

Opponensi vélemény

Táncsics András: Kőolajeredetű szénhidrogénekkal szennyezett, oxigén-limitált felszín alatti közegek mikrobiális ökológiája
c. MTA doktori értekezéséről

A monoaromás szénhidrogének, az ún. BTEX vegyületek (a benzol, a toluol, az etilbenzol és a három xilol izomer) a szénhidrogének világméretű és széleskörű kitermelése, feldolgozása és felhasználása következtében gyakori szennyezői a talajoknak és talajvizeknek. A felszín alatti közegek BTEX-szennyezése általában földalatti tárolótartályokból szivárgó kőolajjal és üzemanyaggal, oldószeralapú festékek gyártásával és gázfeldolgozó üzemek tevékenységével hozható összefüggésbe. A BTEX vegyületek vízdékony tulajdonsága és nagyfokú toxicitása miatt, valamint a környezetnek ezekkel a vegyületekkel való jelentős mértékű szennyeződése folytán, napjainkban fokozódó igény mutatkozik olyan hatékony módszerek kifejlesztésére és alkalmazására, melyekkel ezen vegyületek által okozott környezeti károk minimalizálhatók vagy megszüntethetők. Ezek közé tartoznak a környezetkímélő és költséghatékony biológiai kármentesítési eljárások, melyek mikroorganizmusok anyagcsere képességeit használják fel a szennyező anyagok lebontására vagy átalakítására. A BTEX vegyületekhez köthető szennyezések felszámolására irányuló bioremediációs folyamatokat megalapozó és elősegítő felfedező kutatások jelentősége ezért környezetvédelmi, nemzetgazdasági és humánegészségügyi szempontból is kiemelkedő jelentőséggel bír.

Táncsics András MTA doktori értekezésében az I.2.C alcsaládba tartozó extradiol-dioxigenáz enzimmel rendelkező és diverz *C23O* géneket hordozó mikroszervezetekkel kapcsolatos kutatásai eredményeit foglalta össze. Ezeknek a baktériumoknak fontos szerepük lehet a hazai felszín alatti közegeket ért BTEX szennyezések lebontásában, ezért az értekezés témaválasztása és a kutatási téma aktualitása mind hazai, mind nemzetközi vonatkozásban megkérdőjelezhetetlen. Az értekezésben tárgyalt kutatási eredmények a bioremediációs munkát végző szakemberek számára is értékes és a napi gyakorlatban is alkalmazható új ismeretekkel szolgálnak.

Az értekezés a szerző eddigi teljes, több mint 10 éves szakmai munkásságát öleli fel. A disszertáció 13 neves (köztük 9 Q1-es minősítésű) nemzetközi szakmai folyóiratban publikált eredményen alapul, melyek közül a szerző 9 publikációban terminális illetőségű (5 első és 4 utolsó szerzős közleménnyel). Ezeken felül az értekezéshez szorosan kapcsolódóként jelölt meg további 2 Q1-es publikációt, melyekben szintén első, illetve utolsó szerző. Táncsics András publikációs tevékenysége nemzetközileg is elismerésre méltó, és maradéktalanul eleget tesz az MTA doktori címmel kapcsolatos kívánalmaknak.

A 199 számozott oldal terjedelmű MTA doktori értekezés hagyományos szerkezeti felépítésű (Bevezetés, Irodalmi áttekintés, Kutatási célkitűzések, Anyag és módszer, Eredmények és megbeszélés, Eredmények összegző megbeszélése, Összefoglalás, Rövidítések jegyzéke, Irodalomjegyzék), 73 ábrát és 15 táblázatot tartalmaz. Formai szempontból kifogásolható, hogy az értekezésben szereplő ábrák és táblázatok nagyon különböznek egymástól pl. a méretük (bizonyos esetekben indokolatlanul nagy, lásd pl. 36.,

64. ábrák és az 1., 11., 12. táblázatok, utóbbiakat akár függelékként is szerepelhetnének), a felbontásuk minősége (pl. 14. ábra), az alkalmazott betűtípus és betűméret tekintetében is. Egyes, nem saját (pl. 3-5.) ábrák esetében a forrás nincs megadva, máshol az ábra címében megadott információ nem elégséges ahhoz, hogy az önmagában is értelmezhető legyen (pl. 51., 55., 59. ábrákon hiányzik a mintajelölések feloldása, vagy az 58. A, B, C, D ábrán a különbségek a magyarázata). Egyes, feltehetően az angol nyelvű szakcikkekéből átvett táblázatokban szereplő számértékeknel a tizedesvessző helyett pont szerepel (pl. 3., 4., 5., 8., 11., 15. táblázat), és néhány mértékegység írásmódja sem egységes (pl. „ μ l” és „ μ L”).

Az értekezés megfogalmazása érthető és világos, a magyar szaknyelv használata szabatos és pontos. Gépelési, elírási és megfogalmazási hibák (pl. „által lettek elvégezve” 49. o.) csak szórványosan fordulnak elő benne (ezeket a hozzám eljutott pdf fájlban jelöltem). Itt jegyzem meg, hogy az "archaeabaktériumok" megnevezés ma már nem használatos, ráadásul félrevezető is, hiszen összemosza az Archaea és a Bacteria domének elkülönülését.

Az értekezés *Bevezetés* c. fejezetében a szerző rövid történeti áttekintést ad a szénhidrogének felhasználásával párhuzamosan megjelenő környezetszennyezések problémájáról és a mikroorganizmusok részvételéről a szénhidrogének biodegradációjában, kiemelve a hipoxikus környezetekben mikrobiális anyagcsere folyamatok révén zajló monoaromás szénhidrogén-lebontással kapcsolatos tudományos ismeretek hiányosságait.

Az összesen 20 oldal terjedelmű *Irodalmi áttekintés* két fő fejezetre tagolódik, a kőolaj és származékai által okozott szennyezések bemutatására (II.1), valamint a kőolajeredetű szénhidrogének lebontásában résztvevő prokarióta mikroszervezetek diverzitásának ismertetésére (II.2). Az első részbe tartozó első két alfejezet (II.1.1 és II.1.2) olyannyira tankönyvszerűen tekint át a kőolajszármazékokat, az általuk okozott szennyezések eredetét, formáit, felszín alatti közegekben való terjedését, hogy mindössze egyetlen hivatkozást tartalmaz. Az ezt követő ábrákkal gazdagon illusztrált és logikus felépítésű (II.1.3-II.1.8) alfejezetek az alifás és a monoaromás szénhidrogének változatos mikrobiális lebontó útvonalain vezetik végig az olvasót az elmúlt közel harminc év publikációs eredményeinek áttekintésével. Ehhez kapcsolódóan kérdésként merül fel, hogyan definiálható a baktériumok „obligát alkanotróf” anyagcseretípusa? A kőolajeredetű szénhidrogének lebontásában résztvevő prokarióta mikroszervezetek diverzitását tárgyaló (II.2.1-II.2.6) fejezetek a teljesség igénye nélkül, főleg a Prince és mtsai (2019) által közölt összefoglalás alapján, taxonómiai besorolásuk szerint ismertetik a szénhidrogén-lebontó aktivitással rendelkező főbb prokarióta nemzetségeket és rendeket. Ezt a fejezetet talán célszerű lett volna kiegészíteni egy olyan összefoglaló táblázattal, ahol az egyes taxonok és a hozzájuk köthető szénhidrogén típusok/lebontási útvonalak együtt szerepelnek.

A *Kutatás célkitűzései* c. fejezetben a szerző elsődleges feladatáknak az I.2.C-típusú extradiol dioxigenázokat kódoló gének felszín alatti közegekből kimutatható diverzitásának feltárását és az ezekkel a génekkel rendelkező mikroszervezetek magyarországi kárhelyeken előforduló BTEX-vegyületek lebontásában játszott szerepének tisztázását jelölte meg. A kutatási célok megvalósítása érdekében a szerző jól megtervezett és szervesen egymásra épülő *in situ* kísérletek és laboratóriumi vizsgálatok sokaságát végezte el.

Táncsics András kutatói munkásságának egyik kiemelkedő érdeme, hogy kutatási céljai megvalósításához nemcsak adekvát módon alkalmazta a rendelkezésére álló módszertani repertoár gyakran legmodernebb eszközeit, hanem több esetben célzott módszertani fejlesztést is végzett, amit az értekezés (24 oldalas) *Anyag és módszer* c. fejezete is jól tükröz. A szerző ebben a fejezetben részletezi a klasszikus tenyésztésen alapuló mikrobiológiai módszereket (dúsító tenyészetek létrehozását, baktériumtörzsek izolálását), a környezeti mintából és tiszta tenyészetekből kiinduló DNS és RNS kivonásra épülő, filogenetikai és funkciógén alapú molekuláris biológiai vizsgálatokat, továbbá a molekuláris közösségelemző (TRFLP, SNUPE, klónkönyvtár elemző, metagenomikai) technikákat és végül a stabil izotópos jelölésen alapuló, valamint a polifázikus taxonómiai leírást megalapozó vizsgálati metodikákat. Észrevételként jegyzem meg, hogy az egyes módszerekről szóló rövid bevezetőket célravezető lett volna minden esetben ebben a fejezetben elhelyezni az Eredmények és megbeszélés (pl. V.3.6., V.5.1.) fejezetei helyett. Az értekezés módszertani fejezetében a szerző sajnálatosan nem tért ki a vizsgált kárhelyek bemutatására, a mintavétel körülményeinek, technológiájának és idejének a leírására (vagy ezekre csak egy későbbi alfejezetben kerül sor). A mintavétel feltehetően aszeptikus és nem „steril” körülmények (36. o.) között történt. A fejezet apróbb pontatlanságának tekintem, hogy a koncentráció mértékegységénél angol rövidítések (pl. w/v, v/v) szerepelnek a magyar (pl. m/V, V/V) helyett (pl. 38. o., 50. o.). Egyes rövidítések (pl. PDMS, 38. o.; SAP enzim, 47. o.; LB táplemez, 48. o.) feloldása nem található meg sem a szövegben, sem a Rövidítések jegyzékében. A fejezethez kapcsolódóan a kérdéseim a következők: Milyen volt a baktériumtörzsek izolálásához használt R2A táptalajnak és a szénhidrogén-lebontó baktériumok dúsítására használt tápleveseknek a pH-ja? Miért alkalmaztak eltérő hőmérsékleti értéket (28°C vs. 15°C) a szénhidrogén-bontó és a vas-redukáló dúsító tenyésztések során? A 16S rDNS Roche 454 piroszekvenálási és Illumina MiSeq szekvenálási adatainak bioinformatikai értékelése során az OTU-k megállapításánál miért használtak különböző (98%-os és 97%-os) hasonlósági értékeket? Az értekezés *Anyag és módszer* c. fejezetének hiányosságaként értékelem, hogy a szerző nem tért ki (és nem is hivatkozott) arra, hogy a tenyésztéses és molekuláris biológiai vizsgálatokból származó különböző típusú szekvencia adatokat milyen adatbázisban helyezte el és tette a nyilvánossá.

Az értekezés legfontosabb és egyben tudományos szempontból legértékesebb részét a 92 oldal terjedelmű, 7 alfejezetre tagoló *Eredmények és megbeszélés* c. fejezet képezi. Az első (V.1) alfejezetben a szerző három magyarországi BTEX-vegyületekkel szennyezett kárhelyen, oxigén-limitált talajvizekben előforduló mikrobaközösségek 16S rRNS gén alapú taxonómiai és I.2.C-típusú *C23O* gén alapú funkcionális diverzitás vizsgálatának eredményeit ismerteti. Klónkönyvtár elemzésekkel mindegyik mintavételi helyen a Burkholderiales rend képviselőinek (*Rhodofera*, *Dechloromonas*, *Malikia*, *Acidovorax*) dominanciáját mutatták ki. A szennyezett és a kontroll minták *C23O* T-RFLP elektroferogramjai között jelentős különbséget tártak fel. A következő (V.2-V.3) alfejezetben a siklósi BTEX-vegyületekkel szennyezett kárhely talajvíz mikrobaközösségeinek RNS alapú vizsgálatával az I.2.C-típusú *C23O* gének *in situ* expressziójára derítettek fényt, és kísérletesen igazolták, hogy a korábban univerzálisnak tekintett *C23O* primerpár alkalmazása a mintákban domináns Comamonadaceae család tagjai esetében nem eredményezett PCR terméket. Az ezt követően

a kárhelyen RNS alapon végzett egy éves monitorozó vizsgálatokhoz a szerző és mtsai kifejlesztettek és környezeti minták felhasználásával sikeresen optimalizáltak egy az I.2.C *C23O* alcsaládra specifikus (XylE3 elnevezésű) primerpárt. A szennyezési csóva középpontjából havi gyakorisággal vett talajvízminták 16S rRNS gén alapú T-RFLP módszerrel végzett elemzésével megállapították, hogy a mikrobaközösség faji összetétele a vizsgált időszakban közel állandó volt, de a relatív abundancia viszonyokban jelentős változások mutatkoztak. Az újonnan tervezett *C23O* primerpár segítségével a mintákból 6 különböző I.2.C típusú *C23O* csoportot azonosítottak, melyek expressziós mintázatának monitorozására elsőként alkalmazták a „Single-Nucleotide Primer Extension” (SNuPE) módszert. A domináns baktériumok és a funkciógén expressziós mintázatok statisztikai elemzésével a *Rhodoferrax* nemzetség és a Rhodocyclaceae család még tenyésztésbe nem vont képviselőit valószínűsítették potenciális BTEX-bontókként mikroaerob körülmények között. Az értekezés V.4 fejezetében a szerző egy szintén hazai kárhelyen gázolajjal szennyezett talajvízben lévő perisztaltikus pumpa rozsdamentes acél felszínén kialakult biofilm mintából kitenyésztett Buc^T -jelű baktériumtörzs polifázikus taxonómiai jellemzését és *Zoogloea oleivorans* sp. nov. elnevezéssel a tudományra nézve új fajként történő leírását ismerteti. Az értekezés V.5 alfejezetében a szerző beszámol a siklői kárhelyen mikroaerob toluol lebontásra képes mikroszervezetek stabil izotópos jelöléssel (SIP) történő azonosításának eredményeiről. A talajvíz mintavételi kútból származó üledékminta inokulumként való alkalmazásával létrehozott mikrokozmosz kísérletben stabil szénizotópot tartalmazó tolullal ($^{13}C_7$ -toluol), mikroaerob körülmények között vizsgálták a vegyület biodegradációját. A laboratóriumi DNS alapú vizsgálat eredményeképpen három Burkholderiales rendbe sorolható és mikroaerob körülmények között toluol-bontó baktériumot azonosítottak, melyek közül a *Zoogloea oleivorans* esetében mRNS alapú vizsgálatokkal bizonyították, hogy az rendelkezik a hipoxikus környezetben toluol bontásra képes I.2.C-típusú katekol 2,3-dioxigenáz enzimet kódoló *C23O* génnel. Az értekezés V.6 alfejezetében a szerző bemutatja, hogy az előző kísérlet folytatásaként elvégezték a *Zoogloea oleivorans* Buc^T törzs teljes genomjának feltárását és ennek során olyan részleges *meta*-gyűrűhasítási útvonalat kódoló génklasztert mutatottak ki az általuk izolált és új fajként leírt baktériumból, ami korábban csak klórbenzol bontására képes *Pseudomonas* törzsekből volt ismert. Emellett a *Zoogloea oleivorans* Buc^T törzs genomjában két olyan génklaszterre is rábukkantak, melyek aromás gyűrű hidroxilációját végző enzimeket (a fenol-hidroxilázt és a toluol-dioxigenázt) kódolnak. A stabil izotópos kísérletből származó metatranszkriptom adatok illesztésével bizonyították, hogy a fenol-hidroxilázt kódoló gének alacsony aktivitása és toluol-dioxigenáz enzimet kódoló két gén jelentős aktivitás miatt a toluol gyűrűjének hidroxilációja toluol-cisz-dihidrodiol köztiterméken keresztül vezetett a 3-metilkatekol képződéséhez. Végül az értekezés V.7 alfejezetében a szerző három aerob és mikroaerob mikrokozmosz kísérlet eredményeit elemzi. A kiindulási biofilm minta és az 5 hetes dúsítási kísérletek baktériumközösségeinek összetételét Illumina 16S rDNS amplikon szekvenálással, az I.2.C-típusú *C23O* gének diverzitását molekuláris klónozással tárták fel és hasonlították össze. Ennek során megállapították, hogy bár mindkét dúsító tenyészetben a Burkholderiales rend képviselői váltak dominássá a dúsítás során, az aerob körülmények a *Malikia*, a mikroaerob környezet az *Acidovorax* nemzetség képviselőinek kedvezett. Az eltérés az I.2.C-típusú *C23O* gének diverzitásában is megmutatkozott. A kizárólag egyetlen szénforrást (benzolt, toluolt

vagy etilbenzolt) tartalmazó dúsító tenyésztések során sikeresen felszaporítottak és izoláltak egy *Malikia spinosa* fajként azonosított törzset, melynek teljes genom szekvenálása alapján a törzs egy fenol-lebontásért felelős gén klaszter tagjaként rendelkezett az I.2.C-típusú C23O génnel, és képes volt a benzol, a toluol és az etilbenzol aerob úton történő lebontására. Végül a kőolaj/gázolaj keverékkel kiegészített dúsító tenyészetek összehasonlító vizsgálata rámutatott arra, hogy a nyíltláncú alkánok esetében is különbözött egymástól az aerob és a mikroaerob körülmények között adaptálódott baktériumközösségek összetétele.

Az *Eredmények összegző megbeszélése* c. (7 oldalas) fejezetben a szerző összegzi a komplex módszertani megközelítéssel elvégzett, szerteágazó munka legfontosabb eredményeit, bár az új tudományos eredmények tézisszerű kiemelése elmaradt.

Az értekezés végén található (2 oldalas) *Összefoglalás* c. fejezetben a szerző tágabb kitekintésben világít rá több mint 10 éves kutatási munkája eredményeinek mikrobiális ökológiai jelentőségére.

Az értekezést záró 259 irodalmi hivatkozást felsorakoztató *Irodalomjegyzék* c. fejezet a szerzőnek a témában való széleskörű tájékozottságáról ad tanúbizonyságot.

A bírálónak az értekezéssel kapcsolatos kérdései a következők:

– Milyen kísérletek történtek eddig (szakirodalmi adatok és saját tapasztalok alapján) a BTEX-vegyületekkel szennyezett területeken világszerte gyakran domináns szervezetként kimutatott *Rhodofera* baktériumok kitenyésztésére? Mi lehet az eddigi sikertelenség oka? Segítheti-e a metagenom összeszereléssel létrehozott teljes bakteriális genom ismerete a tenyésztés eredményességét?

– Meckenstock és mtsai (2015) kutatási eredményei alapján az valószínűsíthető, hogy oxigén-limitált környezetekben a baktériumok szénhidrogénbontó aktivitása a szennyezési csóva szélénél (kisebb szennyezőanyag és nagyobb oxigén koncentráció mellett) a legerősebb. Ennek ismeretében milyen módszerekkel és hogyan monitorozná ma a siklósi kárhelyet? Miben várna eltérést a korábban a csóva középpontjában végzett kutatás eredményeihez képest?

– Kutatási eredményei alapján milyen konkrét javaslatokat tenne a vizsgált kárhelyek bioremediációjában résztvevő gyakorlati szakemberek számára?

Összefoglalva megállapítom, hogy Tánicsics András eddigi kiváló kutatói tevékenysége és a benyújtott MTA doktori értekezésben foglalt új tudományos eredmények kimagasló szakmai színvonala alapján méltó az MTA doktora cím elnyerésére. Javasolom a doktori értekezés nyilvános vitára bocsátását és sikeres védelem esetén az MTA doktora cím odaítélését.

Budapest, 2022. május 16.

Kériné Borsodi Andrea
habilitált docens

Eötvös Loránd Tudományegyetem
Mikrobiológiai Tanszék