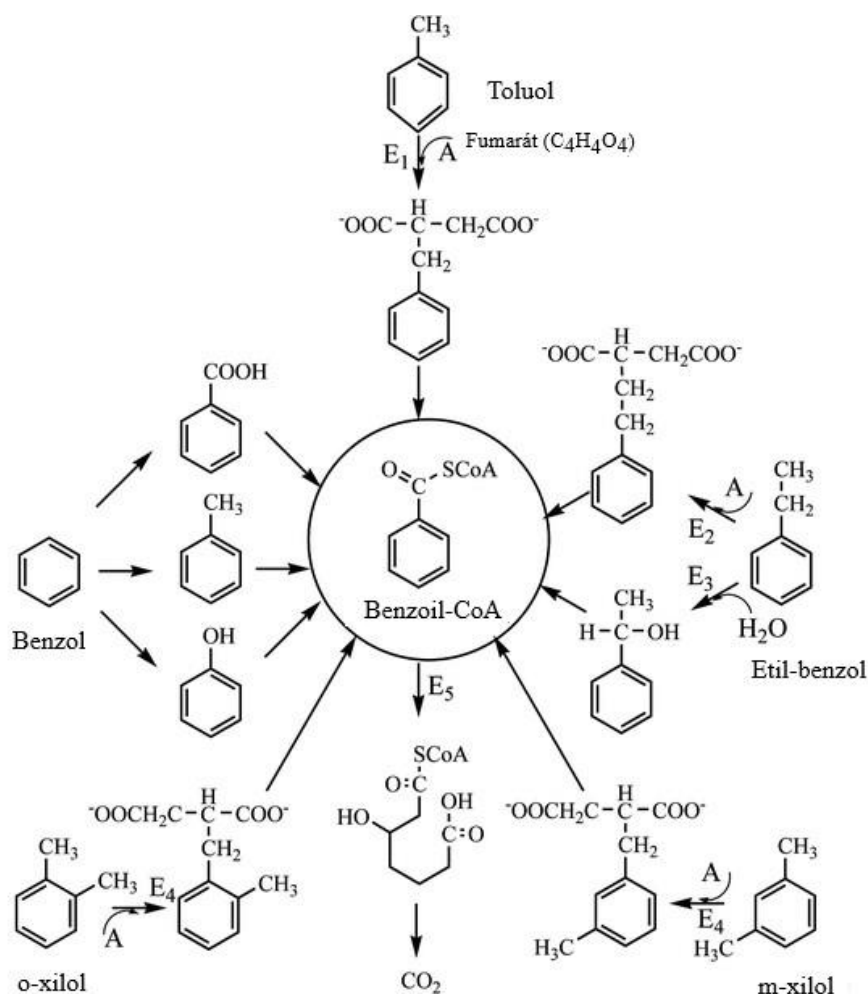
történő lebontásában nagy szerep juthat azon baktériumoknak, amelyek ezt az enzimet kódoló gént fejezik ki.

Az utóbbi évek kutatásainak köszönhetően egyértelművé vált, hogy alacsony oldott oxigén koncentrációk mellett is lejátszódik a BTEX-vegyületek aerob biodegradációja (Olsen et al. 1995, Yerushalmi et al. 2002, Aburto et al. 2009). Diverzitásukat kihasználva az extradiol dioxigenázokat kódoló géneket gyakran használják aromás szénhidrogénekkal szennyezett közegekben biomarkerként a mikroba közösségek anyagsere képességeinek monitorozására (Brennerova et al. 2009, Iwai et al. 2010, Táncsics et al. 2010, Muangchinda et al. 2015, Nafian et al. 2016). Az azonban a mai napig nem tisztázott, hogy az ezeket az enzimeket kódoló gének mennyire elterjedtek a baktériumok között, illetve mely baktériumok hordozhatják ezeket a géneket

2.8 A BTEX-vegyületek anaerob lebontása

Az 1980-as évek előtt szinte csak az aerob mikrobiális BTEX lebontást tanulmányozták, és csak az utóbbi két évtizedben került a kutatások középpontjába a hipoxikus és anoxikus közegek vizsgálata. Abban az összes kutató egyetért, hogy a benzol anaerob lebontása a legbonyolultabb, míg a toluolé aránylag egyszerűen végbemegy. Ezen tényből fakadóan a toluol biodegradációja a leginkább kutatott és feltárt terület. Nitrát, Mn(IV), Fe(III), szulfát, CO₂ és perklorát, klorát terminális elektron akceptorok esetében is megfigyelték e vegyület teljes biodegradációját. Ezen túl a toluol szénforrásként történő hasznosítását anaerob fototróf mikroorganizmusok esetében is leírták (Zengler et al. 1999, Harwood és Gibbson 1998). A talajok mélyebb rétegeiben, tavak, tengerek oxigénmentes üledékeiben is található fakultatív-, illetve obligát anaerob mikroszervezetek kitenyésztése, a sokszor speciális életkörülmények miatt nehézségekbe ütközik, ezért gyakran dúsító tenyészetekben, illetve mikrokozmosz kísérletekben vizsgálják e mikrobaközösségek szénhidrogén-lebontását (Edwards et al. 1992, Herrmann et al. 2007, Musat és Widdel 2008, Sun et al. 2012).

Jelenleg három fő stratégia ismert az anaerob mikroorganizmusok szénhidrogének biodegradációjában (2.7. ábra, Heider 2007): (i) Fumarát addicója a metil vagy metilén csoportokhoz glicil gyök enzimek segítségével. (ii) Oxigén független hidroxiláció, mely az etil-benzol és a hozzá hasonló vegyületek lebontásában játszik fontos szerepet (Johnson et al. 2001, Kniemeyer-Heider 2001). (iii) Karboxiláció, mely feltehetőleg az alkánok (Callaghan et al. 2006), metil-naftalin (Sullivan et al. 2001), naftalin, benzol (Meckenstock és Mouttaki 2011) és fenantrén (Davidova et al. 2007) biodegradációjában játszhat szerepet.



2.7. ábra A BTEX-vegyületek anaerob lebontása (Perei et al. 2013- Zhang 2005 alapján)

Továbbá fontos megemlíteni, hogy a közelmúltban felfedeztek egy olyan oxigenáz enzimet, mely egy elméleti modell szerint a denitrifikációs közttermékekből felszabaduló oxigént használja a szénhidrogének oxidálására. A mechanizmus pontos megértése azonban még várat magára (Zedelius et al. 2011, Ettwig et al. 2012).

2.8.1 A benzol anaerob biodegradációja

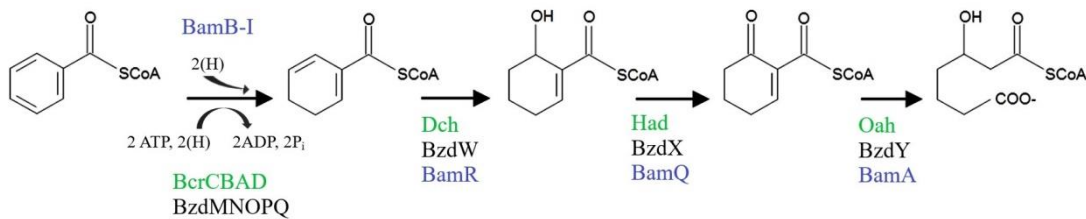
Anaerob közegben terepi és laboratóriumi kísérletek alapján a BTEX-vegyületek közül a benzol a leginkább perzisztens (Aronson és Howard 1997). Nagyon kevés ismeret áll rendelkezésünkre azon mikroorganizmusokról, melyek képesek a vegyület biodegradációjára. Ezidáig két *Dechloromonas* (RCB, JJ) és két *Azoarcus* törzset (DN11 és AN9) sikerült tiszta tenyészetben fenntartani, melyek rendelkeznek e képességgel (Coates et al. 2001b, Kasai et al. 2006). A leginkább kutatott RCB törzs nitrát, perklorát, klorát és oxigén jelenlétében is képes a benzol hasznosítására. Az *Azoarcus* törzsek nitrát jelenlétében voltak képesek a benzol biodegradációjára. Chakraborty és Coates (2004) szerint a (per)klorát-redukáló *Dechloromonas* közeli rokon *Azospira* fajok szintén fontos szerepet tölthetnek be a benzol vegyületek

természetes biodegradációjában. 2011-ben Holmes és munkatársai a hipertermofil archea *Ferroglobus placidus* esetében is beszámoltak benzolbontó képességről.

Anaerob körülmények között az aromás gyűrű aktivizációja, majd lebontása a mai napig ismeretlen. A lehetséges kezdeti lépésként hidroxiláció, karboxiláció és metiláció folyamatait említik a kutatók (Weelink 2010).

2.8.2 A toluol anaerob biodegradációja

A toluol biodegradációjára nitrifikáló körülmények között számos baktérium képes. Legtöbbjük a Bétaproteobaktériumok osztályába tartozó *Azoarcus* és a *Thauera* nemzetségbe sorolható fakultatív anaerob, úgymint a *Thauera aromatica* T1 (Evans et al. 1991) és K172 törzsek (Anders et al. 1995), vagy az *Azoarcus tolulyticus* Tol4 és Td15 (Fries et al. 1994), valamint az *Azoarcus* sp. EbN1 (Rabus és Widdel 1995) és T (Dolfing et al. 1990) törzsek, melyeket többnyire anaerob szennyvíziszapból, vagy talajvíz üledékekből izoláltak. Itt meg kell jegyeznünk, hogy az EbN1-es törzs genomszekvenálását követően átkeresztelték azt "*Aromatoleum aromaticumra*" azonban a mikroorganizmus nem tekinthető valid fajnak, mivel leírása a mai napig nem történt meg (Rabus et al. 2005). A fent említett két nemzetség esetében számos vizsgálat irányult az anaerob toluol lebontás genetikai és biokémiai hátterének megértésére. A reakció kezdeti lépését kódoló benzil szukcinát szintáz funkciógéneket (*bssABC*) az ezredforduló környékén fedezték fel. Az általuk kódolt enzimek a glicil-gyököt tartalmazó enzimek családjához tartoznak, a katalizált reakció során a toluolból fumarát addíciójával benzil-szukcinát képződik. A benzil-szukcinátból CoA-tioészter addíciójával CoA-transzferáz (*bbsEF*) segítségével benzil-szukcinil-CoA és benzoil-CoA keletkezik. Az utóbbi fontos központi anyagcseretermék az anaerob aromás szénhidrogén lebontó útvonalaknak (Harwood et al. 1999, Fuchs et al. 2011; Bharadwaj et al. 2013, Rabus et al. 2016). A következő lépésben az aromás gyűrű bontása történhet ATP függő benzoil-CoA reduktázzal (BcrA-D), vagy ATP független benzoil-CoA reduktázzal (BamB-I; Fuchs et al. 2011). Az előbbi többnyire fakultatív anaerob, míg az utóbbi főként szigorúan anaerob és fermentáló mikroorganizmusokban található meg (Boll et al. 2014). Több lépést követően a gyűrű hasítását végül a BamA, vagy az azzal homológ oah (Laempe et al. 1999), valamint bzdY (López Barragán et al. 2004) gének által kódolt 6-oxociklohex-1-én-1- karbonil-CoA hidroláz végzi (2.8. ábra).

*Thauera aromatica**Azoarcus* sp. CIB*Geobacter metallireducens*

2.8. ábra Benzoyl-CoA metabolikus útvonala (Porter és Young 2016 alapján)

Annak ellenére, hogy a *bss* (benzil szukcinát szintáz) útvonalat először a nitrátredukáló *Azoarcus* és *Thauera* nemzetségbe tartozó fajok esetében írták le, ma már általánosan elterjedt lebontási útvonalnak gondolják a különböző redox körülmények között bontó taxonok között. 2009-ben Weelink és munkatársai egy új taxonba tartozó baktériumot írtak le, mely nitrát, Fe(III) vagy Mn(IV) redukálása mellett is képes a toluol hasznosítására. A *Georgfuchsia toluolica* obligát anaerob mikroszervezet, melyet BTEX-vegyületekkel szennyezett talajvízből izoláltak. A *Geobacter* nemzetség tagjait szintén gyakran kimutatják szénhidrogénekkal szennyezett kárhelyeken, az elsők között írták le a vasredukáló *Geobacter metallireducens* toluol biodegradációs képességét. Ez a szigorúan anaerob mikroszervezet a Deltaproteobaktériumok osztályába tartozik és a Fe(III)-on kívül képes nitrát, Mn(IV) és humusz vegyületek elektron akceptorként történő használatára (Lovley et al. 1993). A *Geobacter grbiciae*, *Geobacter* sp. TMJ1 és a *Desulfotobacterium aromaticivorans* baktériumok esetében is beszámoltak a toluol biodegradációjáról vasredukáló körülmények között (Coates et al. 2001a, Winderl et al. 2008, Kunapuli et al. 2010). A szintén Deltaproteobaktériumokhoz tartozó szulfátredukáló *Desulfobacula toluolica* és *Desulfotignum toluenicum* is képes a toluol lebontására (Rabus et al. 1993, Ommedal és Torsvik 2007). Míg a Bétaproteobaktériumokhoz sorolt *Dechloromonas aromatica* RCB (Chakraborty et al. 2005) fakultatív anaerob mikroszervezet klorát-perklorát, a Clostridia csoportba tartozó *Desulfosporosinus* Y5 törzs (Liu et al. 2004) arzenát elektron akceptorok jelenlétében hasznosította a toluolt.

2.8.3 Az etil-benzol anaerob biodegradációja

Anaerob etil-benzol degradációs képességet számos nitrát-, valamint egy szulfát-redukáló baktérium esetében írtak le. A toluollal való kémiai hasonlóság ellenére az etil-benzol lebontása többnyire eltérő lebontási útvonalakon megy végbe. Az *Azoarcus* nemzetségbe tartozó és ahhoz közeli EB1, EbN1 és PbN1-es törzsek, valamint a *Georgfuchsia toluolica* nitrát redukciója mellett a vegyület teljes biodegradációjára képesek (Ball et al. 1996, Rabus-Heider 1998,

Johnson et al. 2001, Rabus et al. 2002, Weelink et al. 2009). A fenti baktériumok esetében a lebontás kezdeti lépését az etil-benzén-dehidrogenáz (EBDH) katalizálja, mely reakció során (S)-1-fenil-etanol keletkezik. A fenil-etanol oxidációt követően acetofenonná alakul, majd benzil-acetáttá karboxilálódik, melyből végső soron benzoil-CoA keletkezik. Az EBDH fehérje pontos szerkezetét a közelmúltban Heider és munkatársai (2016) írták le.

A szulfátredukáló Deltaprotobakériumokhoz tartozó EbS7 törzs esetében az etil-benzol biodegradációja, azonban hasonlóan a toluoléhoz, fumarát addícióval megy végbe (Kniemeyer et al. 2003).

2.8.4 A xilolok anaerob biodegradációja

Számos kutatás igazolta, hogy a három izomer közül a meta-xilol bomlik le a leggyorsabban, míg a para-xilol sok esetben perzisztens lehet anaerob körülmények között. Azonban mind nitrát-, szulfát- és vasredukáló dúsítási kísérletekben leírtak olyan mikrobaközösségeket, melyek képesek voltak mindhárom izomer teljes biodegradációjára. Számos törzset izoláltak, mely nitrát- (Fries et al. 1994, Rabus- Widdel 1995, Hess et al. 1997) és szulfátredukáló (Harms et al. 1999) körülmények között képes volt a meta-xilol hasznosítására, míg az orto izomer lebontását csak egyes *Desulfosarcina* és a *Desulfotomaculum* törzsek esetében mutatták ki. A meta-xilol lebontási útvonalát elsősorban egy *Azoarcus* törzsben vizsgálták. Az eredmények alapján valószínűsíthető, hogy a meta-xilol degradációja számos reakció során hasonlóan a toluol lebontáshoz fumarát addícióval történik. Morsach és Meckenstock (2005) xilolokkal végzett dúsítási kísérletek során a toluol fumarát addíciója során keletkező metabolitokkal homológ vegyületeket mutattak ki. Herrmann és munkatársai (2009) pedig detektálták a benzilszukcinát szintáz funkciógéneket a legtöbb xilol bontási kísérletük során.

3. Anyag és módszertan

A környezeti mikrobiológia egyik legfőbb célja hogy kapcsolatot találjon az egyes mikroba közösségek és a környezeti folyamatok, tényezők között. A tenyésztéstől független módszerek szerepe az elmúlt két évtizedben egyre hangsúlyosabb lett a mikrobiológiában, olyannyira, hogy napjainkban már rutinszerűen alkalmazzák az rRNS gén alapú technikákat különböző mikroba közösségek összetételének és dinamikájának vizsgálatához. Azonban meg kell jegyezni, hogy e technikák alkalmazása nem minden esetben teszi lehetővé, hogy a vizsgálni kívánt mikroba közösségek ökoszisztémában betöltött szerepét, anyagcsere-útvonalainak működését kellőképpen megérthessük (Morales és Holben 2011). Ahhoz, hogy megtalálhassuk a közvetlen kapcsolatokat a mikroorganizmusok és azok környezetben betöltött szerepe között, valamint hogy a vizsgálni kívánt ökoszisztéma rendszerek interakcióit megérthessük, komplex technikák alkalmazása szükséges. A mikroba diverzitás valamint a funkciógének vizsgálata, illetve a tenyésztés és tenyésztéstől független technikák együttes alkalmazása segíthet a felszín alatti közegek biogeokémiai folyamatainak pontosabb megértésében. Ennek megfelelően, hogy célkitűzéseinket teljesíthessük, doktori munkám során három különböző vizsgálatot, kísérletet hajtottunk végre. Az első során egy BTEX-vegyületekkel szennyezett, korábbi munkáink alapján jól ismert, hipoxikus talajvíz mikrobaközösségét és az aromás szénhidrogének bontásában szerepet játszó funkciógéneket monitoroztuk 13 hónapon keresztül havi rendszerességgel. Ezt követően oxigénlimitált, stabil izotópos dúsító tenyészetekkel azonosítottuk a toluol biodegradációjában részt vevő mikroorganizmusokat. Végül pedig anaerob mikrokozmosz kísérleteket állítottunk össze, hogy egyes feltételezett fakultatív anaerob lebontó mikroszervezeteket feldúsítsunk a közösségből. A doktori munka alatt a kísérleti mintákból és egyéb kárhelyekről is folyamatosan próbáltunk klasszikus mikrobiológiai módszerekkel olyan törzseket izolálni, amelyek rendelkeznek az aromás szénhidrogének hipoxikus bontásáért felelős enzimekkel.

3.1 *Mintavételezés*

A vizsgált talajvízminták egy BTEX-vegyületekkel szennyezett, délnyugat magyarországi kárhelyről származtak. A mintavételezést minden esetben az MSZ 21464:1998 magyar szabványban leírtak betartásával végeztük. Az oldott oxigén koncentrációkat, valamint a redox potenciál értékeket HANNA HI 9828 (HANNA Instruments®, USA) készülék helyszíni alkalmazásával állapítottuk meg. Az egyéb vízkémiai paraméterek és szennyezőanyag koncentrációk meghatározását a Wessling Hungary Kft. végezte. A nitrát és szulfát koncentrációk megállapítása a MSZ EN ISO 10304-1:2009; a Fe^{2+} mennyiségének

maghatározása az EPA 200.8:1999 és a MSZ EN ISO 17294-2:2005, míg az oldott metán meghatározása a WBSE-27:2002 módszerek analitikai előírásai alapján történtek. A BTEX-vegyületek mérése HP 6890 GCMS 08-5975 típusú műszerrel történt az MSZ 1484-4:1998; MSZ EN ISO 15680:2004 szabványok szerint. A mintákat a laborban történő feldolgozásig 4°C-on, kevés gáztért alkalmazva 1 literes üvegekben, sötétben tároltuk.

3.2 DNS és RNS izolálás

Célunk a BTEX-vegyületekkel szennyezett, hipoxikus talajvíz mikroba közösségének és az általuk kódolt monoaromás szénhidrogén bontásáért felelős funkciógének vizsgálata volt. Egyes esetekben a környezeti mintákból RNS-t izoláltunk, tettük ezt azért, mivel az RNS gyors bomlása révén csak a jelenlevő, és aktív mikroszervezetekből nyerhető ki, szemben a DNS-sel, mely a mikrobák pusztulása után, valamint inaktív mikroszervezetekben is megtalálható. A talajvízmintákból fél litert steril, 0,2 µm pórusátmérőjű cellulóz-acetát membránon Millipore vákuum pumpa segítségével szűrtük le. A membránokról az RNS izolálást a PowerSoil Total RNA Isolation Kit-tel végeztük (MoBio Laboratories Inc., USA), a gyártó által megadott protokoll szerint.

Más esetekben, például tiszta tenyészetekből, többszöri átoltást igénylő, vagy stabil izotópos szénforrást alkalmazó mikrokozmosz kísérletek során a mintákból DNS-t izoláltunk. Tehettük ezt azért, mivel a szelekció hatására a mikrokozmoszokban többszöri átoltást követően csak az aktív mikroorganizmusok szaporodhattak fel, illetve a stabil izotópos jelölés módszere során csak a speciális szubsztrátot hasznosítani képes baktériumok DNS-e „jelölődött” az stabil izotóppal. A DNS izolálást szintén a MoBio Laboratories Inc. (USA) által forgalmazott PowerSoil DNA és UltraClean Microbial DNA Isolation Kitekkel végeztük a gyártói protokoll alapján.

3.3 Agaróz gélelektroforézis

A nukleinsav izolálás sikerességét minden esetben agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük. Ehhez 100 ml 1 x TBE (10,8 g Tris; 10,5 g bórsav; 0,93 g Na-EDTA; 1000 cm³-re desztillált vízzel kiegészítve) pufferben magas hőmérsékleten 1 g nagy tisztaságú agarózt oldottunk fel, majd kézmelegre hűtve az oldatba 5 µl 10 mg/ml-es etidium-bromid festéket pipettáztunk, végül az egészet egy fésűsorokat tartalmazó futtatókádba öntöttük. Az etidium-bromid beépül a nukleinsav-száiba és UV fény alatt fluoreszkál, lehetővé téve a könnyed detektálást. A gél megszilárdulását követően a fésűsorokat eltávolítottuk, az így kialakult

zsebekbe 5 µl nukleinsav eluátum és 3µl festék (18,6g EDTA; 20g sarcosyl; 600ml glicerin; 0,5g brómfenolkék; 1000ml desztillált víz) elegyét pipettáztuk. Minden egyes mintasor mellé standardként 4 µl DNS markert (Gene Ruler Mix DNA Ladder, koncentráció: 0,5 µg/µl, Fermentas, Litvánia) vittünk fel. A mintákat 110 V feszültségen 30 percig futtattuk, majd UV fény alatt ellenőriztük.

3.4 Az RNS átírása komplementer DNS-sé

A további vizsgálatokhoz az izolált RNS-t reverz transzkriptáz enzim segítségével cDNS-sé kellett átírni. Első lépésben az RNS-t RiboPure Bacteria RNS izoláló kit (Applied Biosystems, USA) DNáz enzimével kezeltük, hogy az esetlegesen jelenlévő DNS-t elimináljuk. Az ily módon megtisztított RNS-t a RevertAid Premium First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Litvánia) segítségével írtuk át cDNS-sé a gyártó által megadott protokoll szerint.

3.5 PCR (Polimeráz láncreakció)

A PCR segítségével tetszőleges DNS templátból, a reakcióhoz megfelelő körülményeket biztosítva, igen nagyszámú másolatot készíthetünk két iniciáló primer (oligonukleotid) és DNS-polimeráz enzim segítségével. A folyamat három lépcsőből épül fel. Első lépésben a DNS-t magas hőmérsékleten denaturáljuk, mely során a purin és pirimidin bázisok közti hidrogénhidak felbomlanak, a templátunk egyszálúvá válik. Második lépésben a hőmérséklet csökkenésével lehetővé válik a primerek templáthoz történő hibridizációja. Harmadik lépésben a hőmérséklet megemelése a polimeráz enzim a kapcsolódó primerek végeit 5'-3' irányban elongálja, így elkészítve templát DNS-ünk kiegészítő szálát. A 3 fázist 32 ciklusban alkalmazva a kiindulási DNS-ből exponenciálisan növekedve megfelelő számú amplitikonunk (10^6 - 10^9 kópia) keletkezik. A munka folyamán ellenőrzésként negatív (DNS templát nélküli mastermix) és pozitív kontrollt (előzőleg sikeres PCR reakciót eredményező mintát használva templátként) is használtunk, így az egyes mastermix alkotók esetleges hibáit, valamint a keresztszennyeződéseket könnyebben bizonyíthattuk, vagy kizárhattuk.

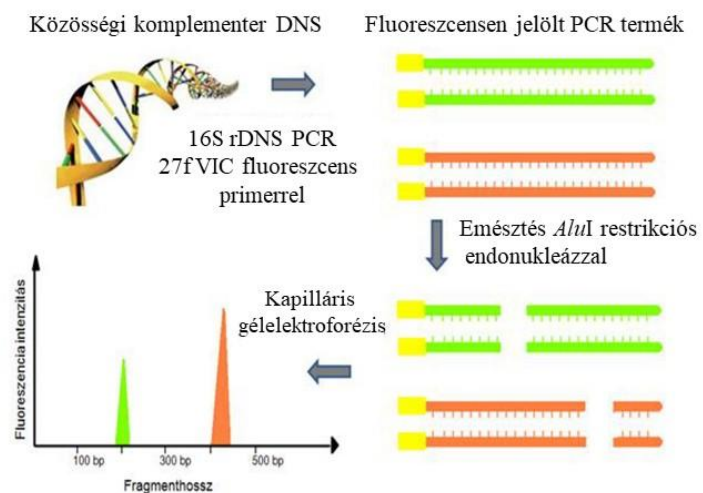
3.6 Terminális restrikciós fragmethossz polimorfizmus vizsgálat (T-RFLP)

3.6.1 DNS szakaszok felszaporítása PCR segítségével a közösségi T-RFLP analízishez

A T-RFLP egy olyan DNS mintázatot vizsgáló módszer, amely alkalmas egy mikroba közösség összetételbeli változásainak gyors nyomon követésére, elemzésére.

A cDNS-ből, vagy DNS-ből első lépésben a 16S rRNS génre specifikus PCR-t készítettünk. A baktériumok esetében a 16S rDNS körülbelül 1500 bázispár hosszúságú, ráadásul e bázispár sorozatnak egyes szakaszai minden egyes baktériumban megegyeznek, vagyis konzervált régiók. Ezen konzervált szakaszok között található variábilis szakaszok összehasonlítása által becsülhetjük az egyes fajok genetikai kapcsolatát. A 16S rDNS PCR terméket restriktációs endonukleázzal emésztettük. A restriktációs enzimeket különböző baktériumok termelik az őket megtámadó vírusok DNS-ének lebontására, többnyire néhány bázis hosszúságú DNS motívumot ismernek föl és ott szétvágják a DNS szálát. Baktériumok DNS-én alkalmazva a hasítási helyek jellemzőek lehetnek egyes nemzetségekre, esetenként fajokra. Itt meg kell jegyeznünk, hogy a T-RFLP módszere nem csak 16S rDNS alapú PCR termékek, hanem például egyes funkciógén típusok elkülönítésére is alkalmazható (az egyes funkciógének kimutatását lásd a 3.11 fejezetben).

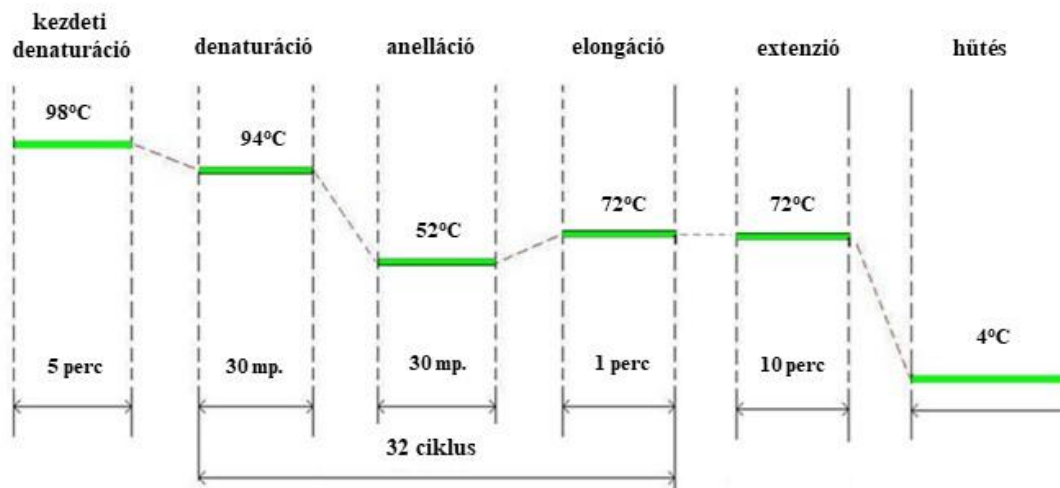
A PCR-hez használt primer pár egyik tagja fluoreszcensen jelölt. A jelölés lehetővé teszi az emésztés után a terminális fragment hosszának kapillaris gélelektroforézis segítségével történő meghatározását (3.1. ábra), ezután a mintánkat a már azonosított hasítási helyel rendelkező taxonokhoz hasonlítva képet kaphatunk a környezeti mintánk diverzitásáról, faji összetételéről.



3.1. ábra A T-RFLP vizsgálat sematikus menete (Vajna, 2010 alapján)

A PCR mastermix egy mintára számítva 16S rDNS PCR esetén:

5 μ l 10x PCR puffert (Fermentas, Litvánia), 2 mM $MgCl_2$ -ot (Fermentas, Litvánia), 0,3 μ M forward VIC fluoreszcensen jelölt 27f 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (Lane 1991, Integrated DNA Technologies, Belgium) és 0,3 μ M reverse primert 519r 5'-GTNTTACNGCGGCKGCTG-3' (Turner et al. 1999), 1 U DreamTaq™ DNS polimerázt, 0,8 μ M dNTP-t (dezoxi-nukleotid-trifoszfátok) (Fermentas, Litvánia), 2 μ l templátot és 50 μ l végtérfogatra kiegészítve MQ vizet tartalmazott.



3.2. ábra A 16S rDNS PCR során használt hőprofil

A PCR az Applied Biosystem ProFlex készülékben zajlott egy előzetesen kidolgozott program alapján, amit a 3.2. ábra szemléltet. A PCR terméket a 4.3-as pontban ismertetett agaróz gélelektroforézissel detektáltuk.

3.6.2 A közösségi PCR termék emésztése restriktós endonukleázzal T-RFLP-hez

A fluoreszcensen jelölt PCR termékeket jellemzően *AluI* (AG↓CT hasítási hely), *RsaI* (GT↓AC), vagy *FspBI* (C↓TAG) enzimmel 37 °C-on emésztettük 1,5 órán keresztül. A reakció 2 µl restriktós enzim puffert (Fermentas, Litvánia), 1 U restriktós enzimet (Fermentas, Litvánia), 10 µl templátot és 20 µl végtérfogatra kiegészítve MQ vizet tartalmazott.

3.6.3 Az emésztett PCR termék tisztítása és analízise

Az emésztett PCR terméket 3 µl 3M-os Na-acetát oldattal; 14,5 µl MQ vízzel, valamint 62,5 µl abszolút etanollal alaposan összekevertük és szobahőmérsékleten 10 percig inkubáltuk. Az alkohol vízelvonó hatása segít a DNS kicsapódásában, míg a nátrium acetát megakadályozza, hogy a DNS-el együtt a reakció után megmaradt dNTP is kivájon az elegyből. Ezt 20 perces centrifugálás követte 4600 g-n, 4 °C-on. A felülúszó leöntése után a mintákra 180 µl 70 %_{v/v} etanolt pipettáztunk, majd azokat 15 percig 4600 g-en ismét centrifugáltuk. A felső fázist ismét leöntöttük, majd a pelletet vízmentesre szárítottuk. 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 (Genescan LIZ 500, Applied Biosystems, USA) keverékéhez, végül az elegyet 5 percig 95 °C-on denaturáltuk. A kapilláris gélelektroforézis ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, USA) segítségével történt. A mintafelvétel 20 másodpercig történt, majd a 30 perces futtatáshoz NanoPOP-7TM polimert

(NimaGen B.V., Hollandia) használtunk 1,8 kV-on. Az eredményként kapott elektroferogramot GeneMapper 4.0 program segítségével dolgoztuk fel (Applied Biosystem, USA).

3.7 DNS klónkönyvtárak létrehozása és feldolgozása

Ahhoz, hogy a T-RFLP elektroferogramok egyes csúcsait beazonosíthassuk, vagy csak egyszerűen a mintánk pontos bakteriális diverzitását meghatározhatjuk, szükségünk van a közösségi DNS termékünk szétválasztására, melyre az egyik megfelelő módszer a klónkönyvtárak létrehozása lehet. A közösségi PCR termékeket egy kék-fehér szelektív elv, valamint antibiotikum rezisztencia alapján működő vektor-kompetens sejt rendszer segítségével választják unikális egységekre. Az amplifikált DNS szakaszt a bakteriális gazdasejtben replikálódni képes vektorba építik, a klónozás helye a *lacZ* génben található, amely a β -galaktozidáz enzimet kódolja. Az enzim a laktózt glükózra és galaktózra bontja, valamint az X-Gal (5-bróm-4-klór-3-indolin- β -D-galaktozid) kromogén szubsztát hidrolízisét is katalizálja. A *lacZ* génbe ékelődött inzert miatt a rekombináns sejtek nem képesek az X-Gal hasítására és fehér telepeket hoznak létre, míg azok a sejtek, amelyek inzert nélküli vektort vettek fel, kék színnel festődnek. A plazmidokban található még egy szelektív marker gén, amely ampicillin-rezisztenciáért felelős, és lehetővé teszi, hogy az antibiotikum tartalmú táptalajon csak azon sejtek szaporodjanak, melyek felvették a vektort. A transzformálás során kisszámú PCR terméket tartalmazó rekombináns vektort adnak nagyságrendekkel több kompetens sejthez, így biztosítva, hogy egy sejtbe csak egy plazmid kerülhessen be. A klónozáshoz legtöbb esetben az *Escherichia coli*-t használják, mivel egyszerű felépítésű és gyorsan osztódik (Nyitray et al. 2013).

3.7.1 A klónkönyvtárak létrehozása

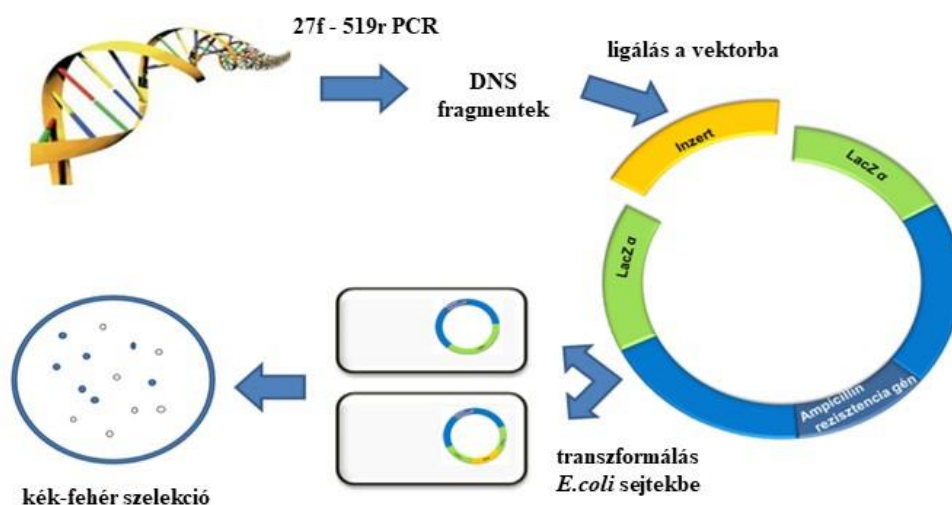
A közösség összetételének és a katabolikus diverzitásának feltárása során cDNS vagy DNS elegyből a 3.6.1. fejezetnek megfelelően 16S rDNS és funkciógén PCR-eket készítettünk, azzal a különbséggel, hogy a forward primerek nem tartalmaztak fluoreszcens jelölést. A további felhasználáshoz a PCR termékek tisztítása szükséges, hogy a primer dimereket, maradék dNTP-t eltávolítsuk a reakciómixből, ehhez NucleoSpin Extract II. (Macherey-Nagel, Németország) kittel használtunk, a gyártó által megadott protokoll szerint. A tisztítás eredményét ismét gélelektroforézissel ellenőriztük.

A klónkönyvtárak létrehozását TOPO® TA Cloning® Kittel (Invitrogen, USA) végeztük. A ligáló reakció összetétele: 1 μ l 10x ligáló puffert, 2 μ l pCR®2.1-TOPO® klónozó vektor, 3 μ l PCR termék, 1 μ l T4 DNS ligáz enzim és 3 μ l MQ víz. A reakció 4°C-on, egy éjszakán át zajlik.

A vektorokat kompetens TOP10 *Escherichia coli* sejtekbe (Invitrogen, USA) történő transzformálásának menete:

- A ligálási reakciómixből 50 μ l kompetens sejthez 3 μ l ligátumot adtunk, majd jégen 20 percig, 42°C-on 1 percig, végül ismét jégen 3 percig inkubáltunk.
- A következő lépésben 0,5 ml SOC médiumot mértünk a transzformálási reakciómixbe, melyet egy órán keresztül 37°C-on és 180 rpm-en rázótermosztátban inkubáltunk. A SOC médium alkalmazása a sejtek regenerálódását segíti, összetétele: 20 g tripton, 5 g élesztő-kivonat, 0,5 g NaCl, 2,5 ml (1M) KCl, dH₂O 1000 ml-re kiegészítve.
- A sejtek ezt követően a korábban előkészített, IPTG-vel (100 mM, 100 μ l/Petri csésze, izopropil-tio-galaktozid, Promega, USA), X-Gal-lal (20 μ g/ml, 20 μ l/Petri csésze, 5-brom-4-klór-3-indolin- β -D-galaktozid, Promega, USA) és ampicillinnel (100 μ g/ml, Sigma-Aldrich, USA) kiegészített LB (1000 ml vízhez; 5 g élesztő, 10 g tripton, 9 g NaCl, 20 g agar) táplemezre szélesztettük, majd 37°C-os termosztátban inkubáltuk egy éjszakán át. Az IPTG a β -galaktozidáz szintézisét indukálja. A vektor felvételével a gazdasejtek rezisztenciát nyernek ampicillinre, az inzert sikeres beépülésével megszűnik a β -galaktozidáz aktivitása és a telepek fehér színnel jelennek meg az LB lemezeken.
- A pozitív telepeket steril fogpiszkálóval átoltottuk egy új, ampicillines LB táplemezre, majd 37°C-os termosztátban inkubáltuk egy napig. A telepeket steril fogpiszkálóval 30 μ l MQ vízben szuszpendáltuk.
- A szuszpenziót 5 percig 98°C-on inkubáltuk, majd 5 percig, 4600 g-n centrifugáltuk. Az így nyert felülúszó tartalmazta az inzertet hordozó plazmid DNS-t. A lizátumot tartalmazó PCR csöveket -20 C°-on tároltuk a későbbi felhasználásig.

A klónkönyvtár létrehozásának folyamatát a 3.3. ábra szemlélteti.



3.3. ábra A 16S rDNS klónkönyvtár kialakítása

3.7.2 Az inzert visszanyerése a klónokból PCR segítségével

A klónkönyvtárak feldolgozásának első lépéseként amplifikáltuk az egyes DNS szakaszokat M13f és M13r primerek segítségével, amelyek az inzertet közrefogó vektorszekvenciákhoz illeszkednek (Promega, USA). A PCR reagensek és körülmények megegyeztek a fent leírtakkal (4.6.1 pont). A PCR terméket agaróz gélelektroforézissel detektáltuk. A további felhasználáshoz a PCR termékeket a korábban is említett NucleoSpin Extract II. (Macherey-Nagel, Németország) kittel tisztítottuk. A tisztítás eredményét ismét gélelektroforézissel ellenőriztük.

3.8 Sanger-féle dideoxi szekvenálás

Ahhoz, hogy a PCR termékek bázissorrendjét meghatározhassuk azok szekvenálására van szükség, melynek elve az úgynevezett dideoxi-, vagy Sanger-féle láncterminációs módszer. A reakcióelegyben normál és fluoreszcens festékkel jelölt módosított dideoxi-nukleotidok (a ribóz 2' és 3' helyéről is hiányzik az oxigén) is találhatóak. A dideoxi, vagy A/T/G/C stop-nukleotidokat a polimeráz enzim nem különbözteti meg a normál bázisoktól és azokat is beépíti a komplementer szálba, a hiányzó kapcsolódási pont (3'-H csoport) miatt azonban ezen a ponton a komplementer lánc szintézise megszakad. A reakció eredményeképpen a templát DNS különböző hosszúságú fragmentjei jönnek létre, végükön a módosított fluoreszcens nukleotidokkal. A szekvenáló reakcióelegy összetétele a következő, egy reakcióra (végtérfogó 10 µl) számítva:

- BigDye (Applied Biosystems, USA) - 1 µl
- BigDye Buffer (Applied Biosystems, USA) - 1,5 µl
- Primer (27f) - 0,5 µl
- templát DNS – 5–20 ng (1-7 µl)
- MQ víz végtérfogatra kiegészítve

A reakció egy 10 másodperces, 94 °C-os denaturációval kezdődik, majd 54 °C –on 15 másodperc alatt a primer a templátokhoz hibridizál, végül 72 °C -on, 4 percig folyik 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 etanol-precipitálással tisztítottuk. Az etanol-precipitálás a 4.6.3-as pontban leírtak szerint történt, a kiszárított mintákat 20µl Hi-Di formamidban oldottuk vissza. A szekvenálás ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer géppel történt (Applied Biosystems, USA) A mintafelvétel 10 másodpercig történt, majd a 45 perces futtatáshoz NanoPOP-7TM polimert (NimaGen B.V., Hollandia) használtunk 1,4 kV-on.

3.9 Bázissorrend és filogenetikai elemzés

A szekvenálás eredményeként kapott elektroferogramokat MEGA5 program (Tamura et al., 2011) segítségével értékeltük ki. A taxonokat a GenBank adatbázis adatai alapján a BLAST algoritmus (Altschul et al. 1990) segítségével, valamint 2014-et megelőzően LeBibi (Bio Informatic Bacteria Identification) szoftver (Devulder et al. 2003), majd a későbbiekben EzTaxon server 2.1 használatával identifikáltuk (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>, Chun 2007, Kim et al. 2012).

A PCR-ek során esetleges kiméra szekvenciákat az online elérhető Bellerophone program (Huber et al. 2004) alkalmazásával szűrtük ki. A kimérák az eredetitől eltérő szekvenciák, melyeket a bázisok olyan károsodása eredményezhet, melyek blokkolják a *Taq* polimeráz enzim működését így az egy másik templárról folytatja a szintézist.

A funkciógének filogenetikai fáinak szerkesztéséhez a távolságmátrix alapú neighbor-joining, míg a 16S rDNS alapú fához karakter alapú maximum likelihood módszert is alkalmaztuk Bray-Curtis hasonlósági index felhasználásával 1000 ismétléssel (bootstrap). A klónkönyvtárak klaszter analízisét az UNIFRAC program (Lozupone és Knight 2005) segítségével végeztük.

A T-RFLP elektroferogramok alapján a minták klaszter analízisét, valamint az egyes 16S rDNS alapú elektroferogramokon feltüntetett Shannon diverzitás értékeket a Paleontological Statistics szoftver (Hammer et al. 2001) segítségével végeztük. A T-RFLP futások egymáshoz illesztését 0,5 bp konfidencia intervallummal a T-Align online program (Smith et al. 2005) segítségével végeztük, az elemzésből kizártuk azokat a csúcsokat, amik nem érték el az összterület 1%-át.

3.10 Csoportreprezentáns klónok terminális fragment (T-RF) hosszának meghatározása

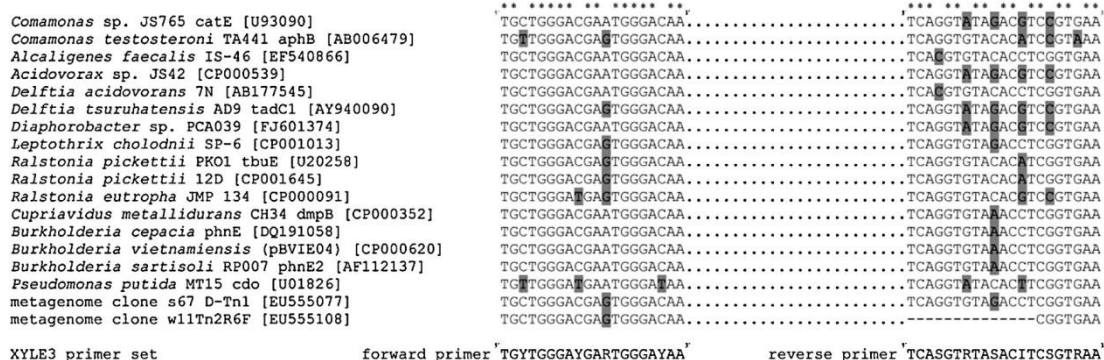
Annak érdekében, hogy a T-RFLP elektroferogramokon kapott csúcsokat be tudjuk azonosítani, a klónkönyvtárak reprezentáns tagjainak 16S rDNS-ét restrikciós fragment analízisnek vetettük alá. Az egyes klónok restrikciós enzimmel történő emésztése után kapott csúcsokat összehasonlítottuk a közösségi, vagy funkciógén T-RFLP csúcsaival.

3.11 Katekol 2,3-dioxigenáz és benzil szukcinát szintáz gének kimutatása a közösségi mintákból

Az aromás gyűrű meta-típusú hasításáért felelős katekol 2,3-dioxigenáz gének expresszió vizsgálata fontos része volt munkánknak, hiszen így képet kaphattunk arról, hogy a vizsgált hipoxikus közegben mely enzimek játszanak szerepet az aromás szénhidrogének lebontásában.

Továbbá az anaerob dúsító tenyészetek esetén vizsgáltuk a toluol anaerob lebontásában szerepet játszó benzil szukcinát szintáz funkciógének jelenlétét is. A funkciógén PCR-ekhez szintén a közösségi cDNS vagy DNS elegy szolgált templátként. A *Pseudomonas* nemzetséghez köthető I.2.A alcsaládba tartozó katekol 2,3-dioxigenáz (C23O) enzimeket kódoló gének kimutatására a XYLE1 forward és reverz primereket (Hendrickx et al., 2006) használtuk, 61 °C-os anellációs hőmérséklettel. A pozitív PCR reakció esetén ~250 bázispár hosszúságú DNS fragmenteket kaptunk (3.1. táblázat). Az I.2.B alcsalád funkciógénjeinek detektálására a szintén Hendrickx és munkatársai (2006) által tervezett XYLE2 primerpárt alkalmaztuk. E funkciógén jelenléte főleg a *Sphingomonas* fajokhoz köthető. A primerek optimális anellációs hőmérséklete ebben az esetben 64 °C volt és ~900 bázispár hosszúságú PCR terméket vártunk (3.1. táblázat).

Ahogy azt a 2.7.1. fejezetben is írtuk az I.2.C alcsaládban a Bétaaproteobaktériumokhoz tartozó *Comamonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia* és a Gammaproteobaktériumokhoz sorolt *Pseudomonas* nemzetség egyes fajai által kódolt C23O szekvenciák egyaránt megtalálhatóak. Ezen nagyfokú heterogenitásnak köszönhetően a szakirodalomban nem találhatóak e funkciógén alcsaládra általánosan használható primerek. Hendricks és munkatársai (2006) például az egyes *Ralstonia* és *Pseudomonas* törzsek által kódolt C23O génekre terveztek specifikus primerpárt. Tácsics és munkatársai (2010) pedig a Comamonadaceae családra általánosan használható primereket alkották meg a *Comamonas testosteroni* (AY568279), *Comamonas* sp. (U93090), *Acidovorax* sp. JS42 (CP000539), *Delftia acidovorans* (AB177545) és *Delftia* sp. (DQ661649) baktériumtörzsek által hordozott I.2 C típusú szekvenciák alapján. Azonban a nagyfokú variabilitás ellenére, munkánk során megkíséreltünk egy olyan degeneratív primerpárt tervezni, amellyel amplifikálható az ezidáig ismert I.2.C alcsaládba tartozó C23O gének összessége. A “XYLE3” primerpár tervezés során az NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázisában fellelhető I.2. C típusú funkciógéneket tartalmazó genomsekvenciákat használtuk fel (3.4. ábra), valamint az OligoAnalyzer 3.1-es online programot alkalmaztuk (PrimerQuest® program, IDT, Coralville, USA, 2012).



3.3. ábra XYLE3 primer pár tervezési folyamata. A *-al jelölt részek konzervatívnak bizonyultak a vizsgált szekvenciákban, míg a szürkével jelölt szakaszok variabilitást mutattak.

Az új primerpár esetén az anneláció 50°C-on történt, valamint ~800 bázispár hosszúságú fragmenteket detektáltunk (3.1. táblázat). A primerpár specifikitását mind az NCBI Primer-BLAST (Ye et al. 2012) nevű alkalmazásával, mind pedig az 3.3. ábrán feltüntetett és Német Törzsgyűjteményből megrendelt referenciatörzsek segítségével ellenőriztük. Mivel az etil-benzol volt az egyik legfőbb szennyezőanyag az általunk vizsgált kárhelyen ezért a Brennerova és munkatársai (2009) által leírt 3-izopropilkatekol (3-IPC) 2,3-dioxigenáz gének expresszióját is vizsgáltuk, ehhez az általuk fejlesztett EXDO-K2 primerpárt használtuk. A benzil szukcinát szintáz (*bssA*) funkciógének kimutatásához a Winderl és munkatársai (2007) által tervezett 7772f és 8546r primereket alkalmaztuk.

3.1. táblázat Az egyes szénhidrogének bontásában szerepet játszó enzimeket kódoló funkciógének kimutatására általunk alkalmazott primerpárok

Primer pár	Célszekvencia	Primerek bázissorrendje	Annelációs hőmérséklet	PCR termék hossza(bp)
Xyle1 f/r	I.2.A alcsaládba tartozó C23O funkciógének	5'CCGCCGACCTGATCWSCATG-3' 5'TCAGGTCAKCACGGTCAKGA-3'	61.5 °C	242
Xyle2 f/r	I.2.B alcsaládba tartozó C23O funkciógének	5'GTAATTCGCCCTGGCTAYGTICA-3' 5'GGTGTTACCGTCATGAAGCGBTC-3'	64 °C	906
Xyle3 f/r	I.2.C alcsaládba tartozó C23O funkciógének	5'TGYTGGGAYGARTGGGAYAA-3' 5'TCASGTRTASACITCSGTRAA-3'	50 °C	800
EXDO-K2-f/r	3-izopropilkatekol (3-IPC) 2,3-dioxigenáz	5'GAAAAAGTGGGTTTGATGGAGG-3' 5'CGCTTATGCCCKCGTCATCACCC-3'	62°C	810
7772 f/8546r	Benzil szukcinát szintáz funkciógének	5'GAC ATG ACC GAC GCS ATY CT-3' 5'TC GTC GTC RTT GCC CCA YTT-3'	52°C	794

3.12 Differenciált dideoxi primerhosszabítás - Single Nucleotid Primer Extension

Az I.2.C alcsaládba tartozó C23O gének időbeni diverzitásának vizsgálatához a SNUPE (Single Nucleotid Primer Extension) módszert használtuk. A SNUPE-t kezdetben pontmutációk okozta genetikai elváltozások rutin diagnosztizálására (Sokolov 1990, Syvanen et al. 1990, Piggee et al. 1997), valamint igazságügyi orvosi kutatásokhoz fejlesztették ki (Vallone et al. 2004). Az utóbbi időben azonban a mikrobiológiában egyes baktériumtörzsek gyors identifikálására és genotipizálására is elkezdtek alkalmazni (Hommais et al. 2005, Scott et al. 2007). Az eljárás hasonló a Sanger-féle dideoxi szekvenáláshoz, azonban itt a reakcióelegyben jelen lévő összes szabad nukleotid dideoxinukleotid (ddNTP), tehát a célszekvenciához hibridizálódott oligonukleotid csupán egyetlen nukleotiddal hosszabbodik meg. A szabad 3' OH csoportok

hiánya miatt ugyanis a lánchosszabbítás megszakad. A reakcióelegyben jelen lévő négyféle dideoxinukleotid (A, T, G, C) különböző fluoreszcens jelölést hordoz (Nikolausz et al. 2009), így a beépült ddNTP filogenetikai információt hordozhat. Ehhez persze az oligonukleotid próbánkat olyan célszekvenciára kell terveznünk, ahol a beépülő nukleotid jelenti az eltérést a különböző szekvencia variánsok között. A PCR termékek SNuPE irányú felhasználása megköveteli, hogy a be nem épült nukleotidokat és primereket magas határfokkal távolítsuk el. Emiatt a PCR termék NucleoSpin Extract II. (Macherey-Nagel, Németország) kittel történő tisztítása után még egy enzimatisztítást is alkalmaztunk. Ennek során 42 µl tisztított PCR termékhez adtunk 12 U alkalikus foszfatázt, 6 U exonukleáz I-et (SAP enzim; *ExoI*; Fermentas, Litvánia), majd a reakcióelegyet 60 µl-re egészítettük ki az SAP enzim pufferével. Az így kapott reakcióelegyet 37 °C-on inkubáltuk 1 órán keresztül, majd az enzimek inaktivációja 75 °C-on történt 15 percig.

A SNuPE reakció összetétele a következő: 1,2 µl SNaPshot multiplex kit reagens (Applied Biosystems, USA), 1,8 µl 5x puffer, 0,5 µl primer vagy primer keverék (az 4.1.5. fejezet 1.2 C típusú C230 klónkönyvtár eredményei alapján tervezett primereket a 8.2. mellékletben ismertetem), 0,75 µl tisztított PCR termék, végül MQ vízzel a reakcióelegyet 10 µl-re egészítettük ki. A 20 cikluson keresztül ismétlődő hőprofil a következő volt: 96°C 10 mp, 55°C 5 mp, 60°C 30 mp. A reakciót követően a felesleges nukleotidok eltávolítására 1 U SAP enzimet adtunk a reakcióelegyhez, majd 37°C-on, 1 órán keresztül inkubáltuk, végül 15 percig 75°C-on inaktiváltuk az enzimet.

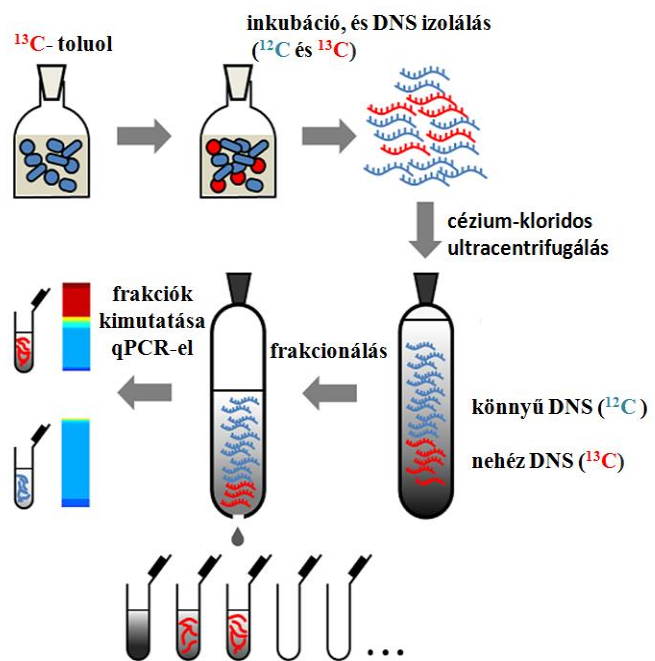
A SNuPE termékek kapilláris gélelektroforézise a 3.6.3. fejezetben leírtak szerint zajlott, azonban a LIZ 500-as size standard helyett, a lényegesen rövidebb fragmentek miatt ez esetben LIZ 120-asat (Applied Biosystems, USA) alkalmaztunk.

3.13 *Stabil izotópos jelölés (SIP)*

A stabil izotópos jelölés (stable isotope probing-SIP) módszere lehetőséget ad arra, hogy egyes egyedi tápanyagokat (esetünkben a BTEX-vegyületek valamelyikét) hasznosítani képes mikroorganizmusokat azonosíthassuk a környezeti mintákban. A módszer során a mikrokozmoszokhoz a legtöbb esetben ¹³C nehéz szénizotópot tartalmazó vegyületet adnak, azonban akadnak példák ¹⁵N és ¹⁸O izotópok alkalmazására is (Dumont és Murrell 2005, Cadisch et al. 2005, Bell et al. 2008, Hungate et. al 2015). Az adott vegyületet hasznosítani képes baktériumok a nehezebb izotópot anyagcseréjük során beépítik a szervezetükbe, így e sejtalkotók (RNS, DNS, fehérjék) gradiens ultracentrifugálás módszerével elválaszthatóak a nem

aktív mikroorganizmusok azonos sejtalkotóitól (3.4. ábra). A kísérletek során kontrollként minden esetben az adott vegyület izotóposan nem jelölt változatát adják a mikrokozmoszokhoz.

A mi vizsgálatunkhoz $^{13}\text{C}_7$, vagyis minden szénatomon jelölt toluolt használtunk egyedi szénforrásként, az inkubációs idő elteltével a mintából DNS-t izoláltunk a korábban ismertett módon. A kísérlet pontos körülményeit a könnyebb érthetőség miatt az eredmények fejezetben részletezem (4.2. fejezet). A DNS koncentrációját



3.4. ábra A stabil izotópos vizsgálat folyamatábrája (Young et al 2015 alapján)

Qubit 2.0 fuorométert és Qubit® dsDNA BR Assay Kit-et (Invitrogen™) használva állapítottuk meg. A kit egy ultraszenzitív DNS festéket tartalmaz, melynek fluoreszcenciája a nukleinsavhoz kötődve a többszörösére növekszik, ezt a változást detektáljuk a fuorométerrel. A DNS-ből 1 μg -ot gradiens pufferrel (0.1 M 8 pH-jú Tris-HCl, 0.1 M KCl, 1 mM EDTA) elegyítettünk, amit végül a cézium-kloridos gradiens médiummal (átlagos sűrűség 1.71 g/mL, Calbiochem, Merck, Darmstadt, Németország) 5 ml-es poliallomer ultracentrifuga csövekbe töltöttünk (Beckman, USA). Ezt követte a 180000 g-n és 65 órán keresztül tartó ultracentrifugálás Beckman VTI 65.2 (USA) vertikális rotor segítségével Centrikon T-2190 centrifugában (Kontron Instruments, Milánó, Olaszország).

Perfusor V típusú fecskendő pumpa segítségével (Braun, Melsungen, Németország) frakcionáltuk a mintákat, amelyek sűrűségét refraktométerrel határoztuk meg. Az egyes frakciókból a DNS-t 30%-os polietilénlikol (PEG) és glikogén keverékével, majd 70%-os alkohol hozzáadásával precipitáltuk. Végül a tisztított DNS mennyiségét az egyes frakciókban SYBR Green alapú 16S rDNS qPCR segítségével állapítottuk meg. A real-time, azaz valós idejű, vagy más néven kvantitatív PCR módszert az amplifikált DNS mennyiségének reakció közbeni pontos meghatározására fejlesztették ki. Az eljárás során a PCR termékek detektálása a kettősszálú DNS-hez általánosan kötődő fluoreszcens festékekkel, vagy szekvenspecifikus oligonukleotid próbákkal történhet. Az általunk használt SYBR Green egy kettősszálú DNS-hez kötődő fluoreszcens festék, melynek fluoreszcenciája a szálakhoz kötődve nagymértékben megnövekszik, így lehetővé téve a PCR során a keletkező ampliconok kvantifikációját. A qPCR-ben a SYBR Green fluoreszcenciájának detektálása a lánchosszabbítási lépés végén történik.

A bakteriális 16S rRNS gének kvantifikációját Ba519f (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') és 907r (5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3') primerekkel (Muyzer és Smalla 1998) végeztük Mx3000P készülékben (Stratagene, La Jolla, CA, USA). A PCR reakció összetevői 50 µl-re a következők voltak: 1 x PCR puffer, 1.5 mM MgCl₂, 1.25 U Taq polymerase, 0.1 mM dNTP (Fermentas, St. Leon-Rot, Németország), 10 mg BSA (Roche, Penzberg, Németország), 0.1 SYBR Green és ROX festékek (ThermoFischer Scientific), 0.25 mM forward és reverse primer, és 2 µl DNS templát. A PCR 40 cikluson keresztül ismétlődő hőprofilja a következő volt: 94 °C, 30 mp; 52 °C, 30 mp; 70 °C, 30 mp. Standardként az *Echerichia coli* teljes hosszúságú 16S rRNS génjét használtuk 10⁷ és 10⁰ kópia/ ml koncentrációban.

Az egyes kísérleti beállítások grádienseiből az eredmények alapján 8-8 frakciót válsztottunk ki 16S rDNS T-RFLP analízisre. A PCR reakcióhoz FAM fluoreszcensen jelölt Ba27f és 907r primereket használtunk, majd a termékeket *RsaI* restrikciós enzimmel emésztettük. A kapilláris gélelektroforézis után az elektroferogramok kiértékelését a 3.6.3 fejezetben leírtak szerint végeztük. Az egyes frakciók 16S rDNS diverzitásának feltárása piroszekvenálás módszerével történt, melynek leírását a 3.14.1 fejezetben ismertetem.

3.14 Újgenerációs DNS-szekvenálási módszerek

Az ezredfordulót követően újgenerációs szekvenálási technológiák (pl. piroszekvenálás, félvezető alapú szekvenálás, reverzibilis terminátor alapú szekvenálás) jelentek meg. Ezek közös vonása, hogy egyszerre számtalan szálon párhuzamosan folyik a DNS szekvenálása. Összehasonlítva e technológiákat a korábban ismertetett Sanger féle módszerrel, az előbbieket esetében általában a rövidebb leolvasási hossz és bizonytalanabb bázispontosság ellenére, a számos párhuzamos reakciónak köszönhetően a végteljesítmény nagyobb. Az egyes platformok leolvasási sebessége akár több ezer bázis is lehet másodpercenként, valamint az egy bázisra számolt költség is jóval alacsonyabban alakul (Pettersson et al. 2009, Mardis et al. 2008). Az újgenerációs módszerek közül mi a kutatásunk során a 454 Life Sciences által kifejlesztett piroszekvenálás és a DNA Electronics Ltd. által kidolgozott, majd az Ion Torrent Systems Incorporation révén továbbfejlesztett félvezető alapú szekvenálási technológiákat alkalmaztuk, így a továbbiakban ezeket részletezem.

3.14.1 Piroszekvenálás

A piroszekvenálás módszerét két évtizede dolgozták ki, alapelve, hogy a DNS- polimeráz aktivitását valós időben detektálják egy kemilumineszcens vegyület segítségével. Amikor egy

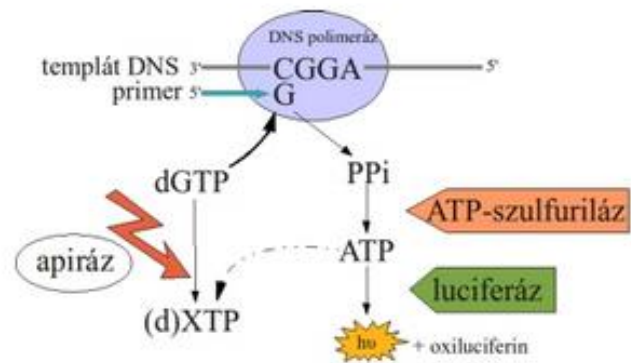
nukleotid beépül a DNS szálba, pirofoszfát és hidrogénion keletkezik, az előzőnek a mennyiségét mérik egy kapcsolt reakcióval. Egyszerre csak egyféle nukleotidot adnak a rendszerhez, ha ebből több is beépül a szintetizált szálba, akkor a fényintenzitás növekedése arányos lesz a felhasznált nukleotidok számával.

Első lépésben a DNS szálát egyszálúsítják, majd úgynevezett emulziós PCR-t készítenek. A piroszekvenálás két típusát különböztetjük meg: a szilárd és a folyadékfázisút. A folyamat lényege, hogy az egyszálú DNS templátot először egy primerrel hibridizáltatják, majd DNS-polimeráz, ATP-szulfuriláz, luciferáz, apiráz, adenzin-5'-foszfoszulfát és luciferin jelenlétében inkubálják. Első lépésben egyféle dNTP-t adnak a rendszerhez. Ha az beépül a szálba, akkor leválik róla a pirofoszfát, ezt a szulfuriláz megköti és az APS-ből ATP-t állít elő.

Az ATP-ből luciferin jelenlétében, a luciferáz oxiluciferint hoz létre (3.5. ábra), amely egy fényvillanással járó folyamat (kemilumineszcencia). Fontos megjegyezni, hogy az ATP-nek egy módosított változatát, (ATP α S)

alkalmazzák, melyet a DNS-polimeráz igen, de az ATP-szulfuriláz nem tud hasznosítani.

Ennek megfelelően a keletkező ATP a pirofoszfátból származik, és a szulfuriláz nem a mesterségesen hozzáadott ATP-t használja fel. Minden egyes felvillanást a száloptika egy kamerához vezet, ami detektálja és rögzíti a képet (Nyitray et al. 2013).



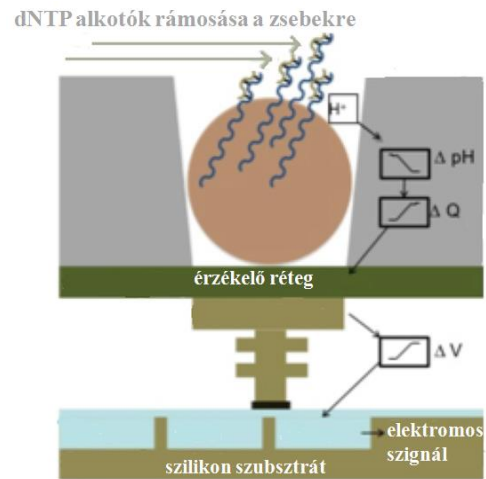
3.5 ábra A piroszekvenálás sémája (Nyitray et al. 2013)

A piroszekvenálást a Zhang és Lüders által ismertett módon a müncheni Helmholtz Zentrum munkatársai végezték (2017). A multiplex PCR a 454 GS FLX+ protokoll (Roche) alapján Ba27f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') és Ba519r (5'-TAT TAC CGC GGC KGC TG-3') primerekkel, Lib-L adapterekkel és MID (multiplex identifier) azonosító oligókkal történt. Az ampliconokat 1,5% agaróz gélen vizualizálták. Végül többszöri tisztítás és kvantifikálást követően az emulziós PCR és a piroszekvenálás a GS FLX Titanium protokolljai alapján történt. A szekvenciákat a GREENGENES online adatbázis és applikáció (DeSantis et al. 2006) segítségével szerkesztették. Az átlagosan 450 bázispár hosszúságú szekvenciák elemzését a SILVAngs internetes adatbázis segítségével végeztük (Quast et al. 2013).

3.14.2 Félvezető alapú szekvenálás

Ahogy az előzőekben ismertettük a DNS szál felépülése során egy bázispár kapcsolódásakor kovalens kötés alakul ki és a reakció során pirofoszfát molekula valamint egy

hidrogén ion szabadul fel (3.6. ábra). Az félvezető alapú szekvenálás a felszabaduló hidrogénion okozta változások mérésén alapul. A felszabaduló hidrogén ion megváltoztatja a közeg pH-ját melyet a mikrozszebek alján található ion szenzitív szenzor detektál. A félvezető chipekből az elektromos jelek sorozatát egy számítógép felé közvetítik, amely ebből közvetlen generálja a DNS szekvenciát, a folyamat során nincs szükség jelölt dNTP alkotókra, vagy köztes szignálalakításokra (Nyitray et al. 2013).



3.6. ábra A félvezető alapú (Ion torrent) szekvenálás sémája (<http://www.genomics.cn> alapján)

A szekvenálást és az abból kapott adatok feltöltését a Seqomics Kft végezte el, Ion Torrent PGM™ platformon. A környezeti minta 1 µg-nyi DNS-éből könyvtárt készítettek Ion Xpress Plus Fragment Library Kit segítségével. Az adaptereket Ion Shear Plus Reagents Kit használatával ligálták, a méretszelekciót pedig 2 % agaróz gélen végezték. A könyvtár amplifikálását Platinum® PCR SuperMix segítségével végezték, majd az azt követő kvantifikációhoz ION Library TaqMan qPCR-t használtak. Az emulziós PCR Ion PGM 200 Xpress Template kittel készült, míg a szekvenálást Ion 316 chipen, Ion PGM 200 seq. kittel végezték.

A feltöltött adatok kiértékelését az MG-RAST (Metagenomics Rapid Annotation using Subsystem Technology) online szoftvercsomag (Meyer et al. 2008) segítségével végeztük. A taxonómiai értékeléshez az online felület M5nr protein és riboszómális RNS adatbázisait egyaránt használtuk.

3.15 Új baktériumfaj leírásához szükséges vizsgálatok

A doktori munkám alatt a kísérleti mintákból és egyéb kárhelyekről is próbáltunk klasszikus mikrobiológiai módszerekkel olyan törzseket feldúsítani, izolálni, amelyek rendelkeznek a monoaromás szénhidrogének hipoxikus bontásáért felelős enzimekkel. Az izoláláshoz döntő többségben R2A táptalajt (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 K₂HPO₄; 0,05 g MgSO₄ x 7H₂O; 0,3 g nátrium-piruvát; 20 g agar; 1 liter desztillált víz), vagy annak módosított glükóz nélküli változatát használtuk. A próbálkozások során számos könnyen tenyészthető *Pseudomonas* és egyéb már jól ismert fajt izoláltunk, ezen eredmények ismertetésére dolgozatomban nem térek ki. Azonban egy esetben sikerült egy ezidáig ismeretlen baktériumfajt izolálnunk, mely rendelkezik egy számunkra fontos I.2 C katekol 2,3-dioxigenáz enzimtípussal. A következőkben szeretném bemutatni, hogy milyen

vizsgálatok szükségesek egy ilyen, a tudomány által még nem ismert mikroorganizmus leírásához.

Az elmúlt 100 évben számos módszert alkalmaztak a prokarióta rendszertanban, azonban még jelenleg is mind a tradicionális, mind az új típusú technikák komplex alkalmazása ajánlott annak érdekében, hogy eldönthessük, valóban egy új fajt sikerült-e izolálnunk. Meg kell jegyeznünk, hogy az újgenerációs technikák fejlődésével a közeljövőben várható, hogy e módszerek egy részének alkalmazását felváltja az egyes törzsek genomszekvenálása és az az alapján történő rendszertani besorolás.

Az egyes baktériumtörzsek azonosítása napjainkban egyértelműen a 16S rRNS gének szekvenciájának meghatározásán alapul. Több kutatás is kimutatta, hogy abban az esetben, ha két törzs ezen génje kevesebb, mint 97%-os hasonlóságot mutat egymással, akkor azok külön fajba sorolhatóak. A 95% alatti homológia esetén pedig számba kell vennünk annak lehetőségét, hogy egy új nemzetséggel van dolgunk (Martínez-Murcia és Collins 1990, Collins et al. 1991, Amann et al. 1992, Fox et al. 1992, Martínez-Murcia et al. 1992). Ahol az egyezés meghaladja a 97%-ot és mégis gyanúnk van, hogy új fajról beszélhetünk, számos olyan vizsgálatra van szükség, mint a DNS-DNS hibridizáció (DDH), vagy az egyéb géncsoportok (Multi Lókus Szekvencia Analízis) összehasonlítása.

3.15.1 DNS-DNS hibridizáció

A DDH értékek esetében többnyire 70% alatti egyezés esetén beszélhetünk új fajról (Brenner 1973, Johnson 1973, 1984, Wayne et al. 1987). A módszer lényege, hogy a kérdéses törzs DNS-ét rövid szakaszokra tördelik, majd valamilyen módon (pl. radioizotóposan) megjelölik. Több hibridizációs, és tisztítást tartalmazó lépés után, a jelölt DNS-ét az összehasonlítandó törzs hasonló módon előkészített jelöletlen DNS-ével együtt hidroxipatit oszlopra viszik fel. Az oszlopot vízfürdőben 2,5 °C-onként a 60-90 °C-os hőmérsékleti tartományon belül melegítik. Az egyes emelések után a denaturált DNS-szalakat lemossák és azok mennyiségét a hőmérséklet függvényében ábrázolják. Végül az ugyanabból a fajból származó DNS molekulák és a hibridizált molekulák olvadási hőmérsékletének különbsége jellemzi a hasonlóság mértékét.

A doktori munkám során leírt baktériumfaj esetében e vizsgálatot a DSMZ GmbH – Német Mikroorganizmusok és Sejtkultúrák Gyűjtemények Leibniz-Intézetében (Braunschweig, Németország) Dr. Cathrin Spröer és munkatársai végezték, melyhez 3 g tömegű nedves biomasszát küldtünk 1:1 v/v arányú izopropanol és víz keverékében. A DDH-hoz az egyes törzsek sejteit Constant Systems TS 0.75 kW típusú géppel roncsolták (IUL Instruments), majd a DNS-t a nyers lizátumból a Cashion és munkatársai (1977) által leírt módon, kromatográfiásan hidroxilapatit segítségével tisztították. A DNS-DNS hibridizációt a De Ley és munkatársai

(1970) által kidolgozott és a Huß és munkatársai (1983) által javasolt módosítások alapján végezték. A módszerhez Cary 100 Bio típusú UV/VIS-spektrofotométert alkalmaztak.

3.15.2 A guanin és citozin százalékos arányának meghatározása

A teljes genomi DNS guanin és citozin (G+C) tartalmának vizsgálatát szintén a DSMZ végezte el. Az általunk küldött 2 g tömegű nedves sejtmasszából a DNS izolálása az előző fejezetben ismertetett módon történt. A DNS-t P1 nukleáz és szarvasmarhából származó alkalikus foszfatázzal választották nukleotid alkotókra (Mesbah et al. 1989), majd azokat Tamaoka és Komagata (1984) módszere alapján reverz fázisú HPLC készüléken szeparálták el egymástól. Kontrollként Lambda DNS-t (az *E. coli* bakteriofágja) és három ismert genomszekvenciájú DNS-t használtak, melyek G+C értéke 43-72 mol% között alakult. A G+C értékeket a deoxiguanozin és timidin arányából számították Mesbah és munkatársai (1989) alapján.

3.15.3 Fenotípusos és kemotaxonómiai vizsgálatok

A telepek morfológiájának megállapítása szabad szemmel és sztereomikroszkóppal történt. A Gram festést a Claus által leírt módszer alapján végeztük (1992). A sejtek morfológiáját és motilitását az MTA Anyag és Környezetkémiai Intézetében Dr. Szabó László segítségével fáziskontraszt-mikroszkóppal és transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. A transzmissziós elektronmikroszkópos analízishez a sejteket 1 % (w/v) uranil acetát oldattal kontrasztosítottuk (Szoboszlai et al. 2008).

A hőmérsékleti optimum megállapításához a tenyészeteket 5 és 45 °C között inkubáltuk R2A agaron, míg a pH toleranciát (pH 3-11, 0,5 egységenként emelve) ugyanilyen típusú folyékony táplevesben vizsgáltuk.

Az oxidáz aktivitást Tarrad és Gröschel (1982), míg a kataláz aktivitást Cowan és Steel (1974) által leírt módszerekkel az ELTE Mikrobiológia Tanszékén Dr. Tóth Erika és munkatársai vizsgálták. A D-glükóz savtermelést Hugh és Leifson (1953) klasszikus tesztje alapján végezték. Az ureáz aktivitást, nitrátredukciót, a keményítő és Tween 80 hidrolízisét, valamint a zselatináz és foszfatáz aktivitást Smibert és Krieg (1994) módszerei alapján szintén az ELTE Mikrobiológiai Tanszékén vizsgálták.

A további asszimilációs tesztek, valamint enzimaktivitások mérését az API 50 CH, API 20 NE és API ZYM (bioMérieux) kitékkel végeztük a gyártó előírásai alapján. Az anaerob körülmények közötti tenyésztést 0,15% (w/v) KNO₃ hozzáadásával, valamint anélkül R2A tápoldatokban vizsgáltuk 28 °C-on. Az anaerob körülmények biztosításához 100 ml-es szérum üvegekbe (Glasgerätebau Ochs) 75 ml steril tápoldatot töltöttünk, lezártuk, majd nitrogén gázzal

kihajtottuk az oxigént. Az oldott oxigén koncentrációkat az üvegben PSt3 szenzor spotokkal (PreSens) és Fibox 3 trace v3 fibre optikai oxigén mérővel non-invazív módon vizsgáltuk.

3.15.4 Sejtmembrán zsírsav analízis

Az új faj jelölt sejtmembrán zsírsav analízisét a DSMZ végezte. A zsírsav-metil-észterek vizsgálatát a Microbial Identification System (MIDI; Microbial ID) előírásai alapján végezték.

3.15.5 Respiratórikus és lipokionok analízise

Az analízist szintén a DSMZ végezte. A respiratórikus kinonok és lipokionok elválasztása 100 mg fagyasztva szárított biomasszából a Tindall (1990a, 1990b) által leírt kétlépcsős módszerrel, valamint metanol-hexán keverékkel történt. A lipokionok későbbi szeparációját hexánban, míg a respiratórikus lipokionok (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 lipokionokat 269 nm hullámhosszon detektálták.

3.15.6 Poláris lipidek meghatározása

A poláris lipidek meghatározását szintén a DSMZ végezte. A respiratórikus lipokionok és kinonokhoz hasonlóan ezek szeparációja is 100 mg fagyasztva szárított biomasszából történt a Tindall (1990a, 1990b) által leírt kétlépcsős módszer segítségével. A poláris lipidek elválasztását kétdimenziós szilikagélen (Macherey-Nagel Art. NO. 818 135) vékonyréteg kromatográfia segítségével végezték. Az első vizsgálat kloroform:metanol:víz (65:25:4, v/v/v), míg a második kloroform:metanol:ecetsav:víz (80:12:15:4, v/v/v/v) elegyével történt. A teljes lipidtartalom meghatározása foszformolibdénsav, míg a funkcionális csoportok meghatározása az azokra specifikus reagensekkel történt (Tindall et al 2007).

3.15.7 Szénhidrogénbontó képesség meghatározása

Mivel a vizsgált baktériumtörzset szénhidrogénnel szennyezett kárhelyről izoláltuk, klasszikus gravimetriás és molekuláris biológiai módszerekkel is vizsgáltuk a biodegradációs képességét. A gravimetriás méréshez a baktériumot 3 napig 28 °C-on R2A táptalajon felszaporítottuk. Ezt követően 5 ml sejtszuszpenziót 100 ml OIR III tápoldatba [5 g (NH₄)₂SO₄, 0.5 g KH₂PO₄, 1 g K₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄·x 7 H₂O, 0.2 g CaCl₂ · 6H₂O, 0.01 g FeSO₄ · 7 H₂O, 0.5 g pepton, 0.5 g

élesztő kivonat, 1000 ml dH₂O] oltottunk, melyet 2 ml gázolaj-kőolaj (3:2, v/v) keverékkel egészítettünk ki. A tenyészeteket 5 napon keresztül 20 °C-on 150 rpm sebességgel rázattuk. Az inkubációt követően a maradék szénhidrogén keveréket 50 ml n-hexánnal extraháltuk az OIR III tápoldatból. A fázisok különválása után a vizes fázist leengedtük, majd az olaj-oldószer keveréket leszűrtük. A Düren 619 G ¼ típusú szűrőpapírra egy kevés Na₂SO₄-et helyeztünk, ezzel megkötve az olajos fázisban esetlegesen megmaradt vizet. A vizes fázist a rázótolcsérbe töltöttük, majd megint összekevertük n-hexánnal, az olajos fázist ismét leszűrtük, végül a folyamatot még egyszer megismételtük. A kezelés után a még vizes fázisban maradt szénhidrogén komponenseket kloroformmal oldottuk ki. A rázás után a kloroformos fázis fajsúlyánál fogva a vizes alatt helyezkedik el, megkönnyítve az elválasztást. Az átszűrt oldószeres olajat előzetesen analitikai mérleggel lemért gömblombikba töltöttük, majd az oldószereket és a szénhidrogéneket Heidolph típusú bepárlókészülékkel forráspont különbség alapján szétválasztottuk. A bepárlás után a gömblombikokat szárítószekrényben 65°C-on 45 percig szárítottuk, így eltávolítva az esetlegesen visszamaradt vizet, illetve oldószert. Kontrollként a gázolaj-kőolaj keveréket szintén 3:2 arányban tartalmazó, rázatott, de baktériumtenyésztéssel be nem oltott tápoldatot használtunk.

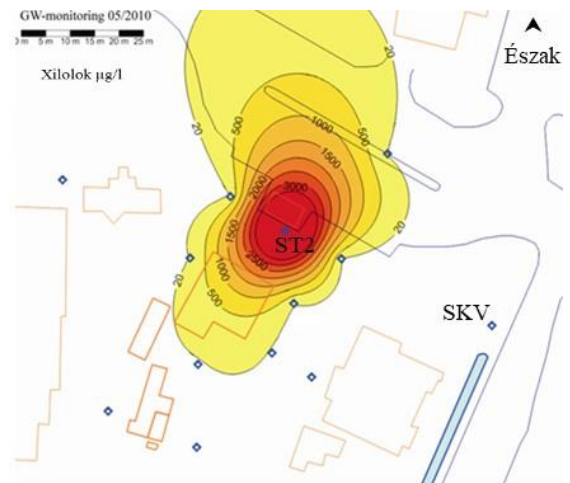
Mivel az izolált törzsünk a Bétaproteobaktériumok osztályába tartozott és e baktériumok rendelkezhetnek az I.2.C típusú katekol 2,3-dioxigenáz funkciógénnel (Táncsics et al. 2012, 2013), ezért megvizsgáltuk, hogy az új faj jelölt rendelkezik-e ezen funkciógénnel. A PCR reakció során a már korábban ismertett XYLE3F és XYLE3R primereket használtunk (Táncsics et al. 2013).

4. Eredmények

4.1 A siklósi BTEX-vegyületekkel szennyezett, hipoxikus talajvíz mikrobaközösségének hosszútávú monitoringja

4.1.1 A mintavételi terület jellemzése

A kutatás céljára kiválasztott siklósi kárhelyen a szennyezést egy korábbi benzinkút földalatti tárolótartályainak a szivárgása okozta. Az általunk vizsgált talajvízminták a terület monitoring rendszerének ST2-es jelű kútjából származtak, amely a szennyezési csóva közepén helyezkedik el (4.1 ábra). A kémiai analitika eredményeit a szennyezetlen SKV háttér kút esetében is megkaptuk. A BTEX komponensek mindegyike kimutatható volt az ST2-es kútban, mindazonáltal a fő szennyezőforrást a benzol, xilol, etil-benzol és egyéb alkilbenzol vegyületek alkották (4.1-es táblázat). Az SKV kút esetében a BTEX-vegyületek mennyisége minden esetben a kimutathatósági határérték alatt maradt.



4.1. ábra A kárhely xilol szennyezettségi térképe (2010)

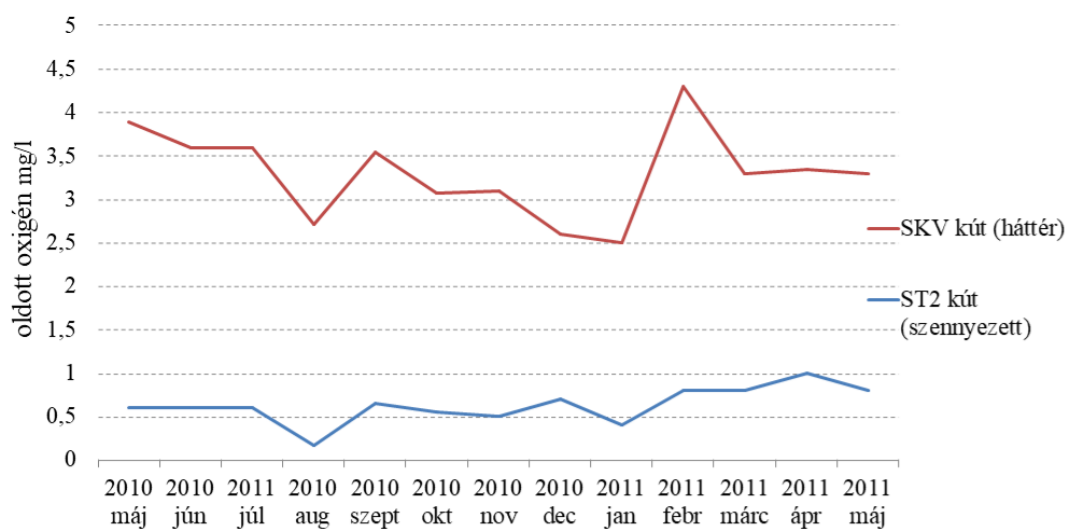
4.1. táblázat Szennyezőanyag koncentrációk az ST2 mintavételi kútban

szennyezőanyag (µg/l)	2010 máj.	2010 aug.	2010 nov.	2011 febr.	2011 máj.
benzol	340	616	320	565	788
toluol	64	102	54	75	71
etil-benzol	966	1330	2420	1570	891
xilol	6700	7450	6880	6030	5320
egyéb alkil benzolok	6710	8790	8220	6130	7030

A talajvíz hőmérséklete mindkét kút esetében 14-17 C° között, a pH 6,8 és 7,3 között alakult a mintavételi időszakban, tehát e paraméterek viszonylag állandónak tekinthetők a vizsgált területen. Hidrogeológiai szempontból a mintavételi időszak két fő részre osztható: míg 2010 májusa és decembere között a teljes csapadékmennyiség 788 mm-nek adódott és a havi csapadékösszeg követte a Kárpát-medencében jellemző szezonális dinamikát, addig 2011 januárja és májusa között extrém száraz időjárás uralkodott, a teljes csapadékmennyiség mindössze 85 mm volt, közel egyenletes eloszlásban. Ennek megfelelően 2010 decemberétől folyamatos csökkenést tapasztaltunk a talajvíztábla szintjében, mígnem az a monitoring időszak

végére extrém alacsony szintet ért el. Nem meglepő módon a havi csapadékmennyiség és a talajvíz szintje, valamint a redox potenciál (E_H) értékek között pozitív korreláció adódott ($r = 0.717$, $P = 0.006$ és $r = 0.718$, $P = 0.006$). A növekvő csapadékmennyiség a redox potenciál értékek növekedését okozta (pl. 2010 szeptemberében), míg a száraz időszakban folyamatos csökkenést tapasztaltunk.

Az oldott oxigén koncentrációk a szennyezett kútban - ST2 - alacsony 0,17 és 1 mg/l, míg a háttér kútban – SKV – magasabb 1,9 és 3,5 mg/l értékek között alakultak a vizsgált időszakban (4.2. ábra). Tehát az általunk vizsgált monitoringkútban hipoxikus körülmények uralkodtak, mivel ha egy közeg oldott oxigén koncentrációja kisebb, mint 2 mg/l, az hipoxikusnak nevezhető (Kukor és Olsen, 1996).



4.2. ábra Az oldott oxigén koncentrációjának változása az ST2-es és SKV monitoring kutakban

Az oldott oxigén koncentrációjának e nagymértékű különbsége a szennyezett és a háttér kút talajvíz mintái között egyértelműen a szénhidrogén szennyezésből adódott. A felszín alatti vizek ugyanis általánosságban véve oligotrófnak, azaz tápanyagban, szénforrásban szegénynek tekinthetőek. A szénhidrogén szennyezés hatására azonban megnövekszik a mikrobák számára hozzáférhető szénforrás mértéke a közegben, ezáltal megnövekszik a mikrobiális anyagcsere aktivitás, ami az elektron akceptorok koncentrációjának csökkenésével jár.

A szennyezett ST2-es kútban nagyságrendileg kisebb volt a nitrát koncentrációja is a háttérkúthoz képest, egyedül 2010 májusában detektáltak mérhető mennyiséget. Az alacsony nitrát koncentrációkból arra következtettünk, hogy az ST2 kút mikroba közösségében nitrátlégzés is megfigyelhető. Az ST2-es és SKV kutak vízkémiai paramétereit az 4.2-es táblázat foglalja össze. A táblázatban feltüntetett Fe(II) a vasredukáló, a metán a metanogén mikroszervezetek légzési terméke, míg a SO_4^{2-} elektron akceptorként funkcionál a szulfátredukációt végző mikrobák számára.

4.2. táblázat A mintavételi és a háttér kutak vízkémiai paramétereit

	paraméter	2010 máj.	2010 aug.	2010 nov.	2011 febr.	2011 máj.
	ST2 (szennyezett)	O ₂ (mg/l)	0,60	0,17	0,50	0,80
Nitrát (mg/l)		2	<1	<1	<1	<1
Fe(II) (mg/l)		4	3	3,1	3,7	2
SO ₄ ²⁻ (mg/l)		24	<5	<5	<5	<5
CH ₄ (mg/l)		1,90	1,24	1,69	1,97	1,84
pH		6,88	6,96	6,98	7,28	7,07
E _H (mV)		148	8	127	-216	-214
vízszint (mm)		-2530	-3120	-3190	-3300	-3940
SKV (háttér)		O ₂ (mg/l)	3,30	2,55	2,60	3,50
	Nitrát (mg/l)	61	70	64	73	67
	Fe(II) (mg/l)	<0,02	<0,01	<0,02	<0,02	<0,02
	SO ₄ ²⁻ (mg/l)	71	79	78	83	90
	CH ₄ (mg/l)	<0,04	<0,04	0,09	<0,04	<0,04
	pH	7,65	7,25	7,27	7,38	6,78
	E _H (mV)	126	388	252	-11	76
	vízszint (mm)	2480	2720	2790	2920	3590

Ezen paraméterek elemzéséből valószínűsíthető, hogy a szennyezési csóva középpontjában a szediment oxigénmentes rétegeiben nitrátredukción túl vas-, szulfát-légzés, valamint metanogenezis is megfigyelhető. Az SKV háttér kútban a metán és Fe(II) koncentrációk egy hónaptól eltekintve a kimutathatósági érték alatt maradtak, míg a szulfát koncentrációja 70 és 90 mg/l között alakult. A vízkémiai eredmények összességükben alátámasztják, hogy a szennyezett ST2-es kút mintái oxigénlimitált közegből származnak, ahol már nem kizárólag az oxigén szerepel légzési szubsztrátként a mikroba közösség számára. A szennyezés által nem érintett SKV háttér kútban ezzel szemben többé-kevésbé aerob körülmények uralkodtak a monitoring teljes ideje alatt, és nincs nyoma annak, hogy az oxigénen kívül más, alternatív elektron akceptorok is szerepet játszanának, mint légzési szubsztrát.

A kutatásunkban szeretnénk volna kideríteni, hogy a fent bemutatott, szénhidrogénnel szennyezett hipoxikus talajvízben milyen a mikrobaközösség összetétele, valamint annak hosszútávú dinamikája. Ennek érdekében a beérkezett talajvíz mintákat különböző molekuláris biológiai módszerekkel vizsgáltuk (T-RFLP, molekuláris klónozás) RNS alapon.

4.1.2 Az ST2-es kút mikroba közösségének feltárása 16S rDNS klónkönyvtárak segítségével

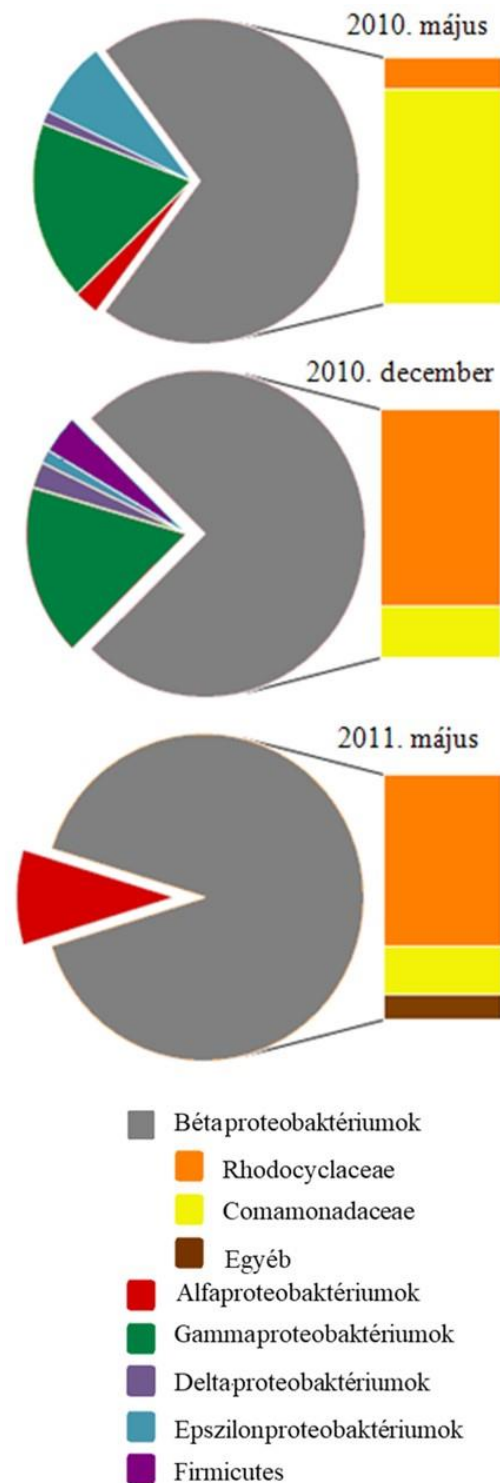
A talajvíz mikroba közösségének pontos faji összetételét, annak időbeli változását oly módon próbáltuk feltárni, hogy 16S rDNS klónkönyvtárakat hoztunk létre a kezdeti 2010. májusi, egy köztes 2010. decemberi, illetve a végponti, 2011. májusi minták esetében. Ehhez a mintákból RNS-t izoláltunk, amelyet reverz transzkriptáz enzim segítségével cDNS-sé, azaz komplementer DNS-sé írtunk át. Az így nyert közösségi cDNS-t templátként használva PCR segítségével felszaporítottuk a mikrobiális 16S rDNS szakaszokat, majd klónkönyvtárakat hoztunk létre. Mindhárom klónkönyvtár esetében legalább 100-100 klónszekvenciát elemeztünk. A klónkönyvtárak csoportrepresentánsainak filogenetikai besorolását, valamint abundanciájukat a 4.3-as ábrán és táblázatban foglaltuk össze.

4.1.2.1 A kiindulási, 2010. májusi minta mikroba közösségének összetétele

A 2010. májusi kiindulási mintában a Bétaproteobaktériumok dominanciája (72%) volt megfigyelhető. A klónok 19%-a a Gammaproteobaktériumokhoz, 6%-a az Epszilonproteobaktériumokhoz, 2%-a az Alfabroteobaktériumokhoz, valamint 1%-a a Deltaproteobaktériumokhoz tartozott. A Bétaproteobaktérium klónok 87%-a a Comamonadaceae családba, míg 13%-a a Rhodocyclaceae családba tartozott (4.3. ábra). Az összes klón 58%-át az előbbi taxonba tartozó *Rhodoferrax antarcticus* és *Rhodoferrax ferrireducens* fajokkal 97%-os 16S rDNS homológiát mutató baktérium alkotta (4.3. ábra), valamint a klónok további 1%-a teljes azonosságot mutatott az utóbbi fajjal. A *Rhodoferrax antarcticus* bíbor nem-kén baktériumot nevének megfelelően először antarktikus területről izolálták Madigan és munkatársai (2000). A mikroba 0 és 25 °C között sötétben oxigén respirációja mellett kemoorganotróf módon, míg anoxikus közegben fény jelenlétében fototróf módon növekszik. A *Rhodoferrax ferrireducens* ellenben Fe(III) redukálására képes fakultatív anaerob baktérium, így gyakran domináns tagja a hipoxikus talajvizek mikroba közösségeinek. E fajok közeli rokonait több esetben is kimutatták oxigénlimitált, BTEX komponensekkel szennyezett kárhelyek vizsgálata során (Finneran et al. 2003, Fahy et al. 2006, Aburto et al. 2011, Tánicsics et al. 2010), így feltételezhető, hogy szerepet játszanak az aromás szénhidrogének hipoxikus körülmények közötti lebontásában. Ezt látszik megerősíteni Eriksson és munkatársainak (2005) a mikrokozmosz kísérlete, mely során megfigyelték, hogy egy oxigénlimitált, propil-benzol lebontó dúsító tenyészetben e mikroorganizmusok voltak az egyeduralgok, így a szennyezőanyag lebontása is valószínű e mikrobákhoz köthető.

A összes klón 5%-a a Rhodocyclaceae családba tartozó *Azoarcus* PbN1-es törzssel mutatott közeli rokonságot, a mikroorganizmust 1995-ben izolálta Rabus és Widdel. E törzs anaerob körülmények között képes az etil- és propil-benzol degradációjára, azonban toluol tartalmú táptalajon nem mutatott növekedést. Fontos megjegyezni, hogy e mikroszervezet aerob körülmények között nem volt képes az alkil-benzolok hasznosítására. A nemzetség egyes törzsei, ahogyan ezt a 2.8. fejezetben is bemutattam, gyakran fordulnak elő anaerob körülmények között, szénhidrogénnel szennyezett talajvizekben, üledékekben. Anaerob közegben a nitrátot használják elektron akceptorként, azt nitrogén gázzá redukálva.

A Gammaproteobaktériumok *Pseudomonas* nemzetségéből detektált *Pseudomonas extremaustralis* és *Pseudomonas fluorescens* fajokat (az összes klón 9 és 1%-a), mint tipikus BTEX-vegyületek biodegradációjára alkalmas mikroszervezeteket tartják számon. Szinte alig akad olyan szénhidrogénnel szennyezett kárhely, ahonnan a *Pseudomonas* nemzetség tagjait ne izolálnák (Hendrickx et al. 2005). A *Pseudomonas extremaustralis*-t első ízben az Anktartisról izolálták, azóta kiderült, hogy a típustörzs genomja számos különböző anyagcsere útvonalat kódol a rideg környezetben való túlélés érdekében, beszámoltak biofilm képző tulajdonságáról, valamint aromás szénhidrogén bontó képességéről is (Tribelli et al. 2012). Egyes *Pseudomonas fluorescens* törzsek esetében ismert, hogy anaerob körülmények között is (a nitrátot elektron akceptorként használva) képesek lehetnek egyes aromás szénhidrogén bontására (Mikesell et al. 1993). A mintában kimutattunk az *Alkanibacter difficilis* mikroszervezettel csupán 95%-os hasonlóságot mutató klónokat, amelyek



4.3. ábra Az ST2-es kút mikroba közösségének alakulása a klónkönyvtárak alapján

az összes klón 9%-át alkották. A Sinobacteraceae családjába tartozó baktériumot Friderich és Lipski izolálta elsőként egy hexánnal kezelt biofilterből (2008).

Az összes klón 6%-át alkotó, Epsilonproteobaktériumok közé tartozó anaerob *Sulfurospirillum multivorans* típusörzse képes a tetraklór-, illetve tetrabrom-etén dehalogenációjára. E mikroszervezet a nitrátot, nitritet, elemi ként is hasznosítja elektron akceptorként (Luijten 2003).

4.1.2.2 A 2010. decemberi minta mikroba közösségének összetétele

A 2010. decemberi mintából kimutatott baktériumok 78%-a a Béta-proteobaktériumok, míg 18%-a a Gammaproteobaktériumok, valamint 3%-a a Delta- és 1%-a az Epsilonproteobaktériumok osztályába tartozott. Az Alfa-proteobaktériumok osztályát e mintában nem tudtuk kimutatni. A Béta-proteobaktérium klónok többsége, ellentétben a májusban tapasztaltakkal, a Rhodocyclaceae családba tartozott, de még mindig jelentős csoportot képviseltek a Comamonadaceae család tagjai is (4.3. ábra).

A Rhodocyclaceae családból az *Azoarcus* PbN1-es törzssel nagy hasonlóságot mutató baktériumot már a kiindulási mintában (4.1.2.1. fejezet) is detektáltuk. 2010. májusban az összes klón csupán 5%-át alkotta e mikroszervezet, míg a decemberi mintában ez az arány már a közösségi dominanciát jelentő 39%-ra növekedett (4.3. táblázat). A nemzetségből egy további fajt, az *Azoarcus buckelii*-t is kimutattuk, ennél a mikroorganizmusnál is megfigyelték, hogy anaerob körülmények között is képesek az aromás szénhidrogének degradációjára (Widdel és Rabus 2001, Mechichi et al. 2002).

A szintén Rhodocyclaceae családba tartozó, az összes klón 6%-át alkotó *Dechloromonas aromatica*, ahogyan azt az irodalmi áttekintésben is írtam, oxigén hiányában, nitrátredukció mellett is képes a benzol teljes lebontására, valamint a nitráton és oxigéneken kívül klorát és perklorát iont is képes elektron akceptorként használni (Coates et al. 2001b). Oxigén vagy klorát jelenlétében valószínű, hogy dioxigenáz enzimek végzik az aromás gyűrű hasítását (Chakraborty et al. 2005).

A korábban domináns, Comamonadaceae családba tartozó *Rhodoferrax*-okkal közel rokon fajt ezen klónkönyvtárban nem sikerült detektálnunk. A családot legnagyobb számban egy *Delftia tsuruhatensis*-el 93%-os hasonlóságot mutató mikroorganizmus képviselte. A távoli rokon baktériumot Shigematsu és munkatársai (2003) egy eleveniszapos szennyvíztisztító üzemből izolálták és vizsgálataik során kimutatták, hogy képes az aromás gyűrűt tartalmazó tereftalát biodegradációjára. Azonban a távoli rokonság miatt a siklósi területen fellelhető baktérium metabolikus tulajdonságait még becsülni is nehéz.

A Gammaproteobaktériumok közül decemberben is csak a *Pseudomonas* nemzetség tagjait tudtuk detektálni, melyek közül a fent ismertetett *Pseudomonas extremaustralis* volt a domináns

faj, az összes klón 9%-át alkotta e mikroszervezet. A mintában kimutattunk *Pseudomonas syringae* közeli klónokat is, e mikroszervezet esetében a szakirodalom nem számol be aromás szénhidrogén bontó képességről, azonban Green és munkatársai (2000) dúsításos kísérletekkel ki tudták mutatni a mikroszervezetet benzol és egyéb aromás vegyületekkel szennyezett talajból. A nemzetséget az aromás klór-szalicilsav bontására képes *Pseudomonas moorei* képviselte még a mintában (Cámara et al. 2007).

A májusi mintában már kimutatott Epsilonproteobaktériumok közé tartozó anaerob *Sulfurospirillum multivorans* egyetlen egy klón erejéig megjelent a decemberi mintánkban is.

A Deltaproteobaktériumokat képviselő klón legközelebbi ismert rokona a *Geobacter toluenoxydans*, olyan Fe(III)-redukáló baktérium, mely az általa hordozott benzil szukcinát szintáz funkciógén révén jelentős szerepet játszik a toluol anaerob körülmények közötti lebontásában (Kunapuli et al. 2010).

Az egyedül ebben a mintában kimutatható Firmicutes osztályt a Gram-pozitív *Anaerovorax odorimutans*-szal 86%-os hasonlóságot mutató klón képviselte. Ezen anaerob fermentatív metabolizmussal rendelkező mikroszervezetet anoxikus, enyhén sós víz üledékéből izolálták Matthies és munkatársai (2000), azonban az alacsony hasonlóság miatt az általunk kimutatott mikroorganizmus anyagszeréje ettől teljesen eltérhet.

4.1.2.3 A 2011. májusi minta mikroba közösségének összetétele

A 2011. májusi mintából kimutatott baktériumok 90%-ban a Bétaproteobaktériumok közé tartoztak. Az előző klónkönyvtárakban 17-18%-ban jelenlévő Gammaproteobaktériumok osztályának teljes hiányát tapasztaltuk, ugyanakkor 10% gyakorisággal ismét megjelentek az Alfaproteobaktériumok. A Bétaproteobaktérium klónok többsége a Rhodocyclaceae családba tartozott, de még mindig jelentős csoportot képviseltek a Comamonadaceae család tagjai is (4.3. ábra és 4.3. táblázat).

A mintában domináns klón (az összes klón 37%-a) a szekvencia analízis során a Bétaproteobaktériumok Rhodocyclaceae családjába tartozó *Uliginosibacterium gangwonense*-vel mutatta a legközelebbi rokonságot, azonban ez a 16S rDNS homológia nagyon alacsony 92,5 %-os értéket mutatott. Az *Uliginosibacterium* nemzetség aromás szénhidrogén degradáló képességéről nincsenek információink, azonban meg kell jegyezni, hogy a következő rokonfajok a *Thauera* és *Zoogloea* nemzetségekbe tartoznak, ahol már ismerősen cseng ez a tulajdonság (Song et al. 2001). A kismértékű, hasonlóság miatt azonban az általunk detektált mikroba anyagszeré-képességeit illetően még becslésekbe sem bocsátkozhatunk.

Az *Azoarcus* PbN1-el nagy hasonlóságot mutató mikroorganizmust az előző mintákhoz hasonlóan itt is sikerült kimutatnunk, azonban míg decemberben az összes klón 39%-át e

mikroba alkotta, öt hónappal később ez az arány csupán 3%-ra csökkent. A mintában sikerült detektálnunk a szintén nemzetségbeli *Azoarcus anaerobius* és *Azoarcus buckelii*, valamint egy a *Zoogloea* nemzetséggel legközelebbi (csupán 91,4%) rokonságot mutató baktériumfajt is.

4.3. táblázat. Az egyes klónok gyakorisága, filogenetikai besorolása, valamint *RsaI* enzimmel végzett emésztés során kapott T-RF hosszak

Filogenetikai besorolás	Klónkönyvtárakban képviselt arány (%)			T-RF hossz (bp)	
	2010. május	2010. december	2011. május	becsült	mért
Bétaproteobaktériumok	70	75	78		
<i>Rhodoferax</i> spp.	58	1	12	433	430
<i>Albidiferax</i> spp.	1	5	0	433/477	429/472
<i>Azoarcus</i> spp.	5	45	16	120	119
ismeretlen Rhodocyclaceae (<i>Uliginosibacterium</i>)	0	9	39	122	120
<i>Dechloromonas</i> spp.	0	7	5	120	121
ismeretlen Rhodocyclaceae (<i>Delftia</i>)	0	5	1	120	117
<i>Hydrogenophaga flava</i>	0	0	1	431	428
<i>Acidovorax</i> spp.	0	0	1	431	428
<i>Sulfuritalea</i> spp.	4	3	1	120	118
<i>Thiobacillus</i> spp.	1	0	2	122	120
<i>Sulfuricella</i> spp.	1	0	0	475	472
Gammaproteobaktériumok	18	17	0		
<i>Pseudomonas</i> spp.	10	17	0	521/472	522/472
ismeretlen <i>Alkanibacter</i>	8	0	0	462	457
Alfaproteobaktériumok	2	0	7		
<i>Rhizobium</i> spp.	2	0	2	111/483	111/478
<i>Oleomonas saganensis</i>	0	0	5	120	119
Epsilonproteobaktériumok	7	1	2		
<i>Sulfurospirillum multivorans</i>	7	1	2	448	449
Deltaproteobaktériumok	1	2	1		
<i>Geobacter</i> spp.	0	1	0	243	243
<i>Desulfopila</i> spp.	1	0	0	226	223
ismeretlen <i>Desulfobacteraceae</i>	0	0	1	258	258
Clostridia	0	3	0		
ismeretlen Clostridia (<i>Anaerovorax</i>)	0	3	0	492	490
Egyéb	0	1	9		

A Comamonadaceae családot képviselő, decemberi klónkönyvtárból hiányzó *Rhodoferax antarcticus*-szal és *ferrireducens*-szel közel rokon faj ismét megjelent a mikroba közösségben, igaz közel sem olyan arányban, mint az egy évvel korábbi mintában. A mikroszervezet az összes

klón 5%-át alkotta. A szintén e családba sorolt, és a klónok 1%-át alkotó *Hydrogenophaga flava* mikroszervezetet Fahy és munkatársai kimutatták és izolálták egy a benzol bontására képes mikroba közösségből, kutatásuk szerint az általuk izolált törzs tiszta tenyészetben is képes a benzol bontására (2006).

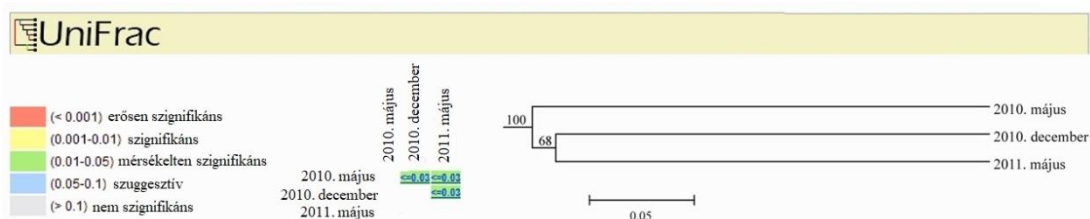
Az általunk ugyancsak kimutatott, az összes klón 5%-át alkotó, Alfa-proteobaktériumokhoz tartozó *Oleomonas sagaranensis* növekedést mutatott olyan aromás szénhidrogének jelenlétében, mint a benzol, toluol és fenol (Kanamori et al. 2002). Tánicsics és munkatársai 2010-ben szintén kimutatták e mikroszervezetet szénhidrogénnel szennyezett talajvízből (2010).

A 2011. májusi mintában, akárcsak az előző két minta esetében, ismét a fakultatív anaerob szervezetek domináltak a klónkönyvtárak, valamint kis számban szintén képviseltették magukat az obligát anaerob mikroszervezetek. A klónkönyvtárak szekvenciáit a JX028875–JX029043.

4.1.3 A klónkönyvtárak statisztikai elemzése, összehasonlítása

A klónkönyvtárak összetétele alapján jól látható, hogy néhány taxon állandó szereplője a közösségnek, így például az *Azoarcus* vagy a *Rhodoferax* nemzetség tagjai, bár gyakoriságuk változó képet mutat. Általánosságban elmondható, hogy mindhárom minta esetében a Béta-proteobaktériumok uralják a közösséget, azonban amíg a kiindulási minta esetében a Comamonadaceae család dominált, addig a 2010. decemberi, illetve a 2011. májusi mintákat a Rhodocyclaceae családba tartozó mikroszervezetek uralták.

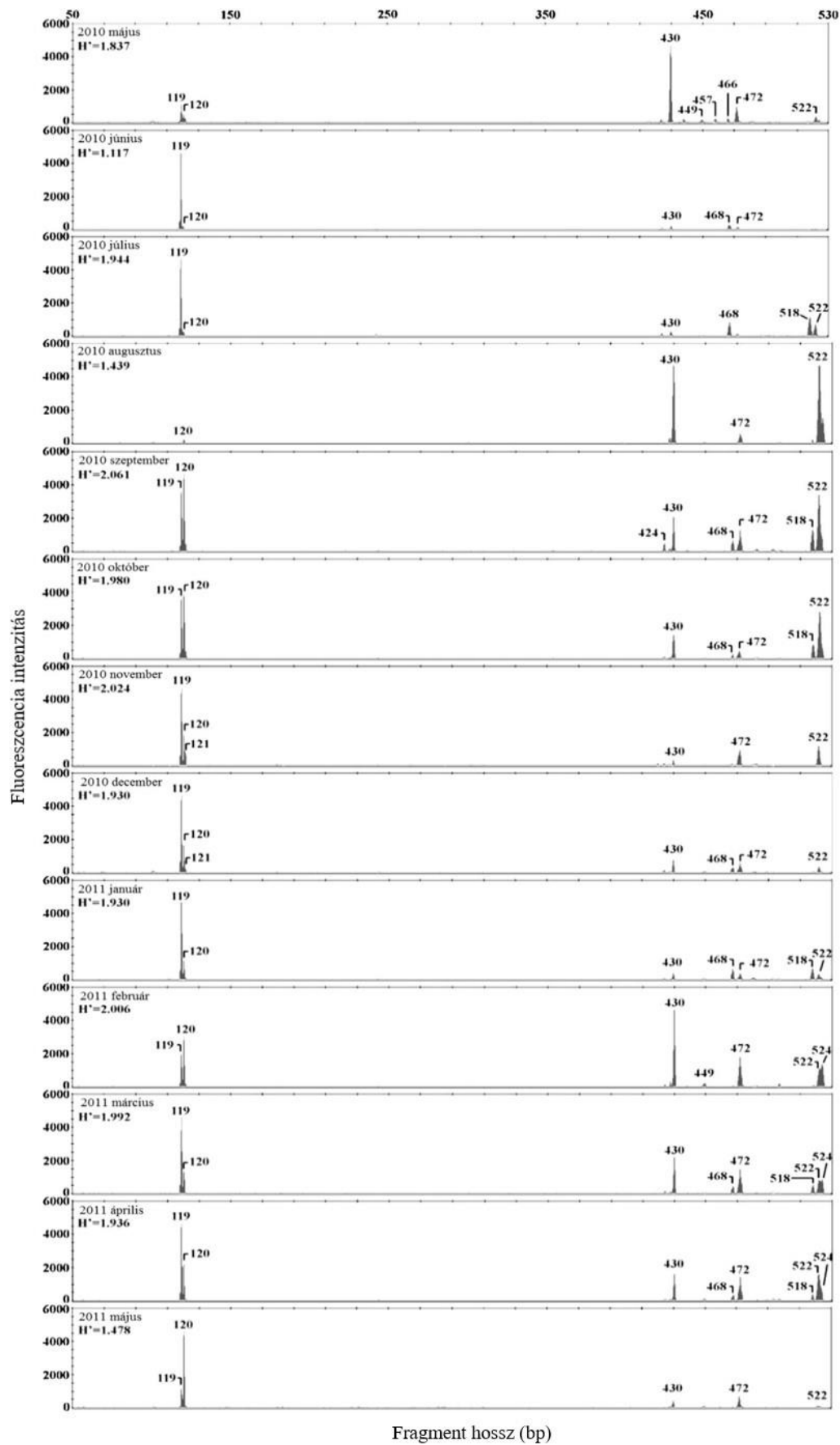
A klónkönyvtárak UniFrac program segítségével végzett összehasonlítása is azt mutatja (4.4. ábra), hogy bár faji összetétel alapján mindhárom közösség szignifikánsan különbözik egymástól, a klaszter analízis szerint a 2010. decemberi és a 2011. májusi minták mikroba közössége között kisebb a különbség, köszönhetően annak a ténynek, hogy mindkét minta közösségét a Rhodocyclaceae család tagjai dominálták.



4.4. ábra 16S rDNS klónkönyvtárak szignifikancia és klaszter elemzésének eredménye

4.1.4 A mikroba közösség dinamikájának vizsgálata T-RFLP segítségével

Amint azt fentebb már említettük, a Rhodocyclaceae családba több olyan nemzetség is tartozik, amelyről ismert, hogy oxigénlimitált, illetve anaerob közegekben nagy szerepet játszanak az aromás szénhidrogének lebontásában (pl. *Azoarcus*, *Thauera*, *Dechloromonas* nemzetségek).



4.5. ábra A minták 16S rDNS T-RFLP elektroferogramja *RsaI* enzimmel történt emésztés eredményeként, H': a Shannon diverzitás index értéke

Kérdés, hogy a dominanciaviszonyoknak ilyen szintű megváltozása, tehát a Comamonadaceae – Rhodocyclaceae átmenet mikor történt meg a vizsgált időperiódusban, illetve ez köthető-e valamilyen környezeti változéhoz. Ahhoz, hogy ezeket a kérdéseket megválasszunk, T-RFLP vizsgálat segítségével tártuk fel a közösség dinamikáját. A 13 hónapon át tartó T-RFLP monitoring eredményeként kapott kromatogramokat a 4.5. ábra szemlélteti. A T-RFLP elektroferogramok elemzése során szintén megfigyelhetjük a klónkönyvtárak értékelésénél kapott eredményt, miszerint a mikroba közösséget a monitoring teljes ideje alatt a Bétaproteobaktériumok uralták. Azon belül is a *Rhodoferax* (430 bp) és *Azoarcus* (119 bp) nemzetségek képviselői, valamint a Rhodocyclaceae család ezidáig ismeretlen tagja (120 bp) a domináns mikroszervezetek. A minták többségében ezenfelül a Gammaproteobaktériumok közé tartozó *Pseudomonasok* (522/472 bp) szintén nagy arányban voltak jelen. A klónkönyvtárak eredményei alapján feltételezett Comamonadaceae-Rhodocyclaceae dominanciaváltás, az elektroferogramokat elemezve sokkal árnyaltabb, a fent említett taxonok abundanciája, akár hónapról-hónapra igen változó képet mutat. Az egyes aromás vegyületek koncentrációja, azok egymáshoz viszonyított aránya, valamint a talajvíz hőmérséklete és pH-ja sem változott jelentősen a monitoring ideje alatt. A légzési szubsztrátok szintjében és a redox potenciálban azonban lényeges változás volt megfigyelhető. A legkisebb oldott oxigén koncentráció 2010 augusztusában volt mérhető, közel anaerobbá vált a közeg, miközben a nitrát és a szulfát koncentrációja a kimutatási határérték alá csökkent, valamint a redox potenciál is igen alacsony értéket (8mV) mutatott. Elképzelhető tehát, hogy e körülmények indukálták a közösség egyes dominanciaviszonyaiban bekövetkezett változásokat. Ahhoz azonban, hogy e feltételezésünket alá tudjuk támasztani, mikrokozmosz kísérletekre, vagy még gyakrabban végzett mintavételekre és nagyobb klónkönyvtárakra, esetleg metagenom elemzésekre lenne szükség.

4.1.5 A szennyezés lebontásában szerepet játszó katekol 2,3-dioxigenáz funkciógének kimutatása

Mivel a mikroba közösséget olyan fajok uralták, amelyekről elsősorban az ismert, hogy anaerob úton bontják a BTEX-vegyületeket (pl. *Azoarcus* nemzetség képviselői), kérdéses volt az, hogy ebben az egyébként hipoxikus közegben aktívak-e az aerob lebontási útvonalak. Ez több szempontból is fontos kérdés, hiszen ismert, hogy az aromás szénhidrogének biodegradációja aerob körülmények között a leggyorsabb, ráadásul a benzol anaerob körülmények között perzisztens vegyületnek számít lassú biodegradációja miatt. Ahhoz, hogy ezt a kérdést megválasszunk, meg kellett vizsgálnunk az aerob lebontási útvonalak kulcsenzimeit kódoló gének aktivitását.

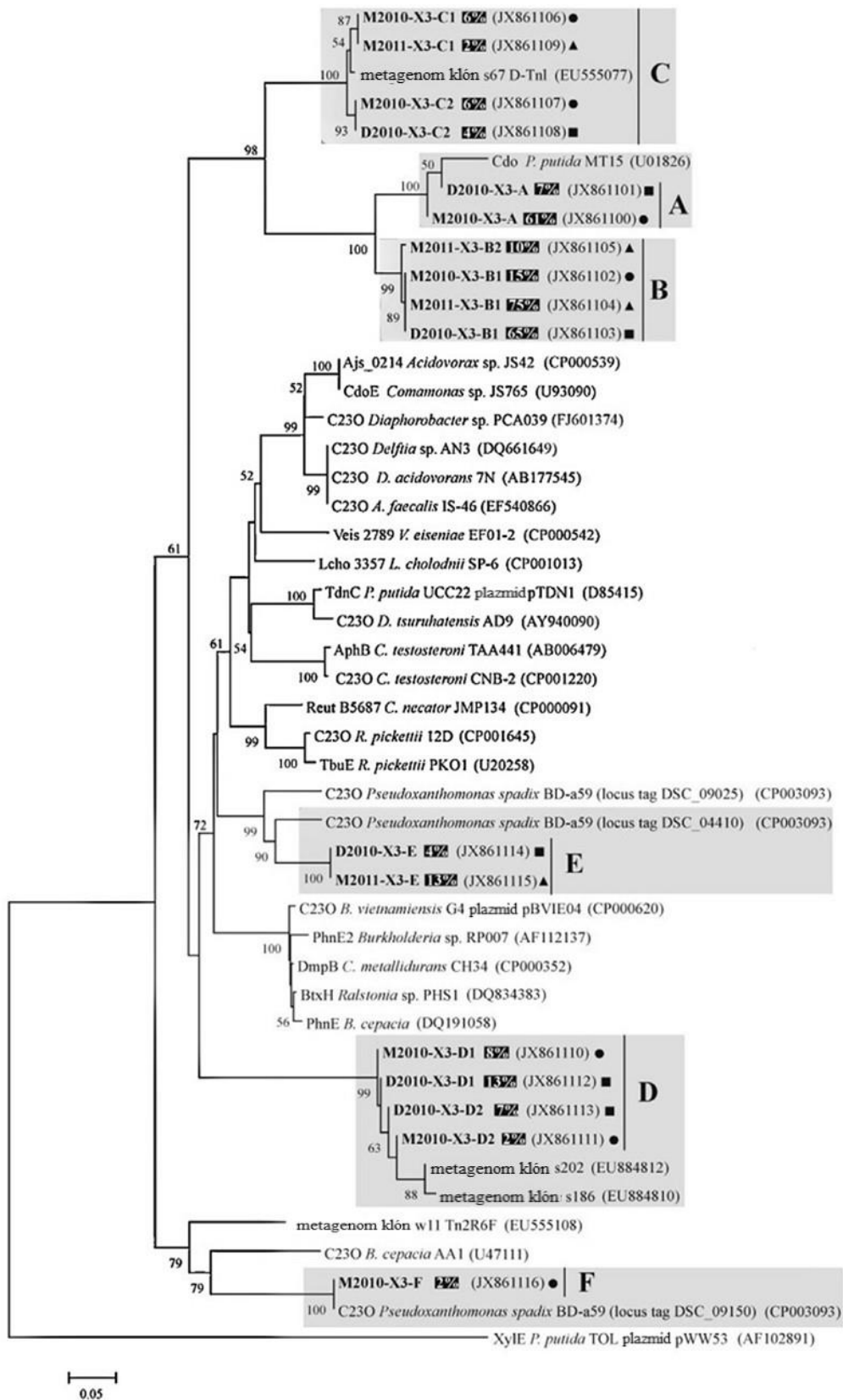
Az egyes katekol dioxigenáz alcsaládok aktivitását funkciógén PCR-ekkel vizsgáltuk, majd diverzitásuk feltárására klónkönyvtárakat hoztunk létre a 2010. májusi, decemberi, valamint 2011. májusi minták esetében, melyekből 48-48 klónszekvenciát határoztunk meg. A katekol 2,3-dioxigenáz enzimek génjeinek átíródását, tehát aktivitását vizsgálva azt az eredményt kaptuk, hogy a hipoxikus biodegradációért felelős enzimeket kódoló I.2.C alcsaládba tartozó géneket minden minta esetében sikerült PCR segítségével detektálni. A klónkönyvtárak alapján az I.2.C alcsalád reprezentánsait aminosav szekvenciáik alapján 6 különböző klaszterbe soroltuk be (4.6. ábra).

A 2010-es májusi minta esetében a fő szekvencia típus (61%, A klaszter) 98,8%-os hasonlóságot mutatott a *P. putida* MT15 C23O II proteinjével. Ezt a C23O enzimet Keil és munkatársai (1985) írták le, mikor észrevették, hogy a pWW15 TOL plazmidon két nem homológ, egymástól függetlenül szabályozott C23O gén kódolt. A második legabundánsabb típus (15%, B klaszter) szintén a *P. putida* MT15 C23O II proteinjével mutatott rokonságot, azonban az egyezés ez esetben már csak 91,4% volt. A C klaszterbe sorolt klónok (12%) az s67 D-Tn1 (GenBank azonosító szám: EU555077) metagenom klónnal mutattak 97,3 és 98,8% közötti hasonlóságot. Ezen szekvenciákat Brennerova és munkatársai (2009) írták le egy korábbi légitámaszpont (Hradcany, Csehország) mintáinak vizsgálata során. Egy korábbi munkánkban ezt az enzimesaládot már kimutattuk a területről egy specifikus nem degenerált primerpárral mely a Comamonadaceae család által hordozott C23O gének kimutatására alkalmas (Táncsics et al. 2012). A D klaszterbe sorolt klónok (10%) a szintén Brennerova és munkatársai (2009) által végzett metagenom szekvenálásból származó klónokkal, az s202 és s186 (GenBank azonosító szám: EU884812 és EU884810) mutatták a legnagyobb homológiát (98,3-99,2%). Az aminosav szekvenciák egy kis része (F klaszter) 100%-os hasonlóságot mutatott a *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59 C23O enzimjével. E baktérium törzs három különböző I.2.C alcsaládba tartozó C23O enzimmel rendelkezik és képes mind a hat különböző BTEX komponens bontására (Kim et al. 2008, Lee et al. 2012).

A 2010. decemberi minta esetében majdnem mindegyik típusú szekvenciát ki tudtuk mutatni, azonban azok gyakorisága megváltozott. Az A klaszter dominanciája megszűnt, csupán a minták 7%-a tartozott ide, míg a B típusú szekvenciák abundanciája 65%-ra növekedett. A C klaszter a minta 4%-át adta, míg a D típusú klónok gyakorisága megduplázódott (20%). Ezen felül egy új szekvencia típus jelent meg (E klaszter, az összes klón 4%-a), mely szintén a korábban említett *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59 C23O szekvenciáival mutatott hasonlóságot, azonban csak jóval alacsonyabb 89,9%-os szinten.

A monitoring időszak végén a B klaszterbe sorolt klónok váltak dominánssá (85%), míg az E típusú szekvenciák gyakorisága 13%-ot tett ki. A C klaszter jelenléte tovább csökkent, 2011

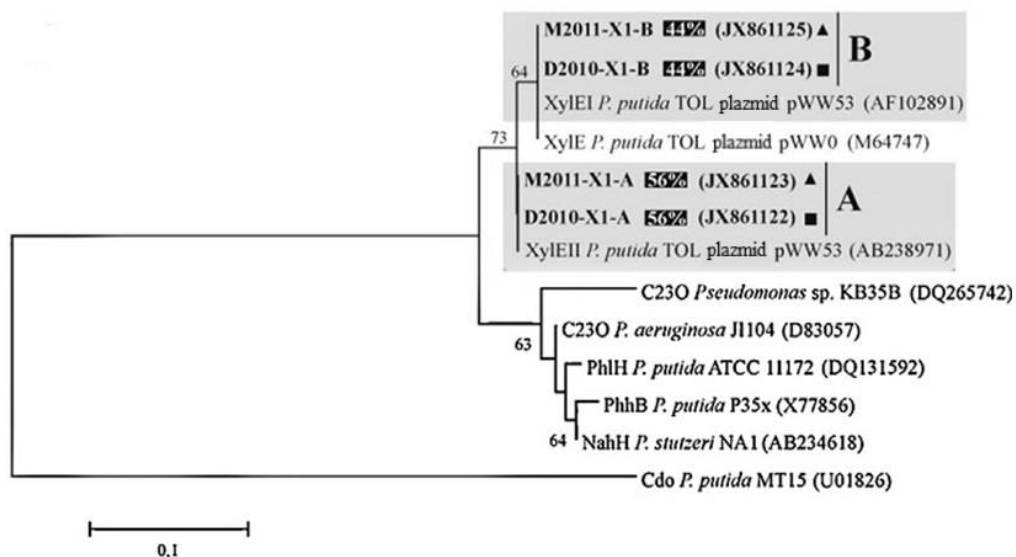
májusában már csak a minta 2%-át alkották e klónok, továbbá az A és D klaszter klónjai teljesen hiányoztak.



4.6. ábra A catekol 2,3-dioxigenáz I.2.C alszámú családjának különböző klaszterei aminosav szekvencia alapján. Az általunk kimutatott klónok félkövér betűtípussal szerepelnek, a 2010. májusi klónokat ●, a 2010. decemberi klónokat ■, míg a 2011. májusi klónokat ▲ szimbólumokkal jelöltük. A fekete négyzetekben az egyes genotípusok %-os abundanciáját tüntettük fel.

Az I.2.B alcsaládkhoz tartozó C23O géneket nem sikerült egyik mintából sem kimutatni. E funkciógén jelenléte főleg a *Sphingomonas* fajokhoz köthető, melyeket a klónkönyvtárak segítségével sem sikerült kimutatnunk, ez nem meglepő, hiszen e fajok szigorúan aerob körülmények között fordulnak elő.

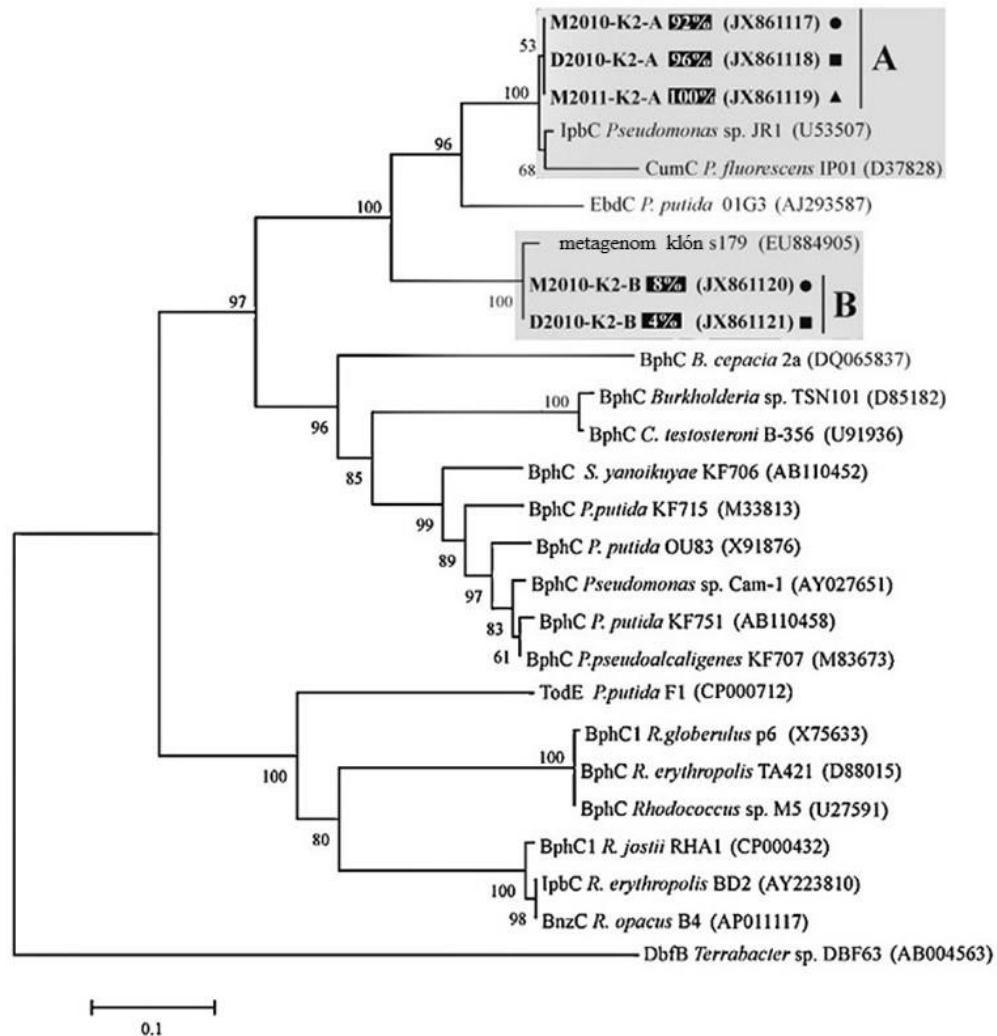
Az I.2.A alcsaládba tartozó katekol 2,3-dioxigenáz funkciógéneket a monitoring időszakban nem tudtuk minden mintából kimutatni, meg kell azonban jegyeznünk, hogy a PCR termékek pozitív esetben is gyengének mutatkoztak. Ahhoz, hogy az I.2.A alcsalád diverzitását feltárjuk, két klónkönyvtárat készítettünk a 2010. decemberi és a végponti, 2011. májusi mintákból. Az aminosav szekvenciák alapján a klónkönyvtárak összetétele meglepő módon mindkét esetben teljesen hasonlóan alakult (4.7. ábra). A domináns klónok (56-56%) 100%-os hasonlóságot mutattak a *P. putida* MT53 törzs TOL plazmidján a xyleII funkciógén által kódolt C23O proteinnel. A minták további része (44-44%) szintén teljes egyezőséget mutatott a pWW53 plazmidon a xyleI gén és a pWW0 plazmidon a xyleE gén által kódolt C23O enzimekkel. A diverzitáselemző rarefaction analízis alapján a funkciógén klónkönyvtárak mintaszáma megfelelő volt mind a 3 típusú dioxigenáz funkciógén esetében.



4.7. ábra I.2.A alcsalád különböző klaszterei aminosav szekvencia alapján. Az általunk kimutatott klónok félkövér betűtípussal szerepelnek, a 2010. májusi klónokat ●, a 2010. decemberi klónokat ■, míg a 2011. májusi klónokat ▲ szimbólumokkal jelöltük. A fekete négyzetekben az egyes genotípusok %-os abundanciáját tüntettük fel.

Mivel az etil-benzol volt az egyik legfőbb szennyezőanyag az általunk vizsgált kárhelyen, ezért a Brennerova és munkatársai (2009) által leírt 3-izopropilkatekol (3-IPC) 2,3- dioxigenáz gének expresszióját is vizsgáltuk (3.11 fejezet alapján). A 3-izopropilkatekol 2,3-dioxigenáz funkciógén PCR-ek minden minta esetében erős pozitív terméket adtak. Az aminosav szekvenciák kiértékelése alapján a klónkönyvtárak diverzitása konstans alacsonynak mutatkozott (4.8. ábra). A domináns klónszekvenciák (92%, 96% és 100%-os arány a klónkönyvtárakban)

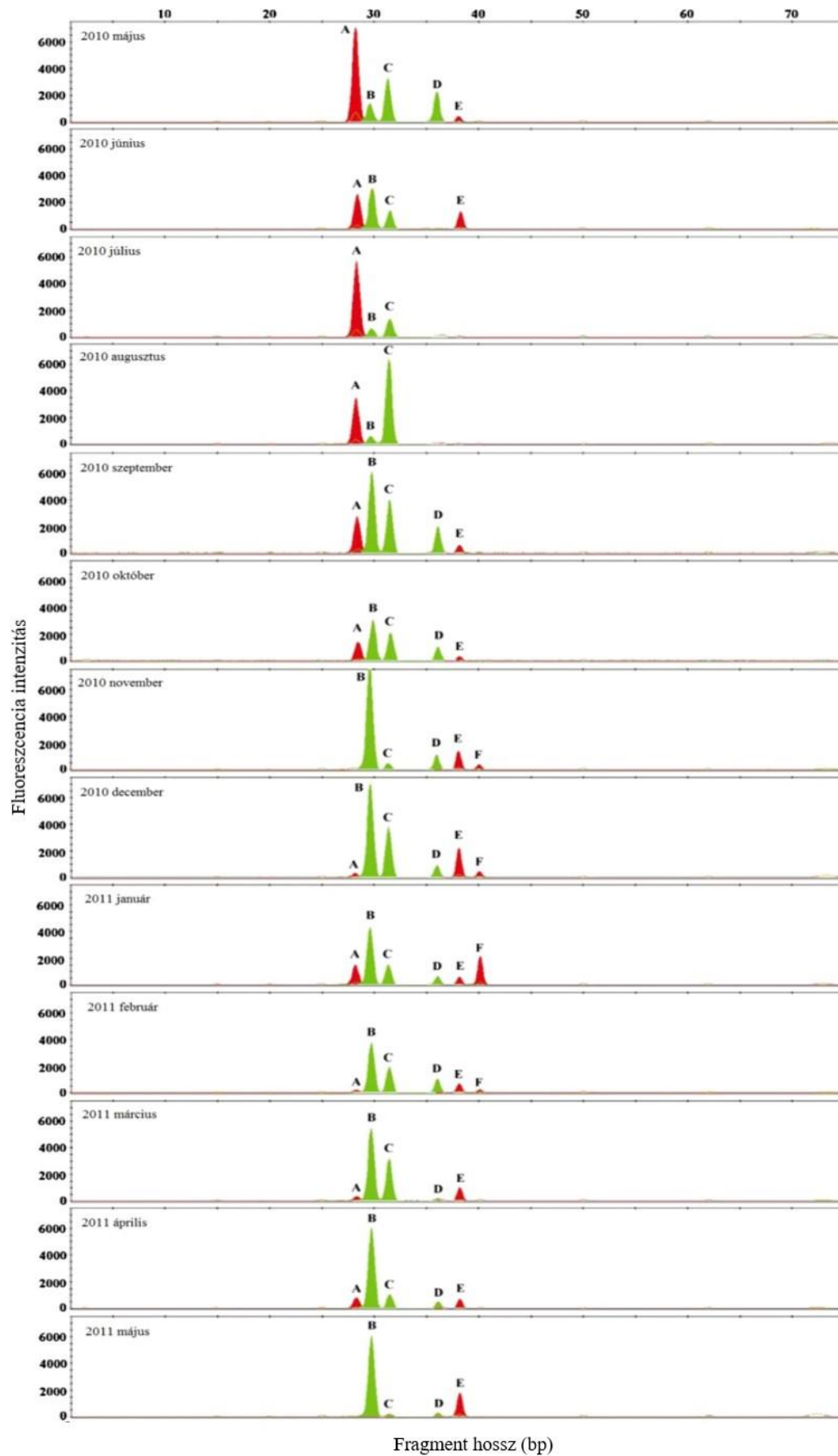
99,2%-os homológiát mutattak a *Pseudomonas* sp. JR1 törzs ipbC génjével (GenBank azonosítószám. U53507), amelyet Pflugmacher és munkatársai (1996) írtak le. A 2010. májusi és decemberi minták esetében a további szekvenciák 99,2%-os hasonlóságot mutattak az s179 (GenBank azonosítószám EU884905) metagenom klónnal, melyet szintén Brennerova és munkatársai (2009) írtak le a már korábban említett csehországi légitámaszponttól.



4.8. ábra A kimutatott 3-izopropilkatekol 2,3-dioxigenáz klaszterek aminosav szekvenciák alapján. Az általunk kimutatott klónok félkövér betűtípussal szerepelnek, a 2010. májusi klónokat ●, a 2010. decemberi klónokat ■, míg a 2011. májusi klónokat ▲ szimbólumokkal jelöltük. A fekete négyzetekben az egyes genotípusok %-os abundanciáját tüntettük fel.

4.1.5.1 Az I.2.C típusú C23O gének expressziójának monitorozása SNUPE módszerrel

A Single Nucleotid Primer Extension módszer már számos kutatásban bizonyította, hogy alkalmazása hasznos lehet a molekuláris biológiai kutatásokban (Cichocka et al. 2010, Hong et al. 2008, 2009, Nikolausz et al. 2008, 2009, Smith et al. 2005). Jelen vizsgálataink során mi is a SNUPE módszert alkalmaztuk, hogy az I.2.C alcsaládba tartozó C23O gének aktivitását a teljes monitoring időszak alatt kimutathassuk. A cél érdekében a három klónkönyvtárból kimutatott hat klaszterre specifikus SNUPE primereket terveztünk.



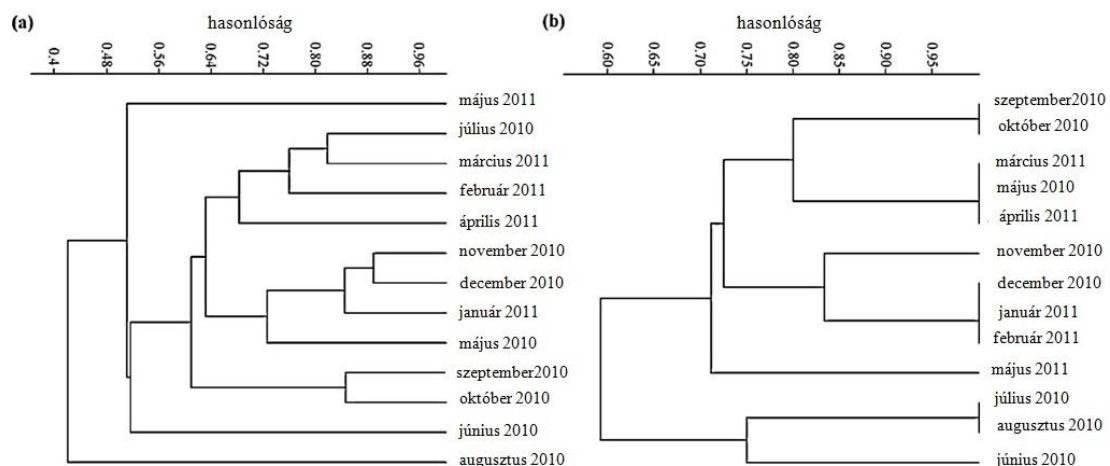
4.9. ábra I.2.C alcsládba tartozó C23O gének aktivitása SNUPE elektroferogramok alapján

Az eredmények alapján a *Pseudomonas*-okhoz köthető A klaszter a monitoring időszak első felében volt meghatározó, aztán a mintákban betöltött aránya jóval csekélyebb lett. Ezzel szemben a B klaszterbe sorolt C23O enzimek dominanciája 2010 szeptemberétől szinte folytonos volt. A C klaszterhez tartozó funkciógének aktivitása változatos képet mutatott, noha mindvégig kimutatható volt a mintákban, egyedül 2010 augusztusában volt csak domináns. A másik három klaszter kevésbé mondható szignifikánsnak. A D és az E típusokat néhány hónapot leszámítva folyamatosan detektáltuk, de a SNUPE csúcsok alapján aktivitásuk relatív alacsonynak mutatkozott. Végül a *Pseudoxanthomonas*-hoz köthető F klaszter funkciógénjeinek aktivitását detektáltuk a legkevesebbszer (4.9. ábra).

4.1.6 Összefüggések vizsgálata a mikrobaközösség összetétele és az I.2.C alcsaládba tartozó C23O gének expressziója között

Annak érdekében, hogy az expressziós mintázat és a bakteriális közösség változásai között összefüggéseket találjunk, elvégeztük a 16S rDNS T-RFLP és C23O SNUPE adatok klaszteranalízisét.

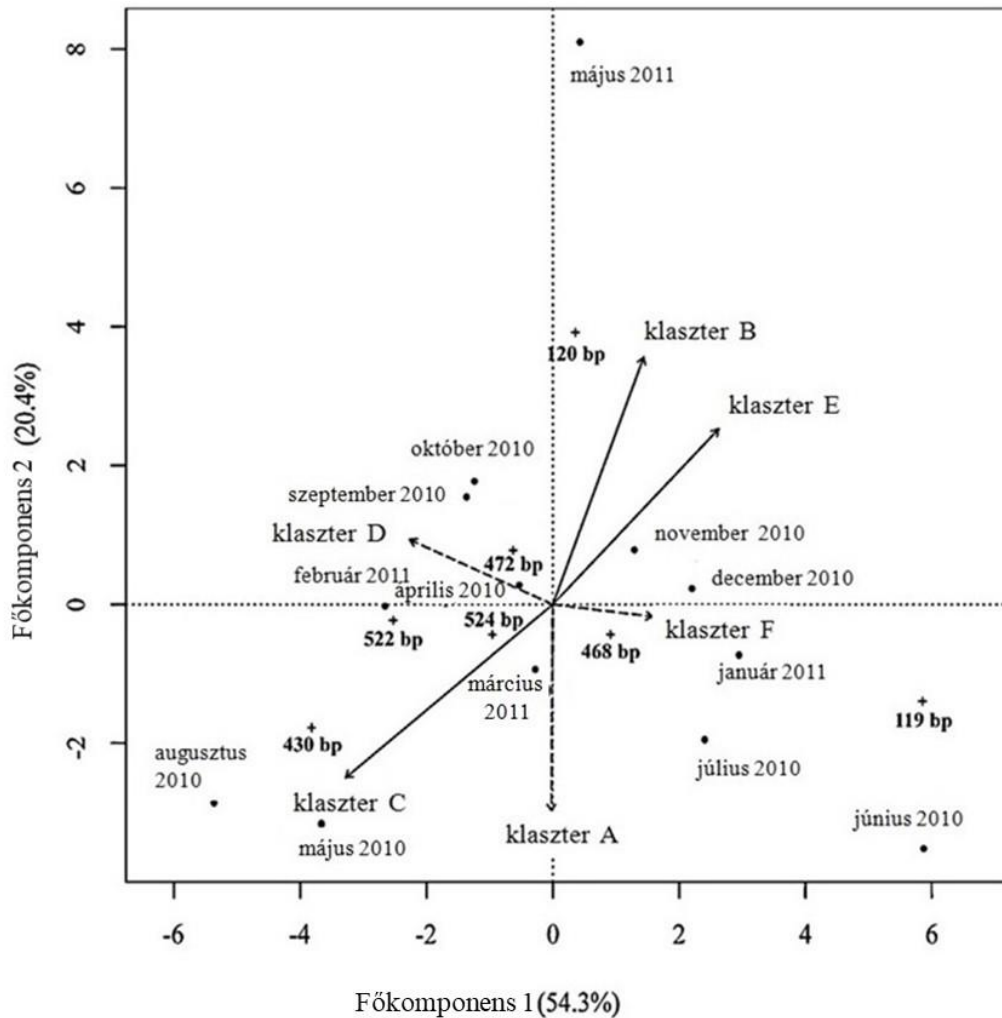
Azokban a hónapokban, melyek során a közösség összetétele nagyban megegyezett (4.10. a ábra), az I.2.C alcsaládba tartozó C23O funkciógének expressziós mintázata szintén hasonlóan alakult (4.10. b ábra).



4.10. ábra a 16S rDNS T-RFLP (a) és az I.2.C alcsaládba tartozó C23O SNUPE adatok (b) klaszteranalízise

Ez a jelenség jól megfigyelhető a 2010. novemberi, decemberi és 2011. januári, továbbá a szeptemberi és az októberi minták esetében is. Ezzel szemben egyes hasonló funkciógén mintázattal rendelkező csoportok (pl. 2010. június, július és augusztus) nagyon elkülönültek a közösségi összetételüket illetően. Hogy a T-RF-ek és az I.2.C alcsaládba tartozó C23O klaszterek közötti összefüggéseket meghatározhassuk, főkomponens analízist végeztünk el (4.11.

ábra). Az analízis során szignifikáns korrelációt (0.0284) találtunk a C klaszter és a *Rhodofera* klónokhoz köthető 430-bp T-RF jelenléte, illetve abundanciája között. A B és az E klaszterek pedig ez eddig ismeretlen *Rhodocyclaceae* klónokhoz köthető 120-bp T-RF-el mutattak szoros kapcsolatot (0.0256 és 0.0409 szignifikancia). Sajnos a másik három funkciógén típus aktivitása (A, D és F klaszterek) nem mutatott összefüggést a bakteriális közösség egyik tagjával sem.



4.11. ábra Összefüggések az I.2.C típusú C23O gének expressziója és a mikrobaközösség összetétele között.

4.1.7 Diszkusszió

Az aromás szénhidrogének oxigénlimitált körülmények közötti lebontása egyre inkább vizsgált terület, napjainkban számos kutatás irányult a mikroaerob biodegradációban fontos szerepet betöltő mikrobaközösségek megismerésére (Smith et al. 2005, Fahy et al. 2006, Nestler et al. 2007, Balcke et al. 2008, Kiesel et al. 2008). Mindezek mellett a katekol dioxigenázok szerepe e folyamatokban még kevésbé megértett. Kutatásunk során 13 hónapon keresztül igyekeztünk feltárni egy mikrobaközösség dinamikáját és a meta gyűrűhasítási útvonal dioxigenáz enzimeinek aktivitását. A vizsgált talajvíz igen sekély fekvésű, ezért az abiotikus paraméterek nagymértékben függenek a csapadékmennyiség szezonális dinamikájától. Ezt az összefüggést

legjobban a havi csapadékmennyiség és a talajvíz redox potenciál értékeinek szoros összefüggése bizonyították, mely szerint a monitoring időszak második felében tapasztalt extrém száraz időjárás a redukált állapot tartós fennmaradását okozta a talajvízben. Fahy és munkatársai szerint (2006) az ilyen erősen redukált felszín alatti vizeket az aromás szénhidrogének degradációjára képes mikrobaközösségek képesek gyorsan benépesíteni. Az általunk vizsgált talajvizet a Bétaproteobaktériumok, elsősorban a *Rhodoferax*, *Azoarcus* és egy ismeretlen Rhodocyclaceae családba tartozó genusz tagjai dominálták. Az éves monitoring alatt jelentős dominanciabeli változásokat figyeltünk meg a fent említett mikrobacsoportok között. E változások háttérében valószínűleg, a talajvíz sekély mivoltából fakadóan, a külső környezeti paraméterek változása állhatott. Ezt a jelenséget, amely általánosnak vélt a hasonló közegekben, Zhou és munkatársai (2012) is megfigyelték egy hidrodinamikailag aktív talajvíz mikrobiológiai összetételének vizsgálatakor. Annak érdekében, hogy az ilyen közösségbeli változások pontos okait sikeresen feltárhassuk még gyakoribb mintavételekre, és a mikroorganizmusok, valamint az abiotikus paraméterek szélesebb körű, mélyrehatóbb vizsgálatára lenne szükség.

Az eredményeinkhez hasonlóan más kutatások is igazolták a Bétaproteobaktériumok gyakoriságát az oxigénlimitált, aromás szénhidrogénekkal szennyezett talajvizekben (Fahy et al. 2006, Nestler et al. 2007, Tánicsics et al. 2010, Martin et al. 2012). Számos Rhodocyclaceae családba sorolt baktériumról már jól ismert, hogy képes az aromás szénhidrogének bontására nitrátredukáló körülmények között (Anders et al. 1995, Zhou et al. 1995, Song et al. 1999, 2001). A Comamonadaceae családban a *Rhodoferax* és azzal közeli rokon mikroszervezetek e képességét csak a közelmúlt vizsgálatai valószínűsítik. A nemzetségbe tartozó mikroorganizmusok tulajdonságai meglehetősen változatosak, megtalálunk köztük fototrófokat, anaerob fermentálókat, aerob kemoorganotrófokat és vasredukáló baktériumokat egyaránt. Martin és munkatársai (2012) stabil izotóposan jelölt fenantrén biodegradációja során *Rhodoferax* rokonsági körbe tartozó mikroorganizmusokat azonosítottak lebontó szervezetekként. Aburto és Peimbert (2011) aerob benzol és toluol bontó mikrokozmosz kísérletei alapján a *Rhodoferax antarcticus*-rokon fajok szerepét valószínűsíti az aromás szénhidrogének bontásában. Továbbá az általunk kimutatott *Rhodoferax* klónok 100%-os 16S rRNS hasonlóságot mutattak a szintén BTEX-vegyületekkel szennyezett és oxigénlimitált angliai SIREN kárhelyről (Fahy et al. 2006), és 99,7–100% homológiát a szintén szénhidrogén kontaminált németországi Zeitz kárhelyről (Alfreider és Vogt 2007) azonosított klónokkal. A nemzetségbe tartozó mikroorganizmusok ilyen jellegű képességét tovább valószínűsíti, hogy más bíbor nem-kén Bétaproteobaktériumok (például *Rubrivivax benzoatilyticus*) is rendelkeznek aromás szénhidrogénbontó képességgel (Ramana et al. 2006).

A Rhodocyclaceae családba tartozó *Azoarcus* klónok legtöbbje 100%-os 16S rRNS gén hasonlóságot mutatott a nitrátredukáló körülmények között etil- és a propil-benzol bontására képes *Azoarcus sp.* PbN1-el, ahogy ezt egy korábbi vizsgálatunkban is tapasztaltuk (Táncsics et al. 2012). A szintén Rhodocyclaceae családba sorolt és a monitoring időszak végén dominánssá váló klón az *Uliginosibacterium* nemzetséggel mutatta a legnagyobb hasonlóságot. Továbbá e klónok azonosak voltak számos környezeti szekvenciával, mint például a Casper kárhelyen (WY, USA) Callaghan és munkatársai által (2010), vagy a Düsseldorf-Flingern területen (Németország) Pilloni és munkatársai által kimutatott szekvenciákkal (2011).

A Bétaproteobaktériumok után a második legnagyobb csoportot a Gammaproteobaktériumok alkották, azon belül is főként a *Pseudomonas* nemzetség tagjai. A leggyakoribb *Pseudomonas* klónok 100% hasonlóságot mutattak az Arktisról izolált *P. extremaustralis* baktériummal, melynek kimutatták biofilm képző, valamint aromás szénhidrogén bontó képességét is (Tribelli et al. 2012.). A többi Proteobaktérium osztály nem volt egyik mintában sem meghatározó számban jelen.

A meta gyűrűhasítási útvonal dioxigenáz génjeinek átíródását monitorozva azt tapasztaltuk, hogy az I.2.C C23O és 3-IPC 2,3-dioxigenáz gének expressziója folyamatos volt. Az újonnan tervezett XYLE3 nevű degenerált primer szett (a tervezési folyamat a 3.11-es fejezetben) az I.2.C alcsaládba tartozó C23O gének széles skáláját volt képes amplifikálni a PCR során, még ezidáig ismeretlen, kitenyésztett baktériumokhoz nem köthető típusokat is. Az eredményeink alapján a Brennerova és munkatársai (2009) által leírt 3-IPC 2,3-dioxigenáz gének is széleskörűen elterjedtek a BTEX-vegyületekkel szennyezett talajvizekben. Ezenfelül, tudunk szerint ez volt az első alkalom, hogy e funkciógének mRNS transzkriptumait kimutatták környezeti mintákból. Az I.2.A alcsaládba tartozó C23O gének aktivitását vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy egy TOL plazmidon hordozott két homológ C23O gén jelenléte valószínűsíthető a közösségben. Ismert, hogy egyes *Pseudomonas* törzsek TOL plazmidjukon két homológ, vagy két nem homológ C23O funkciógént is hordozhatnak (Chatfield et al. 1986). Amikor a TOL plazmidon két homológ C23O gént találunk, mindkettő I.2.A alcsaládba tartozó C23O enzimet kódol (pl. pWW53). Ellenben amikor két nem homológ C23O gént hordoz, akkor az egyik az I.2.A, míg a másik az I.2.C alcsaládba tartozó C23O enzimet kódol (pl. pWW15). A funkcióbeli különbségeket a mai napig kutatják. Keil és munkatársai (1985) szubsztrátspecifitásbeli különbségeket tapasztaltak. Kukor és Olsen (1996) szerint szubsztrát affinitásbeli különbségek is adódhatnak, így valószínűsítik, hogy az I.2.C típusú C23O enzimek megnövekedett oxigénaffinitással rendelkeznek, így lehetővé téve a hipoxikus körülmények között az aromás szénhidrogének bontását. A *P. putida* mt-2 törzs pWW0 TOL plazmidján kódolt I.2.A C23O enzimeket vizsgálva Martinez-Lavanchy és munkatársai (2010) azt tapasztalták, hogy az oxigén

nem csak az enzim koszubsztrátja, de annak expresszióját is szabályozza. Ezek alapján érdekes lenne megvizsgálni, hogy van-e különbség nem homológ C23O funkciógének expressziójában mikroaerob körülmények között.

Mivel az I.2.C alcsaládba tartozó C23O gének nagy diverzitását és eltérő expresszióját tapasztaltuk a klónkönyvtárak alapján, SNUPE próbákat (az egyes próbákat lásd a 8.2. mellékletben) terveztünk az egyes klaszterekre, hogy a gének átíródását feltárhassuk az egész monitoring időszak alatt. A B és C klaszter aktivitása folyamatosan kimutatható volt, így ezen C23O gének és az általuk kódolt enzimek szerepe a BTEX-vegyületek lebontásában valószínűsíthető. Eredményeink alapján a B klaszter jelenléte valószínűleg a Rhodocyclaceae családba tartozó ezidáig ismeretlen baktériumhoz, míg a C klaszteré a szintén ismeretlen *Rhodofera* (Comamonadaceae) fajhoz köthető. Ugyanakkor az egyértelműen *Pseudomonas*-okhoz köthető A klaszter nem mutatott szignifikáns korrelációt a közösség egy tagjával sem. E korreláció hiánya abból adódhat, hogy legalább két T-RF csúcs is a *Pseudomonas* nemzetség fajihoz köthető.

Kutatásunk során kísérletet tettünk arra, hogy a BTEX-vegyületek mikroaerob lebontásában szerepet játszó mikroorganizmusok és a meta gyűrűhasítási útvonal dioxigenáz enzimek közötti összefüggéseket feltárjuk. Kimutattuk, hogy a bakteriális közösséget a Comamonadaceae és Rhodocyclaceae családok dominálták, valamint az I.2.C alcsaládba tartozó C23O gének széles spektrumát és folyamatos aktivitását detektáltuk. A SNUPE módszer alkalmasnak bizonyult a funkciógének expressziójának monitorozására, az általa kapott eredményeket kombinálva a 16S rDNS T-RFLP adatokkal szignifikáns korrelációkat találtunk a közösség összetétele és egyes funkciógének aktivitása között. Két, ezidáig ki nem tenyésztett *Rhodofera* nemzetséghez és Rhodocyclaceae családhoz köthető baktériumot, valamint két nem-homológ C23O dioxigenázt hordozó *Pseudomonas* törzset azonosítottunk, mint lehetséges hipoxikus BTEX-lebontó mikroszervezetet.

Új tudományos eredmény az 4.1-es fejezet alapján: Az újonnan tervezett XYLE3 nevű degenerált primer szett az I.2.C alcsaládba tartozó C23O gének széles skáláját volt képes amplifikálni a PCR során, még ezidáig ismeretlen, kitenyésztett baktériumokhoz nem köthető típusokat is.

Az eredményeinket a *Systematic and Applied Microbiology* szakfolyóiratban publikáltuk (Táncsics et al. 2013).

4.2 A siklósi mikrobaközösség stabil izotópos toluol lebontó vizsgálata hipoxikus körülmények között

4.2.1 A stabil izotópos dúsítás körülményei

Korábbi vizsgálataink során láthattuk, hogy a siklósi kárhelyen az I.2.C típusú katekol 2,3-dioxigenázok nagy diverzitását tudtuk kimutatni. A mikrobiális közösséget a Comamonadaceae és Rhodocyclaceae családba tartozó baktériumok dominálták. Az előbbibe főleg a BTEX-vegyületeket aerob módon bontó, I.2.C típusú C23O-al rendelkező baktériumok, úgymint *Acidovorax*, *Comamonas*, *Delftia*, *Diaphorobacter*, *Hydrogenophaga*, *Polaromonas* és *Variovorax* nemzetségek tagjai tartoznak. A Rhodocyclaceae családba inkább az aromás vegyületeket anaerob úton hasznosító mikroorganizmusokat – *Azoarcus*, *Dechloromonas*, *Thauera* spp. – ismerünk. Azonban a közelmúltban Jechalke és munkatársai (2013) azonosítottak olyan *Zoogloea* fajt, továbbá Corteselli és munkatársai 2017-ben leírtak egy *Rugosibacter* fajt, amelyek a BTEX-vegyületek aerob degradációjára voltak képesek. Annak ellenére, hogy az I.2.C típusú C23O gének általánosan elterjedtek a hipoxikus kárhelyeken, a legtöbb genotípus nem köthető ismert baktériumfajhoz, ennek megfelelően a degradációban betöltött szerepük is sok esetben tisztázatlan. Ahhoz, hogy korábbi eredményeinket alátámaszthassuk és még pontosabb képet kapjunk az egyes mikroszervezetek biodegradációban betöltött szerepéről, stabil izotópos (SIP) vizsgálatot végeztünk.

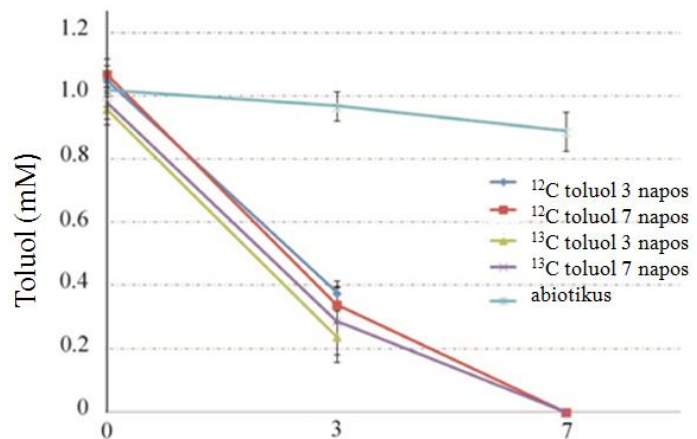
A siklósi mintaterület ST2-es kútjából 2015 áprilisában vettünk üledékben gazdag talajvíz mintát a korábban ismertetett módon. A kísérlet során összesen 15 darab három-három párhuzamos mikrokozmoszt állítottunk be 100 ml-es szérumüvegekben. 5-5 g nedves tömegű homogén üledékhez 50 ml nátrium-hidrogénkarbonát alapú mesterséges talajvíz tápoldatot mértünk, melyet vitamin és ásványi tápanyag törzsoldatokkal egészítettünk ki (a tápoldat részletes leírását lásd a 8.3.1 mellékletben). A mikrokozmoszokból az oxigént N₂/CO₂ 80:20 térfogat arányú gázkeverékkel hajtottuk ki, majd 0,2 µm pórusátmérőjű szűrőn keresztül levegőt juttatva a rendszerekbe 0,5 mg/l-re állítottuk be azok oxigénkoncentrációját. A mikroorganizmusok által elhasznált oxigént napi rendszerességgel pótoltuk, annak koncentrációját nem invazív módon, az üvegekbe ragasztott lumineszcens spotok, Fibox 3 Oxygen Meter műszer, valamint OxyView-PST3-V7.01 szoftver (PreSens, Németország) segítségével detektáltuk.

Hat-hat mikrokozmoszhoz 5 µl jelöletlen (¹²C₇), illetve minden szénatomon izotóposan jelölt (¹³C₇) toluolt adtunk. További három mikrokozmoszhoz, melyek autoklávozás után abiotikus kontrollként szolgáltak szintén 5 µl jelöletlen toluolt mértünk. Hogy a baktériumok aktivitását növeljük, az üvegekbe 5 mM ciklikus adenzin monofoszfátot (cAMP) adtunk. Az így elkészített mikrokozmoszokat 16°C hőmérsékleten 145 rpm rázatás mellett inkubáltuk. Az aromás

szénhidrogén fogyasztását a gáztérből ISQ Single Quadrapole GC-MS műszerrel (ThermoFischer Scientific), SLB-5ms kapillárist alkalmazva (Supleco Analytical) detektáltuk. 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.

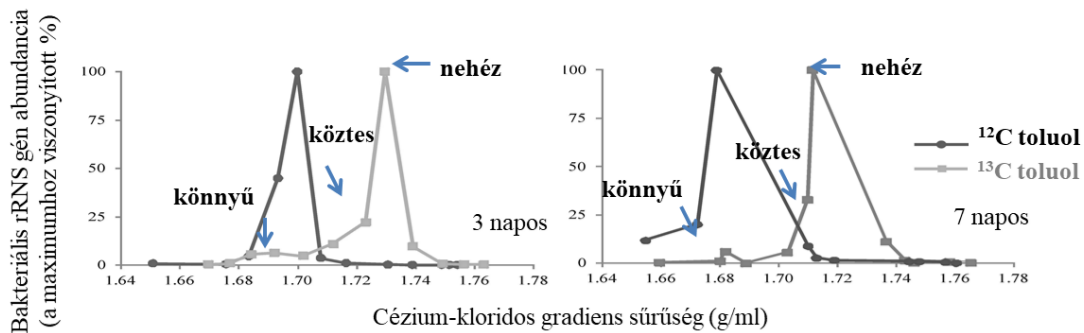
4.2.2 A toluol fogyása a mikrokozmoszokban, valamint az egyes DNS frakciók elkülönítése

Ahogy azt vártuk, a toluol gyors biodegradációja volt megfigyelhető a biotikus mikrokozmoszokban, a harmadik napon a hozzáadott mennyiségnek már csak 30%-át detektáltuk (4.12. ábra). Ekkor, hogy elkerüljük a másodlagos metabolitokkal táplálkozó mikroorganizmusok felszaporodását három-három jelölt és jelöletlen toluolt tartalmazó



4.12. ábra A toluol fogyása a mikrokozmoszokban

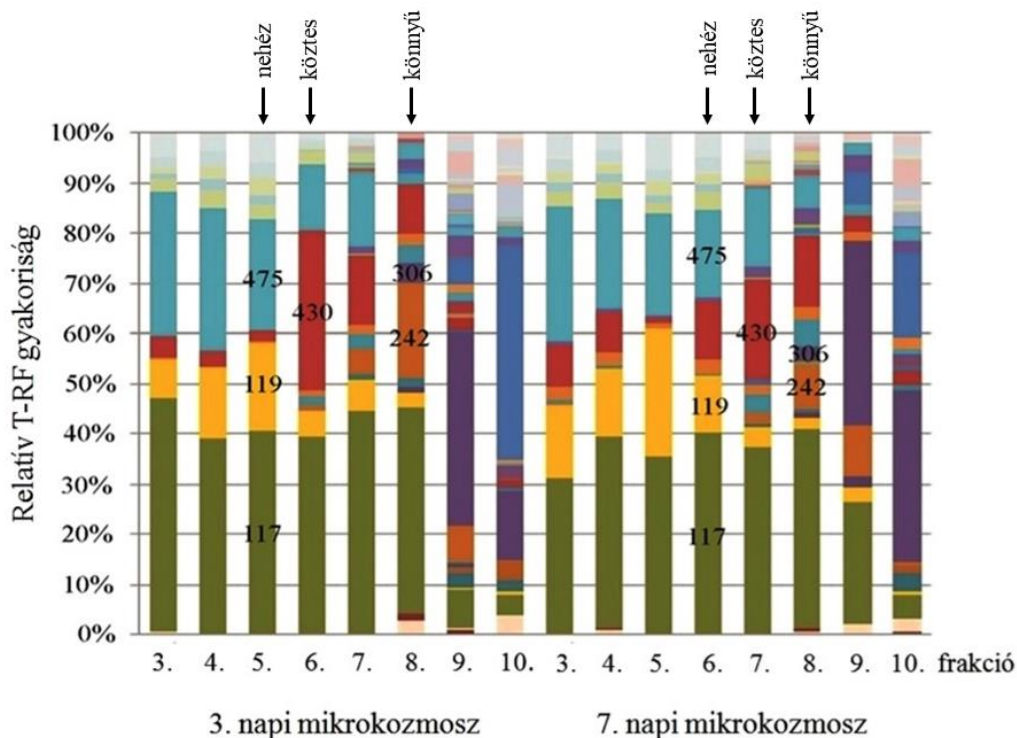
mikrokozmoszból DNS-t izoláltunk. A hetedik napon már egyáltalán nem tudtunk mérhető mennyiséget kimutatni, míg ezzel párhuzamosan az abiotikus kontrollokban mért veszteség elenyésző volt. Ekkor a maradék dúsító tenyészetek DNS-ét is kinyertük. Az egy hétig inkubált dúsító tenyészeteket összesen ~7,8 mL oxigénnel láttuk el az inkubáció alatt, mivel a sztöchiometriai számítások alapján a kozmoszokhoz adott $4,7 \times 10^{-5}$ mol toluol aerob lebontásához (~1 mM koncentráció) $3,1 \times 10^{-4}$ mol oxigén szükséges. Ez az oxigén mennyiség az egyetemes gáztörvény szerint 25°C-on 7,5 mL oxigén gáznak felel meg. Számításaink helyességét igazolta az is, hogy a kísérlet végén az oxigén fogyása nagymértékben lelassult és a 6. napon hozzáadott mennyiség jelentős hányadát 24 órával később is ki tudtuk mutatni a mikrokozmoszokból. A dúsító tenyészetek mikrobaközösségét 16S rDNS T-RFLP módszerrel elemeztük és azt tapasztaltuk, hogy a párhuzamos mikrokozmoszok elektroferogramjai szinte tökéletesen megegyeznek. A nagymértékű hasonlóság miatt az ultracentrifugálást csak egy harmadik napi és egy hetedik napi jelölődött minta esetében végeztük el. A cézium-kloridos gradiensből a 3.13-fejezet alapján visszaizolált „nehéz” és „könnyű” DNS frakciók egyértelműen elkülöníthetőek voltak (4.13. ábra), továbbá köztes frakciókat is meg tudtunk különböztetni.



4.13 ábra A nehéz és könnyű DNS csúcsok elkülönítése a 16S rRNS gén abundanciája alapján

4.2.3 A mikrobaközösség diverzitása

A különböző frakciókból készített 16S rDNS T-RFLP mintázat egyértelmű különbségeket tárt fel a könnyű, köztes, valamint nehéz DNS mintákban. A nehéz frakciókban az uralkodó T-RF-ek 117 bp, 119 bp valamint a 475 bp hosszúságot mutattak mindkét mintavételi pont esetében. A könnyű frakcióban a 242 bp, 306 bp és a nehéz frakcióban szintén megfigyelhető 117 bp, míg a köztes frakcióban a 430 bp hosszúságú T-RF-ek voltak a dominánsak (4.14. ábra). Az amplicon pirosekvenálást mindhárom frakció esetében, mindkét mintavételi ponton, valamint a kiindulási minta esetében is elvégeztük (4.4. táblázat). A szekvenálás adatai az NCBI BioSample könyvtárban (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample>) SAMN07673532- SAMN07673540 azonosítószám alatt érhetők el.



4.14. ábra A 16S rDNS T-RFLP elektroferogramok (*RsaI* enzim) diagram alapú ábrázolása a 3-10 frakciók esetében- a pirosekvenálásra kiválasztott frakciókat a nyilak jelöli

4.4. táblázat A 16S rRNS amplikon piro szekvenálás során kapott eredmények

Filogenetikai besorolás	A piro szekvenálások során képviselt arány (%) zárójelben a szekvenciák száma						
	Kiindulási minta (5118)	3. napi DNS frakciók			7. napi DNS frakciók		
		nehéz (6869)	közepes (10302)	könnyű (7927)	nehéz (8107)	közepes (9091)	könnyű (10247)
Proteobaktériumok	86,3	99,9	99,7	88,3	99,9	99,1	90,2
Bétaproteobaktériumok	58,4	99,4	96,1	41,7	99,2	93,6	65,7
Rhodocyclaceae	45,9	95,1	56,1	26,6	79,6	55,8	39,8
ismeretlen <i>Rhodocyclaceae</i>	2,4	8,8	3,4	0,5	8	2,7	1
<i>Azoarcus</i> spp.	14,8	0,1	0,8	14,8	0,4	7,3	19
<i>Quatronicoccus</i> spp.	13,5	65,5	40,8	4,2	56,2	29,9	8,2
<i>Zoogloea</i> spp.	11,8	19,4	10,9	2,1	13,8	13,5	6,4
<i>Dechloromonas</i> spp.	0,2	0,3	0,2	0,8	0,1	0,3	0,8
<i>Sulfuritalea</i> spp.	2,1	0,0	0,1	2,5	0	0,3	2,4
<i>Ferribacterium</i> spp.	0,5	1,0	0,7	0,3	1,1	1,2	0,7
Comamonadaceae	10,9	4,2	37,9	13,7	17,7	36,6	24,4
ismeretlen <i>Comamonadaceae</i>	1,9	0,3	1,6	1,3	4,4	3	1,4
ismeretlen <i>Rhodoferax</i>	5,7	2,8	33,7	6,8	10,7	26,2	12,7
<i>Rhodoferax</i> spp.	0,4	0,8	0,8	0,8	0,2	2,5	3,3
<i>Acidovorax</i> spp.	0,5	0,2	0,4	1,5	0,5	0,8	1,4
<i>Polaromonas</i> spp.	1,7	0	0,7	2,2	0,2	2,7	2,5
<i>Simplicispira</i> spp.	0,2	0	0,5	0,4	1,6	0,6	0,8
<i>Variovorax</i> spp.	0,2	0	0	0,2	0	0,2	1,7
Gallionellaceae	0	0	1,2	0	1,5	0	0
ismeretlen <i>Gallionellaceae</i>	0	0	1,2	0	1,5	0	0
Gammaproteobaktériumok	4,6	0,3	1	9,5	0,2	1,0	6,7
<i>Aeromonas</i> spp.	0,7	0	0	4,8	0	0,2	3
<i>Pseudomonas</i> spp.	3,0	0,1	1	3,4	0,2	0,5	2,7
<i>Pseudoxanthomonas</i> spp.	0,3	0	0	0,2	0	0,1	0,3
Deltaproteobaktériumok	11,4	0,1	2,2	22,3	0,3	3,2	9,9
<i>Geobacter</i> spp.	7,7	0,1	1,5	18,5	0,2	2	7,5
<i>Desulfocapsa</i> spp.	0,9	0	0	0,6	0	0	0,4
Epsilonproteobaktériumok	10,9	0,1	0,3	13,2	0,1	0,7	6,6
<i>Arcobacter</i> spp.	7,7	0,1	0,2	2,4	0	0,5	4
<i>Sulfurospirillum</i> spp.	1,1	0	0	8,8	0	0,1	1,8
<i>Sulfuricurvum</i> spp.	1,8	0	0	1,9	0	0,1	0,7
Firmicutes	2,2	0	0	1,6	0	0	1
ismeretlen <i>Clostridiales</i>	0,5	0	0	0,7	0	0	0,5
Bacteroidetes	7	0	0,1	6,7	0,1	0,5	6,4
Egyéb	4,5	0,1	0,3	3,4	0,1	0,9	2,4

Az eredmények alapján a nehéz frakció 117 bp hosszúságú T-RF-je *Quatronicoccus* nemzetséghez köthető, míg a 119 bp és 475 bp-os fragmentek a Rhodocyclaceae család ezéddig

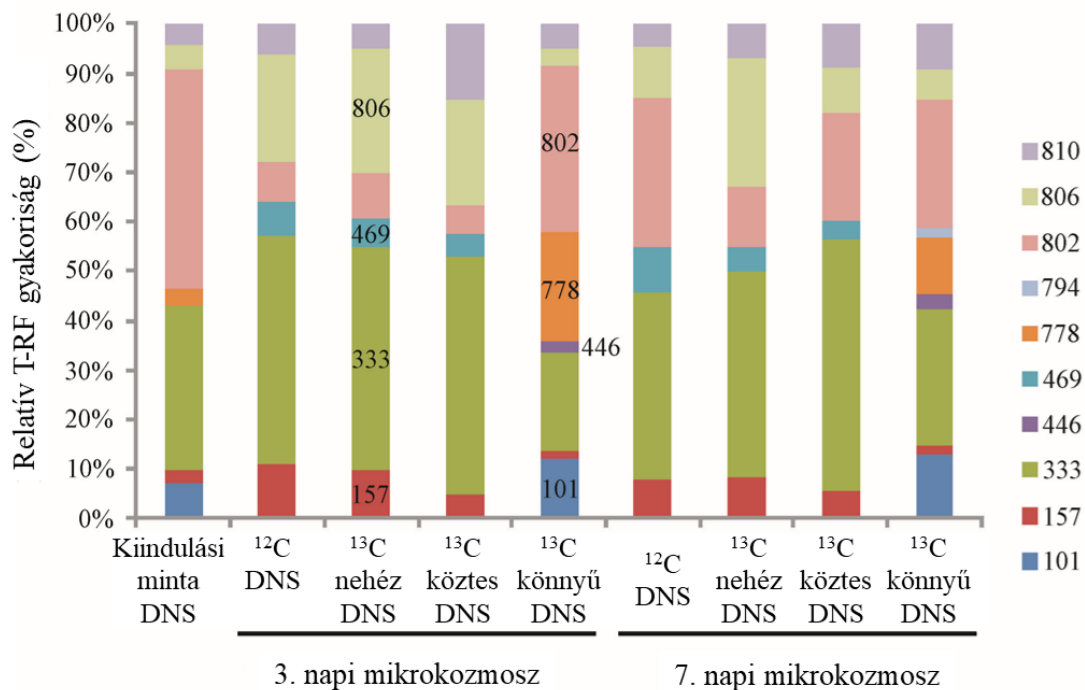
ismeretlen tagjához (*Uliginosibacterium gangwonense* 92%-os homológia), valamint *Zoogolea* fajokhoz tartoznak.

A köztes frakcióban zömében szintén Bétaproteobaktériumokhoz köthető 16S rDNS szekvenciákat figyeltünk meg, melyeknek többsége a Rhodocyclaceae családhoz tartozott, azonban itt már magas számú Comamonadaceae szekvenciát is detektáltunk. E szekvenciák döntő százalékban egy ez idáig ismeretlen általunk korábban is kimutatott *Rhodoferax* baktériumhoz köthetőek.

A könnyű frakcióban a Bétaproteobaktérium rokon mikroszervezetek aránya lecsökkent, noha még mindig a Rhodocyclaceae család dominanciája volt kimutatható, azonban ezt már nem a *Quatrionicoccus*, hanem az *Azoarcus* nemzetség tagjai okozták (117 bp hosszúságú fragmentek), míg a 242 bp és 306 bp-os T-RF-ek a *Geobacter* nemzetség és a *Bacterioidetes* törzs egyes tagjaihoz köthetőek. Az *Aeromonas* és *Pseudomonas* (Gammaproteobaktériumok), valamint az *Arcobacter* nemzetséghez és a Sulfurospirillum (Epsilonproteobaktériumok) családhoz, köthető szekvenciákat is főként e frakcióból tudtuk kimutatni.

4.2.4 Az I.2.C típusú C23O dioxigenázok kimutatása a SIP frakciókból

Annak ellenére, hogy az I.2.C típusú C23O dioxigenázok diverzitását kutatócsoportunk már több ízben is vizsgálta a siklói kárhelyen, számos genotípust még nem tudtuk ismert baktériumfajhoz kötni. Ezért a SIP vizsgálatok során T-RFLP vizsgálattal igyekeztünk feltárni e funkciógének diverzitását az egyes DNS frakciókban. A nehéz és köztes frakciók esetén a katekol dioxigenáz funkciógének mintázata nagyon hasonlóan alakult. A 333 bp és 806 bp hosszúságú fragmentek mindkét mintavételi időpontban dominánsnak mutatkoztak. A 157 bp és 469 bp hosszúságú T-RF-ek kisebb arányban voltak jelen, az utóbbi a könnyű frakcióból teljesen hiányzott. A könnyű frakcióban a 802 bp méretű volt a domináns T-RF, továbbá a 778 bp, 101 bp és 446 bp hosszúságú T-RF-eket is csak innen tudtuk kimutatni (4.15. ábra).

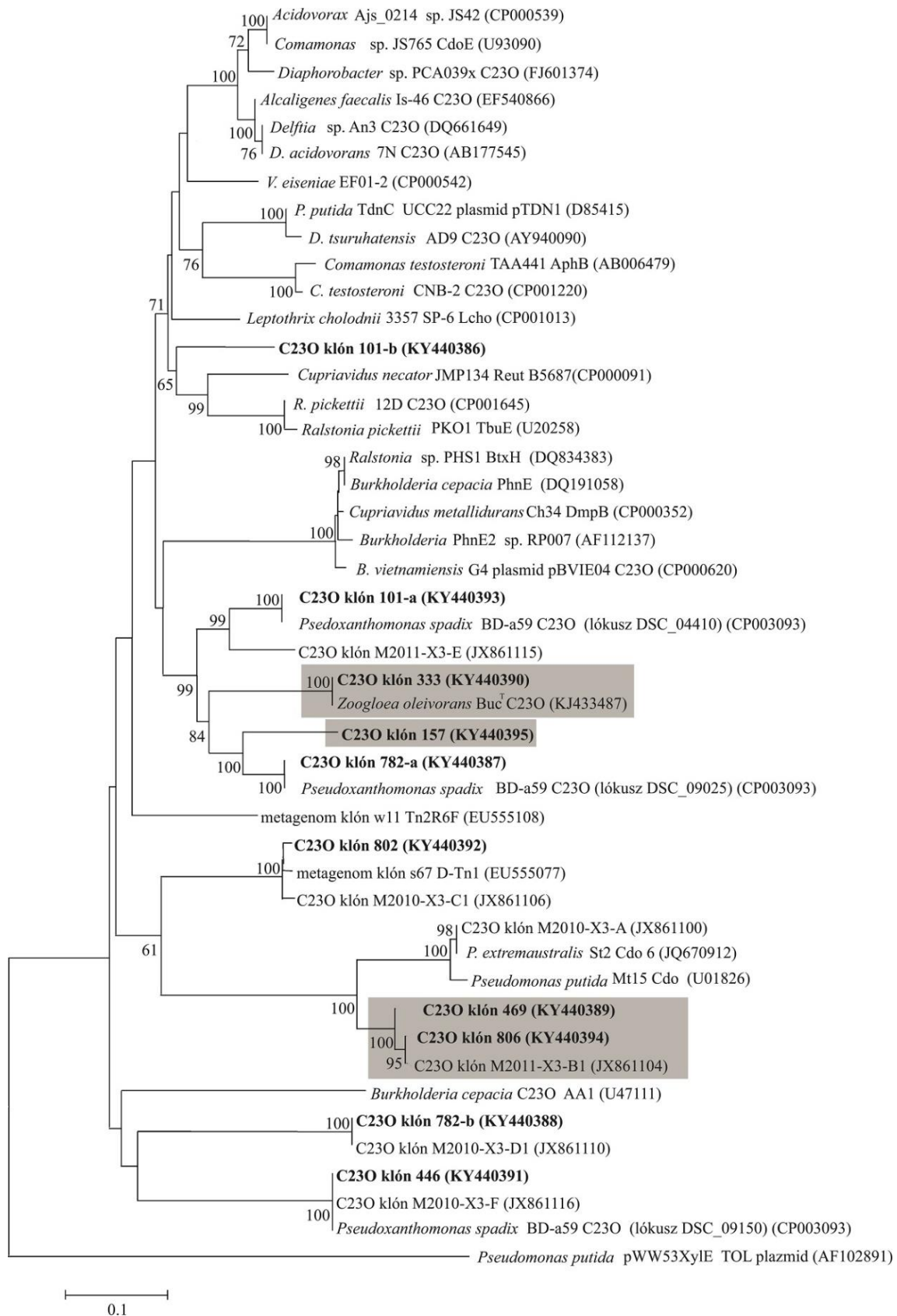


4.15. ábra Az I.2.C típusú C23O T-RFLP diagramjai az egyes frakciókban és mintavételi időpontokban

Hogy az egyes T-RF-eket azonosíthassuk klónkönyvtárakat készítettünk a kiindulási mintából, valamint a harmadik napi mintavétel könnyű és nehéz frakcióiból. A nehéz frakcióban domináns 333 bp méretű I.2 C típusú C23O fragment egyértelműen az általunk egy BTEX-vegyületekkel szennyezett kárhelyről izolált és leírt *Zoogloea oleivorans* fajhoz köthető, az új baktériumfajt a 4.4. fejezetben részletesen fogom bemutatni.

A szintén jelölődött 806 bp hosszúságú T-RF-hez tartozó szekvencia nagyon alacsony, 86%-os hasonlóságot mutatott a *Pseudomonas putida* MT15-ös törzs *cdo* génjével, valamint közel 100%-os hasonlóságot az egy éves monitoring során kimutatott B klaszter C23O génjével (4.16. ábra).

A B klaszter előző fejezet eredményei alapján valószínűleg az ezidáig ismeretlen Rhodocyclaceae családba tartozó baktériumhoz köthető. A nehéz frakcióban található további I.2.C-típusú C23O szekvenciák (157 és 469 bp hosszúságú T-RF-ek) szintén nem voltak ismert fajokhoz köthetőek. A könnyű frakcióban a 802 bp méretű domináns T-RF-hez tartozó szekvencia 99%-os homológiát mutatott egy Brennerova és munkatársai (2009) által jól leírt funkciógén típusal. A frakcióban detektált további 778 bp, 101 bp és 446 bp hosszúságú T-RF-ekhez tartozó ampikonok nagymértékben hasonlítottak a *Pseudoxanthomonas spadix* három I.2.C típusú katekol dioxigenáz szekvenciáihoz, azonban meg kell jegyeznünk, hogy a 101 bp és 778 bp méretű csúcsokat több eltérő szekvencia is eredményezte.



4.16. ábra Az I.2.C típusú C23O diverzitása a kiindulási mintában, valamint a 3 napos könnyű és nehéz frakciókban neighbor-joining módszer alapján. A jelen vizsgálatban kimutatott klónokat félkövér betűtípussal jelöltük, a neveikben az egyes T-RF hosszakat is megjelenítettük. A nehéz frakció genotípusait szürke háttérrel emeltük ki.

4.2.5 Diszkusszió

Noha a siklósi kárhely baktériumközösségét és az I.2.C alcsoportba tartozó katekol 2,3-dioxigenáz funkciógének diverzitását már több esetben is megpróbáltuk feltárni (Táncsics et al. 2012, 2013), a degradációban való részvételük még továbbra is kérdéses volt számunkra. Hogy minden kételyt kizáróan igazolhassuk az egyes funkciógének, valamint baktériumfajok aktivitását oxigénlimitált körülmények között, stabil izotópos toluol bontási kísérletet állítottunk össze. A mikrokozmoszok közösségét két időpontban vizsgálva a 16S rDNS amplikon piroszekvenálás a Rhodocyclaceae családba tartozó baktériumok dominanciáját mutatta ki a nehéz frakciókban. Elsősorban egy *Quatrionicoccus* rokon baktériumfajt azonosítottunk, mint legfőbb mikroaerob toluol lebontó mikroszervezetet (65%-a a jelölődött frakciónak). A nemzetségben egyetlen baktériumfajt találhatunk, a szigorúan aerob, Gram-negatív coccus *Q. australiensis*, melyet egy eleveniszapos szennyvíztisztító rendszerből izoláltak. Sajnos a típusörzs szénhidrogén bontó képességéről nincsenek információk, valamint a leíróktól és az általuk megjelölt törzsgyűjteményekből a faj nem beszerezhető. A szerzők által ismertett táptalajon megpróbáltuk a törzset izolálni, azonban ezidáig nem jártunk sikerrel (Maszenan 2002). A két legközelebbi nemzetség a *Ferribacterium* és a *Dechloromonas*, az utóbbiban találhatjuk a széleskörűen kutatott *Dechloromonas aromatica* mikroorganizmust, amely dioxigenáz enzim (nem I.2.C típusú) és részleteiben még nem ismert anaerob útvonalakon számos elektron akceptor (nitrát, klorát, perklorát) jelenlétében képes az aromás szénhidrogének bontására (Salinero et al. 2009).

A piroszekvenálás eredményei alapján a *Zoogloea* fajok szintén jelentős arányban (a szekvenciák 19,4%-a) voltak jelen a jelölődött frakciókban. A funkciógén klónkönyvtárak eredményei és T-RFLP mintázata alátámasztotta ezt, mivel az általunk leírt *Zoogloea*-hoz köthető I.2.C-típusú katekol 2,3-dioxigenázok jelenlétét szintén ki tudtuk mutatni a nehéz DNS frakciókból. A nemzetség tagjai elsősorban pehelyképző tulajdonságairól ismertek, mely képességét főként szennyvíztisztítási folyamatoknál használják ki. Azonban a Mohn és munkatársai által leírt (1999) *Z. resiniphila* és az általunk identifikált *Z. oleivorans* (Farkas et al. 2015) is képes egyes szénhidrogének bontására. Továbbá Jechalke és munkatársai (2013) a közelmúltban egy RNS-SIP vizsgálat során *Zoogloea* rokon baktériumfajok benzolbontó képességét mutatta ki aerob biofilmekben. Tehát kutatásunk eredményei jól alátámasztják az általunk és más kutatók által leírt megállapításokat, miszerint e baktériumok fontos szerepet játszanak az aromás szénhidrogének bontásában a felszín alatti közegekben.

Egy ezidáig ismeretlen *Rhodocyclaceae* rokon baktériumot szintén magas arányban tudtunk kimutatni a nehéz frakcióból. E faj a legközelebbi rokonságot (~93%-os 16S rDNS hasonlóság) *Uliginosibacterium gangwonense*-vel mutatta és úgy tűnik széleskörűen elterjedt a

szénhidrogénekkal szennyezett felszín alatti közegekben. A mikroorganizmus jelenlétét az egy éves monitoring időszak alatt is kimutattuk (domináns volt a 2011., májusi mintában) és statisztikai elemzéseink alapján valószínűsítettük, hogy rendelkezhet I.2.C típusú katekol 2,3-dioxigenázzal. Az, hogy ez a funkciógén genotípus (B klaszter) jelen dúsitásunk során a második legabundánsabbnak mutatkozott (806 bp) a nehéz DNS frakcióban szintén alátámasztja korábbi feltevésünket. Természetesen tiszta tenyészetek hiányában sajnos még mindig fenntartásokkal kell kezelni ezen összefüggéseket.

Az ultracentrifugálás után a könnyű és a nehéz DNS frakciók jól elkülöníthetőek voltak, azonban mindkét mintavételi időpontban egy-egy köztes frakciót is tudtunk detektálni. E frakciók elkülönülését egy a *Rhodoferrax ferrireducens*-szel 96%-os 16S rDNS homológiát mutató baktérium jelenléte okozta. A mikroorganizmust mi és mások is gyakran mutatták ki anaerob vagy oxigénlimitált szénhidrogénekkal szennyezett kárhelyekről (Callaghan et al. 2010, Táncsics et al. 2010, Táncsics et al. 2013, Larentis et al. 2013, Tischer et al. 2013). Továbbá DNS stabil izotópos kísérletek igazolták, hogy e baktérium képes a fenantrén és naftalin aerob biodegradációjára (Jeon et al. 2003, Martin et al. 2012). Annak ellenére, hogy a mikroszervezet nem jelölődött olyan mértékben, mint a korábban említett baktériumok, valószínűsíthető, hogy szerepet játszik a toluol mikroaerob lebontásában. Kaden és munkatársai (2014) alapján egyes *Rhodoferrax* fajok nagyon lassan növekednek. Továbbá azt is kimutatták, hogy a *R. ferrireducens* szemben a vele kompetitor *Geobacter* fajokkal inkább a lassabb, de energiahatékonyabb növekedést részesíti előnyben. A másik magyarázata az alacsony jelölődésnek az lehet, hogy a mikroszervezet nem a toluol, hanem az egyes metabolitok bontásában vállal szerepet.

A könnyű DNS frakciókban legfőképp a *Geobacter* és *Azoarcus* nemzetség fajaival találkoztunk, e taxonokban számos anaerob toluol lebontó mikroorganizmus ismert (Lueders és Muyzer 2017). E baktériumok inaktivitása nem volt meglepő, hiszen a kísérlet során a mikrokozmoszokhoz folyamatosan oxigént adagoltunk, hogy fenntartsuk a hipoxikus állapotot. A *Pseudomonas* fajok passzivitása azonban furcsa lehet, hiszen számos törzsükről ismert, hogy igen jó arányban képesek a szénhidrogének degradációjára, és a *P. putida* az egyik leginkább kutatott modellszervezet e témakörben (Martínez-Lavanchy et al. 2010). Másrészt a nemzetséghez köthető I.2.C típusú funkciógéneket, melyek lehetővé tették volna számukra a toluol hipoxikus lebontását, nem tudtuk kimutatni a mintákból.

Szintén meglepő módon a jelöletlen frakcióban detektáltuk a *Pseudoxanthomonas spadix* baktériumfajt és a hozzá köthető katekol dioxigenáz géneket, e mikroorganizmus genomjában három különböző I.2. C típusú C23O funkciógén is kódolt.

A könnyű DNS frakciókban leginkább domináns katekol 2,3-dioxigenáz genotípus (802 bp T-RF) a legnagyobb hasonlóságot egy Brennerova és munkatársai (2009) által kimutatott

metagenom klónnal mutatta. A kutatásuk során megállapították, hogy a funkciógén által kódolt enzim a toluol aerob degradációja során keletkező 3-metilkatekol köztitermékének bontásában játszik szerepet. Ennek ellenére az ezt a típust hordozó baktérium nem vett részt a mikrokozmoszainkban a toluol biodegradációjában. Ennek egy magyarázata lehet, hogy esetleg ezen ismeretlen baktériumok oxigénlimitált körülmények között inkább nitrátot használnak elektron akceptorként és a minimális mennyiségű oxigént csak a gyűrű hasításához használják fel (Wilson et al. 1997). Mivel a mikrokozmoszokhoz nem adtunk nitrátot és a vizsgált talajvíz alapvetően nitrátszegény volt, ezért az ilyen módon metabolizáló baktériumok inaktívak maradhattak a kísérlet alatt. Eredményeink alapján ez a genotípus a kiindulási és a könnyű DNS frakciók mintáiban volt jelentős, mely összefüggésbe hozható a szintén e mintákban hasonló abundanciát mutató *Azoarcus* fajokkal. Jelenleg is folyik az ezt a kérdést megválaszolni hivatott anaerob toluol-lebontási dúsító kísérletem.

Új tudományos eredmény az 4.2-es fejezet alapján: Stabil izotópos kísérletekkel igazoltuk, hogy az egyes *Quatrionicoccus* és *Zoogloea* nemzetségbe, valamint a korábbi eredményeink alapján is feltételezett ismeretlen, Rhodocyclaceae családba tartozó baktériumfajok részt vesznek a toluol oxigénlimitált körülmények közötti biodegradációjában. A *Quatrionicoccus* nemzetség esetében mi mutattunk rá először annak aromás szénhidrogén bontó képességére. Az eredményeink publikálása folyamatban van.

4.3 Vasredukáló mikroorganizmusok dúsítása a siklósi, BTEX-vegyületekkel szennyezett kárhelyről

Ahogy az előző fejezetekben bemutattuk, a siklósi kárhely monitoringja során a szennyezési csóvában többek között egy, a *Rhodoferax* nemzetséghez köthető, feltehetően fakultatív anaerob baktérium változó dominanciáját tudtuk kimutatni. A hosszútávú monitoring során végzett statisztikai elemzések alapján e mikroszervezet szerepet játszhat a BTEX-vegyületek lebontásában (Táncsics et al. 2013), azonban a stabil izotópos kísérlet eredményei nem feltétlenül támasztják alá ezt a lehetőséget. Ezen felül a folyamatos monitoring tevékenység során 2013-tól a területen a *Geobacter* nemzetség jelenlétét is detektáltuk. Az utóbbi nemzetség tagjai jól ismertek urán(VI) és vas(III)-redukáló képességükről (Shelobolina et al. 2008) illetve arról, hogy szerves vegyületek oxidálása során grafit elektródot is tudnak elektron akceptorként hasznosítani (Bond et al. 2002, Bond és Lovley 2003). Jelenlegi ismereteink szerint a nemzetség tagjai jelentős szerepet tölthetnek be a monoaromás szénhidrogének biodegradációjában vasredukáló körülmények között (Kunapuli 2010). Lényegesen kevesebbet tudunk a hasonló

környezeti feltételek mellett szintén sokszor kimutatható *Rhodoferax*-rokon fajok ökológiai szerepéről. Ez részben annak is köszönhető, hogy a genusz mindössze négy valid fajt hordoz magában (Kaden et al. 2014). E mikroorganizmusok tulajdonságai meglehetősen változatosak, megtalálunk köztük fototrófokat, anaerob fermentálókat, aerob kemoorganotrófokat és vasredukáló baktériumokat egyaránt. Urániummal és/vagy szénhidrogénnel szennyezett felszín alatti közegekben a *Rhodoferax ferrireducens* és *Rhodoferax antarcticus* fajok vagy azokkal közel rokon klónszekvenciák jelenléte gyakori (Alfreider és Vogt 2007). Mi alapvetően az ismeretlen mikroorganizmus vasredukáló képességét feltételeztük és a doktori kutatómunkám e részében kísérletet tettünk arra, hogy a *Geobacter* nemzetség tagjaival egyetemben szelektív mikrokozmosz kísérletekkel feldúsítsuk e baktériumokat a kárhely mikrobaközösségéből.

4.3.1 A mikrokozmosz kísérlet körülményei

A kiindulási talajvíz mintát a már előzőekben bemutatott siklói terület ST2-es kútjából vettük, mely a szennyezési csóva középpontjában helyezkedik el. A talajvíz mintákat steril 1 literes szérumüvegekbe (Glasgeratebau Ochs) töltöttük gáztér nélkül, hogy elkerüljük az oxigénszint növekedését. Az üvegeket butilgumi dugóval és fémggyűrűkkel hermetikusan lezártuk és sötétben 15°C-on 2 hétig inkubáltuk, hogy a nitrát fogyását elősegítsük a dúsító tenyészetek elkészítése előtt.

Mivel az elsődleges cél a *Rhodoferax* nemzetség egyes fajainak feldúsítása volt, ezért alapvetően a bíbor nemkén baktériumok izolálására használt szakmai útmutatásokat próbáltuk követni. A dúsító tenyészetekhez Fahy és munkatársai (2006) által kidolgozott minimál ásványi tápoldatot alkalmaztunk kisebb módosításokkal. A tápoldathoz szénforrásként sterilre szűrt acetátot adtunk. Madigan és munkatársai (2000) azt tapasztalták, hogy kis mennyiségű élesztő jelenléte serkentheti egyes *Rhodoferax* fajok felszaporodását, ezért alapesetben ezt és fix nitrogén forrást (NH_4^+) is tartalmazott a tápoldatunk. Továbbá a magnézium forrást MgSO_4 helyett MgCl_2 hozzáadásával biztosítottuk, hogy elkerüljük a szulfátredukáló baktériumok esetleges feldúsulását. Mivel a *R. ferrireducens*nek és *R. antarcticus*nak is szüksége van tiaminra (B_1 vitamin) valamint biotinra (B_7 vitamin) a megfelelő növekedéshez (Finneran et al. 2003, Madigan et al. 2000), 1 mg/l tiamint és 15 $\mu\text{g/l}$ biotint továbbá 20 $\mu\text{g/l}$ B_{12} vitamint is adtunk a dúsító tenyészetekhez.

A fentieknek megfelelően négy különböző foszfát puffer alapú tápoldatot állítottunk össze eltérő nitrogénforrással. A táplevesek összetétele a következő volt: I. típusúban 0,05% (w/v) élesztőkivonatot és NH_4Cl -ot (1 g/L) alkalmaztunk; a II. típusúban kizárólag élesztőkivonatot; a III. típusúban kizárólag NH_4Cl -ot, míg a IV. típusúból hiányzott mind az élesztőkivonatot mind a fix nitrogén forma. A tápoldatok alapjait képző oldatokat 121°C-on, 15 percen át autoklávban

sterileztük. Ezt követően szűrve adtuk a B₁, B₁₂ vitaminokat, a biotint és az ásványi anyag komplexet a tápoldatokhoz (a táptalaj pontos összetételét a 8.3.2 számú mellékletben részletezem).



4.17. ábra A négy különböző dúsítótenyészet egy héttel a beoltás után. A zöld szín megjelenése minden esetben vas(III)-redukcióra utal.

A tápoldatokat 100 ml-es szérumbüvegekbe, 50 ml-enként szétosztottuk, majd butil-gumidugóval és alumínium zárókupakkal légmentesen lezártuk. Az anaerob környezetet az oxigén 8-10 perces nitrogéngázzal való kihajtásával teremtettük meg. Az így előkészített mikrokozmoszokba oltottunk 1-1 ml-t a talajvízből, majd 5 mM Fe(III)NTA (nitrilo-trieetsav-vas(III)) komplexet adtunk hozzá, biztosítva a szükséges elektron akceptor megfelelő koncentrációját. Ezután egyhetes, 16°C-on történő rázásmentes inkubáció következett, mely alatt a vasredukáló baktériumok felszaporodhattak. A dúsító tenyészeteket öt héten keresztül hetente átoltottuk, a baktériumokkal teli tápoldatokat minden esetben lecentrifugáltuk és DNS-t izoláltunk belőlük. A dúsító tenyészetek mikrobaközösségének heti dinamikáját T-RFLP módszerrel, *FspBI* enzim segítségével (C↓TAG) követtük nyomon. A kiindulási minta, valamint az ötödik heti dúsító tenyészetek bakterilális diverzitását 16S rRNS klónkönyvtárakkal (~50-50 klón) tártuk fel. Hogy az egyes baktériumcsoportok jelenléte és a tápoldatok összetétele közötti összefüggéseket megismerjük kanonikus korrelációelemzést végeztünk.

Korábbi eredményeink alapján a feldúsítani kívánt *Rhodofera* rokon mikroszervezetek rendelkezhetnek I.2.C-típusú katekol 2,3-dioxigenáz (C23O) funkciógénekkal. A szintén vasredukáló *Geobacter* nemzetség egyes fajai hordozhatnak benzil szukcinát szintáz (bss) funkciógént (Kunapuli et al. 2010). E funkciógének jelenlétét a 3.11-es fejezetben ismertetett módszerrel detektáltuk. Hogy pontosabb képet kapjunk a kiindulási minta mikrobaközösségéről, azt Ion Torrent PGM platformon (Life Technologies) történő shotgun metagenom szekvenálás segítségével is vizsgáltuk. A metagenom analízis során 221267 db, átlagosan 203 nukleotid

hosszúságú DNS szekvencia elemzését végeztük el. A szekvenciák az az MG-RAST szerveren kérésre elérhetőek. A 16S rRNS gének szekvenciáit a KT728574 - KT728623, KT728624 - KT728675 és KT808885 - KT809025, míg a funkciógén szekvenciákat a KT948693 - KT948708 azonosítószám alatt deponáltuk a GenBank adatbázisban.

4.3.2 A kiindulási minta bakteriális diverzitása

Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a kiindulási minta igen diverz képet mutatott.

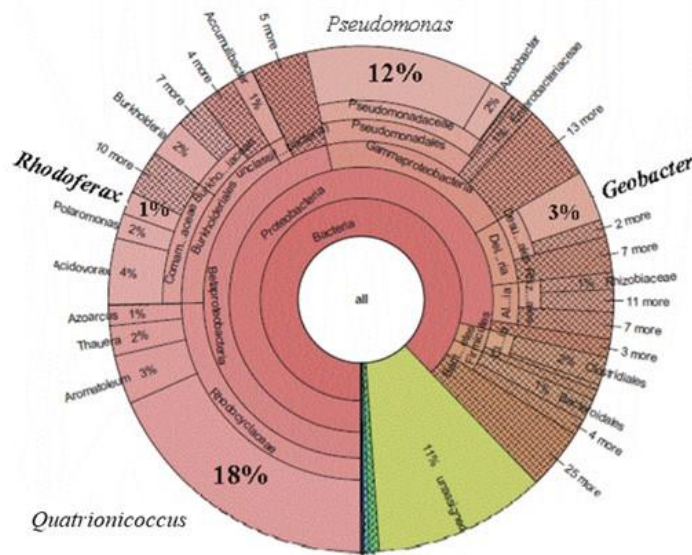
A mikrobaközösséget a Bétaproteobaktériumok dominálták (47%), őket követték a Gammaproteobaktériumok (20%), Deltaproteobaktériumok (7%), Alfaproteobaktériumok (4%), Clostridiák (2%) és végül a Bacteroidiák (1%).

A legnagyobb számban a *Dechloromonas* (18%) nemzetség

képviselői voltak jelen, ezt követték a *Pseudomonas* (12%), *Acidovorax* (4%), *Geobacter* (3%), "*Aromatoleum*" (3%), *Burkholderia* (2%), *Thauera* (2%), *Polaromonas* (2%), *Azotobacter* (2%), *Rhodoferax* (1%) és az *Azoarcus* (1%) nemzetségek képviselői (4.18. ábra).

A metagenomikai vizsgálat során nemzetség szinten természetesen nem sikerült minden csoportot azonosítani, a szekvenciák 11%-a ismeretlen eredetűnek adódott. Az eredeti talajvízmintából készített klónkönyvtár eredményei összehasonlítva a metagenom analízissel, mivel a klónok többsége a Bétaproteobaktériumok osztályába (69%) tartozott, azon belül pedig legfőként a Rhodocyclaceae és a Comamonadaceae családokba (4.5. táblázat). Ugyanakkor a legtöbb klónt a *Quatrionicoccus* nemzetségből tudtuk kimutatni, ellenben a metagenom elemzés során tapasztalt *Dechloromonas*-szal. Ez az ellentmondás azzal magyarázható, hogy ezek a nemzetségek nagyon közeli rokonságban állnak a Rhodocyclaceae családon belül, így a Sanger-féle szekvenálás során kapott hosszabb szekvenciák alapján pontosabb képet kaphattunk a taxonómiai hovatartozásról.

Hasonlóan a metagenom adatokhoz, a klónkönyvtárban is kimutattuk az általunk feldúsítani kívánt *Geobacter* és *Rhodoferax*, továbbá a *Pseudomonas*, "*Aromatoleum*" / *Azoarcus* és *Acidovorax* nemzetségek jelenlétét.



4.18. ábra A kiindulási minta metagenom analízise 221267 db, átlagosan 203 nukleotid hosszúságú DNS szekvencia alapján

4.5. táblázat Az egyes klónok gyakorisága, filogenetikai besorolása, valamint *FspBI* enzimmel végzett emésztés során kapott T-RF hosszak

Filogenetikai besorolás	Klónkönyvtárakban képviselt arány (%)					T-RF hossz (bp)	
	Kiindulási minta	Dúsító tenyészetek				becsült	mért
		I.	II.	III.	IV.		
Bétaproteobaktériumok	66	11	7	2	2		
<i>Quatrionicoccus</i> spp.	42	0	0	0	0	235	237
<i>Azoarcus</i> spp.	8	11	7	2	2	235	232/236
<i>Rhodoferax</i> spp.	4	0	0	0	0	239	239
<i>Acidovorax</i> spp.	10	0	0	0	0	520	520
<i>Brachymonas</i> spp.	2	0	0	0	0	524	525
Gamma proteobaktériumok	16	46	48	31	13		
<i>Citrobacter</i> spp.	0	42	46	0	0	241	240/241
<i>Pseudomonas</i> spp.	16	4	2	31	13	111	111
Delta proteobaktériumok	6	10	0	67	85		
<i>Geobacter</i> spp.	4	10	0	67	85	85/122/ 252	85/122/ 254
<i>Desulfobulbus</i> spp.	2	0	0	0	0	274	275
Negativicutes	4	0	0	0	0		
<i>Veillonellaceae</i> spp.	4	0	0	0	0	237	237
Bacilli	2	0	0	0	0		
<i>Bacillus</i> spp.	2	0	0	0	0	257	258
Clostridia	0	10	37	0	0		
<i>Clostridium</i> spp.	0	10	37	0	0	185/236	185/236
Cytophagia	2	0	0	0	0		
<i>Meniscus</i> spp.	2	0	29	0	0	29	NM
Bacteroidia	0	23	4	0	0		
<i>Bacteroides</i> spp.	0	21	2	0	0	29	NM
<i>Sunxiuqinia</i> spp.	0	2	2	0	0	29	NM
Synergistia	0	0	2	0	0		
<i>Cloacibacillus</i> spp.	0	0	2	0	0	94	94
Egyéb	4	0	2	0	0	-	

NM - nem meghatározott

4.3.3 A dúsítást követő mikrobiális diverzitás

A 16S rDNS T-RFLP analízis és a klónkönyvtárak eredményei megmutatták, hogy a fent részletezett kiindulási bakteriális közösség számottevően megváltozott a dúsítások hatására (4.5. táblázat). Az öt egymást követő átoltás során, a fakultatív anaerob nitrátredukáló baktériumok jelentős csökkenését figyelhetjük meg. A kiindulási mintában domináns *Quatrionicoccus* nemzetséghez köthető 237 bp-os T-RF teljesen eltűnt a dúsítások végére. Az *Azoarcus*

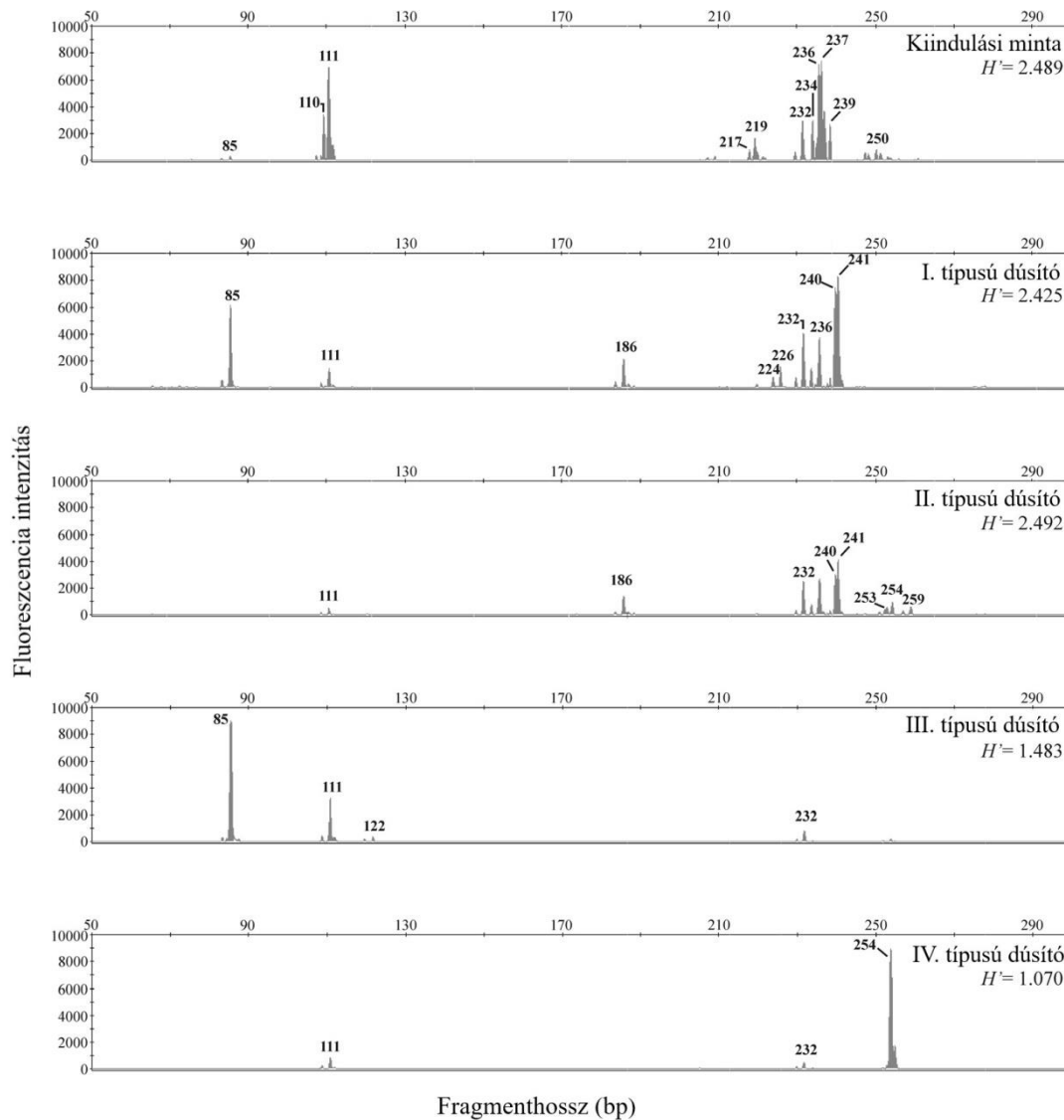
nemzetség egyes tagjainak (236 bp-os T-RF) gyakorisága szintén csökkent az I. és a II. típusú dúsítás esetében, míg a III. és a IV. típusú dúsításban e fajok teljesen eltűntek. A 111 bp-os *Pseudomonas*-okhoz köthető T-RF kisebb mértékben, de továbbra is minden esetben kimutatható maradt.

A T-RFLP elektroferogramok alapján, a I. és II. típusú dúsítások nagyon hasonló összetételű közösséget mutattak (4.19. ábra). Ezekben a *Citrobacter* (240-241 bp T-RF) és *Clostridium* (186 és 236 bp T-RF) nemzetségek tagjai voltak nagy mennyiségben jelen. A kanonikus korrelációelemzés szerint (4.20. ábra) e fajok feldúsulása elsősorban az élesztő jelenlététől függ. Bár a *Citrobacter* fajok elsősorban fermentáló baktériumok, egyes törzsek képesek Fe(III)- vagy perklorát redukciójára (Bardiya és Bae 2004, Liu et al. 2016). A legtöbb *Clostridium* rokon klónszekvencia a *Clostridium tunisiens*-hoz hasonlított 96,2%-ban. Ez az obligát anaerob baktérium képes az acetátot kizárólagos szén- és energiaforrásként használni, miközben az elemi ként redukálja (Thabet et al. 2004). Sajnos, a Fe(III)-redukáló képességét eddig még nem vizsgálták.

A legfontosabb különbség a két típusú dúsítás bakteriális közössége közt az, hogy míg a 85 bp-os T-RF domináns volt az I. típusú dúsításban, a II. típusúból teljesen hiányzott. A 16S klónkönyvtárak alapján ez a T-RF a *Geobacter* nemzetséghez köthető. A klón a III. típusú dúsításban szintén domináns volt és a legközelebbi rokona a *G. lovleyi*, amellyel csupán 95% szekvencia hasonlóságot mutat. Érdekes módon, egy másik, 122 bp hosszú T-RF a III. típusú dúsítóból szintén egy *Geobacterrel* rokon szekvenciát mutat. A klónok a *G. metallireducens*-re hasonlítanak a legjobban, de az egyezés csak 96,3%-os.

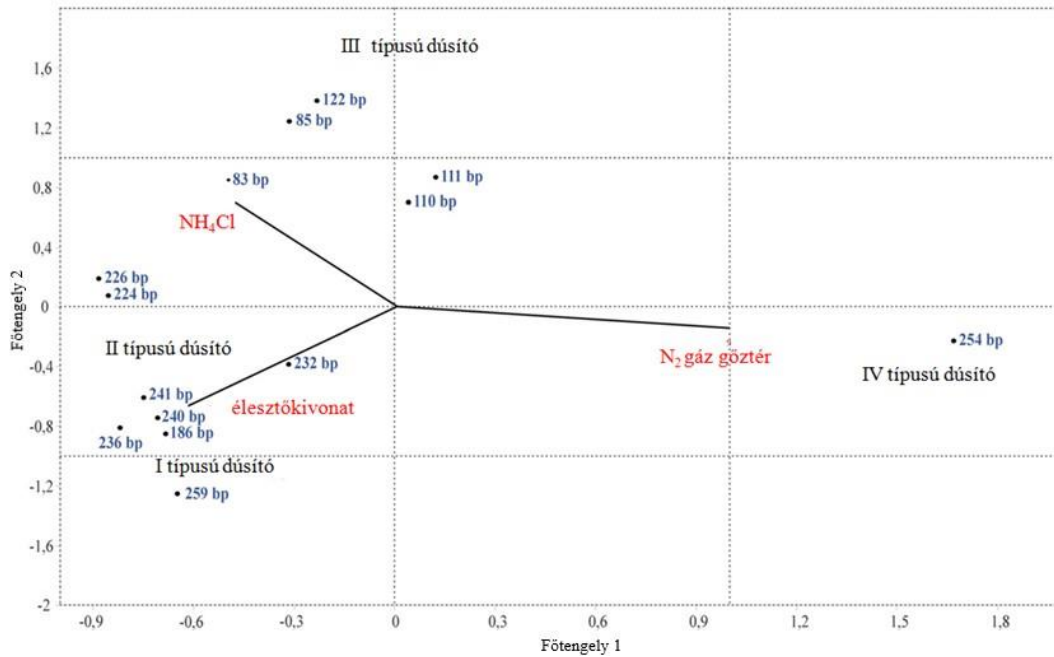
A III. típusú dúsítás a *Geobacter*-rokon baktériumok túlsúlya, és a *Citrobacter*- vagy *Clostridium*-szerű klónok teljes hiánya miatt a CCA diagramon teljesen elszeparálva jelenik meg (4.20. ábra). A *Geobacter* nemzetség dominanciája feltételezhetően a fix nitrogén (ammónium-klorid) forrásnak volt köszönhető.

A IV-es típusú dúsítás esetében csak egyetlen domináns T-RF volt megfigyelhető (254 bp T-RF) (4.19. ábra). A 16S klónkönyvtár elemzésével kiderült, hogy ez a T-RF is a *Geobacter* nemzetséghez köthető. A legközelebbi rokona a *G. luticola*, mely a 16S rDNS szekvenciában 97,5% hasonlóságot mutat. Ennek a baktériumnak a feldúsulása a nitrogénköti körülményekhez köthető, mivel a IV. típusú dúsításban csak a gáznemű N₂ volt az egyetlen nitrogénforrás.



4.19. ábra A kiindulási és a dúsító tenyészetek 16S rDNS T-RFLP elektroferogramjai *FspBI* enzimmel történt emésztés eredményeként, H' : a Shannon diverzitás index értéke

A *Geobacter* fajokról ismert, hogy ammónium hiányában általában képesek a nitrogénfixációra (Zhuang et al. 2011). Elemezve a rendelkezésre álló genom szekvenciákat nyilvánvalóvá vált, hogy a nitrogénáz gének széles körben elterjedtek a *Geobacter* fajokban. Azonban a nitrogénáz gének jelenléte nem szükségszerűen igaz minden *Geobacter*-re, például a *Geobacter soli* GSS01^T nemrégiben feltárt genomszekvenciája (Yang et al. 2015) is híján van az adott funkciógénnek. Ezért a *Geobacter* fajok differenciális dúsítására az egyik lehetséges magyarázat az, hogy az I. és III. típusú dúsításban domináns *Geobacter* baktérium nem volt képes megkötni a nitrogént. Másrészt ez még mindig nem magyarázat arra, hogy a IV. típusú dúsításban túlsúlyban lévő *Geobacter* baktérium miért hiányzott az ammónium kloridos dúsításokból.



4.20. ábra A 16S rDNS T-RFLP adatok kanonikus korrelációanalízise az egyes dúsító tenyészetekben

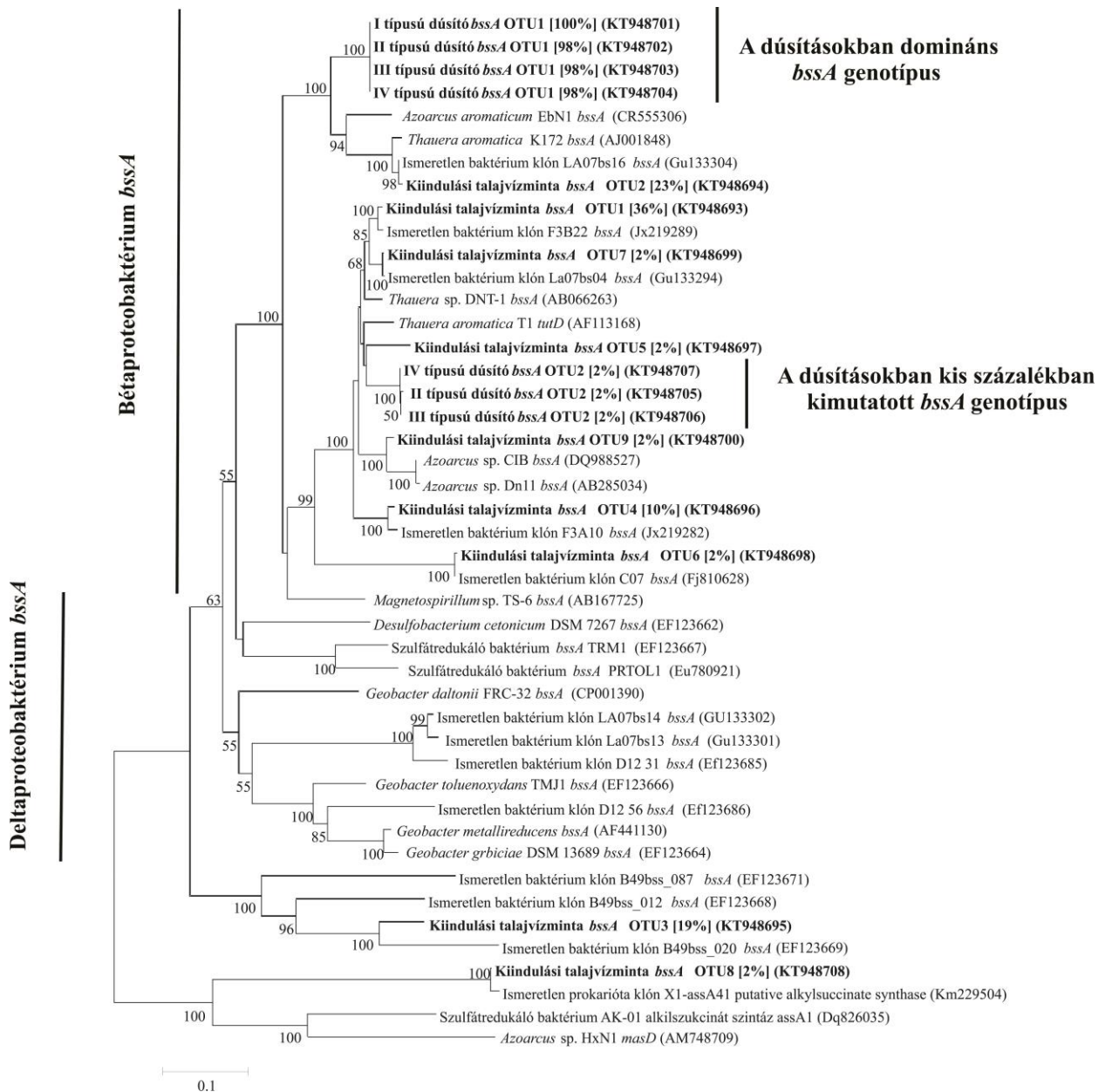
Köztudott ugyanakkor, hogy a legkisebb környezeti változtatások is különböző szervezetek dominanciájához vezethetnek (Zhuang et al. 2011). Nemrégén a „subsurface 1”-es kládba tartozó *Geobacter bemidjensis* genom szekvenciáját összehasonlították más, nem „subsurface 1” kládba tartozó *Geobacter*-ekével és nagymértékű metabolikus, valamint fiziológiai eltéréseket találtak (Aklujkar et al. 2010). A kutatásunk eredményei közelebbi rokonok esetében is feltételezik az esetleges nagyfokú különbségeket.

Elemezve a négy dúsítás baktérium közösségeit sajnos nyilvánvalóvá vált, hogy az alkalmazott dúsítási feltételek nem voltak alkalmasak arra, hogy a *Rhodoferrax*-szal rokon baktériumokat feldúsítsuk.

Meg kell jegyeznünk, hogy a *Pseudomonas* nemzetség tagjai (111-bp T-RF a elektroferogramokon), továbbá valószínűleg egy ismeretlen *Azoarcus*-okkal távoli rokon baktérium (232 bp hosszúságú T-RF) minden esetben kimutatható volt a dúsításokban.

4.3.4 A I.2.C típusú C230 és *bssA* gének detektálása és diverzitása

Az I.2.C-típusú C230 alcsaládot, bár a kiindulási mintában jelen volt, egyik féle dúsításból sem tudtuk kimutatni. Azonban *bssA* géneket mind a kiindulási, mind a dúsító tenyészetekben detektáltuk. A legnagyobb *bssA* gén diverzitás a kiindulási talajvíz mintában volt megfigyelhető. A *bssA* szekvenciákat a klónkönyvtárak alapján kilenc OTU-ba (Operation Taxonomic Unit) – operatív rendszertani egységbe lehetett sorolni (4.21. ábra), és legtöbbjük Bétaproteobaktérium eredetű génekkel mutatott rokonságot.



4.21. ábra A dúsításokból és a kiindulási mintákból kimutatott *bssA* funkciógének diverzitását és rokonsági körét bemutató neighbor-joining módszerrel készült filogenetikai fa, az egyes OTU-k abundanciáját a zárójelben tüntettük fel.

Egyértelműen a *Geobacter*-ekhez köthető *bssA* géneket nem lehetett kimutatni a kiindulási minta klónkönyvtárából. Meglepő módon a 3-as OTU-ba tartozó szekvenciák (19%-a a klónoknak) nagyon alacsony hasonlóságot mutattak az eddig ismert szekvenciákkal. A legközelebbi rokont egy környezeti mintából származó klón ("Testfeld süd", Németország, 83.3% hasonlóság) jelentette.

A dúsított tenyészetekben jelentősen csökkent a *bssA* diverzitása a kezdeti talajvíz mintához képest. Mi több, a tenyészetekből detektált *bssA* szekvenciák nem egyeztek meg egyik kiindulási mintában lévő egyik szekvencia típusával sem. Az összes típusú dúsításban ugyanaz a *bssA* genotípus volt domináns, és egy környezeti klónnal ("Testfeld Süd", Németországi

szénhidrogénekkal szennyezett kárhely) mutatta a legnagyobb, 89,1%-os szekvencia-hasonlóságot, továbbá 88,7%-ban egyezett az "*Aromatoleum aromaticum*" EbN1 funkciógénjével.

A 16S rDNS adatokból valamit a funkciógén klónkönyvtárak eredményeiből arra következtethetünk, hogy az összes dúsításban jelenleg még ismeretlen, valószínűleg Fe(III)-redukáló, az *Azoarcus*-szal távoli rokonságban álló, *bssA* gént hordozó baktériumok voltak jelen. Bár a *Geobacter* fajok domináltak az I., III. és IV. típusú dúsításokban, a *Geobacter* nemzetséghez köthető *bssA* géneket ezekből a baktérium közösségekből sem tudtunk kimutatni.

4.3.5 Diskusszió

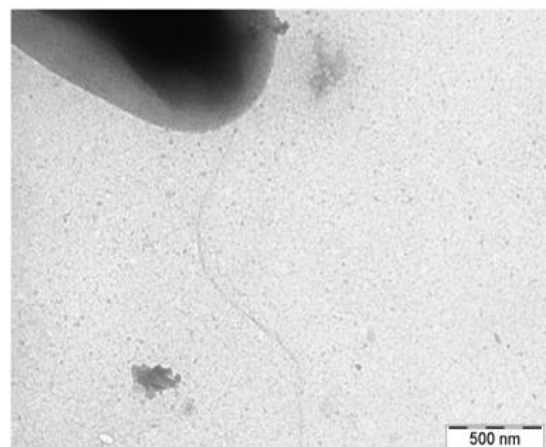
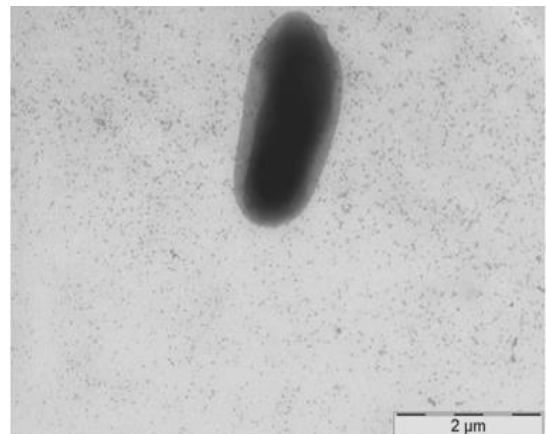
A siklósi kárhelyen végzett metagenom analízis során a szennyezési csóva mikrobaközösségében jelentős *Geobacter* és *Rhodofera* populációt figyeltünk meg. A kiindulási mintákban ezentúl a benzil szukcinát szintáz funkciógének nagy diverzitását is kimutattuk. A *bssA* szekvenciák döntő hányada a Bétaproteobaktériumokhoz volt köthető, míg meglepő módon a Deltaproteobaktérium (*Geobacter*) eredetű klaszterek hiányoztak. Noha a négy különböző dúsító tenyészet egyikében sem sikerült a *Rhodofera*-rokon és más I.2.C-típusú C23O funkciógénnel rendelkező mikroorganizmusok felszaporítása, három esetben *Geobacter* nemzetség tagjai váltak dominánssá. Sőt, a különböző nitrogénforrások más-más *Geobacter*-filotípusok felszaporodását eredményezték, azonban továbbra is csak Bétaproteobaktériumokhoz, feltehetően az *Azoarcus*-okkal távoli rokonságban álló baktériumokhoz köthető *bssA* szekvenciákat azonosítottunk mindegyik tenyészetben. Ezen eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a siklósi kárhely *Geobacter* populációja nem játszik szignifikáns szerepet a toluol anaerob biodegradációjában.

Új tudományos eredmény az 4.3-as fejezet alapján: Sikerült olyan dúsítási körülményeket létrehozunk, melyek alkalmasak voltak az általunk vizsgált közegből különböző *Geobacter* fajok feldúsítására. Igazoltuk, hogy a *Geobacter* populáció nem játszik szignifikáns szerepet a siklósi kárhelyen a toluol anaerob biodegradációjában.

Eredményeinket a nemzetközi *Folia Microbiologica* folyóiratban adtuk közre (Farkas et al. 2017).

4.4 Az új baktériumfaj -*Zoogloea oleivorans* sp. nov.- leírásának bemutatása

A doktori munkám során a kísérleti mintákból és egyéb kárhelyekről is folyamatosan próbáltunk olyan baktériumtörzseket izolálni, amelyek rendelkeznek a BTEX-vegyületek hipoxikus bontásáért felelős enzimekkel. Egy esetben sikerült egy ezidáig ismeretlen *Zoogloea* nemzetségbe tartozó baktériumfajt izolálnunk, mely rendelkezik a I.2.C alcsaládba tartozó katekol 2,3 dioxigenáz enzim típussal. A *Zoogloea* nemzetség tagjait elsősorban szennyvíztisztítók eleveniszapjából izolálták. Pehelyképző tulajdonságainak köszönhetően szennyvízkezelés során szemcsés szerkezetű üledéket képeznek, ez a sajátság előnyös a fonalas szerkezetet kialakító baktériumokkal szemben (Shao et al. 2009, Weissbrodt et al. 2013, Zhao et al. 2013). A sejt aggregátumok kocsonyás állagú, úgynevezett zoogloea mátrixba ágyazottak (Dugan et al. 1992), ami jó alapját képezi a mikrobiális biofilm kialakulásának. Ez idáig a *Zoogloea* nemzetségen belül négy fajt írtak le: a *Zoogloea caeni*-t (Shao et al. 2009), a *Zoogloea ramigera*-t (Crabtree és McCoy 1967), *Zoogloea resiniphila*-t (Mohn et al. 1999) és a *Zoogloea oryzae*-t (Xie és Yokota, 2006). A szennyvíztisztítási folyamatokon túl a mikrobiális biofilmek kulcsszerepet játszhatnak a szennyezett területek bioremediációjában (Pastorella et al. 2012), így nem meglepő, hogy a *Zoogloea* genusszal közeli rokon mikroszervezetek körében a közelmúltban benzolbontó fajokat is kimutattak (Jechalke et al. 2013). Az új fajt is egy a szénhidrogén szennyezést eltávolító biofilteren kialakult biofilmből izoláltuk. A biofilmből hígítási sorokat készítettünk 0.9 % (w/v) sóoldattal, majd a hígítási tagokból 100-100 µl-ert R2A agar lemezekre szélesztettünk (DSM medium No. 830, lásd 3.15-ös fejezet). Öt napig tartó, 28 °C-on történő inkubációt követően a különböző morfológiájú telepeket izoláltuk és azokat újabb 5 napig inkubáltuk. Az izolátumok közül az egyik baktériumtörzs alacsony 16S rDNS hasonlóságot mutatott a legközelebbi *Zoogloea* rokon fajokkal, ezért esetében elvégeztük az új faj leírásához szükséges vizsgálatokat.



4.22. ábra A *Buc^T* törzs elektronmikroszkópos képe. A képeken jól megfigyelhető a sejteket körülvevő, kevésbé elektrondenz vastag tok, valamint a poláris flagellum.

A „Buc” laborjelzésű törzs 5 és 35 °C, valamint 6 és 9 pH között mutatott növekedést, a tenyészhőmérséklet optimumát 25-30 °C között, pH optimumát 6,5-7,5 pH között határoztuk meg. Az R2A agaron a telepek a törzs által termelt zoogloea mátrixnak köszönhetően néhány nap alatt viaszos állagot vettek fel, tápoldatban pedig szabad szemmel is látható pelyhek képződtek. A 1,2-1,4 µm széles és 2,5-3 µm hosszú, pálca alakú sejteket vastag tok veszi körül. A sejtek Gram-negatívan festődnek és aktív helyváltoztatásra képesek, amihez poláris flagellummal rendelkeznek (4.22. ábra).

A törzs a nitrátot nitritté redukálja, de nitrogén gáz képződése nem volt kimutatható. Anaerob növekedést az R2A tápoldatokban (részletes leírás a 4.15.3. pontban) 7 napos 28 °C-on történő inkubáció alatt csak nitrát jelenlétében figyeltünk meg. Az acetátot és a legtöbb szénhidrátot (API 20 NE, API 50 CH) a törzs nem tudja egyedüli szénforrásként hasznosítani.

4.6. táblázat *Zoogloea* nemzetségre jellemző egyes fenotípusos jellegek. 1, Buc^T (saját adatok); 2, *Z. caeni* EMB43^T (saját adatok, valamint a G+C% Shao et al. 2009); 3, *Z. resiniphila* DhA-35^T (Mohn et al., 1999; Shao et al., 2009); 4, *Z. oryzae* A-7^T (Xie és Yokota, 2006); 5, *Z. ramigera* ATCC 19544^T (Unz, 1984; Xie és Yokota, 2006).

	<i>Z. oleivorans</i> Buc ^T	<i>Z. caeni</i> EMB43 ^T	<i>Z. resiniphila</i> DhA-35 ^T	<i>Z. oryzae</i> A-7 ^T	<i>Z. ramigera</i> ATCC 19544 ^T
Sejt átmérő µm	1.2-1.4	0.6-0.9	0.5-0.7	1.0	1.0-1.2
Telepek színe	szürkésfehér	sárgásfehér	fehér	színtelen	szürkésfehér
37°C-on való növekedés	-	+	+	+	+
45°C-on való növekedés	-	-	+	-	-
N ₂ történő denitrifikáció	-	+	-	+	+
Kataláz	+	+	-	+	+
Ureáz	gyenge +	-	-	+	+
Denitrifikáció	+	+	-	+	+
Zselatin hidrolízise	-	-	+	-	+
Kazein hidrolízise	-	-	+	-	+
Acetát hasznosítás	-	+	+	-	+
Citrát hasznosítás	-	-	-	-	+
Glükóz hasznosítás	-	-	+	-	-
Mannitol hasznosítás	-	-	+	-	+
G+C (mol%)	63.2	64.9	n.i.	65.1	65.3

A *Zoogloea* nemzetségre jellemző egyes fenotípusos jellegeket az 4.6. táblázatban foglaltuk össze. Annak ellenére, hogy a Buc^T jelzésű törzs és a *Z. oryzae* A-7^T sok metabolikus hasonlóságot mutat, hőmérsékleti optimumukban, telepmorfológiájukban különböznek, továbbá az *Z. oryzae* a nitrát nitrogén gázzá történő redukciójára is képes (4.6 táblázat).

Az új faj nitrogénfixációs képességét a *nifH* gén molekuláris biológiai vizsgálatával mutattuk ki. A PCR során a PolF, 5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3' forward és PolR, 5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3' reverse primereket alkalmaztuk (Poly et al., 2001), pozitív kontrollként a *Z. caeni* EMB43^T törzsből izolált DNS-t használtuk. Mindkét esetben a várt 340 bp hosszúságú PCR terméket detektáltuk.

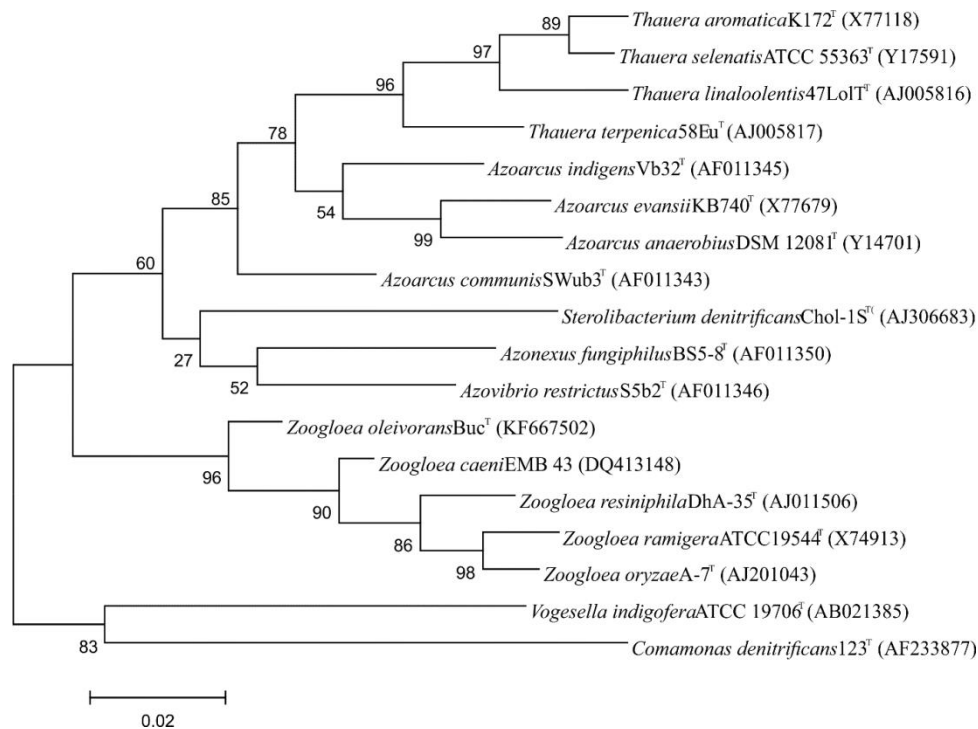
Mivel az új fajt szénhidrogénekkal szennyezett kárhelyről izoláltuk kíváncsiak voltunk annak biodegradációs képességére. A Buc^T és a *Z. caeni* EMB43^T törzsek szénhidrogén bontó képességét OIR III tápoldattal (lásd 3.15.7 fejezet) vizsgáltuk. A méréseket háromszoros ismétlésben végeztük. A 120 órás rázatás során a Buc^T törzs a kőolaj-gázolaj keverék 18.6±1.6%-át volt képes bontani a vizsgált idő alatt, míg a közeli rokon *Z. caeni* EMB43^T törzsnél nem figyeltünk meg degradációs képességet.

Ahogy az előző fejezetekben is bemutattuk, a Béta-proteobaktériumok nagy szerepet tölthetnek be az aromás szénhidrogének bontásában, mivel rendelkezhetnek az I.2.C típusú katekol 2,3-dioxigenáz funkciógénekkal (Táncsics et al. 2012, 2013). Ezért megvizsgáltuk, hogy az új faj jelölt izolátumunk rendelkezik-e ezen funkciógénnel. A PCR reakció során a már korábban ismertetett XYLE3F és XYLE3R primereket használtam (Táncsics et al. 2013). A Buc^T törzsen kívül a *Z. caeni* EMB43^T törzs DNS-éből is megpróbáltam amplifikálni a 800 bp hosszúságú szakaszt, azonban ezt csak az előbbi baktériumban sikerült detektálni. Az I.2.C típusú katekol 2,3-dioxigenáz funkciógén szekvenciáját KJ433487 azonosítószámmal deponáltam a GenBankban.

A Buc^T törzs sejtmembránja hasonlóan a nemzetség többi fajához főként C_{16:0}, C_{10:0} 3-OH, C_{12:0} és 3 (C_{16:1}Ω⁷c és/vagy iso-C_{15:0} 2-OH) zsírsavakat tartalmaz. A legfőbb kimutatott légzési kinon az ubikinon-8 (Q-8), valamint az ubikinon-7 (Q-7) is detektálható volt kis százalékban. A poláris lipid vizsgálatok alapján a fő komponens a foszfatidil-etanolamin. A törzs DNS-ének G+C tartalma 63.2 mol%-nak adódott. A kemotaxonómiai adatokról összességében elmondhatjuk, hogy a törzs értékei összhangban vannak a nemzetség más típusú törzseiben detektáltakal (Unz 1984, Mohn et al. 1999, Xie és Yokota 2006, Shao et al. 2009).

A 16S rRNS gén amplifikálása és szekvenálása univerzális 27f, 803f és 1492r primerekkel történt (Lane 1991). A 1405 bp hosszúságú szekvencia más típusú törzsekkel történő összehasonlításához az EzTaxon server online felületét használtam (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>, Kim et al. 2012). A szekvencia hasonlósági értékek meghatározásához a Buc^T törzs és a rokon fajok között a FASTA3 programot használtam (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/nucleotide.html>). Az új faj rendszertani elhelyezéséhez filogenetikai törzsfát szerkesztettem a MEGA 5.0 szoftver (Tamura et al. 2011) segítségével. A törzsfá megalkotásához mind a távolság-alapú neighbor-joining (Saitou és Nei 1987) és karakter-

alapú maximum-likelihood (Felsenstein 1981), valamint a maximum-parszímónia (Kimura 1980) módszereket alkalmaztam, a fa topológiája mindhárom esetben hasonlóan alakult. A kapott fa topológiájának és távolságértékeinek pontosságát 1000 ismétlésen alapuló bootstrap analízissel vizsgáltuk (4.23. ábra).



4.23. ábra Buc^T törzs filogenetikai helyzetét bemutató maximum likelihood fa

A 16S rRNS gén szekvencia analízise alapján a Buc^T a legnagyobb, 97,2%-os homológiát a *Z. caeni* EMB43^T típus törzssel mutatta, majd ezt követte a *Z. oryzae* A-7^T, *Z. ramigera* ATCC 19544^T és végül a *Z. resiniphila* DhA-35^T 95,9; 95,5 és 95,4 %-os egyezőséggel. A DNS-DNS hibridizáció mértéke a Buc^T és a *Z. caeni* EMB43^T törzsek között 31,6 %-ál alakult, mely egyértelműen a külön fajba sorolhatóságához megállapított 70%-os határ alatt található (Wayne et al. 1987). A fiziológiai, biokémiai és filogenetikai eredmények alapján az általunk izolált törzs új fajnak tekinthető, melynek végül a *Zoogloea oleivorans* nevet adtuk.

Új tudományos eredmény a 4.4-es fejezet alapján: Sikertült egy ezidáig ismeretlen *Zoogloea* baktériumfajt izolálnunk, mely rendelkezik az I.2.C alcsaládba tartozó katekol 2,3 dioxigenáz enzimtípussal. Elvégeztük az új faj nemzetközi követelményeknek megfelelő leírását, mely során a mikroorganizmusnak a *Zoogloea oleivorans* nevet adtuk.

Az eredményeink az *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* szakfolyóiratban jelentetek meg (Farkas et al. 2015).

5. Következtetések

A siklósi, BTEX-vegyületekkel szennyezett, oxigénlimitált kárhelyet vizsgálva nyilvánvalóvá vált számunkra, hogy a Bétaproteobaktériumok, azon belül is elsősorban a *Zoogloea*-, *Quatrionicoccus*-, *Rhodoferax*-nemzetségbe és egy ezidáig kitenyésztetlen, Rhodocyclaceae családba tartozó mikroorganizmusok lehetnek a domináns mikroaerob BTEX lebontó szervezetek. Egy általunk izolált, a kárhelyen is fellelhető új *Zoogloea* fajról bebizonyítottuk, hogy rendelkezik I.2.C típusú katekol 2,3 dioxigenáz funkciógénnel. Az ilyen típusú funkciógének által kódolt enzimek a szakirodalmi adatok alapján megnövekedett oxigén affinitással rendelkeznek, így nagy biodegradációs szerep juthat az őket hordozó baktériumoknak a hipoxikus közegekben. Vizsgálataink során ezt megerősítve számos I.2.C alcsaládba tartozó C23O genotípust tudtunk kimutatni a szennyezési csóvából, továbbá kettőt közülük sikerült statisztikai módszerekkel az ismeretlen *Rhodocyclaceae* és a *Rhodoferax* rokon mikroszervezethez kötnünk. Azonban ahhoz, hogy kétséget kizáróan eldönthessük, hogy e funkciógéneket mely fajok hordozzák, szükséges azok kitenyészítése. A *Rhodoferax* nemzetség esetében erre próbát is tettünk. Nehezítette törekvésünket, hogy a genuszban található mikroorganizmusok tulajdonságai meglehetősen változatosak, megtalálunk köztük fototrófokat, anaerob fermentálókat, aerob kemoorganotrófokat és vasredukáló baktériumokat egyaránt. Mi alapvetően az ismeretlen mikroorganizmus vasredukáló képességét feltételeztük, azonban az izolálás sikertelen volt. A továbbiakban megpróbálunk a nemzetség fototróf tulajdonságát kihasználva új dúsítási technikát fejleszteni.

Az I.2.C alcsaládba tartozó funkciógéneket monitorozva azt is tapasztaltuk, hogy a stabil izotópos kísérlet során az egyes genotípusok (pl. *Pseudoxanthomonas spadix*-hoz köthető C23O) a hipoxikus körülmények ellenére inaktívak maradtak. Ennek egy magyarázata lehet, hogy az ilyen genotípusokat hordozó baktériumok oxigénlimitált körülmények között inkább nitrátot használnak elektron akceptorként és a minimális mennyiségű oxigént csak a gyűrű hasításához használják fel. Tovább árnyalja a képet azonban az, hogy a *Pseudoxantomonas spadix*-hoz tartozó genotípus aktivitását, ha kis arányban is, de a hosszútávú monitoring alatt ki tudtuk mutatni.

A *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó mikroorganizmusok szerepe sem egyértelmű a hipoxikus közegekben. Sok esetben a közösségben igen jelentős arányban (~10%) voltak jelen e baktériumok és a 2010. májusi-júniusi mintákban a hozzájuk köthető C23O funkciógének aktivitását is ki tudtuk mutatni, azonban a stabil izotópos kísérletek során a genusz tagjainak DNS-ét a könnyű frakcióban detektáltuk. Igaz, ebben az esetben a nemzetséghez köthető I.2.C típusú katekol 2,3 dioxigenáz genotípusokat sem tudtunk kimutatni. Látható tehát, hogy az I.2. C

típusú katekol 2,3-dioxigenázok megléte szükségesnek tűnik a BTEX-vegyületek mikroaerob lebontásában, azonban az enzim és az őt hordozó baktérium szerepvállalása az adott közösségben számos más környezeti tényezőtől is függ.

6. Összefoglalás

Annak ellenére, hogy a BTEX-vegyületek aerob és anaerob körülmények közti biodegradációja széleskörűen kutatott, a hipoxikus közegekben lejátszódó lebontási folyamatokról igen kevés információ áll a rendelkezésünkre. Mivel a mélyen fekvő talaj illetve talajvíztáblák oldott oxigén koncentrációja legtöbb esetben alacsony, szükségeszerű azon mikroba közösségek vizsgálata, melyek anyagcsere-útvonalai a hipoxikus körülményekhez adaptálódtak.

Eredményeink alapján az általunk feltárt talajvizet mindvégig a Béta-proteobaktériumok Comamonadaceae és Rhodocyclaceae családjai, azon belül is elsősorban a *Rhodoferax*, *Azoarcus*, *Zoogloea*, *Quatrionicoccus* és egy ismeretlen, a Rhodocyclaceae családba tartozó genusz tagjai dominálták. A Gammaproteobaktériumokhoz tartozó *Pseudomonas* és a Deltaproteobaktériumokhoz tartozó *Geobacter* nemzetségek tagjait is jelentős számban detektáltuk az egyes mintákban.

Vizsgálataink alapján a fent említett genuszok közül a BTEX-vegyületek hipoxikus lebontásában a *Zoogloea*, *Quatrionicoccus* és az ismeretlen Rhodocyclaceae mikroorganizmus minden kétséget kizáróan nagy szerepet játszik. A *Zoogloea* nemzetségből sikerült is izolálnunk és leírunk egy a tudomány számára ezidáig ismeretlen mikroorganizmust, mely rendelkezik a BTEX-vegyületek mikroaerob lebontását lehetővé tevő enzimtípussal. A *Rhodoferax* család képviselőjének szerepvállalása eredményeink és a nemzetközi irodalom alapján sem egyértelmű, ám valószínűsíthető, hogy e mikroorganizmus is szerepet játszik a toluol, vagy egyes metabolitjainak mikroaerob lebontásában.

A *Pseudomonas* fajok a vizsgált időszak kezdetén aktívnak mutatkoztak, majd a későbbiekben passzivitásukat meglepve tapasztaltuk, hiszen számos fajukról közismert, hogy igen jó arányban képesek a szénhidrogének degradációjára. Másrészt a nemzetséghez köthető I.2.C típusú katekol 2,3 dioxigenáz genotípust, mely lehetővé tette volna számukra a toluol hipoxikus lebontását, a stabil izotópos vizsgálatok során már nem tudtuk kimutatni a mintákból.

Az *Azoarcus* fajok hipoxikus körülmények között inaktívak maradtak, ismerte a szakirodalmi adatokat ez egy várt jelenség volt, hiszen e mikroorganizmusok biodegradációs szerepe főleg nitrátredukáló körülmények között igazolt. E baktériumok kárhelyen betöltött szerepét tisztázandó nitrátredukáló toluol-lebontási kísérletem jelenleg is zajlik. A szakirodalom alapján a *Geobacter* nemzetség egyes fajai az általuk hordozott benzil szukcinát szintáz funkciójának révén nagy szerepet töltenek be a BTEX-vegyületek anaerob lebontásában. Kutatásunk alapján azonban valószínűsíthető, hogy a siklósi kárhely *Geobacter* populációja nem játszik szignifikáns szerepet a toluol anaerob biodegradációjában.

7. Summary

Despite the fact that the aerobic and anaerobic degradation of BTEX compounds have been widely studied little is known about these processes under microaerobic conditions. Since the availability of oxygen is often limited in contaminated soil and groundwater ecosystem, investigation of functional diversity of bacterial communities adapted to the microaerobic conditions is required. It was demonstrated that the bacterial community at the investigated site was dominated mainly by Betaproteobacteria, such as members of the genera *Rhodoferax*, *Azoarcus*, *Zoogloea*, *Quatrionicoccus* and unknown bacteria related to Rhodocyclaceae. The Gammaproteobacteria related *Pseudomonas* and Deltaproteobacteria related *Geobacter* genera were also detectable.

In summary, results of studies clearly revealed the central role of *Zoogloea*, *Quatrionicoccus* and unknown Rhodocyclaceae bacteria in hypoxic toluene degradation at the contaminant plume. Furthermore we isolated and describe a novel *Zoogloea* species which possess subfamily I.2.C catechol 2,3-dioxygenases gene, which could have enabled this bacteria to take part in the degradation of toluene under hypoxic conditions.

According to our result and the available literature the role of *Rhodoferax* bacteria in microaerobic degradation of toluene, or its metabolites is still unclear.

The *Pseudomonas* species were active only at the beginning of the monitoring period. During the stable isotope experiment the inactivity of these species can be surprising due to the fact that it is widely known that several members of the genus are capable of degrading aromatic hydrocarbons. On the other hand, *Pseudomonas*-affiliated subfamily I.2.C-type C23O genes were absent from the community at this time.

As it was expected the *Azoarcus* and *Geobacter* species remained inactive in hypoxic conditions. The former species are usually reported as excellent toluene degraders under nitrate reducing conditions. Accordingly nitrate reducer toluene degrading microcosms had been set up to clarify the role of these bacteria in Siklós aquifer, however the results still need to be evaluated.

Numerous studies have suggested that *Geobacter* species take an important part in the anaerobic removal of BTEX hydrocarbons. According to the results, it is highly assumed that although a notable *Geobacter* population can be observed at the Siklós BTEX contaminated site, these bacteria may not play significant role in the anaerobic degradation of toluene.

8. Mellékletek

8.1 Irodalomjegyzék

1. 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. *Journal of Applied Microbiology* 106 (1): 317-328.
2. Aburto A., Peimbert M. (2011) Degradation of a benzene-toluene mixture by hydrocarbon-adapted bacterial communities. *Annals of Microbiology* 61: 553–562
3. Aklujkar M., Young N. D., Holmes D., Chavan M., Risso C., Kiss H. E., Han C. S., Land M. L., Lovley D. R. (2010) The genome of *Geobacter bemidjiensis*, exemplar for the subsurface clade of *Geobacter* species that predominate in Fe(III)-reducing subsurface environments. *BMC Genomics* 11:490
4. Alfreider A., Vogt C. (2007) Bacterial diversity and aerobic biodegradation potential in a BTEX-contaminated aquifer. *Water Air and Soil Pollution* 183:415–426
5. Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.
6. Amann R. I., Lin C., Key R., Montgomery L., Stahl, D. A. (1992). Diversity among *Fibrobacter* isolates: towards a phylogenetic classification. *Systematic and Applied Microbiology* 15, 23–31.
7. Anders H. J., Kaetzke A., Kampfer P., Ludwig W., Fuchs G. (1995) Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying *Pseudomonad* strains K 172 and Kb 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45:327–333
8. Anneser B., Einsiedl F., Meckenstock R. U., Richters L., Wisotzky F., Griebler C. (2008) High-resolution monitoring of biogeochemical gradients in a tar oil-contaminated aquifer. *Applied Geochemistry* 23, 1715–1730.
9. Anneser B., Pilloni G., Bayer A., Lueders T., Griebler C., Einsiedl F., Richters L. (2010): High resolution analysis of contaminated aquifer sediments and groundwater-What can be learned in terms of natural attenuation? *Geomicrobiology Journal* 27, 130–142.
10. Anton A., Borián Gy., Forgács J., Horváth Zs., Lukács L., Lelik Zs. (2006): *Környezettechnika II*, VITUKI KHT, Budapest, 260 p., 98-110 p.
11. Aronson D., Howard P.H. (1997) Anaerobic biodegradation of organic chemicals in groundwater: a summary of field and laboratory studies. In: North Syracuse, NY Environmental Science Center, Syracuse Research Corporation, pp 1–268
12. Atlas R. M. (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective *Microbiological Reviews* 45 (1): 180-209
13. ATSDR (2004): Interaction profile for: Benzen, Toluene, Ethylbenzene, and Xilene (BTEX), 154p. , 68p.

14. Austin B., Calomiris J. J., Walker J. D., Colwell R. R. (1977): Numerical taxonomy and ecology of petroleum-degrading bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 34: 60-8.
15. Balcke G. U., Wegener S., Kiesel B., Benndorf D., Schlomann M., Vogt C. (2008) Kinetics of chlorobenzene biodegradation under reduced oxygen levels *Biodegradation* 19, 507–518.
16. Ball H. A., Johnson H. A., Reinhard M., Spormann A. M. (1996) Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. *Journal of Bacteriology* 178:5755–5761
17. Banat I. M. (1995) Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review *Bioresource Technology* 51:1,p 1-12
18. Bardiya N., Bae J.H. (2004) Role of *Citrobacter amalonaticus* and *Citrobacter farmeri* in dissimilatory perchlorate reduction. *Journal of Basic Microbiology* 44:88–97
19. Barótfi I. (2000) Környezettechnika, Mezőgazda kiadó, Budapest, 981 p., 571-580 p.
20. Bell T. H., Yergeau E., Martineau C., Juck D., Whyte L. G., Greer C.W. (2011) Identification of Nitrogen-Incorporating Bacteria in Petroleum-Contaminated Arctic Soils by Using [¹⁵N] DNA-Based Stable Isotope Probing and Pyrosequencing *Applied and Environmental Microbiology* 77(12):4163-4171
21. Bharadwaj V. S., Dean A. M., Maupin C.M. (2013) Insights into the Glycyl Radical Enzyme Active Site of Benzylsuccinate Synthase: A Computational Study. *Journal of the American Chemical Society* 135, 12279-12288.
22. Biagini G. A., Finlay B. J., Lloyd D. (1998) Protozoan stimulation of anaerobic microbial activity: enhancement of the rate of terminal decomposition of organic matter. *FEMS Microbiology Ecology* 27:1–8.
23. Boll M., Löffler C., Bell M. (2014) Anaerobic degradation of homocyclic aromatic compounds via arylcarboxyl-coenzyme A esters: organisms, strategies and key enzymes. *Environmental Microbiology* 16:612–27.
24. Bond D. R., Holmes D. E., Tender L. M., Lovley D. R. (2002) Electrodereducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science* 295:483–485
25. Bond D. R., Lovley D. R. (2003) Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1548–1555
26. Brenner D. J. (1973) Deoxyribonucleic acid reassociation in the taxonomy of enteric bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 23, 298–307.
27. Brennerova M.V., Josefiova J., Brenner V., Pieper D.H., Junca H. (2009) Metagenomics reveals diversity and abundance of meta-cleavage pathways in microbial communities from soil highly contaminated with jet fuel under air-sparging bioremediation. *Environmental Microbiology* 11, 2216-2227.
28. Bruckner Gy. (1952) Szerves kémia, Tankönyvkiadó, Budapest, 795 p., 69-78 p.

29. Burlage R. S., Hooper S. W., Sayler G. S. (1989) The TOL (pWW0) catabolic plasmid. *Applied and Environmental Microbiology* 55(6): 1323–1328.
30. Cadisch G., Espana M., Causey R., Richter M., Shaw E., Morgan J.A.W., Rahn C., Bending G. D. (2005) Technical considerations for the use of ¹⁵N-DNA stable-isotope probing for functional microbial activity in soils *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19, 1424-1428
31. Callaghan A. V., Gieg L. M., Kropp K. G., Suflita J. M., Young L. Y. (2006) Comparison of mechanisms of alkane metabolism under sulfate-reducing conditions among two bacterial isolates and a bacterial consortium. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4274-4282.
32. Callaghan A. V., Davidova I. A., Savage-Ashlock K., Parisi V. A., Gieg L. M., Suflita J. M., Kukor J. J., Wawrik B. (2010) Diversity of benzyl- and alkylsuccinate synthase genes in hydrocarbon-impacted environments and enrichment cultures. *Environmental Science & Technology* 44: 7287-7294.
33. Cámara B., Strömpl C., Verborg S., Spröer C., Pieper D. H., Tindall B. J. (2007): *Pseudomonas reinekei* sp. nov., *Pseudomonas moorei* sp. nov. and *Pseudomonas mohnii* sp. nov., novel species capable of degrading chlorosalicylates or isopimaric acid. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 923-931
34. Carlyle R. (2013) What Are The Top Five Facts Everyone Should Know About Oil Exploration? *Forbes*, 2013 április 3
35. Cashion P., Holder-Franklin M. A., McCully, J. & Franklin, M. (1977). A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. *Analytical Biochemistry* 81, 461–466.
36. Chakraborty R., Coates J. D. (2004) Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64:437–446
37. Chakraborty R., S. M. O'Connor, E. Chan, J. D. Coates (2005). Anaerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene compounds by *Dechloromonas* strain RCB. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 8649-55.
38. Chatfield L. K., Williams P.A. (1986) Naturally occurring TOL plasmids in *Pseudomonas* strains carry either two homologous or nonhomologous catechol 2,3 oxygenase genes. *Journal of Bacteriology* 168, 878–885.
39. Christensen T. H., Kjeldsen P., Bjerg P. L., Jensen D. L., Christensen J. B., Baun A. (2001) Biogeochemistry of landfill leachate plumes. *Applied Geochemistry* 16:659–718
40. Christensen T. H., Bjerg P. L., Banwart S. A., Jakobsen R., Heron G., Albrechtsen H.J. (2000) Characterization of redox conditions in groundwater contaminant plumes: *Journal of Contaminant Hydrology*, v. 45, p. 165-241.
41. Chun J., Lee J. H., Jung Y., Kim M., Kim S., Kim B. K., Lim Y. W. (2007) EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:2259–2261

42. Cichocka D., Nikolausz M., Haest P.J., Nijenhuis I. (2010) Tetrachloroethene conversion to ethene by a Dehalococcoides-containing enrichment culture from Bitterfeld. *FEMS Microbiology Ecology*. 72, 297–310.
43. Claus D. (1992) A standardized Gram staining procedure. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8, 451–452.
44. Coates J. D., Bhupathiraju V. K., Achenbach L. A., McInerney M. J., Lovley D. R. (2001a) *Geobacter hydrogenophilus*, *Geobacter chapellei* and *Geobacter grbiciae*, three new, strictly anaerobic, dissimilatory Fe(III)-reducers. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51:581–588
45. Coates J. D., Chakraborty R., Lack J. G., O'Connor S. M., Cole K. A., Bender K. S., Achenbach L. A. (2001). Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*. *Nature* 411, 1039-4
46. Collins M. D., Rodrigues U., Ash C., Aguirre M., Farrow J. A. E., Martinez-Murcia A., Phillips B. A., Williams A. M., Wallbanks S. (1991) Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiology Letters* 77, 5–12
47. Corteselli E. M., Aitken M. D., Singleton D. R. (2017) *Rugosibacter aromaticivorans* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium within the family Rhodocyclaceae isolated from contaminated soil, capable of degrading aromatic compounds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67: 311-318
48. Cowan S. T., Steel K. J. (1974). *Manual of Identification of Medical Bacteria*. Cambridge: University Press.
49. Crabtree K., McCoy E. (1967). *Zoogloea ramigera* Itzigsohn, identification and description. *International Journal of Systematic Bacteriology* 17, 1–10.
50. Cunningham J. J., Kinner N.E., Lewis M. (2009) Protistan predation affects trichloroethene biodegradation in a bedrock aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* 75:7588–7593.
51. Danielopol D. L., Griebler C., Gunatilaka A., Notenboom J. (2003) Present state and future prospects for groundwater ecosystems. *Environmental Conservation* 30: 104-130.
52. Davidova I. A., Gieg L. M., Duncan K. E., Suflita J. M. (2007). Anaerobic phenanthrene mineralization by a carboxylating sulfate-reducing bacterial enrichment. *The ISME Journal* 1: 436-442.
53. De Ley, J., Cattoir, H., Reynaerts, A. (1970). The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *European Journal of Biochemistry* 12, 133–142.
54. DeSantis T. Z., Hugenholtz P., Larsen N., Rojas M., Brodie E. L., Keller K., Huber T., Dalevi D., Hu P., Andersen G. L. (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology* 72(7):5069-72.
55. Devulder G., Perrière G., Bath F., Flandrois J.P. (2003) BIBI, a bioinformatics bacterial identification tool. *Journal of Clinical Microbiology* 41(4):1785-1787.

56. Dibble J. T., Bartha R. (1979) Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 37 (4): 729-739
57. Dolfing J., Zeyer J., Binder-Eicher P., Schwarzenbach R. P. (1990) Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. *Archives of Microbiology* 154: 336-341.
58. Dugan P. R., Stoner D. L., Pickrum H. M. (1992) The genus *Zoogloea*. In *The Prokaryotes*, 2nd edn, pp. 3952–3964. Edited by A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.-H. Schleifer. New York: Springer.
59. Dumont M. G., Murrell J. C. (2005) Stable isotope probing - linking microbial identity to function. *Nature Reviews Microbiology* 3(6):499-504
60. Edwards E. A., Wills L. E., Reinhard M., Grbić-Galić D. (1992) Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganisms under sulfate-reducing conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 58(3):794-800.
61. Eltis L. D., Bolin J. T. (1996). Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases. *Journal of Bacteriology* 178, 5930-7.
62. Eriksson S., Ankner T., Abrahamsson K., Hallbeck L. (2005): Propylphenols are metabolites in the anaerobic biodegradation of propylbenzene under iron-reducing conditions *Biodegradation* 16 (3): 253-263
63. Etkin D. S. (2001) Analysis of oil spill trends in the United States and worldwide.-International oil spill conference pp. 1291-1300
64. Ettwig K. F., Speth D. R., Reimann J., Wu M. L., Jetten M. S. M., Keltjens J. T. (2012) Bacterial oxygen production in the dark. *Frontiers in Microbiology* 3.
65. Evans P. J., Mang D. T., Kim K. S., Young L. Y. (1991) Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 57:1139–1145
66. Fahrenfeld N., Cozzarelli I., Bailey Z., Pruden A. (2014) Insights into biodegradation through depth-resolved microbial community functional and structural profiling of a crude-oil contaminant plume. *Microbial Ecology* 68, 453–462.
67. Fahy A., McGenity T. J., Timmis K. N., Ball A. S. (2006) Heterogeneous aerobic benzene-degrading communities in oxygen-depleted groundwaters. *FEMS Microbiology Ecology* 58, 260–270.
68. Farkas M., Szoboszlay S., Benedek T., Révész F., Veres P. G., Kriszt B., Táncsics A. (2017) Enrichment of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria from groundwater of the Siklós BTEX-contaminated site (Hungary). *Folia Microbiologica* 62:63-71.
69. Farkas M., Táncsics A., Kriszt B., Benedek T., Tóth E. M., Kéki Z., Veres P. G., Szoboszlay S. (2015) *Zoogloea oleivorans* sp. nov., a floc-forming, petroleum hydrocarbon-degrading bacterium isolated from biofilm. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65:274-279.

70. Felsenstein J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach *Journal of Molecular Evolution* 17, 368–376.
71. Finneran K. T., Johnsen C. V., Lovley D. R. (2003) *Rhodoferax ferrireducens* sp. nov., a psychrotolerant, facultatively anaerobic bacterium that oxidizes acetate with the reduction of Fe(III). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:669–673
72. Finneran K. T., Johnsen C. V., Lovley D. R. (2003): *Rhodoferax ferrireducens* sp. nov., a psychrotolerant, facultatively anaerobic bacterium that oxidizes acetate with the reduction of Fe(III). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 669–673
73. Fox G. E., Wisotzkey J. D., Jurtshuk P. Jr (1992). How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 42, 166–170.
74. Friedrich M. M., Lipski A. (2008): *Alkanibacter difficilis* gen. nov., sp. nov. and *Singularimonas varicoloris* gen. nov., sp. nov., hexane-degrading bacteria isolated from a hexane-treated biofilter. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58:2324-9.
75. Fries M. R., Zhou J. H., Chee-Sanford J., Tiedje J. M. (1994) Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Applied and Environmental Microbiology* 60:2802–2810
76. Fuchs G., Boll M., Heider J. (2011) Microbial degradation of aromatic compounds - from one strategy to four. *Nature Reviews Microbiology*;9:803–16.
77. Furka Á. (1991): Szerves kémia, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest 930 p., 63-318 p.
78. Gleeson T., Wada Y., Bierkens M.F.P.P., van Beek L.P.H. (2012) Water balance of global aquifers revealed by groundwater footprint. *Nature* 488, 197–200
79. Global Soil Forum (2012) Soil contamination a severe risk for the environment and human health
80. Goldscheider N., Hunkeler D., Rossi P. (2006) Review: Microbial biocenoses in pristine aquifers and an assessment of investigative methods. *Hydrogeol J* 0:1-16
81. Greene E. A., Kay J. G., Jaber K., Stehmeier L. G., Voordouw G. (2000): Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (12): 5282-5289
82. Griebler C., Lueders T. (2009) Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshwater Biology* 54:649-677
83. Griebler C., Malard F., Lefébure T. (2014) Current developments in groundwater ecology from biodiversity to ecosystem function and services. *Current Opinion in Biotechnology* 27, 159–167.
84. Hammer Ø., Harper D. A. T., Ryan P. D. (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9

85. Harayama S., Kok M., Neidle E. L. (1992): Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annual Review of Microbiology* 46:565-601.
86. Harms G., Zengler K., Rabus R., Aeckersberg F., Minz D., Rossello- Mora R, Widdel F. (1999b) Anaerobic oxidation of o-xylene, m-xylene, and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 65:999–1004
87. Harwood C.S., Burchhardt G., Herrmann H., Fuchs G. (1999) Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiology Reviews* 22:439–458
88. Hazen T. C., Dubinsky E. A., DeSantis T. Z., Andersen G. L., Piceno Y. M., Singh N., Jansson J. K., Probst A., Borglin S. E., Fortney J. L., Stringfellow W. T., Bill M., Conrad M. E., Tom L. M., Chavarria K. L., Alusi T. R., Lamendella R., Joyner D. C., Spier C., Baelum J, Auer M, Zemla M. L., Chakraborty R., Sonnenthal E. L., D'haeseleer P., Holman H-Y., Osman S., Lu Z., Van Nostrand J. D., Deng Y., Zhou, J., Mason O. U. (2010): Deep-Sea Oil Plume Enriches Indigenous Oil-Degrading Bacteria *Science* 330 (6001):204-208
89. Heider J. (2007). Adding handles to unhandy substrates: Anaerobic hydrocarbon activation mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology* 11: 188-194.
90. Heider J., Szaleniec M., Sunwoldt K., Boll M. (2016) Ethylbenzene dehydrogenase and related molybdenum enzymes involved in oxygen-independent alkyl chain hydroxylation. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 26:45–62
91. Hendrickx B., Dejonghe W., Boënne W., Brennerova M., Cernik M., Lederer T., Bucheli-Witschel M., Bastiaens L., Verstraete W., Top E. L, Diels L., Springael D (2005): Dynamics of an oligotrophic bacterial aquifer community during contact with a groundwater plume contaminated with benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes: an in situ mesocosm study. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 3815-3825.
92. Hendrickx B., Junca H., Vosahlova J., Lindner A., Ruegg I., Bucheli-Witschel M., Faber F., Egli T., Mau M., Schlomann M., Brennerova M., Brenner V., Pieper D. H., Top E. M., Dejonghe W., Bastiaens L., Springael D. (2006). Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. *Journal of Microbiological Methods* 64, 250-65.
93. Herrmann S., Kleinstaub S., Neu T. R., Richnow H. H., Vogt C. (2008) Enrichment of anaerobic benzene-degrading microorganisms by in situ microcosms *FEMS Microbiology Ecology* 63(1):94-106.
94. Hess A, Zarda B, Hahn D, Haner A, Stax D, Hohener P, Zeyer J (1997) In situ analysis of denitrifying toluene- and m-xylene- degrading bacteria in a diesel fuel-contaminated laboratory aquifer column. *Applied and Environmental Microbiology* 63:2136–2141
95. Holmes D. E., Risso C., Smith J. A., Lovley D.R. (2011) Anaerobic oxidation of benzene by the hyperthermophilic archaeon *Ferroglobus placidus*. *Applied and Environmental Microbiology* 77(17):5926-33.

96. Hommais F., S. Pereira C. Acquaviva P. Escobar P., Denamur E. (2005). Single-nucleotide polymorphism phylotyping of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4784-4792.
97. Hong P.Y., Wu J.H., Liu W.T. (2008) Relative abundance of *Bacteroides* spp. in stools and wastewaters as determined by hierarchical oligonucleotide primer extension. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2882–2893.
98. Hong P. Y., Wu J. H., Liu W. T. (2009) A high-throughput and quantitative hierarchical oligonucleotide primer extension (HOPE)-based approach to identify sources of faecal contamination in water bodies. *Environmental Microbiology* 11, 1672–1681.
99. Huber T., Faulkner G., Hugenholtz P. (2004) Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* 20:2317–2319
100. Hugh R., Leifson E. (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology* 66, 24–26.
101. Hungate B. A., Mau R. L., Schwartz E., Caporaso J. G., Dijkstra P., van Gestel N., Koch B. J., Liu C. M., McHugh T. A., Marks J. C., Morrissey E. M., Price L. B. (2015) Quantitative Microbial Ecology through Stable Isotope Probing *Applied and Environmental Microbiology* 81(21): 7570–7581.
102. Huß V. A. R., Festl H., Schleifer K. H. (1983). Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Systematic and Applied Microbiology* 4, 184–192.
103. Iwai S., Chai B., Sul W. J., Cole J. R. , Hashsham S. A., Tiedje J. M. (2010) Gene-targeted metagenomics reveals extensive diversity of aromatic dioxygenase genes in the environment *The ISME Journal* 4, 279–285.
104. Jechalke S., Franchini A.G., Bastida F., Bombach P., Rosell P., Seifert J., von Bergen M., Vogt C., Richnow, H.H. (2013) Analysis of structure, function, and activity of a benzene-degrading microbial community. *FEMS Microbiology Ecology* 85:14-26.
105. Jeon C.O., Park W., Padmanabhan P., DeRito C., Snape J.R., Madsen E.L. (2003) Discovery of a bacterium, with distinctive dioxygenase, that is responsible for *in situ* biodegradation in contaminated sediment. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 100 (23)3591-13596.
106. Johnson H. A., Pelletier D. A., Spormann A. M. (2001). Isolation and characterization of anaerobic ethylbenzene dehydrogenase, a novel Mo-Fe-S enzyme. *Journal of Bacteriology* 183: 4536-4542.
107. Johnson S.J., Woolhouse K.J., Prommer H., Barry D.A., Christofi N. (2003) Contribution of anaerobic microbial activity to natural attenuation of benzene in groundwater, *Engineering Geology* 70, 343–9
108. Johnson J. L. (1973) Use of nucleic-acid homologies in the taxonomy of anaerobic bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 23, 308–315.

109. Johnson J. L. (1984) Nucleic acids in bacterial classification. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1, pp. 8–11. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
110. JRC - Panagos P., Liedekerke M.V., Yigini Y., Montanarella L. (2013): Contaminated Sites in Europe: Review of the Current Situation Based on Data Collected through a European Network *Journal of Environmental and Public Health* Volume 2013
111. Kaden R., Spröer C., Beyer D., Krolla-Sidenstein P. (2014) *Rhodoferox saidenbachensis* sp. nov., a psychrotolerant, very slowly growing bacterium within the family Comamonadaceae, proposal of appropriate taxonomic position of *Albidiferax ferrireducens* strain T118T in the genus *Rhodoferox* and emended description of the genus *Rhodoferox*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:1186–1193
112. Kanamori T., Rashid N., Morikawa M., Atomi H., Imanaka T. (2002) *Oleomonas sagaranensis* gen. nov., sp. nov., represents a novel genus in the alpha-Proteobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 210, 255-261
113. Kasai Y., Takahata Y., Manefield M., Watanabe K. (2006) RNAbased stable isotope probing and isolation of anaerobic benzene-degrading bacteria from gasoline-contaminated groundwater *Applied and Environmental Microbiology* 72:3586–3592
114. Keil H., Lebens M.R., Williams P.A. (1985) TOL plasmid pWW15 contains two nonhomologous, independently regulated catechol 2,3-oxygenase genes. *Journal of Bacteriology* 163, 248–255.
115. Khan F. I., Husain T., Hejazi R. (2004) An overview and analysis of site remediation technologies *Journal of Environmental Management* 71 95–122
116. 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
117. Kiesel B., Balcke G.U., Dietrich J., Vogt C., Geyer R. (2008) Microbial community shifts as a response to efficient degradation of chlorobenzene under hypoxic conditions *Biodegradation* 19, 435–446.
118. Kim J. M., Le N. T., Chung B.S., Park J.H., Bae J.W., Madsen E.L., Jeon C.O. (2008) Influence of soil components on the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-, m-, and p-xylenes by the newly isolated bacterium *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 7313-7320.
119. Kim O. S., Cho Y. J., Lee K., Yoon S. H., Kim M., Na H., Park S. C., Jeon Y. S., Lee J. H., Yi H., Won S., Chun J. (2012) Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, 716 721.
120. Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16, 111–120.

121. Kniemeyer O., Fischer T., Wilkes H., Glockner F. O., Widdel F. (2003) Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate-reducing bacterium *Applied and Environmental Microbiology* 69:760–768
122. Kniemeyer O., Heider J. (2001) Ethylbenzene dehydrogenase, a novel hydrocarbon-oxidizing molybdenum/iron-sulfur/heme enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 276: 21381-21386.
123. Kukor J. J., Olsen R. H. (1996) Catechol 2,3-dioxygenases functional in oxygen-limited (hypoxic) environments *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1728-1740.
124. Kunapuli U., Jahn M. K., Lueders T., Geyer R., Heipieper H. J., Meckenstock R. U. (2010) *Desulfitobacterium aromaticivorans* sp. nov. and *Geobacter toluenoxidans* sp. nov., iron-reducing bacteria capable of anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60:686–695
125. KVVM (2010): Kármentesítési kézikönyv 5.-Bioremediáció- Mikrobiológiai kármentesítési eljárások. 85 p., 9-14 p.
126. Laempe D., Jahn M., Fuchs G. (1999). 6-Hydroxycyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA dehydrogenase and 6-oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA hydrolase, enzymes of the benzoyl CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *European Journal of Biochemistry* 263, 420–429.
127. Lane D. J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115–175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: Wiley.
128. Larentis M., Hoermann K., Lueders T. (2013) Fine-scale degrader community profiling over an aerobic/anaerobic redox gradient in a toluene-contaminated aquifer *Environmental Microbiology Reports* 5:225-234.
129. Leahy, J. G., Colwell R. R. (1990) Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiology Reviews* 54 (3): 305-315
130. Lee, S. H., Jin, H. M., Lee, H. J., Kim, J. M., Jeon, C. O. (2012) Complete genome sequence of the BTEX-degrading bacterium *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59. *Journal of Bacteriology* 194, 544.
131. Liu A., Garcia-Dominguez E., Rhine E.D., Young L.Y. (2004) A novel arsenate respiring isolate that can utilize aromatic substrates. *FEMS Microbiology Ecology* 48:323–332
132. Liu L., Lee D. J., Wang A., Ren N., Su A., Lai J. Y. (2016) Isolation of Fe(III)-reducing bacterium, *Citrobacter* sp., LAR-1, for startup of microbial fuel cell. *International Journal of Hydrogen Energy* 41:4498–4503
133. López Barragán M. J., Carmona M., Zamarro M. T., Thiele B., Boll M., Fuchs G. (2004) The *bzd* gene cluster coding for anaerobic benzoate catabolism in *Azoarcus* sp. strain CIB. *Journal of Bacteriology* 186, 5762–5774.
134. Lozupone C., Knight R. (2005) UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities *Applied and Environmental Microbiology* 71: 12 8228-8235

135. Lovley D. R. (2003) Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nature Reviews Microbiology* 1:35–44
136. Lovley D. R., Giovannoni S. J., White D. C., Champine J. E., Phillips E. J. P., Gorby Y. A., Goodwin S. (1993) *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Archives of Microbiology* 159:336–344
137. Lueders T., Muyzer G. (2017) The ecology of anaerobic degraders of BTEX hydrocarbons in aquifers. *FEMS Microbiology Ecology* 93: fiw220.
138. Luijten M. L. G. C., de Weert J., Smidt H., Boschker H. T. S., de Vos, W. M., Schraa G., Stams A. J. M. (2003): Description of *Sulfurospirillum halospirans* sp. nov., an anaerobic, tetrachloroethene-respiring bacterium, and transfer of *Dehalospirillum multivorans* to the genus *Sulfurospirillum* as *Sulfurospirillum multivorans* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 787-793
139. Madigan M. T., Jung D. O., Woese C. R., Achenbach L. A. (2000) *Rhodoferrax antarcticus* sp. nov., a moderately psychrophilic purple nonsulfur bacterium isolated from an Antarctic microbial mat. *Archives of Microbiology* 173(4):269-77.
140. Maier R. M. (2000) Microorganisms and organic pollutants. In: Maier, R. M., I. L. Pepper and Ch. P. Gerba: *Environmental Microbiology*. Academic Press, New York, 624 p., 363-402 p.
141. Mardis E. R. (2008) The impact of next-generation sequencing technology on genetics *Trends in Genetics* 24, 133–141
142. Martin F., Torelli S., Le Paslier D., Barbance A., Martin-Laurent F., Bru D., Geremia R., Blake G., Jouanneau Y. (2012) Betaproteobacteria dominance and diversity shifts in the bacterial community of a PAH-contaminated soil exposed to phenantrene. *Environmental Pollution* 162:345-353.
143. Martínez-Lavanchy P.M., Müller C., Nijenhuis I., Kappelmeyer U., Buffing M., McPherson K., Heipieper H.J. (2010) High stability and fast recovery of expression of the TOL plasmid-carried toluene catabolism genes of *Pseudomonas putida* mt-2 under conditions of oxygen limitation and oscillation. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 6715-6723.
144. Martínez-Murcia A. J., Collins M. D. (1990). A phylogenetic analysis of the genus *Leuconostoc* based on reverse transcriptase sequencing of 16 S rRNA *FEMS Microbiology Letters* 70, 73–83.
145. Martínez-Murcia A. J., Benlloch S., Collins M. D. (1992) Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Pleisiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 412–421
146. Maszenan A. M., Seviour R. J., Patel B. K. C., Schumann P. (2002) *Quadricoccus australiensis* gen. nov., sp. nov., a β -proteobacterium from activated sludge biomass. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:223-228.

147. Matthies C., Evers S., Ludwig W., Schink B. (2000): *Anaerovorax odorimutans* gen. nov., sp. nov., a putrescine-fermenting, strictly anaerobic bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50(4), 1591-4.
148. Mattison R. G., Taki H., Harayama S. (2005) The soil flagellate *Heteromita globosa* accelerates bacterial degradation of alkylbenzenes through grazing and acetate excretion in batch culture. *Microbial Ecology* 49:142–150.
149. McDonald R., Weber K., Padowski J., Floerke M., Schneider C., Green P., Montgomery M (2014) Water on an urban planet: Urbanization and the reach of urban water infrastructure *Global Environmental Change*, 27, 96–105.
150. Mechichi T., Stackebrandt E., Gad'on N., Fuchs G. (2002): Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromatica* sp. nov., and *Azoarcus buckelii* sp. nov. *Archives of Microbiology*, 178, 26-35.
151. Meckenstock R. U., Mouttaki H. (2011) Anaerobic degradation of non-substituted aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* 22: 406-414.
152. 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. *Environmental Science and Technology* 49(12):7073-81.
153. Mekonnen M. M., Hoekstra A. Y. (2011) National water footprint accounts: the green, blue and gray water footprint of production and consumption. *Value of Water Research Report Series No. 50*
154. Mesbah M., Premachandran U., Whitman W. B. (1989) Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by highperformance liquid chromatography *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 39, 159–167.
155. Meyer F., Paarman D., D'Souza M., Olson R., Glass E.M., Kubal M., Paczian T., Rodriguez A., Stevens R., Wilke A., Wilkening J., Edwards R.A. (2008) The Metagenomics RAST server a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes *BMC Bioinformatics* 19;9:386
156. Mikesell M. D., Kukor J. J., Olsen R. H. (1993). Metabolic diversity of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from a petroleum-contaminated aquifer. *Biodegradation* 4: 249-59.
157. Mohn W. W., Wilson A. E., Bicho P., Moore, E. R. B. (1999) Physiological and phylogenetic diversity of bacteria growing on resin acids. *Systematic and Applied Microbiology* 22, 68–78.
158. Morales S. E., Holben W. E. (2011) Linking bacterial identities and ecosystem processes: can „omic“ analyses be more than the sum of their parts? *FEMS Microbiology Ecology* 75: 2-16
159. Morasch B., Meckenstock R. U. (2005) Anaerobic degradation of p-xylene by a sulfate-reducing enrichment. *Current Microbiology* 51:127–130

160. Musat F., Widdel F. (2008) Anaerobic degradation of benzene by a marine sulfate-reducing enrichment culture, and cell hybridization of the dominant phylotype. *Environmental Microbiology* 10, 1059.
161. Muyzer G., Smalla K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73: 127-141
162. M-VGT 2009- Vízgyűjtő gazdálkodási terv
163. Nafian F., Gharavi S., Soudi M. R. (2016) Degenerate primers as biomarker for gene-targeted metagenomics of the catechol 1, 2-dioxygenase-encoding gene in microbial populations of petroleum-contaminated environments *Annals of microbiology* 66(7)1127-1136
164. Nestler H., Kiesel B., Kaschabek S.R., Mau M., Schlomann M., Balcke G.U. (2007) Biodegradation of chlorobenzene under hypoxic and mixed hypoxicdenitrifying conditions. *Biodegradation* 18, 755–767.
165. Nikolausz M., Chatzinotas A., Palatinszky M., Imfeld G., Martinez P., Kastner M. (2008) Single-nucleotide primer extension assay for detection and sequence typing of “*Dehalococcoides*” spp. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 300–304.
166. Nikolausz M., Chatzinotas A., Tánicsics A., Imfeld G., Kastner M. (2009) The single-nucleotide primer extension (SNuPE) method for the multiplex detection of various DNA sequences: from detection of point mutations to microbial ecology. *Biochemical Society Transactions* 37, 454–459.
167. Nyitray L. (Szerk.) (2013): Géntechnológia és fehérjemérnökség. ELTE TTK Biológiai Intézet elektronikus-jegyzet, 65-70. p,91.p
168. OKKP 2012 - Székely L., Szabó M. (2014): Az alapvető jogok biztosa és a jövő nemzedékek érdekeinek védelmét ellátó biztoshelyettes Közös Jelentése az AJB-2030/2014. számú ügyben
169. OKKP 2005 VITUKI (2005): Országos Környezeti Kármentesítési Program, Alprogramok tájékoztató összefoglalás az 1997. és 2004. között végrehajtott feladatokról. 67 p., 63-63 p.
170. Okoh A. I. (2006): Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 1 (2): 38-50
171. Olsen R. H., Mikesell M. D. , Kukor J. J., Byrne A. M. (1995) Physiological attributes of microbial BTEX degradation in oxygen-limited environments. *Environmental Health Perspectives* 103: 49-51.
172. Ommedal H., Torsvik T. (2007) *Desulfotignum toluenicum* sp. nov., a novel toluene-degrading, sulphate reducing bacterium isolated from an oil-reservoir model column. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:2865–2869
173. Országos Környezeti Kármentesítési Program 2005-ös jelentése
174. Pastorella G., Gazzola G., Guadarrama S., Marsili E. (2012). Biofilms: applications in bioremediation. In *Microbial Biofilms*, Norwich: Caister Academic Press pp. 73–98.

175. Perei K., Pernyeszi T., Lakatos Gy. (2013) Bioremediáció Szegedi Tudományegyetem, 21 fejezet p 91.
176. Pettersson E., Lundeberg J., Ahmadian A. (2009) Generations of sequencing technologies. *Genomics*, 93, 105–111.
177. Piggee C. A., Muth J., Carrilho E., Karger B. L. (1997) Capillary electrophoresis for the detection of known point mutations by single-nucleotide primer extension and laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 781, 367575
178. Pflugmacher U., Averhoff B., Gottschalk G. (1996) Cloning, sequencing, and expression of isopropylbenzene degradation genes from *Pseudomonas* sp. strain JR1: identification of isopropylbenzene dioxygenase that mediates trichloroethene oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3967– 3977.
179. 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*.
180. Piloni G., von Netzer F., Engel M., Lueders T. (2011) Electron acceptor-dependent identification of key anaerobic toluene degraders at a tar-oil-contaminated aquifer by Pyro-SIP. *FEMS Microbiology Ecology* 78, 165-175.
181. Poly F., Monrozier L. J., Bally R. (2001). Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology* 152, 95–103.
182. 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 Research* 41(Database issue):D590-6.
183. Rabus R., Heider J. (1998) Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate reducing bacteria. *Archives of Microbiology* 170:377–384
184. Rabus R., Kube M., Heider J., Beck A., Heitmann K., Widdel F., Reinhardt R. (2005) The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Archives of Microbiology* 2005:27-36
185. Rabus R., Kube M., Beck A, Widdel F., Reinhardt R. (2002) Genes involved in the anaerobic degradation of ethylbenzene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *Archives of Microbiology* 178:506–516
186. Rabus R., Nordhaus R., Ludwig W., Widdel F. (1993) Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 59:1444–1451
187. Rabus R., Widdel F. (1995): Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria *Archives of Microbiology* 163 (2), 96-103
188. Ramana Ch.V., Sasikala Ch., Arunasri K., Anil K. P., Srinivas T.N.R., Shivaji S., Gupta P., Suling J., Imhoff J.F. (2006) *Rubrivivax benzoatilyticus* sp. nov., an aromatic, hydrocarbon-degrading purple betaproteobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 2157–2164.

189. Saitou N., Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406–425.
190. Salinero K. K., Keller K., Feil W. S., Feil H., Trong S., Di Bartolo G., Lapidus A. (2009) Metabolic analysis of the soil microbe *Dechloromonas aromatic* str. RCB: indications of a surprisingly complex life-style and cryptic anaerobic pathways for aromatic degradation. *BMC Genomics* 10: 351.
191. Scott J. C., Koylass M. S., Stubberfield M. R., Whatmore A. M. (2007). Multiplex assay based on single nucleotide polymorphisms for rapid identification of *Brucella* isolates at the species level. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 7331–7337.
192. Shao Y., Chung B. S., Lee S. S., Park W., Lee S. S., Jeon C. O. (2009). *Zoogloea caeni* sp. nov., a floc-forming bacterium isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 526–530.
193. Shelobolina E. S., Vrionis H. A., Findlay R. H., Lovley D. R. (2008) *Geobacter uraniireducens* sp. nov., isolated from subsurface sediment undergoing uranium bioremediation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58:1075–1078
194. Shigematsu T., Yumihara K., Ueda Y., Numaguchi M., Morimura S., Kida K. (2003) *Delftia tsuruhatensis* sp. nov., a terephthalate-assimilating bacterium isolated from activated sludge *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53(5), 1479–1483
195. Shinoda Y., Akagi J., Uchihashi Y., Hiraishi A., Yukawa H., Yurimoto H. (2005) Anaerobic degradation of aromatic compounds by *Magnetospirillum* strains: isolation and degradation genes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69:1483–1491
196. Siegbahn P. E., Haeffner F. (2004) Mechanism for catechol ring-cleavage by non-heme iron extradiol dioxygenases. *Journal of the American Chemical Society* 126, 8919–32.
197. Smibert, R. M. , Krieg, N. R. (1994) Phenotypic characterization. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*. pp. 607–654. Edited by P Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg, Washington, DC: American Society for Microbiology.
198. 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.
199. Sokolov B. P. (1990) Primer extension technique for the detection of single nucleotide in genomic DNA. *Nucleic Acids Research* 18, 3671.
200. Song B., Haggblom M. M., Zhou J., Tiedje J.M., Palleroni N.J. (1999) Taxonomic characterization of denitrifying bacteria that degrade aromatic compounds and description of *Azoarcus toluvorans* sp. nov. and *Azoarcus toluclasticus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49, 1129–1140.
201. Song B., Palleroni N. J., Kerkhof L. J., Haggblom M. M. (2001) Characterization of halobenzoate-degrading, denitrifying *Azoarcus* and *Thauera* isolates and description of *Thauera chlorobenzoica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 589–602.

202. Stephens S. (2011) BTEX Metabolism Metapathway Map.[http:// umbbd.ethz.ch / BTEX / BTEX map.html](http://umbbd.ethz.ch/BTEX/BTEX_map.html)
203. Strauss E. A., Dodds W. K. (1997) Influence of protozoa and nutrient availability on nitrification rates in subsurface sediments. *Microbial Ecology* 34:155–165.
204. Sullivan E. R., Zhang X., Phelps C., Young L. Y. (2001) Anaerobic mineralization of stable-isotope-labeled 2-methylnaphthalene. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4353-4357.
205. Sun W., Cupples A. M. (2012) Diversity of five anaerobic toluene-degrading microbial communities investigated using stable isotope probing. *Applied and Environmental Microbiology* 78(4):972-80
206. Syvanen A. C., Aalto-Setälä K., Harju L., Kontula K., Soderlund H. (1990) A primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein E. *Genomics* 8, 684-592
207. Szabó I., Szoboszlay S., Kriszt B., Háhn J., Harkai P., Baka E., Táncsics A., Kaszab E., Privler Z., Kukolya, J. (2011) *Olivibacter oleidegradans* sp. nov., a hydrocarbon degrading bacterium isolated from a biofilter clean-up facility on a hydrocarbon-contaminated site. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61, 2861–2865.
208. Szalkai Attila: A vízhiány és társadalmi következményei Nemzet és Biztonság II. évfolyam 2. szám pp. 23-36. ISSN: 1789-5286 ,
209. Székely A. J. doktori értekezés (2008): Bakteriális diverzitás vizsgáló eljárások alkalmazása a szennyvíztisztítás mikrobiológiai kutatásában, Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar Biológia Doktori Iskola, 147 p., 29 p
210. Szoboszlay S., Kriszt B. (2008): Környezeti elemek védelme, Szent István Egyetemi kiadó, Gödöllő, 107 p. ,48-59, 81-89 p.
211. Szoboszlay S., Solymosi J., Kriszt B. (2002): The biodegradation of hydrocarbon compounds concerning to environmental safety. *Academic and Applied Research in Military Science* 1(1): 103-106
212. 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. *International Journal of Systemetic and Evolutionary Microbiology* 58, 2748–2754.
213. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725–2729
214. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731–2739.
215. 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. *Systematic and Applied Microbiology* 36:339-350.
216. Táncsics A., Szabó I., Baka I., 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. *Systematic and Applied Microbiology* 33:398-406.
 217. 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. *Environmental Science and Technology* 46: 232-240.
 218. Tarrand J. J., Gröschel D. H. (1982) Rapid, modified oxidase test for oxidase-variable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 16, 772–774.
 219. Thabet O. B., Fardeau M. L., Joulian C., Thomas P., Hamdi M., Garcia J. L., Ollivier B. (2004) *Clostridium tunisiense* sp. nov., a new proteolytic, sulfur-reducing bacterium isolated from an olive mill wastewater contaminated by phosphogypse. *Anaerobe* 10:185–190
 220. Thomas C. M., Nielsen K. M. (2005) Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria *Nature Reviews Microbiology* 3, 711-721
 221. Tindall B. J. (1990a). A comparative-study of the lipids composition of *Halobacterium saccharovorum* from various sources. *Systematic and Applied Microbiology* 13, 128-130.
 222. Tindall B. J. (1990b). Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi* . *FEMS Microbiology Letters* 66, 199–202.
 223. Tischer K., Kleinstaub S., Schleinitz K. M., Fetzer I., Spott O., Stange F., Lohse U., Franz J., Neumann F., Gerling S., Schmidt C., Hasselwander E., Harms H., Wendeberg A. (2013) Microbial communities along biogeochemical gradients in a hydrocarbon contaminated aquifer. *Environmental Microbiology* 15, 2603–2615.
 224. Tribelli P. M., Di Martino C., López N. I., Raiger Iustman L. J. (2012) Biofilm lifestyle enhances diesel bioremediation and biosurfactant production in the Antarctic polyhydroxyalkanoate producer *Pseudomonas extremaustralis*. *Biodegradation* (5):645-51.
 225. Tsao, Song, Bartha (1998) Metabolism of benzene, toluene, and xylene hydrocarbons in soil, *Applied and Environmental Microbiology* 64 4924–9
 226. Turner S., Pryer K. M., Miao V. P., Palmer J. D. (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46(4):327-38.
 227. Unz, R. F. (1984) Genus IV. Zoogloea Itzigsohn 1868, 30AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, pp. 214–219. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
 228. Vaillancourt F. H., Haro M. A., Drouin N. M., Karim Z., Maaroufi H., Eltis L. D. (2006) Characterization of extradiol dioxygenases from a polychlorinated biphenyl-degrading

- strain that possess higher specificities for chlorinated metabolites. *Journal of Bacteriology* 185, 1253-60.
229. Vajna Balázs doktori értekezés (2010) A baktérium közösségek változásának jellemzése molekuláris módszerekkel a laskagomba-alapanyag gyártása során: A T-RFLP adatfeldolgozás optimalizálása és alkalmazása, Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar Biológia Doktori Iskola, 113p., 12p.
 230. Vallone P. M., Just R. S., Coble M. D., Butler J. M., Parsons T. J. (2004) A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome. *International Journal of Legal Medicine* 118, 147557
 231. Verstraete W., R. Vanlooche R. DeBorger, Verlinde A. (1976) Modelling of the breakdown and the mobilization of hydrocarbons in unsaturated soil layers. 3rd International Biodegradation Symposium, Applied Science Publishers Ltd., London.
 232. Vidali M. (2001) Bioremediation. An overview *Pure and Applied Chemistry*, Vol. 73, No. 7, pp. 1163–1172
 233. Wayne L. G., Brenner D. J., Colwell R. R., Grimont P. A. D., Kandler O., Krichevsky M. I., Moore L. H., Moore W. E. C., Murray R. G. E. (1987). International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* 37, 463–464.
 234. Weelink S. A. B., Eekert van M. H. A., Stams A. J. M. (2010) Degradation of BTEX by anaerobic bacteria: physiology and application *Reviews in Environmental Science and Bio/technology* 9:359–385
 235. Weelink S. A. B., Van Doesburg W, Saia FT, Rijpstra WIC, Roling WFM, Smidt H, Stams AJM (2009) A strictly anaerobic betaproteobacterium *Georgfuchsia toluolica* gen. nov., sp. nov. degrades aromatic compounds with Fe(III), Mn(IV) or nitrate as an electron acceptor. *FEMS Microbiology Ecology* 70:243–253
 236. Weidemeier T. H., Chapelle F. H. (1998) Technical guidelines for evaluating monitored natural attenuation of petroleum hydrocarbons and chlorinated solvents in ground water at Naval and Marine Corps facilities: Internal report prepared for Southwest Division Naval facilities Engineering Command, Southern Division Naval facilities Engineering Command, and Engineering Field Activity, Northwest.
 237. Weissbrodt D. G., Neu, T. R., Kuhlicke U., Rappaz Y., Holliger, C. (2013) Assessment of bacterial and structural dynamics in aerobic granular biofilms. *Frontiers in Microbiology* 4, 175.
 238. WHO (2010): Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, *WHO IARC*, 92
 239. Widdel F., Rabus R. (2001) Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* 12:259–276

240. Wilson L.P., Bouwer E.J. (1997) Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 18:116-130.
241. Winderl C., Anneser B., Griebler C., Meckenstock R. U., Lueders T. (2008) Depth-resolved quantification of anaerobic toluene degraders and aquifer microbial community patterns in distinct redox zones of a tar oil contaminant plume. *Applied and Environmental Microbiology* 74:792–801
242. Winderl C., Schaefer S., Lueders T. (2007) Detection of anaerobic toluene and hydrocarbon degraders in contaminated aquifers using benzylsuccinate synthase (bssA) genes as a functional marker. *Environmental Microbiology* 9:1035–1046
243. Xie C. H., Yokota A. (2006). *Zoogloea oryzae* sp. nov., a nitrogenfixing bacterium isolated from rice paddy soil, and reclassification of the strain ATCC 19623 as *Crabtreeella saccharophila* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systemetic and Evol Microbiology* 56, 619–624.
244. Yang G., Chen S., Zhou S., Liu Y. (2015) Genome sequence of a dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium *Geobacter soli* type strain GSS01T. *Standandards in Genomic Sciences* 10:118
245. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. (2012) Primer BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13:134.
246. 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.
247. Yin S. N., Li G. L., Tain F. D., Fu Z.-I., Jin C., Chen Y. J., Luo S. J., Ye P. Z., Zhang J. Z., Wang G. C., Zhang X. C., Wu H -N., Zhong Q. C. (1987) Leukaemia in benzene workers: a retrospective cohort study. *British Journal of Industrial Medicine*, 44: 124-128
248. Young W., Egert M., Bassett S.A., Bibiloni R. (2015) Detection of sialic acid-utilising bacteria in a caecal community batch culture using RNA-based stable isotope probing. *Nutrients* 7, 2109-2124.
249. Zedelius J., Rabus R., Grundmann O., Werner I., Brodkorb D., Schreiber F., Ehrenreich P., Behrends A., Wilkes H., Kube M., Reinhardt R., Widdel F. (2011) Alkane degradation under anoxic conditions by a nitrate-reducing bacterium with possible involvement of the electron acceptor in substrate activation. *Environmental Microbiology Reports* 3: 125-135.
250. Zengler K., Heider J., Rossello-Mora R., Widdel F. (1999) Phototrophic utilization of toluene under anoxic conditions by a new strain of *Blastochloris sulfoviridis*. *Archives of Microbiology* 172:204–212
251. Zhang L., C. Zhang, Z. Cheng, Y. Yao, J. Chen (2013) Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by the bacterium *Mycobacterium cosmeticum* byf-4 *Chemosphere* 90, 1340–7.

252. Zhao Y., Huang J., Zhao H., Yang H. (2013). Microbial community and N removal of aerobic granular sludge at high COD and N loading rates. *Bioresource Technology* 143, 439–446.
253. Zhou J., Fries M.R., Chee-Sanford J.C., Tiedje J.M. (1995) Phylogenetic analyses of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth on toluene and description of *Azoarcus tolulyticus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45, 500–506.
254. Zhou Y., Kellermann C., Griebler C. (2012) Spatio-temporal patterns of microbial communities in a hydrologically dynamic pristine aquifer. *FEMS Microbiology Ecology* 81, 230–242.
255. Zhuang K., Izallalen M., Mouser P., Richter H., Risso C., Mahadevan R., Lovley D. R. (2011) Genome-scale dynamic modeling of the competition between *Rhodoferrax* and *Geobacter* in anoxic subsurface environments. *ISME Journal* 5:305–316.

Internetes hivatkozások

256. http://www.genomics.cn/en/navigation/show_navigation?nid=2640
257. <https://www.portfolio.hu/gazdasag/a-mol-termeli-a-legtobb-gdp-t.78248.html>

8.2 Az éves monitoring során tervezett SNuPe primerek

cél	primer szekvencia	várt termék hossza (bp)	detektált hossz (bp)	beépülő bázis*
A klaszter	5' CTT GAT CAC ATT GCA CTT GTA 3'	22	28	T
B klaszter	5' (T) ₃ CGG CAT CAA GAC AGA CCT GCT 3'	25	30	A
C klaszter	5' (T) ₆ CAT AGA GGC CTA CGG TAT CGC 3'	28	32	A
D klaszter	5' (T) ₉ GTT GGC CGC ATG CTG AAA TTT 3'	31	36	A
E klaszter	5' (T) ₁₂ CAG GCC GCC ACA TGG CTG ACA 3'	34	38	T
F klaszter	5' (T) ₁₅ TGG CCA AGA ACC GCA CCC GCA 3'	37	40	T

8.3 A kísérletek során használt speciális táptalajok

8.3.1 A stabil izotópos dústásnál használt tápoldat összetétele

A SIP kísérlet során használt tápoldat az alábbi összetevőkből áll:

20 ml anaerob médium: 1 literre; 50 g NaCl, 20 g MgCl₂ x 6H₂O, 10 g KH₂PO₄, 12.5 g NH₄Cl,
25 g KCl.

30ml NaHCO₃ (1M) puffer: 1 literre 84 g NaHCO₃

1ml vitamin oldat: 200 ml-re: 10 mg-10 mg B₁₂, B₁₀, B₁, 2 mg B₇, 20 mg nikotin, 50 mg B₆ és
5 mg B₅,

2ml szelenit-volfrám oldat: 1 literre: 0,5g NaOH, 3g Na₂SeO₃ x 5 H₂O, 4mg Na₂WO₄ x 2H₂O

2 ml ásványi tápanyag oldat 1 literre: 10.00 ml HCl (25%; 7,7M), 1,5 g FeCl₂ x 4 H₂O, 70 mg
ZnCl₂, 100 mg MnCl₂ x 4 H₂O, 36 mg H₃BO₃, 190 mg CoCl₂ x 6
H₂O, 2mg CuCl₂ x 2 H₂O, 24 mg NiCl₂ x 6 H₂O, 36 mg Na₂MoO₄x
2 H₂O

1 ml 10mM cAMP oldat

8.3.2 A vasredukáló mikroorganizmusok dúsítására használt tápoldatok összetétele

A tápoldat összetétele alapesetben: 0,55 g K_2HPO_4 ; 0,125 g KH_2PO_4 ; 0,5 g NH_4Cl ; 0,25 g élesztőkivonat; 450 ml desztillált víz. Az elegyet $121^\circ C$ -on, 15 percen át autoklávban sterilizáltuk. A tápleveshez ezután 0,2 μm -es pórusátmérőjű fecskendőszűrőn keresztül vagy 0,05 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ és 0,2 g $MgCl_2$ 50 ml-es vizes oldatát adtuk.

A baktériumok megfelelő növekedése érdekében az 500 mL térfogatú elegyekhez vitaminokat: 0,5 ml B_1 (1 mg/ml), 5 μl B_{12} (2 mg/ml), 5 μl biotin (1,5 ng/ml) és 0,5 ml ásványi anyag komplexet kevertünk.

Az ásványi anyag komplex összetétele: 14 g $FeCl_2 \cdot 4H_2O$; 0,1 g $ZnCl_2$; 0,015 g H_3BO_3 ; 0,175g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,15g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 0,02g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 0,01g $NiCl_2 \cdot 6H_2O$; 1000 ml dH_2O .

A szénforrásként használt acetát oldat összetétele: 0,415 g $C_2H_3NaO_2$ 5 ml dH_2O , melyet szűrve adtuk a tápoldathoz.

FeNTA(nitrilotriecetsav) elkészítése:

100 mM-os oldat: 1,64 g $NaHCO_3$ -ot feloldunk 80 ml vízben, majd hozzáadunk 2,56 g nitrilotriecetsav-trinátriumsót és 2,7 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ -t.

Az oldatot filteren keresztül sterilizáljuk, majd nitrogéngázzal kihajtjuk belőle az oxigént.

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Táncsics András és Dr. Szoboszlai Sándor konzulenseimnek a rengeteg segítséget, tanácsot és támogatást melyekkel segítettek szakmai fejlődésemet, bővítették tudásom és formálták szemléletem.

Dr. Kriszt Balázs intézetigazgatónak, hogy lehetővé tette a munkák megvalósulását.

Dr. Benedek Tibornak hálás vagyok, hogy részt vállalt a kísérletek elkészítésében és kiértékelésében. Köszönöm Dr. Tillmann Lüdersnek valamint Szalay Annának, hogy megismertettek a stabil izotópos vizsgálatok kivitelezésével. Köszönettel tartozom Dr. Tóth Erikának és munkatársainak az új faj leírásában nyújtott segítségért, valamint Dr. Szabó Lászlónak a fáziskontraszt-mikroszkóppal és transzmissziós elektronmikroszkóppal történt vizsgálatokért.

Köszönöm továbbá a Regionális Egyetemi Tudásközpont és a Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszék minden dolgozójának, akik nélkül dolgozatom nem jöhetett volna létre.

Végül családomnak, és barátaimnak szeretnék köszönetet mondani a türelemért, és a bátorításért, ami végig segített a doktori munkám során, és a dolgozatom elkészítésekor.

A munkát az OTKA PD 104307 és TÉT 12 DE-1-2013-0007 pályázatok segítették.