MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Kőolajeredetű szénhidrogénekkel szennyezett, oxigén-limitált felszín alatti közegek mikrobiális ökológiája

Dr. Táncsics András



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet Molekuláris Ökológia Tanszék Gödöllő, 2021.

Tartalomjegyzék

I.	BEVEZETÉS	8
II.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	. 12
Ι	I.1. A kőolaj és származékai által okozott szennyezések	. 12
	II.1.1. A kőolajszármazékok általános jellemzése	. 12
	II.1.2. A kőolajszennyezés eredete, formái és terjedése felszín alatti közegekben	. 13
	II.1.3. A kőolaj és származékainak alifás szénhidrogén komponensei és azok biodegradációja	. 14
	II.1.4. A monoaromás szénhidrogének és biodegradációjuk	18
	II.1.5. A monoaromás szénhidrogének aerob úton történő biodegradációja	. 19
	II.1.6. Az aromás gyűrű aktivációjában résztvevő lebontási útvonalak és enzimek	. 19
	II.1.7. Az aromás gyűrű hasításában résztvevő lebontási útvonalak és enzimek	22
	II.1.8. A monoaromás szénhidrogének anaerob úton történő biodegradációja	26
Ι	I.2. A kőolajeredetű szénhidrogének lebontásában résztvevő prokarióta mikroszervezetek diverzit	tása
•		29
	II.2.1. Általános áttekintés	29
	II.2.2. Az Actinobacteria törzs főbb szénhidrogén-lebontó nemzetségei	30
	II.2.3. A Bacteroidetes törzs főbb szénhidrogén-lebontó nemzetségei	31
	II.2.4. A Firmicutes törzs főbb szénhidrogén-lebontó nemzetségei	32
	II.2.5. A Proteobacteria törzs főbb szénhidrogén-lebontó nemzetségei	32
	II.2.6. Az Archaea domén szénhidrogén-lebontó képviselői	32
III.	A KUTATÁS CÉLKITŰZÉSEI	34
IV.	ANYAG ÉS MÓDSZER	36
Ι	V.1. Klasszikus mikrobiológiai módszerek	36
	IV.1.1. Mintavétel szénhidrogénekkel szennyezett közegekből – talajvíz és biofilm mintavétel.	36
	IV.1.2. Baktériumtörzsek izolálása környezeti mintákból	36
	IV.1.3. Szénhidrogén-lebontó dúsító tenyészetek létrehozása	37
	IV.1.4. Vas-redukáló dúsító tenyészetek létrehozása	. 38

	IV.1.5. BTEX-lebontási vizsgálatok GC-MS segítségével	. 38
Г	V.2. Alapvető molekuláris mikrobiológiai módszerek leírása	. 39
	IV.2.1. Nukleinsav (DNS, RNS) kivonás tiszta tenyészetekből és környezeti mintákból	. 39
	IV.2.2. RNS átírás cDNS-sé az RNS alapú vizsgálatokhoz	. 39
	IV.2.3. Filogenetikai és funkcionális markergének PCR amplifikációja	. 45
	IV.2.4. Sanger szekvenálás és filogenetikai elemzés	. 45
Г	V.3. Molekuláris közösségelemző módszerek leírása	. 46
	IV.3.1. A terminális restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (T-RFLP) módszere	. 46
	IV.3.2. A Single nucleotide primer extension (SNuPE) módszer	. 47
	IV.3.3. Klóntár készítés	. 48
	IV.3.4. Metagenom szekvenálás és adatelemzés	. 49
	IV.3.5. 16S rDNS amplikon szekvenálás – Roche 454 piroszekvenálás, Illumina ampli szekvenálás és adatelemzés	kon 50
	IV.3.6. Teljes genom szekvenálás és adatelemzés	. 52
Г	V.4. Stabil izotópos jelölés módszertana	. 53
	IV.4.1. A mikrokozmosz kísérlet felállítása	. 53
	IV.4.2. A mikrokozmoszok fenntartása, és a nukleinsav-izolálás	. 54
	IV.4.3. A mikrokozmoszokból izolált DNS grádiens centrifugálása és az elkülönített frakovizsgálata	ciók 54
	IV.4.4. A mikrokozmoszokból izolált RNS grádiens centrifugálása és az elkülönített frakovizsgálata	ciók . 55
Г	V.5. Polifázikus baktérium fajleírás módszertana	. 56
	IV.5.1. Telep- és sejtmorfológiai vizsgálatok	. 56
	IV.5.2. Biokémiai – élettani jellemzés	. 56
	IV.5.3. Izoprenoid légzési kinonok vizsgálata	. 57
	IV.5.4. Zsírsavprofil elemzés	. 57
	IV.5.5. DNS-DNS hibridizáció és G+C mólarány meghatározás	. 58
	IV.5.6. Az új baktériumfaj filogenetikai helyzetének megállapítása	. 58
V.	EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	. 60

V.1. BTEX-vegyületekkel szennyezett, oxigén-limitált talajvizek mikroba közösségeinek feltárása
V.1.1. A 16S rRNS és C23O gének diverzitásának vizsgálata három magyarországi kárhelyen . 60
V.1.2. A vizsgált talajvízminták fizikai-kémiai paraméterei
V.1.3. A <i>C230</i> gének kimutatása a talajvízmintákból 62
V.1.4. A C230 PCR termékek T-RFLP vizsgálata 62
V.1.5. A C230 klónszekvenciák filogenetikai vizsgálata65
V.1.6. A 16S rDNS klónszekvenciák filogenetikai vizsgálata67
V.1.7. A 16S rDNS és C23O klóntárak összehasonlító elemzése UniFrac módszer segítségével 70
V.1.8. Az eredmények összefoglalása – konklúziók 71
V.2. A siklósi BTEX-vegyületekkel szennyezett kárhely mikroba közösségeinek feltárása és az I.2.C-
típusú C23O gének in situ expressziójának vizsgálata
V.2.1. A szennyezett terület ismertetése
V.2.2. Az I.2.C-típusú C23O gének in situ expressziójának vizsgálata a siklósi mintákban 74
V.2.3. A kimutatott extradiol dioxigenázok filogenetikai vizsgálata
V.2.4. A <i>C230</i> transzkriptumok kvantifikációja
V.2.5. A mikrobaközösségek összetétele 79
V.2.6. Az eredmények összefoglalása – konklúziók 82
V.3. A siklósi BTEX-vegyületekkel szennyezett kárhely mikrobaközösségének egy éven át tartó
monitorozása
V.3.1. A vizsgálat célja, menete
V.3.2. Az I.2.C <i>C23O</i> alcsaládra specifikus primerpár
V.3.3. Környezeti változók alakulása a vizsgált talajvízben a monitoring időszak alatt
V.3.4. A mikrobaközösség összetételének 16S rDNS alapú monitorozása
V.3.5. Az I.2.C-típusú C23O gének diverzitásának és aktivitásának monitorozása
V.3.6. Az I.2.C-tipusú C23O gének expressziós mintázatának nyomonkövetése
V.3.7. Statisztikai összefüggések keresése az aktív mikrobaközösségek összetétele és a C23O
gének expressziós mintázata között94
V.3.8. A <i>Rhodoferax</i> nemzetségbe tartozó mikroszervezetek feldúsítására tett kísérlet

V.3.9. Összegzés		
V.4. Az I.2.C-típusó C23O génnel rendelkező Zoogloea oleivorans izolálása és új fajként történő		
leírása		
V.4.1. Baktériumtörzsek direkt izolálása kőolajszármazékkal szennyezett közegből		
V.4.2. A Zoogloea nemzetség általános jellemzése		
V.4.3. A Buc ^T -jelű törzs izolálása és filogenetikai helyzetének feltárása		
V.4.4. Az I.2.C-típusú C23O gén kimutatása, és a szénhidrogén-lebontási képesség igazolása. 101		
V.4.5. A Buc ^T törzs kemotaxonómiai vizsgálata102		
V.4.6. A Buc ^T törzs fenotípusos jellemzése		
V.4.7. A Buc ^T törzs elnevezése		
V.5. Mikroaerob toluol lebontásra képes mikroszervezetek azonosítása a siklósi kárhelyen stabil		
izotópos jelölés (stable isotope probing - SIP) módszerével		
V.5.1. Problémafelvetés és a stabil izotópos jelölés módszerének rövid ismertetése 106		
V.5.2. A ¹³ C ₇ -toluol mikroaerob biodegradációjának vizsgálatához kialakított mikrokozmosz kísérlet menetének rövid leírása		
V.5.3. A ¹³ C ₇ -toluol biodegradációja a mikrokozmoszokban 107		
V.5.4. A mikroaerob lebontó mikroszervezetek kimutatása és diverzitása DNS alapon 108		
V.5.5. Az I.2.C-típusú C23O gének diverzitásának vizsgálata a különböző DNS frakciókban 114		
V.5.6. A mikroaerob lebontó mikroszervezetek kimutatása és diverzitása RNS alapon 117		
V.5.7. Összegzés		
V.6. A Zoogloea oleivorans Buc ^T törzs genomjának feltárása és vizsgálata – a mikroaerob tolud lebontás képességének genetikai háttere		
V.6.1. A genom feltárásának célja120		
V.6.2. A Z. oleivorans Buc ^T trözs genomjának jellemzése		
V.6.3. A stabil izotópos kísérletből származó metatranszkriptóma adatok illesztése a Zoogloea oleivorans Buc ^T törzs genomjára		
V.6.4. Összegzés		
V.7. A mikroaerob szénhidrogén-lebontó mikroszervezetek diverzitásának feltárása dúsító tenyésztések segítségével		

dc_1786_20

	V.7.1. Előszó a dúsító tenyésztések eredményeit tárgyaló fejezethez 126
	V.7.2. Első kísérlet: BTEX-lebontó baktériumok összehasonlító dúsító tenyésztése aerob és
:	mikroaerob körülmények között 129
	V.7.3. Második kísérlet: a Malikia spinosa AB6-os törzs benzol-, toluol- és etilbenzol-lebontó
	képességének igazolása: dúsítás, izolálás és teljes genom analízis
	V.7.4. Harmadik kísérlet: kőolaj/gázolaj keverékkel kigészített, aerob és mikroaerob dúsító
	tenyészetek összehasonlító vizsgálata152
VI.	AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEGZŐ MEGBESZÉLÉSE 167
VII.	ÖSSZEFOGLALÁS 174
VIII.	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE177
IX.	IRODALOMJEGYZÉK

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

"Az ember nekimegy a meredeknek, nem néz máshová, csak oda, ahová lépni szándékozik. Közben megpihen. Azután hátrafordul, és elképedve látja azt a ködbe vesző hosszú utat, amelyet egy életen át maga mögött hagyott."

Hajós Alfréd

A mikrobiális ökológia iránti érdeklődésemet Márialigeti Károly professzor úrnak köszönhetem. Az Eötvös Loránd Tudományegyetem Mikrobiológia Tanszékén tőle kaptam meg azokat a kezdeti ismereteket és iránymutatásokat, amelyek később alapjaiban határozták meg tudományos pályámat. Hálás vagyok neki azért is, hogy szakmai, tudományos, de akár az élet bármely területét érintő kérdéseimmel bármikor felkereshettem Őt.

Köszönettel tartozom Kriszt Balázsnak és Szoboszlay Sándornak, akik a Szent István Egyetemen folytatott több mint tízéves kutatómunkámat a Regionális Egyetemi Tudásközpontban lehetővé tették, és folyamatosan támogatták szakmai előmenetelemet. Segítségük nélkül az itt bemutatott eredmények nem születhettek volna meg.

Köszönöm egykori és jelenlegi kollégáimnak, valamint doktorandusz hallgatóimnak, hogy lelkes és segítőkész munkájukkal tevékenyen járultak hozzá tudományos eredményeimhez. Külön köszönet illeti Farkas Milánt, akinek doktori munkája kulcsfontosságú tudományos felismerésekhez segített hozzá.

Külföldi kollégáim közül két embert kell megemlítenem, akik közös kutatómunkával, vagy akár csak szakmai tanácsokkal, de jelentősen hozzájárultak tudományos munkámhoz és emiatt köszönet illeti őket. E két kutató Tillmann Lüders és Hermann J. Heipieper.

Végül köszönettel tartozom szüleimnek és családomnak, azon belül is elsősorban feleségemnek, aki mindvégig támogatott, hitt bennem és együtt örült a sikereknek.

I. BEVEZETÉS

Az emberiség az utóbbi másfél évszázad alatt, ipari tevékenységének folyományaként oly módon alakította át környezetét, hogy talán bátran kijelenthetjük, a mai kor gyermekei már egy új földtörténeti kor, az Antropocén szülöttei. Bár e kifejezés, amelyet Eugene F. Stoermer ökológus használt először a mai értelmében, a földtudományok területén még hivatalosan nem elfogadott, általánosan elterjedté vált az utóbbi két évtizedben. Az e sorok írásakor 95 éves Sir David Attenborough, angol természettudós saját magát is egy előző kor (értsd Holocén) szülöttjének aposztrofálja. A modern ipari társadalmak kialakulásának alappillére volt a fosszilis energiahordozóknak, azon belül is a kőolajnak a mind nagyobb mértékű felhasználása. Az első modern kori olajkút 1854-ben történt megalkotása óta eltelt több mint másfél évszázad alatt azonban az ember visszavonhatatlanul megváltoztatta környezetét. Manapság a fosszilis energiahordozók kapcsán elsőként a légszennyezés, illetve az ebből fakadó globális klímaváltozás kerül előtérbe, mint a környezetvédelem első számú megoldásra váró, krónikus problémája. A kőolajkitermeléssel azonban szinte egyidős talajaink és vizeink kőolajszármazékokkal történő szennyezése is. Már a kőolajkitermelés hőskorában megtapasztalhatta az ember, hogy mekkora környezetromboló erőt szabadított ki a palackból, néha akár szó szerint értelmezhetően is. Erre jó példa a 20. század elején (1910) California államban működött "Lakeview Gusher Number One" nevezetű olajkút, amely az akkoriban még ismeretlen kitörésgátlók hiányában 18 hónapon át, gejzírszerűen ontotta magából az olajat, ezáltal 9 millió hordónyi (1,4 millió m³) olajjal beborítva környezetét. Ez nagyjából kétszer akkora mennyiség, mint ami a Deepwater Horizon tengeri fúrótorony 2010-ben történt kitörésekor a Mexikói-öböl vizébe ömlött. Azonban a kitermelés mellett a kőolaj vízi úton történő szállítása is nagy kockázatot jelenthet a tengeri ökoszisztémára nézve. Ezt jól példázza az Amoco Cadiz, vagy a közvélemény által talán jóval ismertebb, Exxon Valdez tankhajók balesetei 1979, illetve 1989-ben. Noha Magyarország a napi 14 000 hordónyi eredményével csak a 70. hely környékén található a kőolajkitermelő országok listáján, a leggyakoribb talajés talajvízszennyező anyagoknak a kőolaj, valamint a kőolajeredetű szénhidrogének számítanak. Ennek oka az, hogy nagyon sok olyan ipari tevékenység van, ahol kőolajat, kőolajszármazékokat tárolnak és a mindennapi tevékenység során (pl. átfejtésnél mellécsurgó anyag) vagy kisebb-nagyobb haváriák (vezetéktörés, földalatti tároló tartály korrózió általi sérülése) során éri szennyezés a különböző környezeti elemeket. Emellett több évtizeddel ezelőtti tevékenységekből is visszamaradtak olyan felszín alatti szennyezések, amelyek a mai dc_1786_20

napig jelen vannak. Erre jó példát mutatnak a katonai létesítmények, vagy a Péti Nitrogénművek Rt. egykori pétfürdői olajfinomító üzeme, amelyet a II. világháború során 1944. június 14-én ért bombázótámadás. Az ebből fakadó olajszennyezés pedig a mai napig jelen van az érintett pétfürdői iparterületen és okoz megoldandó problémát az ott működő cégeknek.

A kőolajeredetű szénhidrogének mikrobiológiáját elsőként Claude E. ZoBell vizsgálta mélyrehatóan, és e terület atyjaként tartják őt számon az Amerikai Egyesült Államokban (a tengeri ökoszisztémák mikrobiológiája mellett). Ezen a téren 1938-ban kezdett publikálni, és 1978-ig bezárólag 66 olyan tudományos művet közölt, amelyek témája a kőolaj, illetve a kőolajeredetű szénhidrogének mikrobiológiájához köthető. Bár kezdetben a kőolajat alkotó szénhidrogének mikrobiológiai eredetét, tehát genezisét kutatta, hamar felismerte a mikroorganizmusok szénhidrogén-lebontó szerepét is. A leggyakrabban idézett összefoglaló műve e témában 1946-ban született, amelyben az azt megelőző 50 év ismereteit összegzi (ZoBell, 1946). Meg kell jegyezni ugyanakkor, hogy ebben az időben a szénhidrogének mikrobiális biodegradációját, illetve a mikrobák ebbéli képességét marginális, ritkán megfigyelhető tulajdonságnak gondolták. Még Bushnell és Haas 1941-ben született klasszikus cikke is (Bushnell és Haas, 1941) – amelyben a kerozin, a benzin és különféle ásványi olajok mikrobiális lebontásáról értekeztek - kevés visszhangot kapott, eredményeiket kétkedéssel fogadták. De ZoBell kutatásai előremutatóak voltak abban a tekintetben is, hogy korán felismerte azt a veszélyt, amelyet a nagy olajtanker hajók, illetve ezek zátonyra futásaihoz köthető szennyezések és azok mérete jelenthet a tengeri és tengerparti ökoszisztémákra (ZoBell, 1963). Az ezt követő években folyamatosan leírásra kerültek az aromás és alifás szénhidrogének aerob úton történő lebontásáért felelős enzimek, illetve metabolius útvonalak (Hegeman, 1966; Peterson és mtsai, 1967; Feist és Hegeman, 1969). Egyre több könnyen tenyészthető baktérium és mikroszkópikus gomba fajról vált ismertté, hogy képes egy, vagy több kőolajeredetű szénhidrogént szén- és energiaforrásként hasznosítani. Bartha és Atlas (1977) 22 baktérium, 1 alga és 14 gomba nemzetséget sorol fel, amelyekbe szénhidrogénlebontásra képes fajok tartoznak. E baktériumok azonban kivétel nélkül aerob vagy fakultatív anaerob mikroszervezetek. Ugyanis még az 1980-as évek elején is az a nézet volt elfogadott, miszerint a szénhidrogének lebontása anaerob körülmények között egy elhanyagolható mértékű folyamat. Még Ronald M. Atlas, a szénhidrogén biodegradáció egyik kiemelkedő kutatója is mint negligálható folyamatról írt ekkoriban, bár anaerob szénhidrogén-lebontásra képes baktériumok létezését nem zárta ki (1981). Mindeközben egyes kutatók már közzétettek eredményeket az anaerob szénhidrogén-lebontás területén (Evans, 1977), mégis csak az 1980as évek vége felé kezdtek a kutatás középpontjába kerülni az anaerob szénhidrogén-lebontásra képes mikroszervezetek és a folyamatban kulcsszerepet játszó enzimek. Ennek köszönhetően sorra leírásra kerültek olyan mikroszervezetek, amelyek nitrát-, szulfát-, vagy éppen Fe(III)redukció mellett, illetve metanogén körülmények között képesek egyes monoaromás, policiklusos vagy nyílt szénláncú szénhidrogének lebontására (Rabus és Widdel, 1995; Chakraborty és Coates, 2004; Meckenstock, 2004; Mbadinga és mtsai, 2011). Már a közelmúltban derült fény arra, hogy a nyersolajban előforduló 1-3 mikroliter térfogatú vízcseppekben is komplex, szénhidrogén-lebontó metanogén mikroba közösségek élnek (Meckenstock, 2014).

A fent leírtakból jól látható, hogy a szénhidrogén biodegradáció széleskörűen kutatott területévé vált a mikrobiológiának. Ennek megfelelően ismereteink is elmélyültek e szakterület sok kérdését illetően az utóbbi egy-két évtizedben. De melyek maradtak a megválaszolatlan kérdések? Vannak-e még egyáltalán ilyenek? Ha átnézzük a téma szakirodalmát, akkor látható, hogy az ismereteink nagy részét olyan baktériumoknak köszönhetjük, amelyek - ha olykor nehezen is - de izolálhatóak, illetve valamilyen formában tiszta tenyészetben fenntarthatóak. Régóta ismert azonban a "great plate anomaly" jelensége (Staley és Konopka, 1985), miszerint a létező baktériumfajoknak mindössze 1%-át vagyunk képesek klasszikus mikrobiológiai módszerekkel tiszta tenyészetben fenntartani (Solden és mtsai, 2016). A maradék 99% a baktériumok rejtett világa, vagy a mai divatos fogalommal élve a "microbial dark matter", azaz a mikrobiális sötét anyag (Solden és mtsai, 2016). Az ide tartozó mikroorganizmusok jelentős részét alkotják a Föld biomasszájának és biodiverzitásának, mégis legtöbbjük esetében elenyészően keveset tudunk az alapvető metabolikus képességeikről, és ebből fakadóan az ökológiai szerepükről. A mai modern, tenyésztéstől független molekuláris módszerek, mint például a különböző metagenomikai vagy egy-sejt mikrobiológiai módszerek segítségével egyre több "kitenyészthetetlen" mikroszervezetről derül ki, hogy in situ körülmények között jelentős szerepe van a szénhidrogének biodegradációjában (Mason és mtsai, 2012; Marozava és mtsai, 2018; Kraiselburd és mtsai, 2019). A szakirodalmat értő szemmel olvasva feltűnő az is, hogy a terület kutatói előszeretettel vizsgálják vagy a teljesen aerob, vagy pedig az anaerob körülmények közötti szénhidrogén-lebontást. Felszín alatti közegek szennyezése során az aerob lebontó mikroszervezetek aránylag gyorsan elfogyasztják az amúgy is limitáltan rendelkezésre álló oxigént és anaerob körülmények jönnek létre. Ebből a szemszögből nézve indokolható is az a tény, hogy az utóbb két évtizedben "divattá" vált azon mikroszervezetek kutatása, amelyek anaerob úton képesek kőolajeredetű szénhidrogének lebontására. Azt azonban a téma legkiválóbb képviselői is elismerik, hogy szignifikáns mértékű biodegradáció csak a szennyezési csóva szélein történik, ahol rendelkezésre állnak a lebontást támogató elektronakceptorok, és azok közül is elsősorban az oxigén. Ennek ellenére elenyésző azon tanulmányok száma, amelyek az aerob-anaerob határterületeken aktív lebontó mikroszervezeteket vizsgálják. Nagyon kevés ismerettel rendelkezünk arról, hogy melyek azok a baktériumok, amelyek hipoxikus körülmények között (<2 mg/L oldott oxigén koncentráció), vagy akár nyomnyi mennyiségű oxigén jelenlétében is képesek aerob lebontási útvonalakat használva, szén- és energiaforrásként hasznosítani e vegyületeket. E kérdésnek jelentős gyakorlati vonatkozása is van, hiszen a kőolajeredetű szénhidrogénekkel szennyezett felszín alatti közegek kármentesítése során gyakran alkalmazott módszer a közeg fizikai átlevegőztetése, vagy kémiai úton történő oxigén utánpótlása (pl. hidrogén-peroxid injektálása). Ezt felismerve vállalkoztunk arra, hogy feltárjuk azon baktériumok diverzitását, amelyek a mikroaerob körülmények közötti aromás szénhidrogén-lebontáshoz adaptálódtak, és hogy végső soron feltárjuk e képesség genetikai hátterét.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

II.1. A kőolaj és származékai által okozott szennyezések

II.1.1. A kőolajszármazékok általános jellemzése

A kőolajat főként szerves vegyületek, azon belül is majdnem kizárólag szénhidrogének alkotják. Ez az általában sötét színű, sűrűn folyó anyag igen sok – ezernél is több – szénhidrogén komponenst tartalmaz, mely összetevők külön-külön is ártalmasak lehetnek, de sok esetben egymás hatásait felerősítve a legveszélyesebb környezeti mikroszennyezők közé tartoznak. A különböző alkotóelemek aránya a földrajzi származás helyének függvényében változik. Ennek megfelelően az ásványolaj színe is eltérő lehet, és a világosbarnától a feketéig terjedhet. Szintén az összetételtől függ a konzisztenciája, amely a könnyen folyótól ("könnyűolaj") a szinte szilárd anyagig ("nehézolaj") sokféle lehet. Szokás megkülönböztetni még kis kéntartalmú ("édes"), illetve nagy kéntartalmú ("savanyú") olajokat. A nyersolajok atmoszférikus desztillációs maradéka alapján további csoportosítás lehetséges. Ez alapján megkülönböztetünk paraffinbázisú, vagy más néven pennsylvániai típusú kőolajat, amelynek atmoszférikus maradéka sok paraffint és kevés bitument tartalmaz, illetve nafténbázisú, vagy más néven texasi típusú kőolajat, amelynek az atmoszférikus maradéka sok bitument és kevés paraffint tartalmaz.

A szénhidrogén molekula lehet telített vagy telítetlen, nyílt szénláncú, egy vagy több gyűrűs, melyekhez oxigén, kén- és nitrogén tartalmú vegyületek kapcsolódhatnak. A környezetegészségügyi szempontból legártalmatlanabb szénhidrogének a nyílt láncú, telített alkánok, míg a legveszélyesebbek a több gyűrűt is tartalmazó, zárt szénláncú vegyületek. A kis szénatomszámú (C1-C4) szénhidrogének alkotják a gáz frakciót (pl. metán, etán, propán, bután), a C5-C16 szénatomszám közöttiek folyadékok, C16 felett pedig egyre szilárdabb halmazállapotúak. Hazánkban a jelenleg hatályos 6/2009. (IV. 14.) "a földtani közeg és a felszín alatti víz szennyezéssel szembeni védelméhez szükséges határértékekről és a szennyezések méréséről" szóló KvVM-EüM-FVM együttes rendelet tartalmazza a környezetvédelmi szempontból kockázatos kémiai elemek és vegyületek listáját, továbbá a rájuk vonatkozó "B" szennyezettségi határértékeket külön a földtani közegre és a felszín alatti vizekre vonatkozólag. A kőolaj főbb alkotóelemeit a rendelet három kategóriába sorolja: alifás szénhidrogének (TPH), benzol és alkilbenzolok (BTEX), valamint policiklusos aromás szénhidrogének (PAH).

II.1.2. A kőolajszennyezés eredete, formái és terjedése felszín alatti közegekben

Mivel a kőolajeredetű szénhidrogéneket elsősorban üzemanyagok, fűtőanyagok és oldószerek (pl. kerozin, benzin, gázolaj, könnyű fűtőolajok) gyártásánál használjuk, a leggyakoribb szennyező iparágak és tevékenységek a kőolajbányászat (fúrótornyok és kutak), kőolaj feldolgozás (finomítók), szállítás (tankerek, csővezetékek), tárolás (tartályparkok) és forgalmazás (töltőállomások), a laktanyák területe, a közlekedés és a műanyaggyártás (petrolkémia). Ezek az anyagok a legveszélyesebb és egyben leggyakoribb szennyezők, amelyekkel környezetünket károsítjuk. Az illékony szénhidrogénekre jellemző, hogy a levegő oxigénjével elegyedve tűz-, és robbanásveszélyesek. A bőrön, nyálkahártyákon és a tüdőn keresztül is felszívódhatnak, legtöbbjük irritáló és toxikus hatású.

Magyarországon a szénhidrogének elsősorban a felszín alatti közegekre jelentenek komoly veszélyt. A mélyebb rétegekbe szivárogva a kémiai szerkezetüktől, koncentrációtól, a talaj tulajdonságaitól függően hosszabb-rövidebb ideig perzisztálhatnak a környezetben. Legkönnyebben biodegradálhatóak a TPH vegyületek, a szénatomszám növekedésével azonban a szénhidrogének bonthatósága jelentősen romlik. A talaj pórusaiból a vizet és az oxigént kiszorítva gátolják az oxidatív folyamatokat, ezzel is megnehezítve természetes lebomlásukat.

A felszíni- és felszín alatti vizek által messzire eljuthatnak, veszélyeztetve az ivó- és öntözővízbázisokat, valamint a természetes vizek élővilágát. A toxikus, mutagén, teratogén és karcinogén hatásokkal rendelkező szénhidrogének beléphetnek a táplálékláncba és akkumulálódhatnak az élőlényekben (Szoboszlay és Kriszt, 2010).

A szénhidrogének, speciális fizikai és kémiai tulajdonságaikból adódóan a különböző földtani és víztani közegekbe bejutva jellegzetes módon terjednek. Az olaj a nehézségi erő hatására lefelé húzódik a talajban. Ha elér egy kis áteresztőképességű réteget, az a szennyező anyag szétterülését eredményezi. Abban az esetben, ha a beszivárgott olajmennyiség meghaladja a szivárgási tartomány olajvisszatartó képességét, akkor elérheti a talajvizet és azzal együtt oldalirányban áramlik szét a víz felszínén. Ilyenkor a talaj kapilláris rétege jelentős mennyiségű olaj felvételére képes és a szennyezők akár évekig megmaradhatnak ebben a zónában. A talajvízszint süllyedése és emelkedése révén a szennyezőanyagok könnyen "szétkenődhetnek" az addig tiszta rétegekben is. Vannak olyan oldószerek, folyadékok, melyek sűrűsége nagyobb, mint a vízé, így ezekre jellemző, hogy a legfelső vízzáró réteg fölött, a talajvíz alján terülnek szét. Ha a fekü felszíne valamilyen irányban lejt, akkor ezek a szennyezőanyagok a gravitáció hatására akár a talajvíz áramlásával ellentétes irányban is szivároghatnak. A talajban mozgó olajtestből, ugyanúgy, mint a felszínen, könnyen

13

kipárologhatnak az illékony szennyezők, gőzökből álló "olajpárnát" alkotva a kiszivárgott olajtest körül. Ezek a gázok a szivárgó tartományban vándorló vízben oldódnak és növelik a talajvíz szennyeződését (Szoboszlay és Kriszt, 2010).

II.1.3. A kőolaj és származékainak alifás szénhidrogén komponensei és azok biodegradációja

E vegyületeket a nemzetközi szakirodalomban a "Total Petroleum Hydrocarbon – TPH" megjelöléssel illetik, és minden C5 és C40 közötti szénatomszámú szénhidrogént ide sorolnak. A magyar jogszabályok azonban csak az alifás, azaz nem aromás szénhidrogéneket sorolják ide. A TPH-n belül megkülönböztetünk 5-10 szénatomszámú, illékony (VALPH – Volatile Aliphatic Petroleum Hydrocarbon) és e feletti szénatomszámú kevésbé, vagy egyáltalán nem illékony (EPH – Extractable Petroleum Hydrocarbon) vegyületeket. A megkülönböztetés elsősorban a mintavétel és a kármentesítés módjának megválasztása miatt szükséges (Szoboszlay és Kriszt, 2010).

A normál alkánok, vagy *n*-alkánok a következő általános képlettel írhatók le: C_nH_{2n+2} . E vegyületek aránylag alacsony reaktivitásúnak számítanak, mivel a szénatomok mind a négy vegyértékükkel kovalens kötésben vesznek részt. Apoláros vegyületek, így vízben alig, vagy egyáltalán nem oldódnak (a szénatomszám növekedésével csökken a vízoldhatóságuk). A legegyszerűbb ide sorolható *n*-alkán, a pentán vízoldékonysága 0,1 g/l (20°C-on), míg a sorban következő vegyületé, a hexáné már csak 0,013 g/l (20°C-on). Az ennél hosszabb szénláncú alkánok már csak µg/l-es koncentrációban képesek a vízbe oldódni. Erősen apoláris tulajdonságuk másik következménye, hogy ionos és poláros tulajdonságú vegyületekkel szemben alacsony reakcióképességet mutatnak. A legtöbb *n*-alkán 50 feletti pKa értékkel jellemezhető, emiatt savakkal, illetve bázisokkal szemben gyakorlatilag inert vegyületeknek számítanak. Ugyanakkor redoxireakciókban, oxigénnel vagy halogénatommal reagálva aránylag könnyen részt vesznek.

Az alkánok mikrobiális biodegradációjára irányuló kutatások több mint 100 éves múltra nyúlnak vissza. Egy holland mikrobiológus, N. L. Söhngen volt az első, aki víz felszínén úszó olajfoltok mikrobiális biodegradációjáról hírt adott, illetve leírta, hogy e szénhidrogének szénés energiaforrásként szolgálhatnak egyes mikroszervezetek számára (1913). Ma már tudjuk, hogy a Bacteria domén számos törzsén belül találni ilyen képességgel rendelkező mikroszevezeteket, így például a Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes vagy éppen a *Deinococcus-Thermus* törzsek esetében (van Beilen és Funhoff, 2006). A prokariótákon kívül természetesen ismertek szénhidrogén-lebontásra képes mikroszkópikus

14

gombák (például az Aspergillus, Cladosporium, Corollasporium, Cunninghamella, Dendryphiella, Fusarium, Gliocladium, Lulworthia, Penicillium, Varicospora vagy a Verticillum nemzetségek egyes képviselői), illetve algák is (Prototheca zopfii) (van Beilen és mtsai, 2003). Hovatovább, ma már ismertek obligát alkanotróf baktériumok is, amelyek főleg tengeri ökoszisztémákból mutathatóak ki. E baktériumok az Alcanivorax, Marinobacter, Thallassolituus, Cycloclasticus és Oleispira nemzetségek képviselői, amelyek szénhidrogén-szennyezéstől mentes tengeri ökoszisztémákban csak nagyon kis gyakorisággal vannak jelen, ha egyáltalán ki lehet mutatni a jelenlétüket (Yakimov és mtsai, 2007). Ezzel szemben olajszennyezés hatására e baktériumok válhatnak dominánssá a tengervízben.

Az *n*-alkánok gyors biodegradációja alapvetően aerob körülmények között megy végbe, és a lebontás első lépését, az alkánok hidroxilációját különböző alkán-hidroxiláz enzimek végzik el, függően a szénlánc hosszától (1. ábra). A kis szénatomszámú alkánok, tehát C₁-C₄ vegyületek esetében metán-monooxigenáz enzimek; közepes szénatomszámú alkánok (C5-C16) esetében nem-hem vasat tartalmazó membránfehérjék (pl. alkán-1-monooxigenáz) vagy citokróm P450-szerű enzimek (pl. CYP153 enzim); míg ennél hosszabb szénláncú alkánok (C₁₇₊) esetében az előbb ismertetett alkán-hidroxiláz enzimek mellett számos, ma még részleteiben kevéssé ismert enzimrendszer vesz részt a lebontásban (van Beilen és Funhoff, 2007).



1. ábra: Az n-alkánok aerob, alkán-monooxigenázok által iniciált biodegradációs útvonala és az egyes lépéseket katalizáló enzimek (van Beilen és mtsai, 2003 alapján).

Az *n*-alkánok aerob lebontásában résztvevő enzimrendszerek közül a legjobban a membránkötött, vagy transzmembrán helyzetű alkán-1-monooxigenázt tartalmazó rendszerek ismertek. Az is kijelenthető, hogy kőolajjal, illetve kőolajszármazékokkal történő szennyezések esetében is ezek a legrelevánsabb enzimrendszerek, legalább is aerob körülmények között. Ezt az enzimrendszert elsőként a *Pseudomonas putida* GPo1 törzséből írták le és jellemezték részletesen (van Beilen és mtsai, 1994). Az alkán-hidroxiláz aktivitású enzim ez esetben egy nem-hem vasat tartalmazó (úgynevezett "divas", tehát két vasiont tartalmazó) monooxigenáz membránfehérje (AlkB), amely működéséhez két további, elektron-transzfer szerepet betöltő fehérjét igényel (rubredoxint és rubredoxin-reduktázt). Az ilyen típusú alkán-monooxigenáz enzimek általában hat hidrofób peptidszakaszt tartalmaznak, amelyek α -hélix konformációval rendelkeznek, és a fehérje transzmembrán részét képezik (2. ábra). Jellemzően nyolc vagy kilenc hisztidin aminosavat tartalmaznak meghatározott motívumokba rendeződve, amelyek megléte szükségszerű az enzim aktivitása szempontjából, mivel az enzim aktív centrumában a vasiontartalmú kavitás felépítésében vesznek részt (Shanklin és Whittle, 2003).



2. ábra: Az n-alkánok lebontásban résztvevő alkán-hidroxiláz enzimrendszer sematikus képe (van Beilen és Funhoff, 2003 alapján).

Egyes kiváló *n*-alkán-lebontó mikroszervezetek többnyire nem is egy, hanem több, egymással homológ AlkB enzimet kódolnak a genomjukban. Ez a jelenség a *Rhodococcus*

nemzetség egyes tagjai, így a *R. erythropolis* fajjal rokon törzsek esetében figyelhető meg legjobban, ennek megfelelően pedig nagyon részletesen dokumentált is. A *Rhodococcus* sp. Q15 és NRRL B-16531 törzsek esetében leírták, hogy négy, egymással homológ *alkB* génnel rendelkeznek, amelyek közül az *alkB1* és az *alkB2* olyan gén klaszterek tagjai, amelyek 2-2 rubredoxint is kódolnak, illetve az *alkB1*-et tartalmazó klaszterben egy rubredoxin-reduktáz gén is megtalálható. Ezzel szemben az *alkB3* és *alkB4* gének önállóan voltak megtalálhatóak a genomokban (Whyte és mtsai, 2002). Egyes *Rhodococcus* törzsek, így például a *Rhodococcus* sp. TMP2 esetében még ennél is több, öt *alkB* gént azonosítottak (Takei és mtsai, 2008). A Gram-negatív baktériumok között az *Acinetobacter* és a *Pseudomonas* nemzetségek alkán-lebontó tagjai a leginkább vizsgáltak.

Ma már tudjuk, hogy az *n*-alkánok biodegradációja anaerob körülmények között is végbemehet, és ismert, hogy nitrát- és szulfát-redukáló, illetve metanogén körülmények között egyaránt lezajlik (Agrawal és Gieg, 2013). A folyamat kulcslépése az alkán-vegyületek aktivációja, amely anaerob körülmények között az úgynevezett "fumarát-addíció" útján történik. E lépés során egy új C-C kötés alakul ki és a folyamat eredményeképpen keletkező vegyület egy alkil-szukcinát lesz (3. ábra).



3. ábra: Az n-alkánok fumarát addíciója anaerob körülmények között

A fumarát addíció elsősorban a C2 szubterminális szénatomot érinti. Az alkil-szukcinát ezután szénváz-átrendeződésen megy keresztül, majd dekarboxiláció után egy elágazó szénláncú zsírsav jön létre belőle, ami már könnyedén be tud lépni a központi metabolikus útvonalakba (4. ábra).

17



4. ábra: Az n-alkánok fő anaerob lebontási útvonala

Ami az anaerob lebontásra képes mikroszervezetek diverzitását illeti, izolátumok és dúsító tenyészetek vizsgálata alapján elsősorban a baktériumok két törzsére, a Proteobacteria és a Firmicutes törzsekre korlátozódik (Stagars és mtsai, 2016). Az archaebaktériumok között pedig mindössze egy anaerob alkán-lebontó faj ismert, az *Archaeoglobus fulgidus* (Stagars és mtsai, 2016), amely a C₁₀-C₂₁ alkánok lebontására képes. Míg tengeri ökoszisztémákban szinte kizárólag a szulfát-redukáló baktériumok (ezen belül is a Deltaproteobaktériumok osztálya, Desulfobacteraceae család, *Desulfosarcina/Desulfococcus* klád tagjai) játszanak szerepet ebben a folyamatban, addig talajok esetén nitrát-redukáló fajok is részt vesznek benne (elsősorban Gammaproteobaktériumok osztálya) (Rabus és mtsai, 2016; Stagars és mtsai, 2016).

II.1.4. A monoaromás szénhidrogének és biodegradációjuk

A monociklusos aromás szénhidrogének színtelen, szobahőmérsékleten többnyire folyékony anyagok. Vízben rosszul, szerves oldószerekben, így például más szénhidrogénekben jól oldódnak vagy korlátlanul elegyednek. Ezek közül, az egyetlen aromás gyűrűt tartalmazó vegyületek közül, gyakorlati szempontból a benzol és származékai tekinthetők a legfontosabbnak. A benzol mellett ide tartozik a toluol, az etil-benzol és a xilolok, melyeket együtt BTEX vegyületeknek nevezünk (5. ábra). A BTEX vegyületek mind a hat tagja komoly hatással lehet az idegrendszerre, a benzol károsítja a csontvelőt, mely által károsodik az immunrendszer, kialakulhat anémia és leukémia, továbbá emberben bizonyítottan rákkeltő (Dean, 1985).



5. ábra: BTEX-vegyületek szerkezeti képlete

II.1.5. A monoaromás szénhidrogének aerob úton történő biodegradációja

Az aerob lebontó mikroszervezetek a lebontást általában az aromás gyűrű aktivációjával indítják, amelyet mono- vagy dioxigenáz enzimek katalizálnak. Ezek az iniciáló lépések, illetve az ebben résztvevő enzimek nagyfokú diverzitást mutatnak, azonban a köztitermékek száma ehhez képest meglehetősen limitált, úgymint: katekol, protokatekuát, gentizát vagy (hidroxi)benzokinolok (Pérez-Pantoja és mtsai, 2010). A lebontás következő lépése ezen intermedierek aromás gyűrűjének hasítása, amelyet megintcsak oxigenáz, mégpedig jellemzően dioxigenáz enzimek katalizálnak. A reakciótermékek ezután további átalakítási lépések után a központi anyagcsere-útvonalakba belépve hasznosulnak. A továbbiakban azok a lebontási útvonalak és főbb enzimeik kerülnek bemutatásra, amelyek BTEX-vegyületek lebontásában kulcsszerepet játszanak.

II.1.6. Az aromás gyűrű aktivációjában résztvevő lebontási útvonalak és enzimek

Az aromás gyűrű aktivációját végző enzimek talán legnagyobb csoportját a Rieske-féle, nem-hem vasat tartalmazó oxigenázok alkotják. Ezeket az enzimeket elsőként aromás szénhidrogén-lebontó képességgel rendelkező *Pseudomonas putida* törzsekből írták le (Gibson és mtsai, 1968; Axcell és Geary, 1975). Ma már jól ismert, hogy kulcsszerepet játszanak a benzoát, a benzol, a toluol, a ftalát, a naftalin és a bifenilek lebontásában (Gibson és Parales, 2000). Valójában többkomponensű enzimkomplexekként írhatóak le, amelyek egy terminális oxigenáz komponensből és különféle elektron transzport fehérjékből állnak. A katalizált reakció során két oxigénatom épül be az aromás gyűrűbe, végeredményben egy aromás *cisz*dihidrodiolt képezve. Jó példa erre a reakcióra a toluol dioxigenáz enzim, amelyet Yeh és mtsai írtak le (1977) egy *Pseudomonas putida* törzsből (6. ábra). A reakciót egy dehidrogenációs lépés követi, amelyet általában egy cisz-dihidrodiol dehidrogenáz katalizál, és egy, a szubsztráttól függően szubsztituált vagy szubsztituálatlan katekol molekula a végeredmény (Pérez-Pantoja és mtsai, 2010). A toluol esetében a termék a 3-metilkatekol.



6. ábra: A toluol dioxigenáz enzim által katalizált reakció (Yeh és mtsai, 1977 alapján).

Az előző csoporthoz hasonlóan nagy jelentőséggel bírnak az úgynevezett szolubilis divas monooxigenázok is, amelyek közül egyesek a benzolt és a toluolt képesek monooxigenálni, és ezáltal fenollá, illetve metilfenollá alakítani őket, míg mások ez utóbbi vegyületeket katekollá, illetve metil-katekollá alakítani (Leahy és mtsai, 2003). Az előző csoporthoz hasonlóan többkomponensű enzimkomplexek, amelyek általában а következőképpen épülnek fel: (i) egy reduktáz, illetve néhány esetben ferredoxin tartalmú elektron transzport rendszer, (ii) egy katalitikus effektor fehérje, amelynek az aktív oxigenáz enzim összeszerelődésében van szerepe, és (iii) egy terminális hidroxiláz ($\alpha\beta\gamma$)₂ negyedleges szerkezettel, ahol az α-alegységek tartalmazzák a divas katalitikus centrumot. E katalitikus centrumban zajlik a szubsztrát hidroxilációja. Az α-alegység alapján két csoportjuk vesz részt az aromás vegyületek lebontásában: (i) a négy-komponensű alkén/aromás szénhidrogén monooxigenázok és a (ii) fenol hidroxilázok (Leahy és mtsai, 2003). Az előbbi csoportba tartozó enzimek a nem-hidroxilált aromás komponensek lebontásában játszanak szerepet és a gén klaszereik általában tartalmaznak ferredoxin komponenst (Leahy és mtsai, 2003). Legismertebb képviselőik a toluol monooxigenázok, amelyek akár mindhárom lehetséges pozícióban képesek a toluolt hidroxilálni, ezáltal 2-metil-, 3-metil, vagy 4-metilfenolt létrehozva (Olsen és mtsai, 1994; Shields és mtsai, 1989; Whited és Gibson, 1991) (7. ábra). Egyes toluol monooxigenázok (mint például a *Pseudomonas stutzeri* OX1 PK01 toluol monooxigenáza vagy a *Pseudomonas mendocina* KR1 toluol 4-monooxigenáza) nem csak a toluolt, hanem a fenolt, vagy a metil-fenolt képesek tovább oxidálni katekol vegyületig, vagy akár 1,2,3-trihidroxi-benzolig (Bertoni és mtsai, 1998; Tao és mtsai, 2004).



7. ábra: A toluol aromás gyűrűjének monnoxigenázok általi aktivációja. T-2MO, toluol 2monooxigenáz; T-3MO, toluol 3-monooxigenáz; T-4MO, toluol 4-monooxigenáz; FH, fenol hidroxiláz. (Parales és mtsai, 2008 alapján)

A fenol hidroxiláz aktivitással rendelkező enzimek között találni többkomponensű fenol hidroxiláz rendszereket, mint amilyen például a *Pseudomonas* sp. CF600, a *Pseudomonas putida* 35X, illetve az *Alicycliphilus denitrificans* K601^T és BC törzsek esetében is megfigyelhető (Ng és mtsai, 1994; Oosterkamp és mtsai, 2013; Shingler és mtsai, 1992). Emellett a *Burkholderia cepacia* G4-es törzs toluol 2-monooxigenáz enzime is beleillik e csoportba (is), mivel a toluol mellett a 2-metilfenol (*o*-krezol) oxidációjára is képes, ezáltal a toluolból két monooxigenációs lépésben 3-metilkatekolt hoz létre (Newman és Wackett, 1995). E képesség azonban, ha kisebb mértékben is, de a többkomponensű fenol hidroxilázokra is igaz. Habár elsődleges szubsztrátjaik a fenolok, 2-3 nagyságrenddel kisebb specifitással (k_{cat}/K_M), de képesek a benzolt és a toluolt is szubsztrátként elfogadni, így két monooxigenációs lépésben metil-katekollá alakítani őket (Cafaro és mtsai, 2004). Emiatt fordulhat elő az, amit például az *Alicycliphilus denitrificans* K601^T és BC törzsek esetében is mefigyeltek, hogy bár a genomjukban nem található benzol/toluol mono- vagy dioxigenázt kódoló gén, a

többkomponensű fenol-hidroxiláz rendszernek köszönhetően képesek a benzol és a toluol aerob lebontására (Oosterkamp és mtsai, 2013).

II.1.7. Az aromás gyűrű hasításában résztvevő lebontási útvonalak és enzimek

Az aromás gyűrű aktiválása tehát a legtöbb esetben egy, a kiindulási szubsztráttól függő aromás diol, tehát szubsztituált vagy szubsztituálatlan katekol molekula kialakulásához vezet. A lebontás soron következő lépése a katekol molekula aromás gyűrűjének hasítása, amely alapvetően kétféle úton történhet, mégpedig intradiol vagy extradiol hasítás útján. E két hasítási folyamatot két különböző enzimcsalád tagjai képesek katalizálni.

Az intradiol hasítási útvonalat 3-oxoadipát-lebontási útvonalnak is hívják, amin belül megkülönböztetünk katekol ágat, illetve protokatekuát ágat (Pérez-Pantoja és mtsai, 2010) (8. ábra). A gyűrűhasítást, amit ez esetben *orto*-gyűrűhasításnak is neveznek, a katekol ág esetében a katekol 1,2-dioxigenáz enzim végzi, míg a protokatekuát ág esetében a protokatekuát 3,4-dioxigenáz. A két lebontási útvonal egy közös közti termék, a β-ketoadipát enol-lakton keletkezésekor egybeolvad. Habár számos aromás vegyület lebontása ezeken az útvonalakon keresztül történik, és például a klórbenzol lebontásában kiemelt szerep juthat a (klór-)katekol-1,2-dioxigenáz enzimeknek (Balcke és mtsai, 2008), a metilszubsztituált aromás vegyületek (pl. toluol és xilolok) lebontására a 3-oxoadipát útvonal nem alkalmas. Ennek oka az, hogy a lebontás során keletkező metilszubsztituált mukonolaktonok továbbalakítása nem lehetésges, és a lebontás ennél fogva zsákutcába jut (Catelani és mtsai, 1971).

A metilszubsztituált katekolok lebontása tehát más útvonalon kell, hogy történjen. E vegyületek aromás gyűrűjét az extradiol hasítást végő enzimek, azon belül is az I-es típusú extradiol dioxigenázok, vagy más néven katekol 2,3-dioxigenázok (C23O) katalizálják (Pérez-Pantoja és mtsai, 2010) és *meta*-típusú gyűrűhasítást végeznek. Természetesen a szubsztituálatlan katekol gyűrű hasítására is képesek, ezáltal részt vehetnek a benzol lebontásában, de ismert, hogy a bifenilek és a naftalin lebontásában is kulcsszerepet játszanak (Pérez-Pantoja és mtsai, 2010). Közös jellemzőjük, hogy általában nem-hem vas(II)-iont igényelnek az aktivitásukhoz (Eltis és Bolin, 1996).

dc_1786_20



8. ábra: A 3-oxoadipát-lebontási útvonal katekol és protokatekuát ága (Gaines és mtsai, 1996 alapján).

Az I-es típusú extradiol dioxigenázok filogenetikai osztályozását Eltis és Bolin (1996) végezte el, 35 db C23O enzim aminosav-szekvenciájának vizsgálata alapján. Eszerint az I-es

típusú extradiol dioxigenázok egy szupercsaládot alkotnak, amely további enzim családokra és alcsaládokra osztható (lásd 9. ábra).



9. ábra: Az extradiol dioxigenázok filogenetikai osztályozása Eltis és Bolin szerint (1996).

Eltis és Bolin (1996) három családot különített el. Ezek közül az I.1.-es család egyalegységes enzimeket tartalmaz és két alcsaládra osztható tovább. A másik két család, az I.2 és az I.3 két-alegységes enzimeket tartalmaz és 5-5 alcsaládra oszthatóak tovább. Ez utóbbi enzimekről tudjuk, hogy egy, illetve két aromás gyűrűt tartalmazó szubsztrátokat preferálnak, azonban azt, hogy a családok és alcsaládok között milyen biokémiai, illetve funkcionális különbségek vannak, nem volt ismert Eltis és Bolin (1996) munkája idején. Egyedül az dc_1786_20

I.2.C-alcsalád enzimeiről lehetett azt feltételezni Kukor és Olsen (1996) vizsgálatai alapján, hogy a többi C23O enzimhez képest nagyobb affinitást mutatnak a katekol és az oxigén, mint két szubsztrát iránt, ezáltal kis szubsztrát koncentráció mellett is aktívak maradnak. Ez azt is jelenti, hogy hipoxikus körülmények között is képesek lehetnek az aerob lebontást katalizálni. Az extradiol hasítást követően a lebontás két ágon folyhat tovább: a hidrolitikus, vagy az oxalokrotonát ágon (10. ábra):



10. ábra: A meta-típusú gyűrűhasítás és az azt követő enzimatikus lépések Nešvera és mtsai (2015) alapján. C23O, katekol 2,3-dioxigenáz; HMSH, 2-hidroximukonsav-félaldehid hidroláz; HMSD, 2hidroximukonsav-félaldehid dehidrogenáz; OCI, 4-oxalokrotonát izomeráz

dc_1786_20

Általánosan elmondható, hogy a *meta*-útvonal enzimeit kódoló gén klaszterek mindkét ág enzimeit tartalmazzák (Harayama és mtsai, 1987). Erre azért van szükség, mert a katekolból létrejövő 2-hidroximukonsav-félaldehid, illetve a 4-metilkatekolból származó 5-metil-2hidroximukonsav-félaldehid csak az oxalokrotonát ágon keresztül tud 2-hidroxipent-2,4dienoáttá alakulni (e vegyület mindkét ág "végterméke"). Ezzel szemben a 3-metilkatekolból a gyűrűhasítás után keletkező 2-hidroxi-6-oxo-2,4-heptadienoát inkább ketonként viselkedik, semmint aldehidként, ezért a 2-hidroximukonsav-féladehid dehidrogenáz nem tudja szubsztráként elfogadni. Ebből fakadóan pedig a hidrolitikus útvonalon történik a továbbalakítása (Powlowski és Shingler, 1994). A *meta*-útvonal utolsó lépésében végtermékként acetil-CoA keletkezik (10. ábra).

II.1.8. A monoaromás szénhidrogének anaerob úton történő biodegradációja

A BTEX-vegyületek anaerob lebontása alapvetően kétféle útvonalon keresztül történhet meg. A legismertebb mechanizmus a már korábban az alkánok anaerob lebontásának lerása során ismertetett "fumarát addíció". E folyamatban glicil-gyököt tartalmazó enzimek játszanak szerepet, amelyek működésük eredményeképpen csökkentik az aromás gyűrű stabilitását (Gibson és Harwood, 2002). Az aromás vegyületek fumarát addíció útján történő lebontásának megismerése a toluol anaerob biodegradációjának feltárásával kezdődött. Evans és mtsai (1991) voltak az elsők, akik egy olyan baktériumtörzset írtak le (T1-es jelű törzs), amely denitrifikáló körülmények között volt képes a toluol lebontására. E törzset később Song és mtsai (1998) mint Thauera aromatica (akkor Rhodocyclaceae, ma Zoogloeaceae család) írták le. Evans és mtsai (1992) már a T1-es törzs korai vizsgálata során felismerték, hogy a toluol anaerob lebontása során benzilszukcinát keletkezik. A reakciót, amelynek során a toluol metil-csoportjához egy fumarát molekula kapcsolódik, a benzilszukcinát-szintáz (bss) katalizálja (11. ábra). Ezt követően a benzilszukcinát β-oxidáción megy keresztül és végső soron benzoil-CoA keletkezik, amely számos aromás szénhidrogén anaerob lebontási útvonalának közös köztiterméke (Gibson és Harwood, 2002). Ez a folyamat erősen konzervált, így nem csak denitrifikáló, hanem szulfátés vas-redukáló, illetve metanogén mikroszervezetekben is előfordul, és a toluol mellett más szubsztituált monoaromás komponensek lebomlása is fumarát addícióval indul (Tierney és Young, 2010). Ennek a ténynek köszönhető az, hogy a fumarát addíciót katalizáló enzimek génjeit (pl. a benzilszukcinát szintáz alfa alegységét kódoló bssA gént) széles körben használják marker génként arra, hogy szennyezett közegekben feltárják az anaerob lebontásra képes mikroszervezetek diverzitását (von Netzer és mtsai, 2016).



11. ábra: A toluol anaerob biodegradációja a fumarát addíciós utvonalon keresztül (Young és Phelps, 2005 alapján).

A fumarát addíció mellett a másik lehetséges anaerob lebontási útvonal a karboxiláció útján történő aktiváció, majd lebontás (Tierney és Young, 2010). A karboxiláció általi gyűrűaktiválás elsősorban a benzol, illetve a fenol anaerob lebontása során kap kulcsfontosságú szerepet. A benzol anaerob lebontását elsőként két *Dechloromonas* törzs esetében vizsgálták részletesen. A *Dechloromonas* sp. RCB és JJ-jelű törzsek voltak az első tiszta tenyészetek, amelyekről kimutatták, hogy anaerob körülmények között, nitrát-redukció mellett képesek a benzol lebontása (Coates és mtsai, 2001). Az RCB törzs vizsgálata rámutatott arra, hogy a benzol lebontása során fenol köztitermék keletkezett, ami azt jelenti, hogy az anaerob lebontás első lépése a benzol hidroxilációja lehetett, majd ezt követte a fenol karboxilációja és további lebontása (12. ábra).



12. ábra: A benzol feltételezett anaerob lebontási útvonala a Dechloromonas sp. RCB törzs esetében (Chakraborty és Coates, 2005 alapján).

A fenolt, mint az anaerob benzol lebontás köztitermékét más lebontó mikroszervezetek esetében is kimutatták, így például Zhang és mtsai (2013) a szigorúan anaerob vas-redukáló *Geobacter metallireducens* esetében. Mindemellett egyes szerzők felvetik annak a lehetőségét, hogy a fenol műtermékként is megjelenhet vas-, illetve szulfát-redukáló közösségekből történő mintavételkor. Ilyenkor ugyanis a minta levegővel való érintkezése során reaktív oxigéngyökök keletkezhetnek a Fe²⁺, illetve szulfid-ionok jelenléte miatt, amelyek a benzol fenollá történő autooxidációját indukálhatják (Meckenstock és Mouttaki, 2011). Ráadásul a fenol nem szükségszerűen köztiterméke a benzol anaerob lebontásának, mivel a benzol direkt karboxilációja is lejátszódhat, illetve egy metilációs lépés után a fumarát-addíciós útvonalon is a lebomolhat (Foght, 2008). A benzol három lehetséges anaerob lebontási útvonalát a 13. ábra mutatja be.



13. ábra: A benzol anaerob úton történő lebontásának három lehetsége útvonala (Foght, 2008 alapján).

II.2. A kőolajeredetű szénhidrogének lebontásában résztvevő prokarióta mikroszervezetek diverzitása

II.2.1. Általános áttekintés

Habár a szénhidrogén-lebontás mikrobiológiájának hajnalán e metabolikus képesség elterjedségét a prokarióta mikroszervezetek körében marginálisnak gondolták, ma már tudjuk, hogy széles körben elterjedt a Bacteria domén képviselői között, ráadásul még egyes Archaea nemzetségek képviselői is rendelkeznek e képességgel. Míg a kezdeti, az 1970-es, illetve '80-as években született összefoglaló művek mindössze 20-30 szénhidrogén-lebontó baktérium nemzetséget sorolnak fel (Bossert és Bartha, 1984; Floodgate, 1984), addig a legújabb szakirodalmi összegzésekben 320 Bacteria és 12 Archaea nemzetséget tartanak nyilván, amelyek egyes tagjai rendelkeznek valamilyen szénhidrogén-lebontó képességgel (Prince és mtsai, 2019; Oren, 2019). Tekintettel arra, hogy azon baktérium és archaea nemzetségek száma, amelyeket ezidáig nem sikerült tenyésztésbe vonni ennél a számnál nagyságrendekkel nagyobb,

valószínűsíthető, hogy a szénhidrogén-lebontásra képes mikroszervezeteket tartalmazó nemzetségek száma is jóval nagyobb a jelenleg ismertnél.

A Bacteria domén esetében a szénhidrogén-lebontó képességgel rendelkező nemzetségek többnyire a baktériumok 4 nagy törzsébe sorolhatóak, ahogy az a 14. ábrán is jól látható: ezek az Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes és Proteobacteria (Prince és mtsai, 2019). Az alábbiakban a Prince és mtsai (2019) által a közelmúltban készített összegzés alapján mutatom be röviden e négy törzs főbb szénhidrogén-lebontó csoportjait, illetve nemzetségeit.

II.2.2. Az Actinobacteria törzs főbb szénhidrogén-lebontó nemzetségei

Az Actinobacteria törzsön belül az ismertebb szénhidrogén-lebontó nemzetségek az alábbi nyolc renden belül találhatóak meg: Actinomycetales, Corynebacteriales, Micrococcales, Propionibacteriales, Pseudonocardiales, Streptomycetales, Streptosporangiales és Thermoleophilales. Azonban ezek közül is kiváltképp a Corynebacteriales és a Micrococcales rendek tartalmazzák a legismertebb olaj-lebontókat, mint például a *Dietzia*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Tsukamurella*, *Williamsia*, illetve az *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Citricoccus*, *Kytococcus*, *Microbacterium*, *Micrococcus* nemzetségek, természetesen a felsorolás teljességének igénye nélkül. Mindegyikük aerob lebontó, és szinte kivétel nélkül mezofil mikroszervezetek. Egyetlen kivétel a *Thermoleophilum* nemzetség, amelynek tagjai obligát termofilek és 60°C körüli hőmérsékleti optimummal jellemezhetőek.



14. ábra: A Bacteria domén szénhidrogén-lebontó mikroszervezeteket magában foglaló törzsei (Prince és mtsai, 2010 alapján)

II.2.3. A Bacteroidetes törzs főbb szénhidrogén-lebontó nemzetségei

A Bacteroidetes törzs képviselői jól ismertek arról, hogy képesek a természetben előforduló komplex polimer vegyületek lebontására. A törzs három rendjéről ismert, hogy szénhidrogén-lebontó baktériumok tartoznak ide: ezek a Cytophagales, Flavobacteriales és a Sphingobacteriales. Olyan nemzetségeket szükséges itt említeni, mint a *Chryseobacterium*, *Flavobacterium*, *Cytophaga* vagy *Olivibacter*, megint csak a teljesség igénye nélkül. Fontos megjegyezni, hogy az összes ide tartozó mikroszervezet aerob szénhidrogén-lebontásra képes.

II.2.4. A Firmicutes törzs főbb szénhidrogén-lebontó nemzetségei

A Firmicutes törzsön belül három rendet lehet említeni, amely szénhidrogén-lebontó tagokkal rendelkezik, ezek pedig a következőek: Bacillales, Lactobacillales és Clostridiales. Olyan nemzetségeket kell itt megemlíteni, mint a *Bacillus, Brevibacillus, Planococcus, Desulfitobacterium, Desulfotomaculum, Desulfosporosinus, Peptococcus.* A Clostridiales rendbe sorolható fenti nemzetségek közül a *Desulfotomaculum* és a *Desulfosporosinus* szulfátredukáló, míg a *Desulfitobacterium* vas-redukáló mikroszervezeteket tartalamaz, így ezek a szénhidrogének anaerob lebontásában vesznek részt.

II.2.5. A Proteobacteria törzs főbb szénhidrogén-lebontó nemzetségei

A szénhidrogén-lebontó képességgel rendelkező baktérium nemzetségek többsége ebbe a hatalmas csoportba tartozik. Az Epsilonproteobacteria kivételével mindegyik osztály tartalmaz szénhidrogén-lebontókat, sőt, obligát szénhidrogén-lebontó mikroszervezeteket is találni itt, mint az *Alcanivorax, Cycloclasticus, Oleiphilus, Oleispira* és *Thalassolituus*. De a jól ismert anaerob szénhidrogén-lebontók is többnyire ide tartoznak, mint például az *Azoarcus, Thauera, Georgfuchsia, Geobacter* nemzetségek, amelyek képviselői főleg monoaromás komponensek anaerob lebontására képesek nitrát-, vagy vas-redukáló körülmények között. De fontos megemlíteni a *Dechloromonas*, illetve az *Alicycliphilus* nemzetségeket, amelyek egyes képviselői klorátot képesek elektron-akceptorként hasznosítani, miközben a benzolt használják szén- és energiaforrásként. A főbb aerob szénhidrogén-lebontók között mindenképpen meg kell említeni a *Pseudomonas, Polaromonas, Variovorax, Comamonas, Pseudoxanthomonas Sphingobium* vagy *Novosphingobium* nemzetségeket, csak hogy a legismertebbeket megnevezzük, mert e felsorolást hosszan lehetne folytatni.

II.2.6. Az Archaea domén szénhidrogén-lebontó képviselői

Sokáig tartotta magát az a nézet, hogy az Archaea domén képviselői nem vesznek részt a szénhidrogének biodegradációjában. Ezt az elképzelést erősítette például a Röling és mtsai (2004) által elvégzett mikrokozmosz kísérlet, ahol a tengerpati üledékhez adott kőolaj hatására az Archaea domén képviselői szinte eltűntek a mikroba közösségből. Az utóbbi években azonban számos olyan arhcaeabaktériumról adtak hírt a kutatások, amelyek képesek egyes kőolajkomponensek biodegradációjára. E mikroszervezetek az Archaeoglobus, Haloarcula, Halobacterium, Halococcus, Halorientalis, Natronomonas, Haloferax, Halorubrum, Halovivax, Natrialba, Natronococcus, illetve Natronolimnobius nemzetségekbe tartoznak. Ahogy a felsorolásból is látszik, e mikroszervezetek szinte kizárólag a Halobacteria osztály (Euryarchaeota) képviselői. Ennek a megfigyelésnek az lehet az oka, hogy egyes kőolajlelőhelyek hiperszalinikus habitatokat tartalmaznak (pl. Kazahsztán és Tatárföld kőolajlelőhelyei). Emellett olyan hiperszalin élőhelyekről is kimutathatóak szénhidrogénlebontó Halobacteria archaeabaktériumok, ahol nem volt jelen kőolajszennyezés. Meg kell jegyezni ugyanakkor, hogy e mikroszervezetek esetében a szénhidrogén-lebontás biokémiájáról nagyon kevés ismeretünk van, genomikai tudásunk pedig gyakorlatilag nem létezik ebben a témakörben, mivel egyetlen szénhidrogén-lebontó Halobacteria osztályba tartozó tözs genomját sem tárták fel ezidáig.

III. A KUTATÁS CÉLKITŰZÉSEI

A következő fejezetekben részletezett több mint tíz éves kutatómunka origójának, illetve fő ihletőjének Barbara Hendrickx és munkatársainak "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" című folyóiratcikke tekinthető, amely 2006-ben jelent meg a Journal of Microbiological Methods nevű folyóiratban (64:250-265). Hendrickx és mtsai e műben írták le azokat a csoportspecifikus PCR primereket, amelyekkel a főleg Pseudomonas fajokhoz köthető I.2.A alcsaládba tartozó C23O gének, illetve a kizárólag alfaproteobaktérimokhoz (Sphingobium, Novospingobium, Sphingomonas) köthető I.2.B alcsaládba tartozó *C230* gének amplifikálhatóak. Azonban a harmadik csoport, tehát a főként bétaproteobaktériumokhoz (ma már Burkholderiales rend) köthető, I.2.C alcsaládba tartozó C230 gének amplifikációjához nem terveztek PCR primereket, mondván ez a csoport túlságosan heterogén ahhoz, hogy csoportspecifikus PCR primereket tervezzenek a kimutatásukhoz. Ekkor már 10 éve ismert volt Kukor és Olsen (1996) kutatási eredménye, miszerint az I.2.C-típusú extradiol dioxigenázok olyan közegekhez adaptálódhattak, amelyek alacsony szubsztrát koncentrációval jellemezhetők, emiatt nagy oxigén affinitással rendelkeznek és ennek megfelelően alacsony oldott oxigén koncentráció mellett is aktívak. Emellett egyre több kutatás adott hírt arról, hogy a BTEX-szennyezett felszín alatti közegek mikrobaközösségeit a Betaproteobacteria osztály (ma már Burkholderiales rend) képviselői dominálják. Mindezek ismeretében merült fel bennem a kérdés, hogy mekkora lehet az I.2.C-típusú extradiol dioxigenázokat kódoló gének diverzitása ezekben a közegekben, és hogy milyen szerepet játszanak a BTEX-vegyületek lebontásában azok a mikroszervezetek, amelyek rendelkeznek e génekkel.

A fentiekből adódóan a kezdeti céljaim között szerepelt egyrészt egy olyan primerpár megtervezése, amely az I.2.C-típusú *C230* génekre specifikus, másrészt ennek segítségével e gének diverzitásának, illetve *in situ* expressziójának feltárása. Később célom volt BTEX szennyezett közegekből, illetve dúsító tenyészetekből izolált baktérium törzsek körében vizsgálni az I.2.C-típusú *C230* gén meglétét, hogy tovább növeljem e gének ismert diverzitását, illetve, hogy minél több *C230* gént tudjak ismert baktériumfajhoz kötni. Célom volt továbbá az izolált baktériumtörzsek segítségével a mikroaerob BTEX-lebontás genetikai hátterének feltárása, a teljes lebontási útvonal megismerése. Végül, de nem utolsó sorban célul tűztem ki,

hogy stabil izotópos jelölés módszerével azonosítsak mikroaerob BTEX-lebontásra képes mikroszervezeteket.

IV. ANYAG ÉS MÓDSZER

IV.1. Klasszikus mikrobiológiai módszerek

IV.1.1. Mintavétel szénhidrogénekkel szennyezett közegekből – talajvíz és biofilm mintavétel

A vizsgált kárhelyekről a szennyezett talajvíz mintázása minden esetben akkreditált módon, az MSZ ISO 5667-11:2009/1-2 szabványok szerint történt. A mintavételi kutakból a pangóvíz szivattyúzással eltávolításra került, majd a friss talajvizet steril körülmények között barna színű, 1 L térfogatú steril üvegekbe mértük. A mintákat a további feldolgozásig sötétben és 4°C-on hűtve tároltuk, illetve jutattuk el a laboratóriumba. A talajvízminták hőmérsékletének, kémhatásának, illetve redox-potenciáljának meghatározása a mintavétel helyszínén történt, terepi mérőműszerek segítségével (WTW Handheld Meter Multi 350i). Az általános vízkémiai és szennyezettségi paraméterek meghatározása akkreditált laboratóriumban történt (Wessling Hungary Kft.), az alábbi szabvány módszerek alapján: nitrát és szulfát koncentráció – MSZ EN ISO 10304-1:2009; Fe²⁺ és Mn²⁺ - EPA Method 200.8:1999 és MSZ EN ISO 17294-2:2005. A különböző szénhidrogén komponensek koncetrációjának meghatározása HP-6890 GC FID/PID gázkromatográf segítségével történt a következő szabvány módszerek szerint: WBSE-26:2009 és MSZ 1484-7:2009.

A biofilm mintavétel steril spatula segítségével történt, és minden esetben 10-15 g nedves biofilmet helyeztünk 100 mL térfogatú, barna színű, steril üvegedénybe.

IV.1.2. Baktériumtörzsek izolálása környezeti mintákból

A törzs izolálások során minden esetben tizes alapú, 8 lépcsős hígítási sort készítettünk fiziológiás sóoldat felhasználásával. A hígítási tagokból 0,1 ml-t szélesztettünk Petri-csészében lévő R2A táptalajra. Az R2A táptalaj összetétele a következő volt: proteóz pepton – 0,5 g; kazaminosav – 0,5 g; élesztőkivonat – 0,5 g; dextróz – 0,5 g; vízoldékony keményítő – 0,5 g; K₂HPO₄ – 0,3 g; MgSO₄ x 7H₂O – 0,05 g; nátrium piruvát 0,3 g; agar - 15 g; dH₂O 1000 ml. A lemezeket ezután termosztátban 28°C-on inkubáltuk, majd egy hét elteltével a különálló telepeket átoltva tiszta tenyészeteket hoztunk létre. A törzsek hosszútávú tárolása -80°C-on, glicerin oldatban történt.
IV.1.3. Szénhidrogén-lebontó dúsító tenyészetek létrehozása

A dúsító tenyésztésen alapuló kísérletek során szénhidrogénekkel szennyezett felszín alatti közegekből származó talajvízmintákat, illetve biofilm mintákat használtunk inokulumként. A dúsító tenyészeteket minden esetben 100 ml térfogatú, butil gumi szeptummal és alumíniumkupakkal hermetikusan zárható szérumüvegekben hoztuk létre. Az üvegek 45 ml ásványi tápoldatot tartalmaztak, amely három oldatból épült fel a következőek szerint: 100 ml "A" oldat, 100 ml "B" oldat, 1 ml "C" oldat és 800 ml dH2O. A "A"-jelű oldat összetétele a következő volt: MgSO4x7H2O – 5 g; CaCl2xH2O – 1 g; 1000 ml dH2O; sterilre szűrt oldat. A "B"-jelű oldat összetétele a következő volt: Na₂HPO₄ – 11,1 g; NH₄NO₃ – 10 g; 1000 ml dH₂O; autoklávban sterilizált oldat. A "A"-jelű oldat összetétele a következő volt: FeSO₄x7H₂O – 10 g; Na₂EDTAx3H₂O - 0,64 g; ZnCl₂ - 0,1 g; H₃BO₃ - 0,015 g; CoCl₂x6H₂O - 0.175 g; NaMoO₄x2H₂O - 0,15 g; MnCl₂x4H₂O 0,02 g; NiCl₂x6H₂O - 0,01g; 1000 ml H₂O; sterilre szűrt oldat. Az elkészült oldat a következő vitaminokkal lett kiegészítve (l⁻¹): B1 vitamin – 1 mg; biotin – 15 µg; B12 vitamin – 20 µg. A vitamin törzsoldatok 0,22 µm pórusátmérőjű fecskendőszűrővel lettek sterilre szűrve. Amennyiben a dúsító tenyészetek valamelyik BTEXkomponenst tartalmazták egyedi szénforásként, akkor azok kezdeti koncentrációja minden esetben 1 mM volt. Azon dúsító tenyészetek, amelyek esetében gázolaj/kőolaj keverék (3:2, v/v) volt a szénforrás, 20 µl keveréket tartalmaztak. A mikroaerob tenyészetek esetében a lezárt, tápoldatot tartalmazó üvegekben karbogén gázkeveréket (N2/CO2, 80:20, v/v) áramoltattunk át a folyadékfázison 10 percen keresztül, majd ezután történt a kívánt oldott oxigén koncentráció (0,5 mg/l) beállítása, amely sterilre szűrt levegőnek a lezárt üveg folyadékfázisába történő injektálását jelentette. Az oldott oxigén koncentráció mérése nem-invazív módon történt, száloptikás Fibox 3 trace v3 oldott oxigén mérő készülék és PSt3 szenzor segítségével. A szenzorok minden esetben a folyadékfázisban helyezkedtek el, és a tápoldat szérumüvegbe töltése előtt kerültek rögítésre steril körülmények között, áttetsző szilikonragasztó segítségével. A dúsító tenyészetek beoltása 5 ml talajvízzel, vagy biofilm szuszpenzióval (ami 1 g nedves biofilmből készült 99 ml steril fiziológiás sóoldat segítségével) történt, majd rázótermosztátban inkubáltuk őket 28°C-on. Az aromás szénhidrogének koncentrációját a gáztérből határoztuk meg gázkromatográfhoz kapcsolt tömegspektrométer (GC-MS) segítségével.

IV.1.4. Vas-redukáló dúsító tenyészetek létrehozása

A vas-redukáló dúsító tenyészeteket *Rhodoferax* nemzetségbe tartozó baktériumok feldúsítása céljából hoztuk létre. Ehhez az előző alfejezetben ismertetett ásványi tápoldatot használtuk, kisebb módosításokkal. A tápoldatból kihagytuk az NH4NO3-ot, míg a magnéziumot MgCl₂ formájában adtuk az oldathoz, MgSO4 helyett. Szénforrásként fecskendőszűrővel sterilre szűrt nátrium-acetátot adtunk a tápoldathoz, hogy az acetát koncentráció 10 mM legyen. Nitrogénforrás tekintetében e tápoldatnak négy variánsát hoztuk létre: az I-es típusú dúsító 0,05% (w/v) élesztőkivonatot, illetve 1 g/l NH4Cl-ot tartalmazott; a II-es típusú dúsító csak élesztőkivonatot, míg a III-es típusú tápoldat csak NH4Cl-ot tartalmazott nitrogénforrásként. Végül a IV-es típusú tápoldat se élesztőkivonatot, se NH4Cl-ot nem tartalmazott, csak a szérumüveg gázterében lévő nitrogén szolgált nitrogénforrásként. A tápoldatot tartalmazó üvegekben karbogén gázkeveréket (N₂/CO₂, 80:20, v/v) áramoltattunk át a folyadékfázison 10 percen keresztül, hogy anaerob körülményeket teremtsünk. Egyedüli elektron-akceptorként filter sterilizált Fe(III)NTA oldatot adtunk a tápoldatokhoz 5 mM végkoncentrációban. A dúsító tenyészeteket 15°C-on, sötétben inkubáltuk egy héten át, rázatás nélkül.

IV.1.5. BTEX-lebontási vizsgálatok GC-MS segítségével

Az aromás komponensek fogyását a dúsító tenyészetekben, illetve a vizsgált egyedi baktérium törzsek BTEX-lebontó képességét GC-MS segítségével vizsgáltuk. Utóbbi esetben a lebontási képességet a dúsító tenyészetekhez hasonlóan 100 ml-es szérumüvegekben vizsgáltuk, 50 ml ásványi tápoldatban. Az egyes BTEX-komponensek mint egyedüli szénforrás voltak jelen a vizsgálatokban, minden esetben 5 mg/l koncentrációban. A baktériumtörzsekből OD (600 nm) 0.5-ös szuszpenziót készítettünk steril fiziológiás sóoldat segítségével, majd 100 μl szuszpenziót mértünk be az üvegek folyadékfázisába. A tenyészeteket rázótermosztátban inkubáltuk 150 rpm-en és 28°C-on. A lebontási képességet minden esetben tisztán aerob körülmények között vizsgáltuk, három-három párhuzamos mintán. Negatív kontrollként baktérium tenyészettől mentes minták szolgáltak (szintén 3-3 párhuzamos). A BTEX-komponensek koncetrációit a hermetikusan lezárt szérumüvegek gázteréből vizsgáltuk, szilárd fázisú mikroextrakciót végezve 100 μm rétegvastagságú PDMS szál (Supelco) segítségével. A GC-MS (Trace 1300 GC – ISQ Single Quadrupole MS; Thermo Fisher Scientific) SLB-5ms típusú oszloppal volt működtetve (Supelco). A hőprofil a következő volt:

40°C 3 percig, majd percenként 20°C hőmérséklet emelkedés 190°C-ig, majd 1 perc 190°C-on. A tömegspektrométer 250°C-on és "full scan" üzemmódban működött.

IV.2. Alapvető molekuláris mikrobiológiai módszerek leírása

IV.2.1. Nukleinsav (DNS, RNS) kivonás tiszta tenyészetekből és környezeti mintákból

A tiszta tenyészetekből és a dúsító tenyészetekből az UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (MoBio, USA), illetve a DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen, Németország) segítségével vontuk ki a DNS-t, a gyártó előírása szerint. A talajvízmintákból a DNS és RNS izolálást egyidejűleg, a MoBio PowerSoil Total RNA Isolation Kit (MoBio, USA) és az RNA PowerSoil DNA Elution Accessory Kit (MoBio, USA) használatával végeztük el a gyártó előírásai szerint. A biofilm mintákból a PowerBiofilm DNA Isolation Kit (MoBio, USA) segítségével izoláltunk DNS-t a gyártó előírása szerint.

A kapott DNS-t agaróz gélelektroforézissel detektáltuk, amihez 1%-os agaróz gélt készítettünk (1 g agaróz, 10 ml 10xTBE, 90 ml bdH2O, és 0,5 μl/ml etídium-bromid). A gél zsebeibe 5 μl DNS-mintát és 3μl töltőpuffert (30 v/v % glicerin, 0,25 mM brómfenolkék), az első zsebbe pedig 1,8 μl molekulasúly markert (Fermentas, Lambda DNA/EcoRI + HindIII Marker, 3) pipettáztunk. A gélt 1xTBE pufferben (TRIS-bázis 10,78 g/l; bórsav 5,50 g/l; EDTA 0,74 g/l; pH 8,3) 100 V-on 20 percig futtattuk, majd UV fényben vizsgáltuk.

IV.2.2. RNS átírás cDNS-sé az RNS alapú vizsgálatokhoz

Azon vizsgálatok esetében, ahol RNS izolálás történt, első lépésben DNase I enzim kezelést alkalmaztunk a RiboPure – Bacteria Kit (Ambion) segítségével a gyártó által megadott protokoll szerint, annak érdekében, hogy a potenciális DNS szennyeződést eltávolítsuk az RNS mellől. Ezt követően a közösségi RNS-t (200 ng-ot) cDNS-sé írtuk át a RNase H activity-less RevertAid Premium Reverse Transcriptase enzim (Thermo Scientific) segítségével, a gyártó által megadott protokoll szerint. A továbbiakban az így kapott cDNS-t használtuk templátként a PCR reakciók során.

1. táblázat: Az alkalmazott PCR eljárások összegzése

Eljárás	Drimon nóv	Duimon házissonnand	Cél gén – cél	Reakció	Ujvotkozás
száma	r rimer nev	r miner bazissorrenu	szervezetek	hőprofilja	nivatkozas
1. eljárás	27F	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	Bacteria	98°C, 5 perc; 32	Lane, 1991;
			– 16S rRNS gén	ciklus (94°C, 30	Polz és
	1492R	5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'		mp; 52°C, 30 mp;	Cavanaugh,
				72°C, 1 perc);	1998
				72°C, 10 perc	
2. eljárás	27F	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	Bacteria	98°C, 5 perc; 32	Lane, 1991;
			– 16S rRNS gén	ciklus (94°C, 30	Muyzer és
	518R	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'		mp; 52°C, 30 mp;	mtsai, 1993
				72°C, 1 perc);	
				72°C, 10 perc	
3. eljárás	27F	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	Bacteria	94°C, 3-5 perc; 24-	Lane, 1991;
			– 16S rRNS gén	28 vagy 40 ciklus	Kunapuli és
	907R	5'-CCG-TCA-ATT-CCT-TTG-AGT-TT-3'		(94°C, 30 mp;	mtsai, 2007
				52°C, 30 mp; 72	
				°C, 30 mp);	
				72°C, 5 perc	

4. eljárás	519F	5'-CAG CMG CCG CGG TAA TAC-3'	Bacteria	94°C, 3 perc; 40	Kunapuli és
			– 16S rRNS gén	ciklus (94°C, 30	mtsai, 2007
	907R	5'-CCG-TCA-ATT-CCT-TTG-AGT-TT-3'		mp; 52°C, 30 mp;	
				70°C, 30 mp);	
				72°C, 5 perc	
5. eljárás	519F	5'-CAG CMG CCG CGG TAA TAC-3'	Bacteria	45°C 30 perc	Bradford és
			– 16S rRNS gén	(reverz	mtsai, 2018
	907R	5'-CCG-TCA-ATT-CCT-TTG-AGT-TT-3'		transzkripció);	
				95°C 3 perc; 35	
				ciklus (95°C 30 mp,	
				52°C 30 mp, 68°C	
				30 mp); 68°C 5	
				perc	
6. eljárás	Illumina	5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT	Bacteria		Klindworth és
	16 S- F	AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC	– 16S rRNS gén		mtsai, 2013
		AG-3'			
	Illumina	5'GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA			
	16S-R	TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT			
		CTA ATC C-3'			

7. eljárás	M13F	5'-GTA AAA CGA CGG CCAG-3'	M13 klónozó vektor	98°C, 5 perc; 32	-
				ciklus (94°C, 30	
	M13R	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'		mp; 52°C, 30 mp;	-
				72°C, 1 perc);	
				72°C, 10 perc	
8. eljárás	COMC23OF	5'-CGA GAA CGT GCT GGG CAT GAA G-3'	Betaproteobacteria	98°C, 5 perc; 32	Táncsics és
			– C23O gén	ciklus (94°C, 30	mtsai, 2009
	COMC23OR	5'-AAG GCG ATG TCG TGC GGC-3'		mp; 63°C, 30	
				mp; 72°C, 1	
				perc);	
				72°C, 10 perc	
9. eljárás	XYLE1F	5'-CCGCCGACCTGATCWSCATG-3'	Gammaproteobacteria	98°C, 5 perc; 32	Hendrickx és
			– I.2.A C23O gén	ciklus (94°C, 30	mtsai, 2006
	XYLE1R	5'-TCAGGTCAKCACGGTCAKGA-3'		mp; 61,5°C, 30	
				mp; 72°C, 1	
				perc);	
				72°C, 10 perc	

10. eljárás	XYLE2F	5'-GTAATTCGCCCTGGCTAYGTICA-3'	Alphaproteobacteria	98°C, 5 perc; 32	Hendrickx és
			– I.2.B C23O gén	ciklus (94°C, 30	mtsai, 2006
	XYLE2R	5'-GGTGTTCACCGTCATGAAGCGBTC-3'		mp; 64°C, 30 mp;	
				72°C, 1 perc);	
				72°C, 10 perc	
11. eljárás	XYLE3F	5'-TGY TGG GAY GAR TGG GAY AA-3'	Betaproteobacteria	95°C, 3 perc; 40	Táncsics és
			– I.2.C C23O gén	ciklus (94°C, 30	mtsai, 2013
	XYLE3R	5'-TCA SGT RTA SAC ITC SGT RAA-3'		mp; 50°C, 30 mp;	
				72°C, 1 perc);	
				72°C, 10 perc	
12. eljárás	ST5-qPCR-F	5'-GTG GGC ACA GAG GTC GGC-3'	ismeretlen	95 °C, 10 perc;	Táncsics és
			Betaproteobacteria	40 ciklus (95°C,	mtsai, 2012
	ST5-qPCR-R	5'-AAG AAC TTG GTG TTC TCG GC-3'	– I.2.C C23O gén	15 mp; 51°C, 30	
				mp; 72°C, 30 mp)	

13. eljárás	ST2-qPCR-F	5'-CCG GCT TGA ACT ACG TGG C-3'	ismeretlen	95°C, 10 perc; 40	Táncsics és
			Betaproteobacteria	ciklus (95°C, 15	mtsai, 2012
	ST2-qPCR-R	5'-CTG GGC AGC ATG AAC TGC AAC-3'	– I.2.C C23O gén	mp; 55°C, 30 mp;	
				72°C, 30 mp)	
14. eljárás	alkB 1f_deg	5'-AAY ACI GCI CAY GAR CTI GGI CAY AA-3'	"univerzális"	95°C, 3 perc; 32	Kloos és
			– alkB gén	ciklus (94°C, 30	mtsai, 2006;
	alkB 1r_deg	5'-GCR TGR TGR TCI GAR TGI CGY TG-3'		mp; 58°C, 30 mp;	Pérez-de-
				72°C, 1 perc);	Mora és
				72°C, 10 perc	mtsai, 2011

Kevert bázisok kódjai: W – A/T; K – G/T; Y – C/T; R – A/G; S – G/C; M – A/C; B – G/C/T; H – A/C/T; N – A/C/T/G

IV.2.3. Filogenetikai és funkcionális markergének PCR amplifikációja

A vizsgálatok során tiszta tenyészetekből, illetve környezeti mintákból nyert DNS mintákból PCR technika segítségével történt a 16S rRNS, katekol 2,3-dioxigenáz (*C23O*), illetve alkán 1-monooxigenáz (*alkB*) gének amplifikációja az 1. táblázatban részletezett PCR eljárásokat használva. A reakciókat legtöbb esetben 50 μL végtérfogatban végeztük ABI 2700 PCR készülék (Applied Biosystems, USA), ProFlex PCR System készülék (Life Technologies, USA), vagy Mx3000P készülék (Stratagene, USA) segítségével. A PCR terméket a NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Németország) segítségével tisztítottuk, majd - 20°C-on tároltuk a további felhasználásig. A PCR termékek minőségi és mennyiségi ellenőrzését 0,5 μg/mL etídium-bromiddal festett, 1%-os agaróz gélen történő elektroforézissel végeztük, 100 V, 15 perc futási paraméterekkel az előzőekben leírtak szerint.

IV.2.4. Sanger szekvenálás és filogenetikai elemzés

A PCR segítségével tiszta tenyészetekből, illetve klóntárakból amplifikált 16S rDNS, C230 és alkB génszakaszok bázissorendjének megállapítása Sanger-féle láncterminációs dideoxi szekvenálás segítségével történt. A reakciót minden esetben 10 µL végtérfogatban BigDye Terminator v3.1 kittel végeztük (Applied Biosystems, USA). A szekvenáló reakció a következőket tartalmazta: 2 µl BigDye Terminator, 3 µl puffer, 1 µl szekvenáló primer (amelynek koncentrációja 32,5 nM), 8 µl dH₂O, 6 µl tisztított PCR termék. A reakció hőprofilja a következő volt: 28 ciklus (96 °C 10mp, 50 °C 5 mp és 60 °C 4 perc. A reakció után a be nem épült bázisok eltávolítására az etanolos precipitációt használtuk. Ennek során minden szekvenáló reakcióhoz 62,5 µL 96%-os etanolt, 14,5 µL steril MQ vizet, illetve 3 µL 2M-os Na-acetát oldatot adtunk. Az oldatban lévő alkohol vízelvonó hatása segít a DNS kicsapódásában, míg a Na-acetát megakadályozza, hogy a reakció során be nem épült dNTP a DNS-sel együtt precipitálódjon. Tíz perc szobahőmérsékleten történő inkubáció után a reakcióelegyet 2360 g-n 30 percig centrifugáltuk (4°C), majd a felülúszót eltávolítottuk. Ezután a precipitálódott DNS-re 180 µL 70%-os etanolt mértünk, és újabb 10 percig centrifugáltuk 2360 g-n (4°C). A felülúszó ismételt eltávolítása után a precipitátumot vízmentesre szárítottuk, majd mintánként 20 µL HI-DI formamidot mértünk rá, amely denaturált formában tartja a DNS-t. A kész elegyet 4°C-on tároltuk a további vizsgálatig.

A szekvenálási termékeket ABI Prism 310 Genetic Analyser és ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) kapilláris gél-elektroforézis berendezésekkel értékeltük. A kapott

elketroferogramok minőségét manuálisan értékeltük a MEGA szoftver (Tamura és mtsai, 2007) éppen aktuális verziójának segítségével és javítottuk az esetleges hibákat.

A szekvenálás eredményeként kapott bázissorendeket minden esetben összehasonlítottuk a GenBank adatbázisban fellelhető 16S rDNS, *C23O* és *alkB* adatokkal a BLAST keresőprogram használatával (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Ezen felül a 16S rDNS bázissorendeket összehasonlítottuk az EzTaxon/EzBioCloud adatbázisban található típus törzsek 16S rDNS bázissorendjével (https://www.ezbiocloud.net/).

A filogenetikai fákat minden esetben a MEGA szofver éppen aktuális verziójának segítségével készítettük (Tamura és mtsai, 2007). Az evolúciós távolságokat minden esetben a Kimura-féle kétparaméteres eljárással határoztuk meg (Kimura, 1980). A filogenetikai törzsfákat alapesetben a neighbor-joining algoritmus segítségével képeztük (Saitou és Nei, 1987), de polifázikus fajleírások esetén a maximum likelihood (Felsenstein, 1981) és a maximum parszimónia (Kimura, 1980) algoritmusok alapján is elkészítettük a törzsfákat. A törzsfák elágazásainak stabilitását bootstrap újramintázási eljárással ellenőriztük, 1000 lépés alkalmazásával (Felsenstein, 1985).

IV.3. Molekuláris közösségelemző módszerek leírása

IV.3.1. A terminális restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (T-RFLP) módszere

A T-RFLP egy olyan közösségi ujjlenyomat vizsgáló módszer, amelynek során restrikciós enzimmel emésztett PCR terméket analizálunk kapilláris gél-elektroforézissel. A PCR terméket minden esetben fluoreszcensen jelölt forward primer segítségével amplifikáltuk (a reverz primer nem jelölt). A fluoreszcens jelölés minden esetben HEX vagy VIC volt (Integrated DNA Technologies, Belgium; illetve Life Technologies, USA). A fluoreszcensen jelölt PCR termékek restrikciós emésztéséhez a következő enzimeket használtuk: *RsaI* (GT \downarrow AC, 16S rDNS szakaszok vizsgálata, Thermo Fisher Scientific), *AluI* (AG \downarrow CT, I.2.C-típusú *C230* génszakaszok vizsgálata, Thermo Fisher Scientific); *Hin6*I (G \downarrow CGC, I.2.C-típusú *C230* génszakaszok vizsgálata, Thermo Fisher Scientific); *HPyCH4V* (TG \downarrow CA, *alkB* génszakaszok vizsgálata, New England BioLabs). A jelölt PCR termékek emésztése 20 µl végtérfogú reakcióelegyben történt, amely a következőket tartalmazta: 10 µl PCR termék, 3 U restrikciós enzim, 2 µl enzim puffer és annyi dH₂O amennyi a 20 µl végtérfogat eléréséhez szükséges. A reakcióelegyte 1-3 órán át 37°C-on inkubáltuk PCR berendezés segítségével, majd etanolos precipitáció segítségével pelletáltuk az emésztett DNS-t, majd

25-30 μl dH₂O-ban visszaoldottuk. Az így kapott elegyet a további felhasználásig -20°C-on tároltuk. A tisztított és emésztett DNS-ből 0,5-1,5 μl-t adtunk 12 μl formamidhoz (Promega, USA) és 0,6 μl standard meghatározott hosszúságú DNS fragmenthez (Genescan TAMRA 500, vagy LIZ500, vagy LIZ1200, Applied Biosystems, USA). Ezután a mintákat kapilláris gélelektroforézisnek vetettük alá ABI 310 Genetic Analyzer, vagy (Applied Biosystem, USA) segítségével. Az eredményként kapott elektroferogramokat GeneMapper program segítségével dolgoztuk fel (Applied Biosystem, USA). Az eredmények statisztikai értékelése során kizártuk azokat a T-RF-eket, amelyek az össz fluoreszcencia intenzitáshoz (vagy másképpen fogalmazva az össz T-RF csúcs alatti területhez) 1%-nál kisebb mértékben járultak hozzá, illetve azokat a T-RF-eket is, amelyek 50 bp hossznál kisebbek voltak. Ezután az adatokat elsőként a T-Align online szoftver (Smith és mtsai, 2005) segítségével hasonlítottuk össze, amelynek eredményeképpen megkaptuk az egyes T-RF-ek százalékos abundanciáját minden egyes mintára vetítve. A minták hasonlósági dendrogramjait a PAST szoftvercsomag segítségével generáltuk, Jaccard, illetve Bray-Curtis algoritmusok szerint (Hammer és mtsai, 2001).

IV.3.2. A Single nucleotide primer extension (SNuPE) módszer

A SNuPE vizsgálathoz használt I.2.C C23O PCR termékeket kétszeresen tisztítottuk, hogy a be nem épült nukleotidok semmiképpen se zavarják a SNuPE reakciót. Ehhez első lépésben a NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up Kit (Macherey-Nagel) segítségével végeztünk tisztítást a gyártó által megadott protokoll szerint. A következő lépésben az egyszeresen tisztított PCR termékekből 500 ng-ot 12 U alkalikus foszfatázzal (SAP; Thermo Scientific) és 6 U exonukleáz I enzimmel (ExoI; Thermo Scientific) kezeltünk 60 µl végtérfogatra kiegészítve az SAP enzim pufferével. A reakcióelegyet 37°C-on inkubáltuk 1 órán át, majd enziminaktivációt végeztünk 75°C-on 15 percig. Az így kapott, duplán tisztított PCR terméket használtuk templátként a SNuPE reakcióban. A reakcióelegy végtérfogata 10 µl volt, és a következőket tartalmazta: 1,2 µl SNaPshot Multiplex Kit reagens (Applied Biosystems); 1,8 µl 5x SNaPshot puffer (Applied Biosystems); 1 µl PCR termék; 0,5 µl SNuPE primer keverék (1,5 µM egyenként); és 5,5 µl dH2O. A SNuPE reakcióelegyet ezután PCR berendezésben a következő hőprofil mellett inkubáltuk: 28 ciklus [96°C 10 mp, 55°C 5 mp, 60°C 30 mp]. Következő lépésben 1 U SAP enzimet mértünk a reakcióelegyekhez, hogy eltávolítsuk a be nem épült dideoxinukleotidokat és 37°C-on inkubáltuk 1 órán át, majd enziminaktivációt végeztünk 75°C-on 15 percig. A SNuPE reakcióelegyből 1 µl-t mértünk 9 µl formamid és 0,5 µl LIZ 120 standard meghatározott hosszúságú DNS fragmenthez (Applied Biosystems). Az egy nukleotiddal meghosszabbított SNuPE primereket kapilláris gél-elektroforézis segítségével választottuk el egymástól Model 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) berendezést használva. A kapilláris gél-elektroforézist 36 cm hosszúságú kapillárissal végeztük (Applied Biosystems), POP4 polimerrel (Applied Biosystems) és E5 filterrel (Applied Biosystems). Az elektroferogramokat GeneMapper 4.0 szoftverrel értékeltük (Applied Biosystems). Az adatmátrix létrehozása hasonlóan történ, mint a T-RFLP elektroferogramok esetében, a T-Align és a PAST szoftvereket használva. A 16S rDNS alapú T-RFLP-vel és C23O alapú SNuPE módszerrel egyaránt vizsgált talajvízminták esetében a SNuPE vizsgálat eredményét vektorok formájában illesztettük rá a T-RFLP adatok főkomponens analízissel kapott diagramjára, az R programcsomag "envfit" algoritmusa szerint (Oksanen és mtsai, 2010). Az illeszkedés szignifikanciaszintjét 10000 random permutáció alapján számítottuk ki.

IV.3.3. Klóntár készítés

A kísérletek során klóntárak készítésével tártuk fel a C230 és alkB gének diverzitását a vizsgált környezeti mintákban, illetve dúsító tenyészetekben. Ezen túlmenően, a korai vizsgálatok esetében a 16S rRNS gének diverzitását is e módszer segítségével tártuk fel. A kiindulási PCR termékeket az 1. táblázatban szereplő 2., 7., 9. és 12. eljárások szerint készítettük el. A PCR termékeket tisztítottuk (Viogene DNA/RNA Extraction Kit, Viogene BioTek Corp., vagy NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up Kit, Macherey-Nagel) és p-GemT Easy vagy pCR II vektorba ligáltuk (Promega, illetve Invitrogen), ezt követően JM109 High Efficiency Competent Escherichia coli (Promega) vagy TOP10 Competent Escherichia coli (Invitrogen) sejteket transzformáltunk az így készült vektorral a gyártók előírásai szerint. Az inzertet tartalmazó vektort hordozó sejteket kék-fehér szelekció segítségével választottuk ki. Ehhez az ampicillint (Sigma-Aldrich) tartalmazó LB táplemezekre X-Gal-t (5-bróm-4-klór-3indolin-β-D-galaktozid; Promega) és IPTG-t (izopropil-tio-galaktozid, Promega) vittünk fel a gyártó által előírt koncentrációban, majd erre szélesztettük a transzformált E. coli sejteket, és 37°C-on 24 órán keresztül inkubáltuk. A kinőtt fehér telepeket steril fogpiszkáló segítségével átpontoztuk egy másik LB táplemezre, majd újabb 24 órát inkubáltuk 37°C-on. A telepeket egyenként 30 µl steril vízbe vittük át steril fogpiszkáló segítségével. Kémcsőkeverő segítségével történő alapos szuszpendálás után a plazmid DNS kinyeréséhez a sejteket 98°C-on 5 percig lizáltuk, majd centrifugáltuk (10000 g; 5 perc). Az inzert visszanyerése funkciógén (C23O, alkB) esetében ugyanazzal a primerpárral és eljárással történt, amellyel a kiindulási PCR terméket nyertük, míg 16S rRNS gén esetében a vektorra specifikus M13 primerekkel történt a visszaamplifikálás az 1. táblázatban feltüntetett 5. eljárás alapján.

IV.3.4. Metagenom szekvenálás és adatelemzés

A filogenetikai elemzés céljára készült teljes metagenom vizsgálatok Ion Torrent PGM (Life Technologies) berendezés segítségével történtek, és a Seqomics Kft. által lettek elvégezve. A 200 nukleotid hosszúságú DNS fragmentekből álló "könyvtár" az Ion Xpress Plus Fragment Library Kit (ThermoFisher Scientific) segítségével készült, a gyártó által megadott protokoll szerint, 1 µg környezeti DNS felhasználása mellett. Az adapter ligáció és a nick-transzláció az Ion Shear Plus Reagents Kit (ThermoFisher Scientific) segítségével történt, míg a méret szelekció 2%-os agaróz gélen történt. A "könyvtár" amplifikációja Platinum PCR SuperMix (ThermoFisher Scientific) segítségével történt. Az emulziós PCR-hez Ion PGM 200 Xpress Template Kit lett használva. A DNS szekvencia meghatározása Ion Torrent PGM berendezésen történt, Ion 316-os chip használata mellett. Az adatelemzéshez az online elérhető MG-RAST (Metagenomics Rapid Annotation using Subsystems Technology) szoftvert használtuk. Az elemzés során a maximum e érték 10⁻⁵ volt, míg a minimum hasonlósági érték 60%, és a minimum illesztési hossz 20 nukleotid volt.

A teljes genomépítéshez végzett metagenom szekvenálás ("genome-resolved metagenomics") Illumina MiSeq platformon történt a Seqomics Kft. által. A szekvenáláshoz használt közösségi DNS minőségének és integritásának vizsgálata Agilent 2200 Tapestation berendezéssel történt. A "paired-end" fragmentek (2x250 nukleotid) létrehozása MiSeq Reagent Kit v2 (500 ciklus) segítségével történt. Az elsődleges adatelemzés (base-calling) a Bbcl2fastq[^] szoftver sevítségével történt (v2.17.1.14, Illumina). A nyers szekvencia adatok minőség ellenőrzése a BBDuk szoftver (v. 37.09; https://sourceforge.net/projects/bbmap) és a SICKLE szoftver (https://github.com/najoshi/sickle) segítségével történt. Ezt követően a scaffold-okba rendezés a metaSPADES szoftver (v 3.13, Nurk és mtsai, 2017) segítségével történt (Hyatt és mtsai, 2010) segítségével történt, míg a gének annotációja diamond blast (Buchfink és mtsai, 2015) segítségével történt az UniRef100 (Suzek és mtsai, 2007) adatbázist használva. A scaffold-okon lévő gének taxonómiája alapján minden egyes taxon esetében megállapítottuk azok konszenzus taxonómiai besorolását (Schulze-Makuch és mtsai, 2018). Az egyes scaffold-ok lefedettégét a bowtie2 szoftver (Langmead és Salzberg, 2012) segítségével állapítottuk meg.

A célszervezet genomjának felépítése tetranukleotid frekvenciák alapján történt, az "emergent self organizing map" módszert használva (Dick és mtsai, 2009). A célszervezet abundanciáját a S3 riboszómális fehérjét tartalmazó scaffoldok lefedettsége alapján határoztuk meg. A taxonómiai meghatározásához 16 riboszómális fehérje (L2, L3, L4, L5, L6, L14, L16, L'8, L22, L24, S3, S8, S10, S17 és S19) szekvenciáját válogattuk ki a célszervezet genomjából (Hug és mtsai, 2016), majd egy Probst és mtsai (2018) által létrehozott adatbázis szekvenciával illesztettük őket a MUSCLE szoftver (v3.8.31, Edgar, 2004) segítségével. A bizonytalanul illeszkedő terminális régiókat a Geneious szoftver (11.0.5) segítségével távolítottuk el. A 16 különböző fehérje illesztést ezután összefűztük, majd csak azokat a szekvenciákat tartottuk meg, ahol az aminosav pozíciók több, mint 50%-ban átfedtek. A fennmaradó szekvenciákat használtuk arra, hogy filogenetikai fát hozzunk létre, a maximum-likelihood becslés alapján (Price és mtsai, 2010). A fa megjelenítéséhez a Dendroscope szoftvert (v.3.5.10) használtuk.

IV.3.5. 16S rDNS amplikon szekvenálás – Roche 454 piroszekvenálás, Illumina amplikon szekvenálás és adatelemzés

A 16S rDNS amplikonok piroszekvenálásához egy egyirányú szekvenálási módszert alkalmaztunk, amelyet Zhang és Lueders (2017) írtak le. A 16S rDNS amplikonokat barcode-ot tartalmazó 27F és 907R primerek segítségével amplifikáltuk (a primerek szekvenciáit az 1. táblázat tartalmazza). Mindkét primer Lib-L adaptereket tartalmazott, míg a 27F primerhez multiplex azonosítót kapcsoltunk (MID) a 454 GS FLX+ protokoll alapján (Roche). Az amplifikáció a Karwautz és Lueders (2014) által leírtak szerint történt. Az amplikonok minőségét 1,5%-os (w/v) agaróz gélen történő gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk, majd a tisztítást PCRextract kit (5Prime) segítségével végeztük el a gyártó által megadott protokoll szerint. Az ezt követő minőségellenőrző lépést (primer dimer szennyeződés mértékének, illetve a megfelelő fragmentméret megállapítása) Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) készülék segítségével végeztük, High Sensitivity DNA assay chip (Agilent) felhasználásával, a gyártó előírásai szerint. A multiplex amplicon pool 20 db "könyvtárat" tartalmazott, ahol az egyes "könyvtárak" ekvimoláris (5x10⁹ molekula/µl) mennyiségű barkódolt amplikont tartalmaztak. A megfelelő mennyiségeket Quant-iT PicoGreen dsDNA quantification kit (Invitrogen) segítségével állapítottuk meg. Az amplikon keveréket ezután újabb tisztításnak vetettük alá, amelyhez Agencourt AMPure-XP gyöngyöket (Beckman Coulter) használtunk, a hődenaturációs protokoll (Roche) szerint. Az emulziós PCR és az azt követő fázisszeparáció a Roche által megadott protokoll szerint történt, majd a piroszekvenálás 454 GS FLX+

dc_1786_20

berendezésen történt az IMGM Laboratories (Planegg, Németország) által végzett szolgáltatás keretében. A nyers szekvencia adatok elsődleges minőségellenőrzését GS Run Processor alkalmazás segítségével végeztük el, a LongAmplicon3 filtert (Roche) használva. A szekvenciákat ezután a MID barkódok alapján szétválogattuk, hasonlóan, ahogy azt korábban Pilloni és mtsai (2012) tették. A szekvenciák trimmelését a Greengenes "Trim" funkciójának segítségével végeztük el, az alapbeállításokat használva (DeSantis és mtsai, 2006). A trimmelt szekvenciákat a SILVA rRNA Gene Database Project - NGS Analysis Pipeline (SILVAngs 1.3) szoftver segítségével elemeztük (Quast és mtsai, 2013). A szekvenciákat a SILVA Incremental Aligner (SINA v1.2.10 for ARB SVN (revision 21008)) (Pruesse és mtsai, 2012) szoftver segítségével illesztettük a SILVA SSU rRNA SEED adatbázis szekvenciáival (Quast és mtsai, 2013). Azokat a szekvenciákat, amelyek 50 nukleotidnál kisebb átfedéssel illeszkedtek a többi szekvenciához, vagy 40-nél kisebb illeszkedési értéket vettek fel, vagy 2%-nál több bizonytalanul meghatározott bázist tartalmaztak, illetve 2%-nál több homopolimert tartalmaztak kizártuk a további értékelésből. A szekvenciák OTU-kba rendezését a CD-HIT-EST (v.3.1.2) szoftver (Li és Godzik, 2006) segítségével végeztük 98%-os szekvencia hasonlósági kritérium mellett. Az OTU-k klaszifikációja lokális nukleotid BLAST keresés segítségével történt a SILVA SSU Ref adatbázist (v.123; http://www.arb-silva.de) és a blastn (v.2.2.30) szoftvert felhasználva (Camacho és mtsai, 2009).

Az Illumina 16S rDNS amplikon szekvenálások Illumina MiSeq platform segítségével történtek, a Seqomics Kft. által végzett szolgáltatás keretein belül. A V3-V4 régiót lefedő 16S rDNS amplikonok generálása a Klindworth és mtsai (2013) által megadott PCR primerek segítségével történt az 1. táblázat 4. eljárása szerint. Az amplifikációhoz KAPA HiFi HotStart Ready Mix-et (KAPA Biosystems) használtunk az Illumina által megadott protokoll szerint. A paired-end fragmentek szekvenálás MiSeq Reagent Kit v3 (600 ciklus) segítségével történt. Az elsődleges adatelemzés (base-calling) a Bbcl2fastq[^] szoftver sevítségével történt (v2.17.1.14, Illumina). A kapott szekvenciaadatok további elemzése (minőségi ellenőrzés és trimmelés) a CLC Genomics Workbench Tool 9.5.1-es verziójával történt (minimum szekvenciahossz 50 nukleotid). A filogenetikai adatelemzés MEGAN6 szoftver (Huson és mtsai, 2007) vagy MOTHUR szoftver (v1.41.1, Schloss és mtsai,2009) segítségével történt.

A MEGAN6 szoftverrel történő adatelemzés előtt a BLASTN illesztés az aktuális SILVA rRNA adatbázis segítségével történt. A taxonómiai azonosításhoz a 16S Percent Identity Filter algoritmust használtuk, és a nemzetség szintű besorolás 97%-os hasonlósági szint felett történt.

A MOTHUR szoftverrel történő adatelemzés során a MiSeq Standard Operation Procedure (SOP) lépéseit követtük (<u>http://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP</u>) (Kozich és mtsai, 2013). A szekvenciák illesztése a SILVA 132 SSURef NR99 adatbázis segítségével történt (Quast és mtsai, 2013). A kiméra szekvenciák detektálása a "uchime" algoritmussal történt (Edgar és mtsai, 2011), majd a "split.abund" paranccsal távolítottuk el az egy példányban jelenlévő szekvenciákat (Kunin és mtsai, 2010). A szekvenciák taxonómiai azonosításához az aktuális SILVA adatbázis segítségével történt. A szekvenciák OTU-kba (Operational Taxonomic Unit) rendezése 97%-os szekvencia hasonlósági érték alapján történt (Tindall és mtsai, 2010).

IV.3.6. Teljes genom szekvenálás és adatelemzés

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

IV.4. Stabil izotópos jelölés módszertana

IV.4.1. A mikrokozmosz kísérlet felállítása

A stabil izotópos vizsgálat során 13-as szénizotópot (¹³C₇- tehát mind a 7 db C-atom 13-as szénizotóp) tartalmazó toluol mikroerob körülmények közötti lebomlását vizsgáltuk mikrokozmosz kísérletek segítségével. A mikrokozmoszok inokulumaként egy BTEX-vegyületekkel szennyezett kárhelyen (Siklós) vettünk nagy mennyiségű szediment mintát. A mikrokozmoszokat 100 ml-es, hermetikusan zárható szérumüvegekben hoztuk létre oly módon, hogy mindegyikbe 5 g (nedves tömeg) szedimentet és 50 ml mesterséges talajvíz oldatot mértünk. Ez utóbbi oldat a következőképpen került összeállításra: NaCl – 0,1 g; MgCl₂x6H₂O - 0,04 g; CaClx2H₂O - 0,01 g; NH₄Cl - 0,025 g; KH₂PO₄ - 0,02 g; KCl - 0,05 g; 1000 ml dH₂O; 1 ml nyomelemoldat (HCl (25%) – 12,5 ml; FeSO₄x7H₂O – 2100 mg; H₃BO₃ - 30 mg, MnCl₂x4H₂O - 100 mg; CoCl₂x6H₂O - 190 mg; NiCl₂x6H₂O - 24 mg; CuCl₂x2H₂O -2 mg; ZnSO₄x7H₂O -144 mg; Na₂MoO₄x2H₂O -36 mg; 987 ml dH₂O); 1 ml szelén-wolfram oldat (NaOH - 0,4g; Na₂SeO₃x5H₂O - 6 mg; Na₂WO₄x2H₂O - 8 mg; 1000 ml dH₂O); 30 ml nátrium-karbonát oldat (NaHCO₃ – 84 g; 1000 ml dH₂O); vitamin oldat – 1 ml (10 mM-os Na₂HPO₄ oldat – 100 ml; 4-aminobenzoesav – 4 mg; D(+)-biotin – 1 mg; nikotinsav – 10 mg; kalcium D(+)-pantoténsav – 5 mg; piridoxin-dihidroklorid – 15 mg; 0,2 µm pórusátmérőjű fecskendőszűrővel sterilre szűrve); tiamin oldat – 1 ml (25 mM-os Na₂HPO₄ oldat – 100 ml, pH 3,4; tiamin dihidroklorid – 10 mg; ,2 µm pórusátmérőjű fecskendőszűrővel sterilre szűrve); B₁₂ viamin oldat – 1 ml (cianokobalamin – 5 mg, 100 ml dH₂O; 2 μm pórusátmérőjű fecskendőszűrővel sterilre szűrve). A mikrokozmoszokhoz 5 µl cAMP oldatot adtunk, hogy annak végső koncentrácója 10 µM legyen az üvegekben (Bruns és mtsai, 2002). Ezt követően a szérumüvegeket hermetikusan lezártuk viton dugóval és alumínium zárókupakkal, majd sterilre szűrt karbogén gázkeveréket (N₂/CO₂ - 80:20) buborékoltattunk át a folyadékfázison 10 percen keresztül, hogy az oxigént eltávolítsuk az üvegekből. Ezután sterilre szűrt levegő beinjektálásával állítottuk be az üvegekben a 0,5 mg/l-es oldott oxigén koncentrációt, amelyet Fibox 3 trace v3 oldott oxigén mérő készülék és PSt3 szenzor segítségével mértünk a fent leírtak szerint. Szénforrásként 5 µl, izotóposan jelölt ¹³C7 toluolt (Sigma-Aldrich) adtunk a mikrokozmoszokhoz (6 db), illetve, jelöletlen ¹²C₇ toluolt (Sigma-Aldrich) a biológiailag aktív kontroll mikrokozmoszokhoz (szintén 6 db). Ezen felül három mikrokozmoszt háromszori autoklávozással inaktiváltunk, majd azokhoz 5 µl jelöletlen (¹²C₇) toluolt adtunk. E három mikrokozmosz szolgált abiotikus kontrollként a kísérlet során. A mikrokozmoszokat rázótermosztátban inkubáltuk 16°C-on, 145 r.p.m.-en, 7 napig.

IV.4.2. A mikrokozmoszok fenntartása, és a nukleinsav-izolálás

A mikrokozmoszok fenntartása során 24 óránként ellenőriztük az oldott oxigén koncentrációját és szükség esetén steril levegő beinjektálásával állítottuk vissza a kiindulási 0,5 mg/l-es oxigén koncentrációt. A toluol koncentrációját szintén 24 óránként vizsgáltuk gáztér elemzéssel GC-MS segítségével a fent leírtak szerint. A mikrokozmoszokból DNS-t és RNS-t izoláltunk, amelynek során első lépésként a mikrokozmosz teljes folyadék és szediment tartalmát centrifugálás segítségével ülepítettük (2360 g, 4°C, 10 perc), majd az RNA PowerSoil Total RNA Isolation Kit (MoBio) és az RNA PowerSoil DNA Elution Accessory Kit (MoBio) segítségével izoláltuk a nukleinsavakat a gyártó előírása szerint. A DNS és RNS koncentrációkat Qubit Fluorometer 2.0 (Invitrogen) készülék segítségével állapítottuk meg. További felhasználásig a nukleinsavakat -80°C-on tároltuk.

IV.4.3. A mikrokozmoszokból izolált DNS grádiens centrifugálása és az elkülönített frakciók vizsgálata

Az izolált DNS-ből mikrokozmoszonként 1 μg-nyi mennyiséget mértünk hozzá a CsCl (Calbiochem) grádiens oldathoz (5 ml), amelynek átlagos sűrűsége 1,71 g/ml volt, és a következő grádiens puffer segítségével állítottuk össze: 0,1 M Tris-HCl (pH 8), 0,1 M KCl, 1 mM EDTA (0,2 μm pórusátmérőjű fecskendőszűrővel sterilre szűrve). A keverékeket ezután 5,1 ml térfogatú poliallomer Quick Seal műanyag centrifugacsövekbe (Beckman Coulter, USA) töltöttük, majd ~68 órán keresztül, 180 000 g-én centrifugáltuk Optima XE90 ultracentrifuga, illetve vertikális rotor (VTI 65.2) (Beckman Coulter) segítségével. A centrifugálást követően Perfusor V fecskendőpumpa (B.Braun, Németország) segítségével frakcionáltuk az oldatokat. A frakciók buoyant sűrűségét AR200 refraktométer (Reichert Inc., Németország) segítségével állapítottuk meg, majd a DNS visszanyerését polietilén-glikolos (PEG) kicsapással értük el. Ehhez 150 g polietilén-glikol 6000-et, és 46,76 g NaCl-ot mértünk 500 ml molekuláris tisztaságú desztillált vízhez, majd az oldatot autoklávozással sterilizáltuk. A PEG oldatból kétszeres térfogatot mértünk minden egyes frakcióhoz, majd 30 percig centrifugáltuk 10 000 g-én és 4°C-on. Ezt követően a felülúszót pipettával eltávolítottuk, 150 μl hideg 70%-os etanolt mértünk a pelletre, majd 5 percig centrifugáltuk 10 000 g-én és 4°C-on. Ezt követően a

dc_1786_20

felülúszót ismételten eltávolítottuk pipettával, majd a DNS pelletet 25 µl eluáló pufferben oldottuk fel (az eluáló puffer az RNS/DNS izoláláshoz használt MoBio kitből származott). Az egyes DNS frakciókban a 16S rDNS kópiaszámot qPCR segítségével állapítottuk meg az 1. táblázat 4. eljárása alapján. Az 50 µl végtérfogatú reakciók az alábbiakat tartalmazták: 1 x PCR puffer, 1,5 mM MgCl₂, 1,25 U Taq polimeráz, 0,1 mM dNTP (minden előző reagens MBI Fermentas, Németország), 0,1 x SybrGreen és ROX festékek (FMC Bioproducts), 0,25 µM mindkét primer esetében és 2 µl DNS templát. A kvantifikációhoz szükséges kalibrációs egyenest olyan reakciók szolgáltatták, ahol E. coli-ból származó közel teljes 16S rDNS amplikonok szolgáltak DNS templátként 10⁰-on és 10⁷-en közötti mennyiségben. A kellő mennyiségű DNS-t tartalmazó frakciók esetében T-RFLP segítségével vizsgáltuk a 16S rDNS és az I.2.C-típusú C23O gének diverzitását az 1. táblázatban leírt 3. és 10. eljárások szerint, VIC-jelölt forward primereket használva. A 16S rDNS amplikonokat RsaI, míg a C23O amplikonokat AluI restrikciós enzimmel hasítottuk a fent leírtak szerint. A 16S rDNS amplikon piroszekvenáláshoz a 16S rDNS amplikonok előállítása az 1. táblázat 3. eljárásában feltüntetett primerek segítségével történt a fent leírtak szerint. Az amplikon piroszekvenálás az IV.3.5. fejezetben leírtak szerint történt.

IV.4.4. A mikrokozmoszokból izolált RNS grádiens centrifugálása és az elkülönített frakciók vizsgálata

Az RNS grádiens centrifugálásához mintánként 5 ml 2 g/ml sűrűségű cézium trifluoroacetát oldatot (CsTFA; GE Healthcare, Germany), 185 μl formamidot és 1 ml grádiens puffert (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M KCl, 1 mM EDTA) használtunk, amelyhez 1 μg RNS-t mértünk. A keverékeket ezután 5,1 ml térfogatú poliallomer Quick Seal műanyag centrifugacsövekbe (Beckman Coulter) töltöttük, majd ~60 órán keresztül, 125 000 g-én centrifugáltuk Optima XE90 ultracentrifuga, illetve vertikális rotor (VTI 65.2) (Beckman Coulter) segítségével. A frakcionálás a fent leírtak szerint történt, majd az RNS visszanyerését izopropanolos precipitációval végeztük. Ennek során azonos térfogatnyi izopropanolt mértünk az egyes frakciókhoz, majd 30 percig centrifugáltuk 10 000 g-én és 4°C-on. Ezt követően a felülúszót pipettával eltávolítottuk, majd 150 μl hideg 70%-os etanolt mértünk a pelletre, és 5 percig centrifugáltuk 10 000 g-én és 4°C-on. A felülúszó ismételt pipettával történő eltávolítása után a pelletet 25 μl eluáló pufferben (Qiagen, Germany) oldottuk fel. A frakciókban található 16S rRNS mennyiségét RT-qPCR segítségével állapítottuk meg, amelyhez AccessQuick RT-PCR kitet (Promega, USA) használtunk az 1. táblázat 4. eljárásában leírt 519F és 907R

primerek felhasználásával. A 40 µl végtérfogatú RT-qPCR reakciók a következőeket tartalmazták: 20 µl 2x AccessQuick Master Mix, 0,4 µl 20 mg/ml szarvasmarha szérum albumin, 0,2 µl 1/500 hígítású SybrGreen (ThermoFisher Scientific), 0,6 µl 1/500 hígítású ROX, 10 µM mindkét primerből és 2 µl RNS templát. A reakció az 1. táblázatban leírt 5. eljárás szerint történt, amelyet egy disszocióációs görbe felvétele követett 55°C és 95°C között, annak érdekében, hogy a reakció specifitását ellenőrizhessük. A kalibrációs görbéhez szükséges rRNS-t a Ribopure *in vitro* transcription kit (Promega) segítségével nyertük olyan plazmidok felhasználásával, amelyek egy *Methylobacterium* sp. 16S rRNS génjét tartalmazták. Az RNS kvantifikációját Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit (ThermoFisher Scientific) segítségével végeztük el.

IV.5. Polifázikus baktérium fajleírás módszertana

IV.5.1. Telep- és sejtmorfológiai vizsgálatok

A telepmorfológiai megfigyeléseket R2A táptalajon való tenyésztés után, 24-48 órás tenyészeteket felhasználva végeztük el sztereomikroszkóp segítségével. A Gram festés a Claus (1992) által leírt módszer szerint történt. A sejtek morfológiáját fáziskontraszt mikroszkóp, és transzmisszós elektronmikroszkóp (TEM, Morgagni 268) segítségével vizsgáltuk. Az elektronmikroszkópi vizsgálathoz a preparátumokat negatívan festettük 1% (w/v) uranil-acetát oldattal (Szoboszlay és mtsai, 2008).

IV.5.2. Biokémiai – élettani jellemzés

Az oxidáz aktivitást a Tarrand és Gröschel (1982), míg a kataláz aktivitást és a Voges-Proskauer reakciót a Cowan és Steel (1974) által leírt módszerek szerint vizsgáltuk. A D-glükózból való savtermelés képességét a Hugh és Leifson (1953) által leírt módszer alapján ellenőriztük. A hőmérséklet toleranciát 5°C és 45°C között vizsgáltuk folyékony R2A médiumban és agar lemezen egyaránt. A pH toleranciát pH 3 és 11 között vizsgáltuk szintén R2A táplevesben. Az ureáz aktivitást, nitrát redukciót, keményítő és Tween 80 hidrolízist, zselatináz és foszfatáz aktivitást a Smibert és Krieg (1994) által leírt módszerek szerint vizsgáltuk. A savtermelést különböző szénforrásokból, illetve egyéb enzimaktivitásokat a következő API tesztek segítségével vizsgáltuk meg: API 50 CH, API 20 NE és API ZYM (bioMérieux). Az anaerob növekedés képességét 0.15% (w/v) KNO₃-ot tartalmazó R2A

tápoldatban vizsgáltuk, amelyből nitrogén gáz (tisztaság 5.0, Messer) steril körülmények közötti átbuborékoltatásával eltávolítottuk az oxigént. A szénhidrogén-lebontási képességet 100 ml OIR III tápoldatban vizsgáltuk, amelynek összetétele a következő volt: (NH4)₂SO₄ – 5 g; KH₂PO₄ - 0,5 g; K₂HPO₄ - 1 g; MgSO₄x7H₂O - 0,5 g; CaCl₂x6H₂O - 0,2 g; FeSO₄x7H₂O -0.01 g; pepton -0.5 g; élesztőkivonat -0.5 g; 1000 ml dH₂O; gázolaj/kőolaj 3:2 arányú keveréke – 2 ml. A vizsgált törzset előzőleg R2A tápoldatban tenyésztettük, majd a még exponenciális növekedési fázisban lévő tenyészetből 5 ml-t oltottunk át az OIR III tápoldatba. A vizsgálatot három párhuzamos mintán végeztük el és három beoltatlan lombik szolgált negatív kontrollként. A lombikokat 120 órán keresztül inkubáltuk rázótermosztátban 20°C-on és 150 rpm-en. Az inkubáció végeztével a szénhidrogén frakciót 3x50 ml hexánba vittük át rázótölcsér segítségével, majd a 150 ml hexánt Na₂SO₄-ot tartalmazó Düren 619 g ¹/₄ szűrőpapíron szűrtük át, hogy eltávolítsuk az esetlegesen a hexánban visszamaradt vizes fázist. Annak érdekében, hogy maximalizáljuk a szénhidrogén-kinyerést az OIR III oldatból, 50 ml kloroform segítségével vontuk ki az esetlegesen visszamaradt gázolaj/kőolaj nyomokat az oldatból. Ezt követően az 50 ml kloroformot a 150 ml hexánhoz adtuk. Következő lépésben az oldószereket Heidolph Rotary Evaporator berendezés segítségével elpárologtattuk, majd a visszamaradt gázolaj/kőolaj keveréket 45 percig inkubáltuk 65°C-on, hogy az összes oldószermaradványt eltávolítsuk a keverék mellől. A szénhidrogén-lebontási hatékonyságot a visszanyert gázolaj/kőolaj keverék tömege alapján számítottuk.

IV.5.3. Izoprenoid légzési kinonok vizsgálata

Az izoprenoid kinonok vizsgálatát a Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Németország) végezte. A kinonok extrakciója 200 mg liofilizált biomasszából történt hexán segítségével (a vizsgált törzset előzetesen R2A táptalajon tenyésztettük). A kinonok tisztítása szilika-alapú szilárd fázisú extrakcióval, míg elválasztásuk és meghatározásuk reverz fázisú HPLC-vel történt (Tindall BJ, 1990a, 1990b).

IV.5.4. Zsírsavprofil elemzés

A zsírsav metil-észterek és a poláris lipidek elemzéséhez a vizsgált törzset R2A táptalajon növesztettük. A celluláris zsírsavak és a poláris lipidek vizsgálatát a Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig,

Németország) végezte. A zsírsavak kinyerése, szaponifikációja és metilációja Miller (1982) és Kuykendall és mtsai (1988) által kidolgozott, kismértékben módosított módszerei szerint történt. A zsírsav metil-észterek elválasztása láng-ionizációs detektorral felszerelt gázkromatográf segítségével történt, a Sherlock Microbial Identification System (MIDI) eljárása szerint. A poláris lipidek kivonása 200 mg liofilizált biomasszából történt kloroform:metanol:NaCl (0,3%-os) oldat keverékével, ahol a poláris lipidek a kloroform fázisban koncentrálódnak (Bligh és Dyer, 1959). Az oldatból a poláris lipidek elválasztása 2dimenziós szilika vékonyréteg kromatográfiával történt, ahol az első elválasztás kloroform:metanol:víz elegyével, míg a második elválasztás kloroform:metanol:ecetsav:víz elegyével történt. A teljes lipidtartalom meghatározása foszformolibdénsav használatával történt, míg az egyes specifikus lipidcsoportok meghatározása csoportspecifikus reagensek használatával történt (Tindall és mtsai, 2007).

IV.5.5. DNS-DNS hibridizáció és G+C mólarány meghatározás

A DNS-DNS hibridizációt és a G+C mólarány meghatározását szintén a a Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Németország) végezte. A DNS-DNS hibridizáció a De Ley és mtsai (1970) által leírt módszer alapján, de annak kissé módosított, Huβ és mtsai (1983) által leírt változata szerint történt. A mérések Cary 100 BIO UV/VIS (Varian) spektrofotométerrel történtek, amely Peltier elemes termosztálású 6x6 küvettaváltóval és *in situ* hőmérséklet ellenőrzésen alapuló, programozható hőmérséklet szabályozóval volt felszerelve.

A vizsgált baktériumtörzs DNS-ének G+C mólarány meghatározásához a bakteriális sejtek feltárása Constant Systems TS 0.75 kW (IUL Instruments) berendezés segítségével történt. A DNS tisztítása hidroxiapatit oszlopkromatográfiás módszerrel történt (Cashion és mtsai, 1977), amelyet P1 nukleázzal és szarvasmarha bélnyálkahártya-eredetű alkalikus foszfatázzal történő emésztés követett (Mesbah és mtsai, 1989). Az így nyert nukleozidok elválasztása reverz fázisú HPLC-vel történt a Tamaoka és Komagata (1984) által leírt módszer szerint. A DNS G+C tartalmának kiszámítása a deoxiguanozin – timin arányból történt.

IV.5.6. Az új baktériumfaj filogenetikai helyzetének megállapítása

A vizsgált törzs filogenetikai helyzetét a 16S rDNS szekvencia alapján állapítottuk meg, filogenetikai fa segítségével. Ehhez a legközelebbi rokonok 16S rDNS szekvenciáját az NCBI

dc_1786_20

GenBank adatbázisból töltöttük le, majd a szekvenciák illesztése és a filogenetikai fák készítése a IV.2.4. alfejezetben leírtak szerint történt.

V. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

V.1. BTEX-vegyületekkel szennyezett, oxigén-limitált talajvizek mikroba közösségeinek feltárása

V.1.1. A 16S rRNS és C23O gének diverzitásának vizsgálata három magyarországi kárhelyen

Az I.2.C alcsaládba tartozó gének diverzitását elsőként három olyan magyarországi kárhelyen vizsgáltuk, ahol a felszín alatti közeg nyers kőolajjal, vagy valamilyen finomított kőolajszármazékkal volt szennyezett. Az "OM"-jelű kárhely Dél-Kelet-Magyaroszágon található, ahol is egy kőolajvezeték sérülése folytán került kőolaj a felszín alatti közegbe. A "BM"-jelű kárhely Kelet-Magyarországon helyezkedik el, míg a "ZM"-jelű kárhely Nyugat-Magyarországon található. E két szennyezés eredete üzemanyag töltőállomásokhoz köthető. E két utóbbi kárhely esetében a bioremediációs eljárás megkezdése előtt történt a mintavételezés, míg az "OM"-jelű kárhely esetében ez három hónappal a kármentesítési folyamat (biostimuláció levegőztetés útján) megkezdése után történt.

V.1.2. A vizsgált talajvízminták fizikai-kémiai paraméterei

Az "OM"-jelű kárhelyen három talajvíz mintavételi kutat vizsgáltunk: a kontrollnak tekinthető (bár kismennyiségű benzolt tartalmazó) OM3, illetve a BTEX-vegyületekkel jelentős mértékben szennyezett OM7-es és OM8-as kutakat (lásd 2. táblázat). Habár az oldott oxigén koncentrációk ezekben a kutakban aerob viszonyokra utaltak, az alacsony redoxpotenciál értékek alapján még erősen redukált volt a közeg (3. táblázat). Meg kell jegyezni azonban, hogy a levegőztetés megkezdése előtt a szennyezett kutakban 2,9 mg/l-t. Ami a többi általunk vizsgált terminális elektron akceptor mennyiségét illeti, a nitrát koncentrációja a szennyezett kutakban a kimutathatósági hatérték (1 mg/l) alatt volt, ami szintén arra utal, hogy a levegőztetés megkezdése előtt a közeg erősen oxigén-limitált volt (3. táblázat). A szennyezett kutakban jelentős mennyiségű Fe(II)-t lehetett kimutatni, ami arra utal, hogy a nitrát mellett a Fe(III)-is szerepet játszhatott az ebben a közegben jelenlévő anaerob nichekben, mint terminális elektron akceptor.

dc 1786 20

Minte	BTEX-vegyü	BTEX-vegyületek koncentrációja (µg/L)				
Minta	Benzol	Toluol	Etilbenzol	Xilolok	Egyéb alkilbenzolok	TPH (µg/L)
OM3	77.9	<1	<1	<1	20	<50
OM7	4141	2480	117	1420	549	2150
OM8	1990	1580	69	1570	667	3200
ZM4	2.3	5	<1	<5	<20	<50
ZM9	7690	2690	<1	8050	3740	3080
BM1	<0.2	<1	<1	<5	20	<50
BM7	0.9	1	<1	26	113	250

2. táblázat: Az "OM", "BM" és "ZM"-jelű kárhelyekről származó talajvízminták szennyezettségi paraméterei

A "ZM"-jelű kárhelyen két talajvíz mintavételi kutat vizsgáltunk: a kontrollnak tekinthető (bár nyomnyi mennyiségű benzolt és toluolt tartalmazó) ZM4-es, illetve a BTEX-vegyületekkel jelentős mértékben szennyezett ZM9-es kutakat (lásd 3. táblázat). Az oldott oxigén koncentráció mindkét kútban alacsony volt, ugyanakkor a ZM4-es kútban a nitrát koncentrációja 84 mg/l-nek adódott, míg a ZM9-es kútban a kimutathatósági határérték alatt volt. Ez alapján nitrát-redukáló baktériumok aktivitása is feltételezhető volt a szennyezett közegben. A Fe(II) koncentrációk tekintetében elmondható, hogy a szennyezett kútban nagyobb koncentrációban volt kimutatható, mint a háttér kút esetében, de a különbség nem volt olyan mértékű, mint az "OM"-jelű kárhely esetében.

3. táblázat: Az "OM", "BM" és "ZM"-jelű kárhelyekről származó fizikai-kémiai paraméterei

Minta	Oldott oxigén koncentr	áció (mg/L) Oxigén telítettség (%)	Redox potenciál(mV) ^a	$NO_3^-(mg/L)$	NO_2^- (mg/L)	Fe ²⁺ (mg/L)	pН	Mélység (m)
OM3	3.7	35,3	228	28	0.13	< 0.02	7.22	3.16
OM7	3.6	34.0	153	<1	0.01	22	6.55	2.81
OM8	4.3	44,0	212	<1	0.08	4	6.67	2.72
ZM4	0.3	2.7	480	87	< 0.01	0.02	6.95	3.11
ZM9	1.2	9.9	240	<1	0.04	0.15	9.07	2.95
BM1	1.0	9.4	363	659	0.05	0.03	7.80	3.09
BM7	0.2	1.8	246	57	<0.01	0.5	7.45	2.7

^a Hidrogén referencia elektróddal mérve.

A "BM"-jelű kárhelyen kettő darab talajvíz mintavételi kutat vizsgáltunk: a kontrollnak tekinthető BM1 és a főleg xilol, illetve alkil-benzolokkal szennyezett BM7-es kutakat. Az oldott oxigén koncentráció mindkét kútban alacsony volt, és az oxigén telítettségi értékek is hipoxikus közegre utaltak. A BM1-es kút esetében kirívóan magas nitrát koncentrációt lehetet megfigyelni, ami a terület intenzív mezőgazdasági használatára vezethető vissza. Ezzel szemben a szennyezett közegben jóval alacsonyabb (bár még mindig a "B"-szennyezettségi határértéket túllépő) nitrát koncentrációt lehetett kimutatni, ami mikrobiális nitrát-redukció jelenlétét valószínűsítette. A Fe(II) koncentrációk tekintetében elmondható, hogy a szennyezett kútban egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációban volt kimutatható, mint a háttér kút

esetében, ami Fe(III)-redukáló baktériumok jelenlétét valószínűsítette a szennyezett közegben minden bizonnyal jelenlévő anaerob nichekben.

V.1.3. A C230 gének kimutatása a talajvízmintákból

Az I.2.A alcsaládba tartozó extradiol dioxigenázt kódoló géneket csak a BM7-es kút vízmintájából tudtuk kimutatni. Ez alapján megállapítható volt, hogy a Pseudomonadaceae családba tartozó, BTEX-lebontó baktériumok egyedül e minta esetében lehettek jelen számottevő mennyiségben. Az I.2.B alcsaládba tartozó extradiol dioxigenázt kódoló géneket azonban egyetlen mintából sem tudtuk kimutatnia, ami azt jelentette, hogy a Sphingomonadaceae családba tartozó, egyébként jó aromás szénhidrogén-lebontó képességgel rendelkező fajok egyik vizsgált területen sem voltak domináns közösségalkotók. Mindezek mellett az I.2.C alcsaládba tartozó extradiol dioxigenázt kódoló géneket mintából (háttér és szennyezett mintákból egyaránt) sikerült kimutatnunk. Ebből az eredményből arra következtethettünk, hogy a vizsgált kárhelyeken azok a mikroszervezetek játszhatták a legjelentősebb szerepet a BTEX-vegyületek lebontásában, amelyek I.2.C alcsaládba tartozó extradiol dioxigenáz enzimet kódoló génel rendelkeztek. Mivel e géneket mind a szennyezett, mint pedig a kontroll mintákból is ki tudtuk mutatni, meg szerettük volna vizsgálni azt, hogy vajon eltérő genotípusok mutathatóak-e ki a mintákból. E kérdés megválaszolásához elsőként elvégeztük a közösségi I.2.C *C230* PCR termékek T-RFLP analízisét.

V.1.4. A C230 PCR termékek T-RFLP vizsgálata

Az I.2.C *C230* PCR termékek T-RFLP vizsgálata alapján elmondható, hogy a szennyezés hatására eltérő genotípusok jelentek meg, illetve váltak dominánssá. Ez legjobban az "OM"-jelű kárhely mintái esetében szembetűnő, ahol az OM3-as minta *C230* T-RFLP elektroferogramja teljesen eltérő mintázatot mutat, mint az OM7-es és OM8-as mintáké, míg e két utóbbi mintázata teljesen megegyezik (15. ábra). A "ZM" és "BM"-jelű minták esetében nem volt ennyire drasztikus a különbség a szennyezett és a kontroll minták *C230* T-RFLP elektroferogramjai között. Megfigyelhető volt ugyanis, hogy e minták esetében egyes T-RF-ek mind a szennyezett, mind pedig a kontroll kutakból származó mintákban kimutathatóak voltak (16. és 17. ábrák). Ez minden bizonnyal azzal magyarázható, hogy a "ZM"- és "BM"-jelű kárhelyeken a kontroll kutak is tartalmaztak minimális mértékű szénhidrogén szennyezést. Az azonban nagy biztonsággal kijelenthető, hogy a szennyezés hatására jelentősen megváltozott a

szénhidrogén-lebontó mikrobaközösség szerkezete, és új *C230* genotípusok jelentek meg, illetve mások váltak dominánssá. Ahhoz, hogy a T-RFLP elektroferogramokon megfigyelt T-RF-eket *C230* genotípusokhoz lehessen kötni, klóntárakat kellett létrehozni.



Fragmenthossz (bázispár)

15. ábra: Az "OM"-jelű kárhely C23O T-RFLP elektroferogramjai



16. ábra: A "ZM"-jelű kárhely C23O T-RFLP elektroferogramjai (Táncsics és mtsai, 2010 alapján)



Fragmenthossz (bázispár)

17. ábra: A "BM"-jelű kárhely C23O T-RFLP elektroferogramjai (Táncsics és mtsai, 2010 alapján)

V.1.5. A C230 klónszekvenciák filogenetikai vizsgálata

A C230 T-RF-ek azonosítása céljából a C230 PCR termékeket felhasználva klóntárakat hoztunk létre (az OM7-es minta kivételével, mivel annak T-RFLP profilja teljesen megegyezett az OM8-as mintáéval), majd Sanger-szekvenálás segítségével állapítottuk meg a klónok nukleotid szekvenciáját. A klónszekvenciák vizsgálata kimutatta, hogy az összes kimutatott C23O genotípus az extradiol dioxigenázok I.2.C alcsaládjába tartozó enzimet kódolt (18. ábra). Sajnos azonban a kimutatott genotípusok döntő többsége nem volt köthető egyetlen ismert baktériumfajhoz sem. Mindössze négy, többnyire marginális abundanciával rendelkező T-RF-ekhez köthető genotípust sikerült konkrét baktériumhoz, vagy baktériumcsoporthoz kötni. A BM1-1-jelű, 165 bp hosszúsággal jellemezhető T-RF-hez tartozó klónszekvencia főleg a Burkholderiales rendbe tartozó baktériumokhoz volt köthető. E baktériumok az Alcaligenes, Delftia, Comamonas és Acidovorax nemzetségekbe tartoznak és jellemzően aromás szénhidrogén-lebontó képességgel rendelkeznek. A BM7-4-jelű (346 bp T-RF) és az OM3-3jelű (358 bp T-RF) klónszekvenciák a Leptothrix cholodnii SP6-os törzsének C230 génjével mutattak nagyfokú hasonlóságot (>94%). Az utóbbi klónszekvenciához tartozó T-RF volt ráadásul a domináns az OM3-as (kontroll) mintában. Bár régóta ismert, hogy e baktérium rendelkezik az aromás gyűrűhasítás enzimét kódoló génnel, a szakirodalomban nem találni kísérletes bizonyítékot arra, hogy képes lenne az aromás szénhidrogéneket szén- és energiaforrásként hasznosítani. Végül, a ZM9-2-jelű (165 bp T-RF) klónszekvencia 100%-os hasonlóságot mutatott a Delftia acidovorans 7N törzsének C23O génjével. E baktérium elsősorban az anilin, vagy másnéven az aminobenzol lebontásáról ismert (Urata és mtasi, 2004). Végső soron azonban, a nagymértékű szénhidrogén szennyezést tartalmazó kutakból származó minták esetében a domináns T-RF-ekhez tartozó klónszekvenciák nem voltak köthetőek egyetlen ismert baktériumhoz sem.



0,05

18. ábra: Az "OM", "BM" és "ZM"-jelű kárhelyekről kimutatott C23O génszekvenciák filogenetikai helyzetét mutató neighbor-joining fa (Táncsics és mtsai, 2010 alapján)

V.1.6. A 16S rDNS klónszekvenciák filogenetikai vizsgálata

A 16S rDNS klóntárakat az OM3, OM8, ZM4, ZM9, BM1 és BM7-jelű mintákból hoztuk létre. A legfontosabb klónszekvenciák filogenetikai azonosításának eredményeit a 4. táblázat tartalmazza.

Az "OM"-jelű kárhely esetében jól látható, hogy mind a kontroll (OM3), mind pedig a szennyezett mintavételi kút (OM8) esetében a Burkholderiales rend (korábban Betaproteobacteria osztály) tagjai voltak a domináns közösségalkotók. Azon belül is a Comamonadaceae család volt a legmeghatározóbb mindkét mintában. Amíg azonban az OM3-as minta esetében a Rhodoferax-Albidiferax nemzetségek emelkedtek ki a közösségből (15 db klónszekvencia), addig az OM8-as minta esetében a Malikia nemzetség képviselői szinte egyeduralkodóak voltak (32 db klónszekvencia). Ez utóbbi baktérium nemzetség mindössze két fajt tartalmaz: M. spinosa és M. granosa. E két baktériumról egészen a közelmúltig csak annyi volt ismert, hogy polihidroxi-alkanoát és polifoszfát akkumulációra képesek (Spring és mtsai, 2005), azonban az aromás szénhidrogének esetleges lebontásában való szerepükről egészen minimális információ állt rendelkezésre. Habár Aburto és Ball Malikia eredetű 16S rDNS szekvenciákat azonosítottak domináns DGGE csíkokból, amikor is egy aerob benzol lebontó mikrobaközösséget vizsgáltak, a releváns információ hiányában saját eredményeiket kétkedve fogadták (2009). Valószínűbbnek tartották ugyanis, hogy a 16S rDNS szekvencia rövidsége miatt jutottak erre az eredményre, és valójában a Malikia nemzetség legközelebbi rokonának, a Hydrogenophaga nemzetségnek egy tagját sikerült kimutatniuk, mint domináns benzol lebontó baktériumot. Ez utóbbi nemzetség több tagjáról ismert ugyanis, hogy kiváló benzol lebontó képességgel rendelkezik (Fahy és mtsai, 2008). Minden esetre az OM8-as mintában mutatott nagyfokú Malikia-dominancia azt a feltételezést erősítette, hogy e baktériumok képesek lehetnek egyes BTEX-vegyületeket szén- és energiaforrásként hasznosítani. Azonban a Dechloromonas nemzetségről, azon belül is a "Dechloromonas aromatica" (valid fajként nem leírt) törzsről ismert, hogy aerob és anaerob körülmények között is képes a benzol lebontására (Coates és mtsai, 2001). Az e baktériumhoz köthető 16S rDNS klónszekvenciák száma szintén kiemelkedő volt az OM8-as minta esetében (8 db klónszekvencia).

A "ZM"-jelű kárhely esetében sem a kontroll, sem pedig a szennyezést tartalmazó mintavételi kút esetében nem tudtunk domináns mikroszervezetet kimutatni. Az ugyanakkor elmondható, hogy a ZM4-es kontroll mintavételi kútból származó mintában az Alphaproteobacteria osztály képviselői voltak a dominánsak, és olyan nemzetségek képviselőit sikerült kimutatni, mint *Novosphingobium* és a *Sphingomonas*. E nemzetségek számos

képviselőjéről ismert, hogy egyébként képesek az aromás szénhidrogének lebontására és a gyűrűhasítást olyan katekol 2,3-dioxigenáz enzimekkel végzik, amelyek az extradiol dioxigenázok I.2.B alcsaládjába tartoznak. Ennek ellenére ilyen típusú enzimet kódoló C23O gént nem sikerült kimutatnunk a mintából. A ZM9-es, nagyfokú BTEX-szennyezést tartalmazó mintavételi kútból származó minta mikrobaközössége a ZM4-estől eltérő volt ugyan, de még mindig az Alphaproteobacteria osztályba tartozó baktériumok 16S rDNS klónszekvenciái alkották az egyik legnagyobb csoportot. A Sphingomonas nemzetség azonban nem volt kimutatható, míg a Novosphingobium nemzetséget mindössze 1 darab klónszekvencia képviselte. Sikerült kimutatni ugyanakkor az Oleomonas sagaranensis jelenlétét (2 db klónszekvencia), amelyről ismert, hogy képes növekedni benzolon, toluolon és fenolon (Kanamori és mtsai, 2002). Kiemelendő, hogy a Burkholderiales renden belül a Comamonadaceae családba tartozó baktériumok 16S rDNS klónszekvenciái voltak dominánsan kimutathatóak. Ezen belül is az Albidiferax, a Rhodoferax, a Curvibacter, a Polaromonas és a Hydrogenophaga nemzetségeket sikerült kimutatni. Utóbbi két nemzetség egyes képviselői kifejezetten szénhidrogénekkel szennyezett ökoszisztémákból mutathatóak ki a leggyakrabban és BTEX-, vagy PAH-lebontó képességük is ismert (Fahy és mtsai, 2008; Sun és mtsai, 2010; Xie és mtsai, 2011).

A "BM"-jelű kárhely esetében a BM1-es kontroll minta mikrobaközösségét a Burkholderiales rend képviselői dominálták. Ezen belül is a *Malikia* és az *Acidovorax* nemzetségekhez tartozó 16S rDNS klónszekvenciák voltak főleg kimutathatóak. Mellettük a Pseudomonadales rend két, több szempontból kiemelkedő fontosságú nemzetségeket. A BM7-es, kismértékű szennyezést tartalmazó kútból származó minta esetében ugyancsak a Burkholderiales rend képviselői voltak dominánsak a mikrobaközösségben, és ugyancsak a *Malikia spinosa* volt kimutatható a legnagyobb gyakorisággal (12 db 16S rDNS klónszekvencia). Mellette közel hasonló gyakorisággal voltak kimutathatóak az *Albidiferax*, illetve *Rhodoferax* nemzetségekhez tartozó mikroszervezetek.

dc_1786_20

4. táblázat: Az "OM", "BM" és "ZM"-jelű kárhelyekről kimutatott 16S rDNS szekvenciák főbb jellemzői.

Klónszekvenciák száma	Legközelebbi rokon faj	Hasonlóság (%)
OM3 (115)		
8	Albidoferax ferrireducens	96.5-98.7
4	Rhodoferax antarcticus	97.4-99.1
3	knoaoferax fermentans	98.5-99.1
5	Vogesella indigofera	95.8-99.5
4	Pseudomonas anguillisentica	98 1-99 6
5	Pseudomonas iessenii	99.1-100
1	Pseudomonas frederiksbergensis	100
OM8 (112)		
32	Malikia spinosa	95.5-100
8	Dechloromonas aromatica	99.3
2	Albiaojerax jerrireaucens	90.9-97.9
5	Callionella cansiferriformans	93.1-98.7
4	Geothrix fermentans	98.0
3	Denitratisoma oestradiolicum	91.8-93.0
ZM4 (106)		
2	Novosphingobium aromaticivorans	98.0-98.5
1	Sphingomonas dokdonensis	97.9
1	Sphingomonas jaspsi	97.0
1	Sphingomonas xenophaga	99.9
1	Sphingomonas mucosissima	96.3
2	Denitratisoma oestradiolicum	91.7-93.3
1	Albidoferax ferrireducens	98.7
1	Azoarcus aromaticum	98.5
1	Hydrogenophaga flava Malilia managa	98.8
1	Malikia granosa Elavobactarium vinigingonsa	90.0
2	Flavobacterium johnsoniae	99.1-100
1	Pseudomonas jessenii	100
3	Dehalobacter restrictus	99.0-99.5
ZM9 (104)		
4	Asticcacaulis benevestitus	98.1-98.5
1	Asticcacaulis excentricus	97.5
2	Oleomonas sagaranensis	100
1	Novosphingobium aromaticivorans	98.5
3	Albiaojerax fermientans	97.2-99.4
1	Curvibactor gracilis	97.3
1	Denitratisoma oestradiolicum	90.5
1	Polaromonas vacuolata	95.3
1	Hvdrogenophaga atvpica	99.9
3	Nevskia ramosa	92.5-97.7
BM1 (68)		
6	Malikia spinosa	99.4-100
4	Acidovorax delafieldii	97.7-100
2	Acidovorax defluvii	98.8-99.5
3	Herbaspirillum sp. AKB-2008-1E24	95.1-99.5
1	Asinatohastar huoffii	99.5
2	Acinetobacter twojju	98.9-99.2
4	Pseudomonas anguilliseptica	99.5-99.9
BM7 (86)	-	
12	Malikia spinosa	99.6-100
9	Albidoferax ferrireducens	95.2-98.0
1	Rhodoferax antarcticus	95.7
2	Leptothrix cholodnii	99.5
2	Pseudomonas putida	99.3
1	rseudomonas anguilliseptica	99.9

V.1.7. A 16S rDNS és C23O klóntárak összehasonlító elemzése UniFrac módszer segítségével

A klóntárak hasonlósági viszonyainak vizsgálata az UniFrac programcsomag segítségével történt. A 16S rDNS klóntárak esetében kapott eredmény (19. ábra, "a"- panel) könnyen magyarázható. Mivel az Alphaprotebacteria osztályba tartozó mikroszervezeteket főként a "ZM"-jelű kárhely mintáiból lehetett kimutatni, így nem meglepő, hogy e két klóntár élesen elkülönül a többitől, és a ZM4-es illetve ZM9-es minta egy csoportot alkotnak a dendrogramon. Az OM3-as és az OM8-as minták esetében más-más baktériumok dominálták a közösséget (*Albidiferax-Rhodoferax* nemzetség szemben a *Malikia* és *Dechloromonas* nemzetségekkel), ennek megfelelően jól elkülönülten helyezkedtek el a dendrogramon is. Az OM3-as és BM7-es minták kismértékben voltak szennyezettek BTEX-vegyületekkel (az OM3-as minta főleg benzol, míg a BM7-es minta pedig főleg alkil-benzol szennyezést tartalmazott) és valószínűleg ennek köszönhetö, hogy e két minta mikrobaközössége között volt felfedezhető a legnagyobb hasonlóság.



19. ábra: A 16S rDNS és C23O klóntárak hasonlósági dendrogramja (UniFrac) (Táncsics és mtsai, 2010 alapján)

A C23O gén alapú klóntárak csoportosulása a dendrogrammon már kevésbé egyértelmű (19. ábra, "b"- panel). Az ugyanarról a kárhelyről származó háttér (kontroll), illetve szennyezett kutak mintái élesen elkülönülnek egymástól, ami természetesen a BTEX szennyezéssel magyarázható. Az OM8-as és BM7-es minták C23O klóntárai között lehetett a legnagyobb hasonlóságot felfedezni, habár az OM8-as mintavételi kút jóval nagyobb mértékben volt szennyezett BTEX-vegyületekkel, mint a BM7-es. A ZM9-es minta ugyanakkor, amely szintén egy nagymértékben szennyezett kútból származott, élesen elkülönült az OM8-as és BM7-es mintáktól, és a BM1-es háttér mintával mutatta a legnagyobb hasonlóságot. Ennek az az oka, hogy a ZM9-es és a BM1-es mintában is ugyanaz a C23O genotípus volt dominánsan jelen és még legalább egy, de kis abundanciával rendelkező genotípuson osztoztak. Ez alapján azt feltételezhetjük, hogy szennyezetlen ökoszisztémákban is jelen lehetnek olyan I.2.C-típusú C230 gének, amelyek BTEX-szennyezett közegekben is dominánssá válhatnak, és valószínűleg szerepet játszhatnak az aromás vegyületek lebontásában. Érdekes ugyanakkor, hogy a "BM"-jelű kárhelyen mégsem ez a genotípus vált dominánssá a szennyezés hatására, hanem egy másik, bár hasonló genotípus (lásd filogeneikai fa). Ahhoz tehát, hogy megértsük mikor melyik I.2.C-típusú C23O gén válik dominánssá egy BTEX-szennyezett közegben, illetve hogy mely komponensek lebontásában játszanak szerepet, fontos lenne azon baktériumokat izolálni, amelyek rendelkeznek e génekkel.

V.1.8. Az eredmények összefoglalása – konklúziók

A fenti vizsgálatok eredményeként bizonyosságot nyert, hogy az extradiol dioxigenázok I.2.C alcsaládjába tartozó C23O enzimeket kódoló gének széles körben elterjedtek mind szennyezetlen, mind pedig BTEX-szennyezést tartalmazó talajvíz ökoszisztémákban. Továbbá mind a T-RFLP, mind pedig a klóntárak eredményei azt mutatták, hogy a szennyezés hatására a mikrobaközösségekben bekövetkező változás az I.2.C-típusú *C23O* gének szintjén is kimutatható. Ez pedig azt valószínűsíti, hogy az e génekkel rendelkező baktériumok részt is vesznek az aromás vegyületek biodegradációjában. Bár megjegyzendő, hogy *C23O* gének diverzitásának dinamikus változása akár BTEX-szennyezéstől mentes ökoszisztémákban is megfigyelhető. Kasuga és mtsai (2007) egy eutróf tó vízmintáit használva állítottak össze mikrokozmoszokat, amelyekhez eltérő összetételű oldott szervesanyag-koncentrátumot adtak (pl. humuszsav, vagy nádból készített "humusz"). Az eltérő oldott szervesanyag koncentrátumok hatására természetesen eltérő *C23O* diverzitást kaptak a mikrokozmoszokban. Az elhalt növényi anyagok, így a humusz is számtalan aromás vegyületet, fenolokat,

dc_1786_20

polifenolokat tartalmaznak, emiatt nem meglepő, hogy e szénforrások megváltoztatták a mikrobaközösségeket, ami a *C230* gének diverzitásának megváltozásában is megmutatkozott.

A 16S rDNS klónkönyvtárak eredményei alapján azt lehet látni, hogy a szennyezett közegek mikrobaközösségeiben elsősorban a Burkholderiales rend képviselői, azon belül is a Comamonadaceae családba tartozó baktériumok voltak dominánsan kimutathatóak. Ezen felül mikroaerofil, és fakultatív anaerob mikroszervezetek is nagy gyakorisággal voltak jelen a vizsgált talajvízmintákban. Hasonló megfigyelésre jutottak Alfreider és mtsai (2002) is, akik egy klór-benzollal szennyezett talajvizet kezelő in situ bioreaktor mikrobaközösségét vizsgálták. Megfigyelték, hogy mind a befolyó, klór-benzollal szennyezett és oxigén-limitált, mind pedig az elfolyó, kezelt, de szintén oxigén-limitált talajvíz esetében a Burkholderiales rend tagjai dominálták a közösséget. Fahy és mtsai (2006) egy hosszú ideje benzollal szennyezett terület oxigén-limitált talajvizének mikrobaközösségeit vizsgálták mikrokozmosz kísérletek segítségével. Több, aerob benzol lebontást mutató mikrokozmoszban is a Burkholderiales rendbe tartozó baktériumok, azon belül is a Comamonadaceae család nemzetségei, így az Acidovorax, illetve a Hydrogenophaga voltak a dominánsak. Nestler és mtsai (2007) egy klór-benzol-lebontó talajvíz mikrobakonzorciumot vizsgáltak, és szintén azt találták, hogy hipoxikus körülmények között a Burkholderiales rendbe tartozó baktériumok uralták a közösséget (Acidovorax, Rhodoferax és Alcaligenes fajok). Az ugyanerről a szennyezett területről (Bitterfeld, Németország) izolált Acidovorax facilis UFZ B530-as törzs esetében kimutatták, hogy hipoxikus körülmények között is képes a klór-benzol lebontására, mégpedig azért, mert egy nagy oxigén-affinitású klórkatekol 1,2-dioxigenáz enzimet használ a benzol aromás gyűrűjének felnyitásához (Kiesel és mtsai, 2008).

A magyarországi kárhelyek vizsgálatainak eredményei tehát jól illeszkedtek a nemzetközi szakirodalmi adatok közé és valószínűsíthető volt, hogy BTEX-vegyületekkel szennyezett, hipoxikus felszín alatti közegekben fontos szerepe lehet a szennyezőanyagok lebontásában azoknak a baktériumoknak, amelyek az extradiol dioxigenázok I.2.C alcsaládjába tartozó katekol 2,3-dioxigenáz enzimet kódoló génnel rendelkeznek. A vizsgálatok során dominánsnak mutatkozó I.2.C-típusú *C230* genotípusok azonban nem voltak ismert baktériumhoz köthetőek, így az is feltáratlan maradt, hogy ezek mely BTEX-vegyületek lebontásában vehetnek részt. Ahhoz, hogy ezek a kérdések is megválaszolhatóak legyenek, további vizsgálatokra volt szükség.
V.2. A siklósi BTEX-vegyületekkel szennyezett kárhely mikroba közösségeinek feltárása és az I.2.C-típusú *C230* gének *in situ* expressziójának vizsgálata

V.2.1. A szennyezett terület ismertetése

A siklósi BTEX-vegyületekkel szennyezett kárhely egy mára felszámolt benzinkút földalatti tárolótartályának szivárgása miatt alakult ki. A vizsgálatok kezdetekor még az összes BTEX-vegyület kimutatható volt a talajvízből, de már ekkor is a xilol és az etil-benzol koncentrációja volt a legnagyobb. A xilol-szennyezés kiterjedtségét mutatja a 20. ábra.



20. ábra: A siklósi BTEX-vegyületekkel szennyezett kárhely sematikus térképe, a xilol szennyezési csóva feltüntetése mellett. A szennyezési csóván feltüntetett számok a xilol-vegyületek együttes koncentrációit mutatja μg/L-es koncentrációban (Táncsics és mtsai, 2012 alapján).

Ezen az ábrán láthatóak a kárhelyen létesített mintavételi talajvíz kutak, amelyek közül a szennyezési csóva közepén elhelyezkedő ST2-es, a csóva szélén elhelyezkedő ST5-ös, valamint a csóván kívül elhelyezkedő, tehát szennyezést nem tartalmazó SK-V jelű kutak lettek a mikrobiológiai vizsgálatokhoz kiválasztva. A vizsgált talajvízminták szennyezettségi és fiziko-kémiai paramétereit az 5. táblázat részletezi.

5. táblázat: A vizsgált siklósi talajvízminták szennyezettségi és fiziko-kémiai paraméterei

Mintavételi	BTEX-vegyületek (µg/L)				fiziko-kémiai paraméterek					
kutak	benzol	toluol	etilbenzol	xilolok	oldott oxigén (mg/L)	$\mathrm{NO_3}^- (\mathrm{mg/L})$	Fe^{2+} (mg/L)	$\mathrm{SO_4^{\ 2-}}(mg/L)$	$CH_4(mg/L)$	redox potenciál (mV)
SKV	< 0.2	<1	<1	<2	3.3	61	< 0.02	71	< 0.04	369
ST5	53	2	58	29	2.8	13	0.7	63	< 0.04	284
ST2	340	64	966	6700	0.6	2	4	24	1.9	148

A szennyezési csóva közepét feltáró ST2-es mintavételi kút esetében alacsony oldott oxigén és nitrát koncentrációt lehetett kimutatni. A szulfátion koncentrációja a többi mintához képest alacsonyabb volt, míg a Fe²⁺ és a metán esetében ennek az ellenkezőjét lehetett kimutatni, tehát esetükben nagyobb koncentrációt mértünk, mint a csóva szélén elhelyezkedő ST5-ös, illetve SK-V-jelű kutakban. Ez alapján azt lehetett valószínűsíteni, hogy alapvetően nitrát-redukáló körülmények uralkodnak a szennyezési csóva középpontjában, és oxigén maximum nyomnyi mennyiségben fordul itt elő. Emellett valószínűsíthető volt szulfát-redukáló, Fe³⁺-redukáló, és metanogén mikroszervezetek jelenléte is, amelyek szigorúan anaerob életmódot folytatnak. A szennyezési csóva szélén elhelyezkedő ST5-ös mintavételi kút esetében viszont inkább aerob, bár közel hipoxikus viszonyokra utaltak a fiziko-kémiai paraméterek, míg a háttér mintát szolgáltató SK-V kút esetében tisztán aerob viszonyok voltak megfigyelhetőek.

V.2.2. Az I.2.C-típusú C23O gének in situ expressziójának vizsgálata a siklósi mintákban

A siklósi kárhely előbb bemutatott három mintavételi kútjából származó talajvízmintákból RNS izolálás történt, hogy vizsgálni lehessen az I.2.C-típusú *C230* gének *in situ* expresszióját is, azok diverzitásán túl. E vizsgálatok során a Comamonadaceae-eredetű I.2.C-típusú *C230* géneken kívül az I.2.A-, illetve az I.2.B-típusú *C230* gének expressziójának kimutatására is kísérletet tettünk. A vizsgálataink során, a különböző alcsaládba tartozó *C230* gének kimutatásához használt PCR primerek szekvenciáit a 6. táblázat mutatja.

			Anellációs	Amplikon	
Primer pár	Cél gén	Primer szekvencia	hőmérséklet	méret (hn)	Hivatkozás
			(°C)	merer (op)	
	az extradiol	5'-CCGCCGACCTGATCWSCATG-3'			(Hendrickx
XylE1 F/R	dioxigenázok I.2.A	5' TEAGETCARCACGGTCARGA 2'	61.5 °C	242	és mtsai.,
	alcsaládja	3-ICAOOICARCACOOICAROA-5			2006)
	az extradiol	5'-GTAATTCGCCCTGGCTAVGTICA-3'			(Hendrickx
XylE2 F/R	dioxigenázok I.2.B	5' COTOTTO A COCTOATO A COOPTO 2'	64 °C	906	és mtsai.,
	alcsaládja	5-GOIGITCACCOICAIGAAGCOBIC-5			2006)
	Comamonadaceae-				(Táncsics és
COMC23O	eredetű I.2.C-	5'-CGAGAACGTGCTGGGCATGAAG-3'	62.90	561	mtsai., 2010;
F/R	típusú extradiol	5'-AAGGCGATGTCGTGCGGC-3'	05 C	501	Sikorski és
	dioxigenázok				mtsai., 2010)
	extradiol				
C110 E.T.	dioxigenázok	5'-AAGAGGCATGGGGGGGCGCACCGGTTCGATCA-3'	,	200	(Sei és
C250 F/K	univerzális	5'-CCAGCAAACACCTCGTTGCGGTTGCC-3'	55°C	580	mtsai., 1999)
	detektálása				

6. táblázat: Az extradiol dioxigenázt kódoló gének kimutatásához használt PCR primerek jellemzése.

A C230 PCR vizsgálatok eredményei szerint csak az ST5-ös és az ST2-es kutak mintáiból lehetett C23O transzkriptumot kimutatni, és csak a COMC23O primerrel. Ez utóbbi azt is jelenti, hogy csak az I.2.C alcsaládba tartozó extradiol dioxigenázt kódoló C230 gének átíródása volt kimutatható az adott körülmények között. Ezen eredmények alapján már ekkor megjósolható volt, hogy mind a szennyezési csóva közepén, mind pedig a szélén a Burkholderiales rendbe tartozó baktériumok uralják a mikrobaközösségeket. Ugyanakkor érdekes eredmény volt, hogy a szakirodalom által univerzálisnak mondott C230 primerpár használata nem eredményezett PCR terméket. Ez pedig azt mutatja, hogy ez a primerpár nem feltétlenül alkalmas azoknak a feltehetően Comamonadaceae-eredetű I.2.C-típusú C23O géneknek a kimutatására, amelyeket a COMC23O PCR primerekkel sikerült amplifikálni a mintákból. Ez egyúttal azt is jelenti, hogy a Sei és mtsai által leírt PCR primerpár (1999) nem használható univerzális jelleggel a C23O gének kimutatására. E primerpárt ugyanakkor számos tanulmány során alkalmazták C230 gének diverzitásának, illetve aktivitásának vizsgálatára. Lillis és mtsai (2010) például 2,4-diklór-fenollal szennyezett talaj mikrobaközösségének vizsgálatakor használták e primereket annak a kérdésnek az eldöntéséhez, hogy az orto-, vagy a meta-gyűrűhasítási útvonalak dominálnak ezen típusú vegyület in situ lebontása során. Megvizsgálva azonban e primerek illeszkedését néhány reprezentatív I.2.A, I.2.B és I.2.C alcsaládba tartozó extradiol dioxigenázt kódoló C230 gén célszekvenciájához, láthatóvá vált, hogy e primerpár korántsem nevezhető univerzálisnak. Ahogy az a 21. ábrán is látható, a primerpár gyenge pontja a "*forward*" primer, mivel a célszekvencia variabilitása meglehetően nagy, emiatt pedig 10-11 aspecifikus bázispárosítás is kialakulhat, főleg az I.2.C-típusú *C230* gének esetében. Ez pedig erősen leszűkíti ennek a primerpárnak a specifitását és egyáltalán nem használható a *C230* gének általános kimutatására.



21. ábra: A Sei és mtsai (1999) által tervezett "univerzális" C23O PCR primerek és egyes potenciális célszekvenciák összehasonlító elemzése (Táncsics és mtsai, 2012 alapján).

V.2.3. A kimutatott extradiol dioxigenázok filogenetikai vizsgálata

Az ST2-es és ST5-ös mintákból az RNS átírást követően tehát csak a COMC230 primerekkel sikerült PCR terméket nyerni. Ahhoz, hogy látni lehessen van-e különbség a két mintában előforduló és kifejeződő *C230* gének tekintetében, a PCR termékeket felhasználva klóntárakat hoztunk létre (48 darab klónszekvencia klóntáranként). Ahogy az a filogenetikai fán is jól látható, teljesen más genotípusok voltak aktívak a szennyezési csóva közepén (ST2), mint a szélén (ST5) (22. ábra). Az ST2-es mintában az összes klónszekvencia egy metagenom vizsgálatból származó *C230* genotípussal alkotott egy csoportot. E *C230* gént elsőként Brennerova és mtsai (2009) mutatták ki egy csehországi kerozinnal szennyezett terület talajmintáiból (metagenomic clone s67 D-Tn1). Expressziós vizsgálataik alapján az e gén által kódolt katekol 2,3-dioxigenáz elsősorban a 3-metilkatekolt, a toluol lebontásának egyik köztitermékét preferálja szubsztrátként. Hasonló *C230* gén korábban a magyarországi "OM"-jelű kárhelyről is kimutatásra került, méghozzá a szennyezést feltáró OM8-as mintavételi kútból. Ahogy az a filogenetikai fán látható, az ST2-es mintából kimutatott *C230*

genotípusok döntő többsége az innen származó OM8-2-jelű genotípussal mutatta a legnagyobb hasonlóságot.



0.1

22. ábra: A siklósi kárhely ST2-es és ST5-ös mintavételi kútjaiból kimutatott C230 klónok filogenetikai helyzetét bemutató, aminosav alapú neighbor-joining fa. A fa gyökereztetéséhez a P. putida MT53 I.2.A-típusú C23O enzimének aminosav szekvenciáját használtuk (Táncsics és mtsai, 2012 alapján). Az ST5-ös minta esetében szintén egy Brennerova és mtsai által kimutatott *C230* genotípus köré csoportosultak (metagenomic clone w11 Tn2R6F) a COMC230 primerpárral kimutatott genotípusok és döntő többségük a magyarországi OM8-1-es genotípussal mutatta a legnagyobb hasonlóságot. Sajnos a kimutatott *C230* genotípusokat továbbra sem lehetett kitenyésztett, ismert baktériumhoz kötni. Annyi konklúziót azonban le lehetet vonni ezekből az eredményekből, hogy a kimutatott I.2.C alcsaládba tartozó extradiol dioxigenázt kódoló *C230* gének, illetve ezekhez hasonló genotípusok általánosan kimutathatóak BTEX-vegyületekkel szennyezett felszín alatti közegekből és egyértelműen e közegekhez köthető a jelenlétük.

V.2.4. A C230 transzkriptumok kvantifikációja

Ahhoz, hogy a kimutatott C23O gének környezeti relevanciáját vizsgálni lehessen, el kellett végezni a génekről átíródott transzkriptumok mennyiségi meghatározását. Mivel a két mintavételi kútból kimutatott genotípusok két, egymástól meglehetősen eltérő csoportba rendeződtek, nem volt lehetőség arra, hogy egy primerpár segítségével el lehessen végezni a mRNS-ek kvantifikációját. Az ST5-ös minta esetében a következő qPCR primerpár került megtervezésre és használatra: ST5-qPCR-F 5'-GTG GGC ACA GAG GTC GGC-3' és ST5qPCR-R AAG AAC TTG GTG TTC TCG GC-3'. A primerpár optimális anellációs hőmérséklete 51°C, és 149 bp hosszúságú amplikont eredményez. Az ST2-es minta vizsgálatához készült qPCR primerpár: ST2-qPCR-F CCG GCT TGA ACT ACG TGG C-3' és ST2-qPCR-R CTG GGC AGC ATG AAC TGC AAC-3'. A primerpár optimális anellációs hőmérséklete 55°C, és 151 bp hosszúságú amplikont eredményez. Mindkét primerpár nagy specifitást mutatott, aspecifikus fragment nem keletkezett a használatuk során és pozitív reakciót mutattak akkor is, ha csak 10 db célszekvencia volt jelen a 25 µL végtérfogatú PCR reakcióban. Használatukkal bizonyítást nyert, hogy a kimutatott I.2.C-típusú C230 gének jelentős mértékben átíródnak. Az ST5-ös mintában 4,16 x 108 db / mL mRNS transzkriptumot lehetett kimutatni, míg az ST2-es minta esetében ez a szám 1,77 x 10⁸ db / mL volt. A szakirodalomban hasonló nagyságrendű C23O transzkriptumokról számoltak be más kutatók szintén környezeti minták vizsgálata után (Francis és mtsai, 1998; Mesarch és mtsai, 2000; Mesarch és mtsai, 2004). A jelen vizsgálat során kimutatott I.2.C-típusú C23O gének (ha nem is feltétlenül az összes genotípus) tehát minden bizonnyal szerepet játszanak a BTEX-vegyületek lebontásában.

V.2.5. A mikrobaközösségek összetétele

A mikrobaközösségek faji összetételének feltárása szintén RNS alapon történt, hogy kizárólag az aktív mikroszervezetek kimutatása történjen meg. E célból a talajvízmintákból izolált RNS-ből elsőként cDNS átírás történt, majd ebből került amplifikálásra a közösségi 16S rDNS. A 16S rDNS amplikonokból klóntárak készültek, ahol legalább 100 klón szekvenciája került megállapításra.

Ahhoz, hogy a szennyezés által okozott, a mikrobaközösség összetételében bekövetkezett változásokat értékelni lehessen, a BTEX-szennyezést nem tartalmazó SK-V kút mikrobaközössége is feltárásra került. E minta esetében bár nagy diverzitást lehetett tapasztalni (Shannon-Weaver index: 3,22), a 16S rDNS klónszekvenciák jelentős része a Proteobacteria osztályt képviselte (23. ábra). A legnagyobb csoportot a Betaproteobacteria osztályba (újabban Burkholderiales rend) tartozó baktériumokhoz köthető szekvenciák alkották, és azon belül is az Oxalobacteraceae családba tartozó *Massilia, Herminiimonas* és *Undibacterium* nemzetségek voltak dominánsak. Ehhez képest a Comamonadaceae családhoz köthető klónszekvenciák (*Malikia, Rhodoferax, Acidovorax, Variovorax* nemzetségek) jóval kisebb számban voltak megtalálhatóak a klóntárban. Jelentős csoportot képviseltek még a szűken értelmezett Gammaproteobacteria osztályt képviselő klónszekvenciák is, amelyek elsősorban különböző *Pseudomonas* fajokhoz voltak köthetőek, méghozzá különösen nagy diverzitással. Így például kimutathatóak voltak elsősorban növény patogén (*Ps. viridiflava, Ps. marginalis, Ps. cichorii*), édesvíz-forrásokhoz köthető (*Ps. jessenii*) vagy szénhidrogén-lebontó fajok is (*Ps. benzenivorans, Ps. frederiksbergensis*).

Az ST-5-ös, szennyezési csóva szélén elhelyezkedő kút esetében az SK-V mintától jelentősen eltérő, jóval kisebb diverzitású mikrobaközösséget lehetett kimutatni (Shannon-Weaver index: 2,38). A klónszekvenciák döntő többsége a Betaproteobacteria osztályba (újabban Burkholderiales) tartozó baktériumhoz volt köthető, azon belül is a Comamonadaceae családba tartozó *Rhodoferax* nemzetséghez. Jelentős csoportot alkottak még a *Sideroxydans lithothrophicus* litoautrotróf, mikroaerofil vas(II) oxidáló baktériumhoz köthető szekvenciák. Megjelentek olyan baktériumok is, amelyek egyértelműen a BTEX-szennyezéshez, illetve e vegyületek lebontásához köthetőek. Ilyen például a disszertációban már korábban részletesen bemutatott "*Dechloromonas aromatica*". Feltűnő ugyanakkor az aromás szénhidrogének lebontására képes *Pseudomonas* fajok hiánya a mintában.



23. ábra: A siklósi kárhelyen feltárt mikrobaközösségek összetétele (a) osztály, illetve (b) család szinten. α, Alphaproteobacteria; β, Betaproteobacteria; γ, Gammaproteobacteria; δ, Deltaproteobacteria; ε, Epsilonproteobacteria, Ba, Bacteroidetes; Oxa, Oxalobacteraceae; Coma, Comamonadaceae; Rhod, Rhodocyclaceae; Gall, Gallionellaceae; Neis, Neisseriaceae; Hydro, Hydrogenophilaceae; Meth, Methylophilaceae; GIS, Genera Incertae Sedis (Táncsics és mtsai, 2012 alapján).

Az ST2-es minta mikrobaközössége esetében azt lehetett megfigyelni, hogy a közösség diverzitása az ST5-ös mintához képest is kisebbnek mutatkozott (Shannon-Weaver index: 1,58). Az ehhez a mintához tartozó 16S rDNS klóntár elemzése alapján elmondható, hogy a Betaproteobacteria osztályhoz (újabban Burkholderiales rendhez) köthető klónszekvenciák voltak jelen túlnyomó többségben. Ráadásul ezeknek a klónszekvenciáknak közel 80%-a ugyanahhoz a 16S rDNS filotípushoz tartozott. A legközelebbi tenyésztésbe vont baktérium, amihez kötni lehet e szekvenciákat, a Comamonadaceae családba tartozó Rhodoferax antarcticus ANT.BR jelű törzse volt, 97%-os 16S rDNS szekvencia hasonlóság mellett. Ugyanez a filotípus korábban az "OM"-jelű kárhely OM8-as mintavételi kútjából is kimutatásra került, illetve Callaghan és mtsai egy észak-amerikai kárhelyen (Casper, WY, USA) találták domináns mikroszervezetnek (Callaghan és mtsai, 2010). Fahy és mtsai egy 99,9%-ban hasonló 16S rDNS klónszekvenciát mutattak ki jelentős gyakorisággal egy oxigén-limitált, benzollal szennyezett talajvíz mikrobaközösségének vizsgálata során (clone Pi113, GenBank hivatkozási szám AM110010) (Fahy és mtsai, 2006). Ezek alapján kijelenthető, hogy ezeknek a Rhodoferax nemzetségbe tartozó mikroszervezeteknek a jelenléte egyértelműen BTEX-vegyületekkel szennyezett, oxigén-limitált felszín alatti közegekhez köthető. Az, hogy a BTEX-vegyületek lebontásában milyen szerepet játszanak, kérdéses volt, hiszen e baktérium tiszta tenyészete sem a vizsgálatok idején sem pedig a disszertáció írásakor nem létezett. Egy propil-benzol lebontó dúsító tenyészet mikrobaközösségének összetétele arra enged következtetni, hogy e baktérium egyes törzsei képesek lehetnek az aromás vegyületek anaerob lebontására, vas(III)-redukció mellett (Eriksson és mtsai, 2005). Emellett egy stabil izotópos kísérlet eredményei arra engednek következtetni, hogy egyes törzsei a fenantrén aerob lebontásában vehetnek részt (Martin és mtsai, 2012). Az ST2-es klóntárban említésre érdemes csoportot alkottak még a Rhodocyclaceae családhoz köthető klónszekvenciák, azon belül is azok, amelyek az Azoarcus sp. PbN1-jelű törzsével mutattak közeli rokonságot. E baktériumtörzsről ismert, hogy nitrátredukció mellett, tehát anaerob úton képes az etil-benzol, valamint a propil-benzol lebontására és Widdel, 1995). Jelentős csoportot alkottak még a Pseudomonas (Rabus veronii/extremaustralis leszármazási vonalhoz köthető klónszekvenciák is, bár megjegyzendő ugyanakkor, hogy a főleg a Pseudomonas nemzetséghez köthető I.2.A-típusú C230 gének átíródása nem volt kimutatható.

A 16S rDNS klóntárak közötti különbségek szignifikáns voltát az Unifrac programcsomaggal történt vizsgálat mutatta meg. Az eredmények alapján mindegyik klóntár, így tehát mindegyik mikrobaközösség szignifikánsan különbözött egymástól az összetételüket tekintve (a Bonferroni elv alapján számított *p* érték minden párosítás esetén ≤0,03). A klóntárak klaszter elemzése azt is megmutatta, hogy az ST5-ös és ST2-es minták élesen elkülönülnek az SK-V mintától, és kis hasonlóság mellett ugyan, de egy csoportot alkotnak a dendrogramon (24. ábra.). Ez alapján feltételezhető, hogy mind a szennyezésnek, mind pedig az oxigén-limitációnak szignifikáns hatása volt a mikrobaközösségek összetételére. Ugyanakkor kétségkívül a szennyezés hatására változott meg leginkább a terület eredeti mikrobaközössége, és ez okozta az Oxalobacteraceae család által dominált mikrobaközösség átalakulását Comamonadaceae és Rhodocyclaceae családok által dominált közösségekké.



24. ábra: A 16S rDNS klóntárak hasonlósági dendrogramja (UniFrac) (Táncsics és mtsai, 2012 alapján).

V.2.6. Az eredmények összefoglalása – konklúziók

A siklósi kárhely első vizsgálatának ezen eredményei rávilágítottak arra, hogy a már korábban más magyarországi kárhelyekről is kimutatott I.2.C-típusú *C230* gének jelentős mértékben átíródnak a siklósi, BTEX szennyezést tartalmazó környezeti mintákban. Emiatt pedig feltételezhető, hogy jelentős szerepet játszanak a BTEX-vegyületek lebontásában felszín alatti közegekben. Ugyancsak megerősítést nyert az a korábbi megfigyelés (Brennerova és mtsai, 2009), hogy az I.2.A-típusú *C230* gének hipoxikus, felszín alatti közegekben csak marginális szerepet játszhatnak a BTEX-vegyületek lebontásában. Az a tény, hogy mind a szennyezési csóva szélén, mind pedig annak közepén a *Rhodoferax* nemzetségbe tartozó mikroszervezetek voltak dominánsak, felveti annak lehetőségét, hogy e baktériumok némelyike részt vesz egyes BTEX-vegyületek biodegradációjában. A dominánsnak mutatkozó 16S rDNS filotípus azonban olyan baktériumhoz köthető, amely tenyésztésbe nem vont mikroszervezet, így ebbéli képességét még nem sikerült minden kétséget kizáróan igazolni.

A siklósi kárhely vizsgálata során kimutatott I.2.C-típusú *C230* géneket sajnos továbbra sem lehetett ismert baktériumhoz kötni. A szennyezett közeg stabilitása (sekély szennyezés, csekély mértékű talajvízáramlással) és könnyű hozzáférhetősége azonban jó alapot szolgáltatott ahhoz, hogy a további vizsgálatok középpontjába ez a terület kerüljön.

V.3. A siklósi BTEX-vegyületekkel szennyezett kárhely mikrobaközösségének egy éven át tartó monitorozása

V.3.1. A vizsgálat célja, menete

A siklósi BTEX-vegyületekkel szennyezett kárhely mikrobaközösségeinek feltárása rávilágított arra, hogy a szennyezési csóva közepén egy meglehetősen specializált, alacsony diverzitású mikrobaközösség alakult ki. Ez jó lehetőséget biztosított arra, hogy a mikrobaközösség folyamatos, havonta történő monitorozása mellet megfigyelhető legyen annak esetleges dinamikája, és így a domináns I.2.C-típusú *C230* genotípusok baktériumokhoz, baktérium csoportokhoz kapcsolódása. A vizsgálatok ez esetben is RNS alapon lettek elvégezve. A korábbi vizsgálatok során nyilvánvalóvá vált, hogy e *C230* gének jelentős környezeti relevanciával bírnak. Ugyanakkor a COMC230 primerpár eredetileg kizárólag olyan I.2.C-típusú *C230* génszekvenciák alapján lett megtervezve, amelyeket a Comamonadaceae családba tartozó baktériumok kódoltak. Ismert azonban, hogy e gének megléte nem korlátozódik a Comamonadaceae családba tartozó mikroszervezetekre, hanem

általánosan elterjedt a Burkholderiales rend baktériumai között, de még a Pseudomonadaceae és a Xanthomonadaceae családok között is megtalálhatóak olyan nemzetségek, amelyek között előfordulnak ilyen génnel rendelkező baktériumok (pl. *Pseudomonas* és *Pseudoxanthomonas* fajok a szűken értelmezett Gammaproteobacteria osztályon belül). Éppen ez a heterogenitás okozza azt a problémát, hogy nehéz az egész I.2.C alcsaládra specifikus primerpárt tervezni, és emiatt nem is próbálkoztak meg ezzel Hendrickx és mtsai amikor az I.2.A és I.2.B alcsaládokra specifikus primerpárokat leírták (Hendrickx és mtsai, 2006). Az adatbázisok bővülése azonban lehetőséget kínált arra, hogy teljes, vagy közel teljes I.2.C-típusú *C230* génszekvenciák alapján ez a megfontolás átgondolásra kerüljön, így kísérletet tettem egy szélesebb specifitású, a teljes I.2.C-alcsaládra specifikus primerpár megtervezésével.

V.3.2. Az I.2.C C23O alcsaládra specifikus primerpár

Ahogy azt a Sei és mtsai (1999) által tervezett és általánosnak mondott C230 primer esetében látni lehetett, a probléma e primerpár használata során abból adódott, hogy a szerzők a célszekvencia heterogenitását teljesen figyelmen kívül hagyták. A 25. ábrán láthatóak az általam tervezett I.2.C alcsaládra specifikus primerek célszekvenciái. Megfigyelhető, hogy ez esetben is (de főleg a reverz primer esetében) meglehetősen heterogének a célszekvenciák, ugyanakkor megfigyelhetőek erősen konzerváltnak tűnő szakaszok is. A célszekvenciák heterogenitása okozta problémát úgynevezett "degenerált" primerek tervezésével próbáltam megoldani, így végül mind a forward, mind pedig a reverz primer esetében egy-egy primer keveréket kaptam eredményül. A reverz primer esetében egy pozícióban inozin beépítésére is szükség volt, mivel az adott pozícióban mind a négyféle nukleotid előfordálása megfigyelhető volt a célszekvenciák között. A primerpár a XylE3 nevet kapta, mivel Hendrickx és mtsai az I.2.A alcsaládra specifikus primerpárt XylE1-nek, míg az I.2.B alcsaládra specifikus primerpárt XylE2-nek nevzte el (Hendrickx és mtsai, 2006). A primerpár működésének vizsgálata környezeti minták felhasználásával történt, és fontos eredménynek tartom, hogy ilyen minták felhasználása során a primerpár soha nem eredményezett aspecifikus PCR terméket, és pozitív reakció esetén mindig egyértelmű és az agaróz gélben éles képet adó amplikont eredményezett. A primerpár optimális anellációs hőmérséklete 50°C, a várt amplikon méret ~800 bp. A további vizsgálatok során mindig e primerpár került felhasználásra az I.2.C-típusú C23O gének kimutatásához.

Comamonas sp. JS765 catE [U93090] Comamonas testosteroni TA441 aphB [AB4 Alcaligenes faecalis IS-46 [EF540866] Acidovorax sp. JS42 [CP000539] Delftia acidovorans 7N [AB177545] Delftia tsuruhatensis AD9 tadC1 [AY940 Diaphorobacter sp. PCA039 [FJ601374] Leptothrix cholodnii SP-6 [CP001013] Ralstonia pickettii PK01 tbuE [U20258] Ralstonia pickettii 12D [CP001645] Ralstonia eutropha JMP 134 [CP000091] Cupriavidus metallidurans CH34 dmpB [Burkholderia vietnamiensis (pBVIE04) Burkholderia sartisoli RP007 phnE2 [A] Decoderes profile Mm16 ada [U2026]	,** 7006479] TC 70090] TC 70090] TC 70090] TC 70000352] TC 700000352] TC 700000352] TC 7000000000 TC 7000000000000000000000000000000000000	GCTGGGACGAATGGGACAA GCTGGGACGAATGGGACAA GCTGGGACGAATGGGACAA GCTGGGACGAATGGGACAA GCTGGGACGAATGGGACAA GCTGGGACGACTGGGACAA GCTGGGACGACTGGGACAA GCTGGGACGACTGGGACAA GCTGGGACGACTGGGACAA GCTGGGACGACTGGGACAA GCTGGGACGACTGGGACAA GCTGGGACGAATGGGACAA GCTGGGACGAATGGGACAA GCTGGGACGAATGGGACAA GCTGGGACGAATGGGACAA GCTGGGACGAATGGGACAA GCTGGGACGAATGGGACAA GCTGGGACGAATGGGACAA GCTGGGACGAATGGGACAA	TCAGGTATA ACCTCGGTGAA TCAGGTATA ACCTCGGTGAA TCAGGTATA ACCTCGGTGAA TCAGGTATA ACCTCGGTGAA TCAGGTATA ACCTCGGTGAA TCAGGTATA ACCTCGGTGAA TCAGGTATA ACCTCGGTGAA TCAGGTGTA ACCTCGGTGAA TCAGGTGTA ACCTCGGTGAA TCAGGTGTACACTCGGTGAA TCAGGTGTAACCTCGGTGAA TCAGGTGTAAACCTCGGTGAA TCAGGTGTAAACCTCGGTGAA TCAGGTGTAAACCTCGGTGAA
Burkholderia vietnamiensis (pBVIE04) Burkholderia sartisoli RP007 phnE2 [Al	[CP000620] TO F112137] TO	GCTGGGACGAATGGGACAA	
metagenome clone s67 D-Tn1 [EU555077] metagenome clone w11Tn2R6F [EU555108]		GTTGGGATGAATGGGATAA GCTGGGACGAGTGGGACAA GCTGGGACGAGTGGGACAA	
XYLE3 primer pár	forward primer T	GYTGGGAYGARTGGGAYAA	reverz primer TCASGTRTASACITCSGTRAA

25. ábra: Az I.2.C C23O alcsaládra specifikus XylE3 primerpár szekvenciája és összehasonlító elemzése néhány potenciális célszekvencia segítségével ((Táncsics és mtsai, 2013 alapján)).

V.3.3. Környezeti változók alakulása a vizsgált talajvízben a monitoring időszak alatt

A vizsgálatokhoz felhasznált talajvízminták a 2010 májusa és 2011 májusa közötti időszakból származtak a szennyezési csóva közepét feltáró ST2-es mintavételi kútból. Az RNS izolálást mind a 13 havi minta esetében elvégeztem, míg komplex vízkémiai vizsgálat elvégzésére három havonta volt lehetőségem, így azok öt időpont esetében álltak rendelkezésemre. Ahogy az a 7. táblázat adataiból is látszik, a BTEX-vegyületek koncentrációja nagyjából hasonlóan alakult a monitoring vizsgálat időtartama alatt. Ennek során végig a xilolok és az etilbenzol voltak kimutathatóak, mint legfőbb szennyezőanyagok, de a benzol is jelentős koncentrációban volt jelen. A toluol koncentrációja mutatkozott a legkisebbnek a BTEX-vegyületek között, ami már önmagában is mutatta, hogy oxigén-limitált közegről van szó, hiszen a toluol biodegradációja a leggyorsabb ilyen körülmények között.

Mintavétel	BTEX-v	1)		
idöpontja	benzol	toluol	etilbenzol	xilolok
2010 május	340	64	966	6700
2010 augusztus	616	102	1330	7450
2010 november	320	54	2420	6880
2011 február	565	75	1570	6030
2011 május	788	71	891	5320

7. táblázat: A siklósi ST2-es mintavételi kútban mért szennyezettségi paraméterek a 2010. május és 2011. május közötti időszakban.

Az oldott oxigén koncentrációja 0,17 mg/L és 0,8 mg/L között változott, tehát a teljes monitoring időszak alatt hipoxikus körülmények uralkodtak a talajvízben. A nitrát koncentrációja a monitoring időszak kezdetén még a kimutatási határérték felett volt, később azonban 1 mg/L alá csökkent. A szulfát esetében hasonló tendencia látható. A vas(II) koncentrációja 2 és 4 mg/L között változott, míg a metáné 1,2 és 2 mg/L között (8. táblázat). Ezek az értékek azt mutatták, hogy a vizsgált közeg elektronakceptor-limitált volt, és a szediment anaerob részeiben élő mikroszervezetek már jórészt elfogyasztották a rendelkezésre álló elektronakceptorok egy részét (nitrát és szulfát). Nem meglepő tehát a fakultatív anaerob vas(III)-redukáló Rhodoferax nemzetség korábban kimutatott dominanciája a szennyezési csóva középpontjában. A szennyezés sekély fekvése miatt fontos megemlíteni, hogy csapadék szempontjából két részre lehet osztani a monitoring időszakot. A 2010 májusa és decembere közötti időszakban 788 mm-nyi csapadék hullott a mintevételi terület környezetében (forrás: Országos Meteorológiai Szolgálat) és eloszlása a szokásos szezonális dinamikát mutatta. Ezzel szemben 2011. január és 2011 májusa közötti időszak szélsőségesen száraz volt és mindössze 85 mm-nyi csapadék hullott. (Mint utólag fény derült rá, a 2011. év volt a legszárazabb év Magyarországon 1901 óta, és mindössze 404,4 mm csapadék hullott országos szinten ebben az évben.) Ennek következtében a talajvíz szintje folyamatos és jelentős csökkenést mutatott a monitoring időszak alatt.

8. táblázat: A siklósi ST2-es mintavételi kútban mért fizikai-kémiai paraméterek a 2010. május és 2011. május közötti időszakban.

Mintavétel	fiziko-kémiai paraméterek								
időpontja	oldott oxigén (mg L ⁻¹)	$NO_3^{-}(mgL^{-1})$	$Fe^{2+}(mgL^{-1})$	$SO_4^{2+}(mgL^{-1})$	$CH_4 (mg L^{-1})$	pН	$E_{\rm H}({\rm mV})$	talajvízszint (mm)	
2010 május	0.6	2	4	24	1.9	6.88	148	-2530	
2010 augusztus	0.17	<1	3	<5	1.24	6.96	8	-3120	
2010 november	0.5	<1	3.1	<5	1.69	6.98	127	-3190	
2011 február	0.8	<1	3.7	<5	1.97	7.28	-216	-3300	
2011 május	0.8	<1	2	<5	1.84	7.07	-214	-3940	

V.3.4. A mikrobaközösség összetételének 16S rDNS alapú monitorozása

A szennyezési csóva közepét feltáró ST2-es talajvízmintavételi kút mikrobaközösségének dinamikáját 16S rRNS gén alapút T-RFLP módszer segítségével vizsgáltam. Ahhoz, hogy az egyes T-RF-ekhez baktériumot, vagy baktérium csoportot tudjak kötni, és ezáltal az esetlegesen megfigyelhető dinamika mibenlétét feltárhassam, három mintavételi időpontban (2010. május, 2010. december és 2011. május) 16S rDNS alapú klóntárakat hoztam létre, majd megállapítottam az egyes klónszekvenciák T-RF hosszát.

dc_1786_20

A kiindulási, 2010. májusi minta esetében a Burkholderiales rendbe tartozó baktériumok uralták a mikrobaközösséget, és elsősorban a *Rhodoferax*, *Azoarcus* és *Sulfuritalea* nemzetségek képviselőit lehetett kimutatni. E nemzetségekhez lehetett kötni sorrendben a 430 bp, a 119 bp és a 118 bp hosszúsággal jellemezhető T-RF-eket (9. táblázat).

9. táblázat: Az ST2-es kút mikrobaközösségének összetétele három mintavételi időpontban és a reprezentatív 16S rDNS klónszekvenciák számított és mért TR-F hossza.

Filogenetikai besorolás	%-os arány az adott klónkönyvtárban			T-RF hossz (bp)		
000010185	2010M	2010D	2011M	számított	mért	
Betaproteobacteria	70	75	78			
Rhodoferax	58	1	12	433	430	
Albidiferax	1	5		433/477	429/472	
Azoarcus	5	45	16	120	119	
unc. Rhodocyclaceae		9	39	122	120	
Dechloromonas		7	5	120	121	
Delftia		5	1	120	117	
Hydrogenophaga			1	427	422	
Acidovorax			1	431	428	
Sulfuritalea	4	3	1	120	118	
Thiobacillus	1		2	122	120	
Sulfuricella	1			475	472	
Gammaproteobacteria	18	17				
Pseudomonas	10	17		521/472	522/472	
Alkanibacter	8			462	457	
Alphaproteobacteria	2		7			
Rhizobium	2		2	111/483	111/478	
Oleomonas			5	120	119	
Epsilonproteobacteria	7	1	2			
Sulfurospirillum	7	1	2	448	449	
Deltaproteobacteria	1	2	1			
Geobacter		1		243	243	
Desulfopila	1			226	223	
unc. Desulfobacteraceae			1	258	258	
Clostridia		3				
Anaerovorax		3		492	490	
Egyéb		1	9			

A *Pseudomonas* nemzetséghez köthető, szintén nagy gyakorisággal előforduló klónszekvenciák 472 és 522 bp hosszúságú T-RF-fel voltak jellemezhetőek, míg az *Alkanibacter* nemzetséghez köthető szekvenciák 457 bp hosszúságú T-RF-fel.

A 2010. decemberi minta esetében továbbra is a Burkholderiales rend tagjai mutatkoztak dominánsnak, de kissé eltérő közösségkép rajzolódott ki. A 2010. májusi mintával ellentétben az *Azoarcus* nemzetség volt jelen túlnyomó többségben, míg a *Rhodoferax*

86

nemzetség marginális mértékben volt kimutatható. Jelentős csoportot képviseltek még azon klónszekvenciák, amelyek egy kitenyésztetlen, Rhodocyclaceae családba tartozó baktériumhoz voltak köthetőek (120 bp hosszúságú T-RF), illetve ugyancsak említésre méltó abundanciával rendelkeztek a *Dechloromonas* nemzetséghez köthető szekvenciák (121 bp hosszúságú T-RF). A klóntár egészét tekintve a második legjelentősebb csoportot a *Pseudomonas* nemzetséghez köthető klónszekvenciák alkották (472 és 55 bp T-RF-ek).

A monitoring időszak végére az ismeretlen, Rhodocyclaceae családba tartozó mikroszervezethez köthető klónszekvenciák váltak túlnyomó részben dominánssá, de jelentős csoportot alkottak az *Azoarcus*, a *Rhodoferax* és a *Dechloromonas* nemzetségekhez köthető szekvenciák is. Érdekes módon a *Pseudomonas* nemzetség nem volt kimutatható a mintából (a szűken értelmezett Gammaproteobacteria osztály egyáltalán nem volt kimutatható), míg az Alphaproteobacteria osztályt főleg *Oleomonas* nemzetséghez köthető szekvenciák képviselték (119 bp hosszúságú T-RF).

Ami a mikrobaközösség 2010 májusa és 2011 májusa közöti dinamikáját illeti, a T-RFLP elektroferogramok alapján az látható, hogy a monitoring időszak alatt a mikrobaközösség faji összetétele többé-kevésbé állandó volt, ezzel szemben a dominanciaviszonyok nagyobb változatosságot mutattak (26. ábra). Ez utóbbi jelenség, miszerint akár jelentős dominanciaviszonybeli átrendeződést lehetett tapasztalni akár egyik hónapról a másikra is, jó lehetőséget biztosított arra, hogy megvizsgáljam az I.2.C-típusú *C230* gének kimutathatósági, illetve kifejeződésbeli dinamikáját, majd statisztikai összefüggések alapján baktériumokhoz kössem a jelentősebb genotípusokat.



26. ábra: Az ST2-es mintavételi kút mikrobaközösségének 16S rDNS T-RFLP mintázata a 2010. május és 2011. május közötti időszakban (Táncsics és mtsai, 2013 alapján).

V.3.5. Az I.2.C-típusú C23O gének diverzitásának és aktivitásának monitorozása

A 13 hónapos vizsgálati periódus alatt minden hónapban vizsgáltam az I.2.C-típusú *C230* gének aktivitásának kimutathatóságát. Az eredmények alapján kijelenthető volt, hogy az ehhez az alcsaládhoz tartozó *C230* gének mindvégig aktívak voltak, és a cDNS átírás után sikerült a XylE3 primerpár segítségével amplifikálni a kérdéses génszakaszokat. A diverzitás feltárásához, hasonlóan a 16S rRNS génekhez, a 2010. májusi, 2010. decemberi és a 2011. májusi minták esetén klóntárat készítettem a *C230* PCR termékeket felhasználva. A szekvenciák aminosav szintű filogenetikai elemzése azt mutatta, hogy a kimutatott klónszekvenciákat 6, egymástól jól elkülöníthető csoportba lehetett sorolni (27. ábra).



27. ábra: A monitoring időszak alatt az ST2-es mintavételi kútból kimutatott I.2.C C23O klónok filogenetikai helyzetét és csoportosulását bemutató, aminosav szekvencia alapú neighbor-joining fa. A fa gyökereztetéséhez a pWW53 TOL plazmidon kódolt I.2.A C23O enzim aminosav szekvenciáját használtuk (Táncsics és mtsai, 2013 alapján).

A 2010. májusi minta esetében a klónszekvenciák döntő többségét (a szekvenciák 61%-a) az "A"-jelű klaszterbe lehetett sorolni, és e szekvenciák aminosav szinten a legnagyobb hasonlóságot a Pseudomonas putida MT15-ös törzsének C23OII enzimével mutatták (98,8%). Ezt az extradiol dioxigenázok I.2.C alcsaládjába tartozó C23O enzimet elsőként Keil és mtsai írták le (1985), amikor is felfedezték, hogy egyes Pseudomonas törzsek két, egymással nem homológ és egymástól függetlenül szabályozott C230 génnel rendelkeznek. (E baktérium törzs C23OI enzime egyébként egy I.2.A alcsaládba tartozó extradiol dioxigenáz.) A szekvenciák második legnagyobb csoportja (15%) a "B"-jelű klaszterbe tartozott, és szintén a P. putida MT15 C23OII enzimével mutatták a legnagyobb hasonlóságot, ám ez csupán 91,4%-os hasonlóságot jelentett, így e csoportot nem lehetett ismert baktériumhoz kötni. A klónszekvenciák 12%-a a "C"-jelű klaszterbe tartozott és a Brennerova és mtsai által leírt (2009), metagenomból kimutatott s67 D-Tn1-jelű, hipotetikus C23O enzimmel mutattak közeli rokonságot (97,3 – 98,8% aminosav szekvencia hasonlóság). A siklósi kárhely első vizsgálatakor ez a C23O szekvencia volt a legnagyobb gyakorisággal kimutatható a szennyezési csóva közepéből a COMC23O primerpár segítségével (Táncsics és mtsai, 2012). A klónszekvenciák 10%-a tartozott a "D"-jelű klaszterbe és szintén Brennerova és mtsai által leírt (2009) metagenomi szekvenciákkal mutattak közeli rokonságot (98,3%-99,2%). Sajnos azonban ezeket a szekvenciákat sem lehetett ismert baktériumhoz kötni. Mindössze egy darab klónszekvencia tartozott az "F"-jelű klaszterbe, amely a Pseudoxanthomonas spadix BD-a59 törzs egyik C23O szekvenciájával mutatott 100%-os egyezést. Itt kell megjegyezni, hogy a mind a hat BTEX-komponens lebontására képes BD-a59-es törzs genomja ismert, és abban három különböző C23O enzim génje található meg, azonban ezek mindegyike I.2.C alcsaládba tartozó enzimet kódol (Kim és mtsai, 2008; Lee és mtsai, 2012). A 2010. decemberi minta esetében szintén kimutathatóak voltak e szekvencia típusok, ám kissé eltérő abundancia volt megfigyelhető mindegyik esetében. Az "A"-jelű klaszterbe tartozó szekvenciák abundanciája jelentősen csökkent (7%), és helyette a "B"-jelű klaszterbe tartozó szekvenciák voltak dominánsak (65%). A "C"-jelű csoportba tartozó szekvenciák aránya csökkent (4%), míg a "D"-jelűbe tartozóké jelentősen megnőtt (20%). Bár "F"-jelű klaszterbe tartozó szekvenciát ebből a klónkönyvtárból nem sikerült kimutatni, alacsony gyakorisággal ugyan, de megjelent egy újabb szekvenciatípus ("E"-jelű klaszter, a szekvenciák 4%). E szekvenciák alacsony hasonlóság mellett (89,9%) a Pseudoxanthomonas spadix BD-a59 törzs egyik C230 szekvenciájával mutattak rokonságot, tehát nem lehetett egyértelműen ismert baktériumhoz kötni őket. A monitoring periodus végére a klónszekvenciák diverzitása jelentősen csökkent.

Továbbra is a "B"-jelű klaszterbe tartozó szekvenciák voltak a dominánsak, sőt már a szekvenciák 85%-a tartozott ide. Az "E"-jelű klaszterbe tartozó szekvenciák gyakorisága nőtt (13%), míg a "C"-jelű klaszterbe tartozóké tovább csökkent (2%). Emellett az "A" és "D"-jelű klaszterbe tartozó szekvenciák nem voltak kimutathatóak a 2011. májusi klóntárból.

Az I.2.C-típusú *C230* gének aktivitása mellett szintén havi szinten vizsgáltam az I.2.A és I.2.B-típusú *C230* gének kifejeződését is. Utóbbiak esetében nem lehetett transzkriptumot kimutatni, míg az I.2.A-típusú *C230* gének esetében, amelyek szinte kizárólag a *Pseudomonas* nemzetséghez köthetőek, 2010 decembere és 2011 májusa között lehetett aktivitást kimutatni, de meg kell jegyezni, hogy nagyon gyenge PCR termék keletkezett minden esetben. A kifejeződött gének diverzitásának feltárása okán a 2010. decemberi és 2011. májusi minták esetén klóntárakat készítettem és vizsgáltam. Ahogy az a számított aminosavszekvenciák alapján készült filogenetikai fán is látható, a szekvenciák két klaszterbe voltak sorolhatóak (28. ábra). E két klaszter szekvenciái a TOL plazmidon kódolt két, egymással homológ C23O enzim valamelyikével mutattak teljes egyezést (100%-os aminosav szekvencia hasonlóság). Ez az eredmény azt feltételezi, hogy TOL plazmiddal rendelkező *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó baktériumok gyenge aktivitását lehetett kimutatni a 2010 decembere és 2011 májusa közötti időszakban.



28. ábra: A monitoring időszak alatt az ST2-es mintavételi kútból kimutatott I.2.A C23O klónok filogenetikai helyzetét és csoportosulását bemutató, aminosav szekvencia alapú neighbor-joining fa. A fa gyökereztetéséhez a P. putida MT15-ös törzs I.2.C C23O enzimének aminosav szekvenciáját használtuk (Táncsics és mtsai, 2013 alapján).

V.3.6. Az I.2.C-tipusú C23O gének expressziós mintázatának nyomonkövetése

A klóntárak által feltárt I.2.C-típusú *C230* genotípusok aktivitásának nyomonkövetését a Single Nucleotide Primer Extension (SNuPE) módszer segítségével végeztem el. Ezt a humán genetikában használatos molekuláris módszert eredetileg pontmutációk detektálására dolgozták ki, de számos tanulmány igazolta, hogy mikrobiális ökológiai vizsgálatok esetén is jól használható. A módszer lényege, hogy az adott genotípus kimutatására tervezett oligonukleotid próba a célszekvenciához való hibridizáció után mindössze egy darab nukleotiddal hosszabbodik meg a DNS polimeráz enzim jóvoltából, ugyanis a reakcióban résztvevő összes nukleotid didezoxi formában van jelen, amelynek beépülése láncterminációt okoz (akárcsak a Sanger-féle DNS szekvenálási módszer esetén). A különböző didezoxi nukleotidok egyedi fluoreszcens jelölést hordoznak, így a reakció után az oligonukleotidok kapilláris gélelektroforézissel történő elválasztás után lézeres úton detektálhatóak. A beépült nukleotid minősége hordozza a kérdéses genetikai információt.

Ahhoz, hogy a SNuPE módszerrel vizsgálni tudjam a kimutatott I.2.C-típusú *C230* genotípusok expressziós mintázatát, a hat különböző klaszterre specifikus oligonukleotid próbákat kellett terveznem. E próbák szekvenciáját, és alapvető tulajdonságaikat a 10. táblázat részletezi.

Cél klaszter	Oligonukleotid szekvencia	Az oligonikleotid hossza a reakció végén (bp)	Mért hosszúság* (bp)	Beépülő bázis**
A	5' CTT GAT CAC ATT GCA CTT GTA 3'	22	28	T
В	5' (T)3 CGG CAT CAA GAC AGA CCT GCT 3'	25	30	A
С	5' (T)6 CAT AGA GGC CTA CGG TAT CGC 3'	28	32	A
D	5' (T)9 GTT GGC CGC ATG CTG AAA TTT 3'	31	36	A
E	5' (T) ₁₂ CAG GCC GCC ACA TGG CTG ACA 3'	34	38	T
F	5' (T)15 TGG CCA AGA ACC GCA CCC GCA 3'	37	40	T

10. táblázat: Az I.2.C C23O klaszterek kimutatásához tervezett SNuPE primerek jellemzői

*: A tényleges, és a kapilláris gél-elektroforézis során mért hossz az oligonukleotid rövidsége miatt jelentősen eltérhet.

**: A beépülő nukleotid színe megfelel az elektroforetogramon várt jel színének.

A minták SNuPE vizsgálat elektroforetogramjai alapján azt lehetett látni, hogy az "A"jelű klaszter aktivitása, amely a *Pseudomonas* nemzetséghez volt köthető, elsősorban a vizsgálati időszak első felében volt megfigyelhető. A 2010 októberét követő időszakban dc_1786_20



azonban többnyire marginális aktivitását lehetett megfigyelni az e klaszterbe tartozó genotípusoknak (29. ábra).

29. ábra: A siklósi ST2-es kút mikrobaközösségének I.2.C C23O SNuPE mintázata a 2010. május és 2011. május közötti időszakban (Táncsics és mtsai, 2013 alapján)

93

Ezzel szemben a "B"-jelű klaszter aktivitása a vizsgálati időszak második felében volt jelentős, és 2011 áprilisára gyakorlatilag egyeduralkodóvá vált az e csoport aktivitását mutató SNuPE jel az elektroferogramon. A "C"-jelű klaszter aktivitása változó képet mutatott, és 2010 augusztusában e csoport mutatta a legnagyobb aktivitást. Emellett elmondható még, hogy minden hónapban kimutatható volt az aktivitása. A többi három klaszter aktivitásuk alapján kisebb jelentőségűnek mondható. Bár a "D"-jelű klaszter aktivitása három hónap mintáinak kivételével (2010. június, július és augusztus) többnyire kimutatható volt, szinte mindig alacsony aktivitást detektáltunk e csoport esetében. Szinte ugyanez elmondható az "E"-jelű klaszterről is, míg az "F"-jelű klaszter esetében csak a 2010 novembere és 2011 februárja közötti időszakban lehetett detektálható aktivitást kimutatni.

V.3.7. Statisztikai összefüggések keresése az aktív mikrobaközösségek összetétele és a *C230* gének expressziós mintázata között

Az RNS alapon feltárt mikrobaközösség összetétele és az I.2.C-típusú *C230* gének expressziós mintázata közötti összefüggések feltárásához első lépésben klaszter elemzést végeztem külön-külön a 16S rRNS gén alapú T-RFLP, illetve a *C230* SNuPE elektroferogramok alapján. Ennek eredményét az 30. ábra mutatja.



30. ábra: A siklósi ST2-es mikrobaközösség (a) 16S rDNS T-RFLP, illetve (b) C23O SNuPE elektroferogramjainak klaszter elemzése (Táncsics és mtsai, 2013 alapján).

Bizonyos esetekben megfigyelhető volt, hogy olyan egymást követő hónapokban, ahol az aktív mikrobaközösség összetétele nagy hasonlóságot mutatott, ott a *C230* gének expressziós mintázatáról is el lehetett mondani ugyanezt. Ez legjobban a 2010 novembere és

2011 januárja, 2010 szeptembere és októbere, illetve kevésbé egyértelműen, de a 2011 márciusa és áprilisa közötti időszakokban volt megfigyelhető. Ugyanakkor voltak olyan minták, amelyek esetében bár hasonló *C230* expressziós mintázat volt megfigyelhető, a mikrobaközösség összetételében jelentős különbség volt megfigyelhető közöttük. Erre jó példa a 2010. júniusi és júliusi minták esete. Ez a jelenség lehetővé tette, hogy összefüggést keressünk egyes T-RF-ek és SNuPE klaszterek jelenléte és abundanciája között. Az R statisztikai programcsomag segítségével a SNuPE elektroferogramokból nyert adatokat vektorok formájában hozzáillesztettük a 16S rRNS gén alapú T-RFLP eredmények főkomponens analíziséhez. Ennek eredményét mutatja a 31. ábra.



31. ábra: A 16S rDNS és a SNuPE eredmények közötti statisztikai összefüggések megjelenítése PCA diagramon az R programcsomag segítségével (Táncsics és mtsai, 2013 alapján).

E statisztikai vizsgálat eredményét értékelve elmondható, hogy a "B" és "E"-jelű klaszterek a 120 bp hosszúságú T-RF-fel mutattak szignifikáns korrelációt, míg a "C"-jelű klaszter a 430 bp hosszúságú T-RF-fel. Ez alapján azt lehetett valószínűsíteni, hogy a "C"-jelű klaszterhez tartozó C23O géneket a *Rhodoferax* nemzetségbe tartozó baktériumok kódolják, míg a "B" és "E"-jelű klaszterbe tartozó géneket a Rhodocyclaceae családba tartozó

baktériumokhoz lehetett kötni. Megjegyzendő, hogy e kísérletek óta a Rhodocyclaceae család taxonómiai revizión esett át, és két új család vált ki belőle: *Azonexaceae* (nemzetségek: *Azonexus, Dechloromonas, Ferribacterium* és *Quatrionicoccus*) és Zoogloeaceae (nemzetségek: *Zoogloea, Thauera, Uliginosibacterium* és *Azoarcus*). A Rhodocyclaceae családot ma mindössze a *Rhodocyclus, Azospira* és *Propionivibrio* nemzetségek alkotják (Boden és mtsai, 2017). Mivel ez utóbbi nemzetségek képviselőit nem lehetett a vizsgált közegből kimutatni, helyesebb talán úgy fogalmazni, hogy az utóbbi két klaszterbe tartozó *C230* géneket nagy valószínűséggel a Zoogloeaceae, illetve az Azonexaceae családokba tartozó baktériumok kódolják.

V.3.8. A Rhodoferax nemzetségbe tartozó mikroszervezetek feldúsítására tett kísérlet

A fenti eredmények arra engedtek következtetni, hogy egy Rhodoferax nemzetségbe tartozó, ám ezidáig tenyésztésbe nem vont baktériumnak kulcsszerepe lehetett a BTEX-vegyületek mikroaerob lebontásában, és e baktérium I.2.C C230 génnel rendelkezhet. Emiatt döntöttünk úgy, hogy egy dúsítási kísérlet segítségével megpróbáljuk kitenyészteni ezt a mikroszervezetet. A legközelebbi rokonokról ismert volt, hogy nitrogén-fixációra lehetnek képesek (Rhodoferax antarcticus), illetve felszín alatti közegben élő képviselőik vas(III)-redukáló fakultatív anaerob életmódot folytató mikroszervezetek, amelyek képesek acetáton növekedni (Rhodoferax ferrireducens) (Madigan és mtsai, 2000; Finneran és mtsai, 2003). Ezen ismeretek alapján négyféle, ám egymástól csupán a nitrogénforrás tekintetében eltérő anaerob dúsító tenyészetet hoztunk létre. Feltételezésünk az volt, hogy a keresett Rhodoferax sp. baktérium abban a tápoldatban fog leginkább feldúsulni, ahol csupán a lombik gáztere tartalmazott nitrogént, és így nitrogén-fixációra késztetjük a feldúsuló mikroszervezeteket. A szénforrás minden esetben acetát, míg az elektron akceptor Fe(III)-NTA volt. A várt eredménnyel szemben azonban egyik dúsító tenyészetben sem jelentek meg a Rhodoferax nemzetség képviselői. Bár a nitrogén-fixáló, IV-es típusú dúsító tenyészetben alacsony diverzitású baktériumközösséget találtunk, a domináns mikroszervezet az obligát anaerob, vas-redukáló Geobacter luticola fajjal mutatott rokonságot (97,5% 16S rDNS hasonlóság) (Farkas és mtsai, 2017). E kísérlet tehát nem mutatkozott alkalmasnak arra, hogy a keresett Rhodoferax nemzetségbe tartozó baktériumot feldúsítsuk és izoláljuk.

V.3.9. Összegzés

A siklósi kárhely mikrobaközösségének 13 hónapon át tartó folyamatos vizsgálata rávilágított arra, hogy a korábban tapasztaltnál is nagyobb az I.2.C-típusú *C230* gének diverzitása a területen. Ezt a diverzitást egy olyan, újonnan tervezett PCR primerpár segítségével tudtam feltárni, amelyet kifejezetten az I.2.C-típusú *C230* gének kimutatására terveztem (XylE3 primerpár). Bizonyítást nyert, hogy az e típusba tartozó *C230* gének jóval nagyobb diverzitással vannak jelen a siklósi kárhelyen (legalább is a szennyezési csóva közepén), mint az I.2.A-, vagy az I.2.B-típusú *C230* gének. Ennek megfelelően a szennyezőanyagok biodegradációjában betöltött szerepük is jelentősebbnek tűnik.

Sikerült kimutatni, hogy a szennyezési csóva középpontjában a mikrobaközösség faji összetétele többnyire stabil volt a vizsgált időszak alatt, ugyanakkor a dominanciaviszonyai változó képet mutattak. Elmondható, hogy a mikrobaközösséget végig a Comamonadaceae, Zoogloeaceae és Azonexaceae családokba tartozó baktériumok uralták és egyes I.2.C-típusú *C230* géneket sikerült is e családokhoz, illetve e családok valamely nemzetségéhez kötni, ám egyelőre csak statisztikai úton.

A kísérletek rámutattak arra is, hogy a SNuPE módszer valóban jól használható mikrobiális vizsgálatok során is, és kifejezetten alkalmas arra, hogy funkciógének expressziójának vizsgálatakor különböző genotípusok aktivitását elemezhessük egyidőben, egy reakció keretén belül.

Végül, de nem utolsósorban, nyilvánvalóvá vált, hogy ahhoz, hogy minden kétséget kizáróan azonosítani tudjuk a mikoraerob BTEX-lebontásra képes mikroszervezetek körét, kísérletet kell tenni e mikroszervezetek feldúsítására és izolálására, illetve olyan komplex molekuláris ökológiai módszerek használatához kell folyamodni, mint például a stabil izotópos jelölés (stable isotope probing - SIP) módszere.

V.4. Az I.2.C-típusó *C230* génnel rendelkező *Zoogloea oleivorans* izolálása és új fajként történő leírása

V.4.1. Baktériumtörzsek direkt izolálása kőolajszármazékkal szennyezett közegből

Ahogy az az előző fejezetek alapján látható, a tisztán molekuláris módszereken alapuló vizsgálatok csak az I.2.C-típusú *C230* gének diverzitásának feltárását engedték meg, míg az e génekkel rendelkező baktériumok diverzitása jórészt ismeretlen maradt. Emiatt szükséges volt a klasszikus, tenyésztésen alapuló módszereket is bevonni a vizsgálatokba. Ennek

folyományaként, a siklósi, illetve egy másik magyarországi, Bugyi nagyközség közelében található kárhelyről származó mintákból folyamatosan végeztem direkt, dúsítás nélküli baktériumtörzs izolálást. A törzsek 16S rDNS alapú azonosítása mellett minden esetben megvizsgáltam, hogy az adott törzs rendelkezik-e I.2.C-típusú *C23O* génnel. Egy ilyen, 2013-ban történt izolálási kísérlet során sikerült a bugyi kárhelyről származó mintából (gázolajjal szennyezett talajvízben, egy perisztaltikus pumpa rozsdamentes acél felszínén kialakult biofilm) egy olyan törzset izolálni, amely a 16S rDNS szekvencia előzetes vizsgálata alapján a *Zoogloea* nemzetség új, még nem leírt tagjának tűnt és egy korábban ismeretlen I.2.C-típusú *C23O* genotípussal rendelkezett. A továbbiakban e baktériumtörzs új fajként történő polifázikus leírását ismertetem.

V.4.2. A Zoogloea nemzetség általános jellemzése

A Zoogloea nemzetség képviselői elsősorban kommunális szennyvíztisztítói eleveniszapból mutathatóak ki. Jelenlétük a szennyvíztisztítás során kiemelkedő fontosságú, mivel kiváló flokkulumképző tulajdonsággal rendelkeznek, ezáltal amellett, hogy részt vesznek a szervesanyagok lebontásában, hozzájárulnak a biomassza kiülepedéséhez, ezáltal az eleveniszap kialakulásához (Shao és mtsai, 2009; Weissbrodt és mtsai, 2013; Zhao és mtsai, 2013). Egyes kutatók szerint e baktériumoknak kifejezetten kulcsszerepük van az eleveniszap flokkuláció általi kialakulásában (Rosello-Mora és mtsai, 1995). A sejtek a flokkulumképződés közben beágyazódnak a sejtek által termelt zselatinszerű exopoliszacharid mátrixba, amit a szakirodalom "zoogloea mátrix"-ként is ismer (Dugan és mtsai, 1992). Jellemző tulajdonságuk még a polihidroxialkanoát (PHA) tartalmú, szén- és energiaraktárként szolgáló zárványtestek megjelenése a sejtek belsejében, emiatt a biológiailag lebomló műanyagok előállítása során is fontos szerephez juthatnak e nemzetség képviselői (Khanna és Srivastava, 2004). Az új faj jelölt izolálásakor a Zoogloea nemzetség mindössze négy ismert fajt tartalmazott, amelyek a következőek voltak: Zoogloea ramigera (Crabtree és McCoy, 1967), Zoogloea resiniphila (Mohn és mtsai, 1999), Zoogloea oryzae (Xie és Yokota, 2006), illetve Zoogloea caeni (Shao és mtsai, 2009).

Bár a nemzetség képviselőit leggyakrabban eleveniszapból mutatják ki, kétségtelen tény, hogy talajokból és felszín alatti közegekből is kimutathatóak (Huang és mtsai, 2015; Lu és Lu, 2018). Szakirodalmi adatok alapján az aromás szénhidrogén-lebontási képessége is ismert egyes törzseknek. A *Zoogloea resiniphila* típustörzse képes például a dehidroabietát nevű, aromás gyűrűt tartalmazó gyantasav lebontására (Yu és Mohn, 2002), de aerob úton

történő benzol-lebontásban résztvevő *Zoogloea* populációt is azonosítottak már, stabil izotópos jelölés módszerének segítségével (Jechalke és mtsai, 2013).

V.4.3. A Buc^T-jelű törzs izolálása és filogenetikai helyzetének feltárása

A Buc^T-jelű törzs egy piszkosfehér színű, nyálkás biofilmből került izolálásra. A biofilm egy Bugyi nagyközség közelében elhelyezkedő, kőolajszármazékkal szennyezett kárhely talajvíz kútjából származott. A törzs szürkésfehér színű, kezdetben nyálkás, majd később viaszos állagú telepeket alkotott R2A tápagar felszínén, míg R2A táplevesben aránylag gyors flokkulumképződést mutatott. A fiatal, flokkulumot még nem képező 24-48 órás tenyészetek segítségével a sejtekről készült transzmissziós elektronmikroszkópi kép alapján látható volt, hogy a fiatal sejtek 2,5-3 µm hosszúak, míg átmérőjük 1,2 – 1,4 µm és egy poláris flagellummal rendelkeznek (32. ábra). A képeken megfigyelhető volt az is, hogy a sejteket vastag tok veszi körül.



(b)



32. ábra: A Buc^T törzsről készült transzmissziós elektronmikroszkópi felvételeken megfigyelhetőek (a) a baktérium általános morfológiai jellemzői, illetve (b) a poláris flagellum. (Farkas és mtsai, 2015 alapján)

Három-négy napos, R2A táplevesben növekvő tenyészetek esetében már erőteljes flokkulumképződés volt megfigyelhető. A natív flokkulumokról fénymikroszkóppal készült felvételeken látható, hogy ekkor már egyes sejtek megnyúltak, akár 5 µm hosszúságot is elérőek és bennük fekete gyöngyökként tűnnek fel a minden valószínűség szerint PHA-t tartalmazó zárványtestek (33. ábra).



33. ábra: A Buc^T törzs sejtjeinek natív praparátuma 1000x-es nagyítás mellett, fénymikroszkóppal vizsgálva. Jól megfigyelhetőek a feltehetően PHA-t tartalmazó zárványtestek. (A szerző saját, máshol nem publikált felvétele.)

A 16S rRNS gén (GenBank hivatkozási szám: KF667502) közel teljes szekvenciájának vizsgálata alapján egyértelmű volt, hogy a törzs legközelebbi rokonai a *Zoogloea* nemzetségbe tartoznak. A 16S rDNS szekvenciahasonlóság alapján legközelebbi rokonának a *Zoogloea caeni* adódott 97,2%-os homológiával. A nemzetség többi tagjával 96% alatti 16S rDNS hasonlóságot lehetett csak kimutatni. Bár ez alapján már valószínűsíteni lehetett azt, hogy a *Zoogloea* nemzetség egy új, ezidáig ismeretlen tagjáról van szó, DNS-DNS hibridizációs vizsgálat elvégzésére volt szükség ennek a feltevésnek a minden kétséget kizáró igazolásához. E vizsgálatot a Buc^T törzzsel és a vele 97% feletti 16S rDNS hasonlóságot mutató *Zoogloea caeni* típustörzsével kellett elvégezni. Mivel a kapott eredmény mindössze 31,6%-os DNS-

DNS hibridizációt mutatott, nyilvánvalóvá vált, hogy a Buc^T-jelű törzs faji szinten elkülöníthető a *Zoogloea caeni*-től, és a *Zoogloea* nemzetség új fajaként írható le. A Buc^T törzsnek a többi *Zoogloea* fajtól való filogenetikai elkülönülését a neighbor-joining módszerrel készült fa is jól mutatja (34. ábra). Sőt, a filogenetikai fa alapján elmondható, hogy valójában nem lehet egyértelműen megállapítani, hogy melyik *Zoogloea* faj a Buc^T törzs legközelebbi rokona, mivel annyira különálló ágon helyezkedik el.



34. ábra: A Buc^T törzs filogenetikai helyzetét bemutató, neighbor-joining módszerrel készült fa. (Farkas és mtsai, 2015 alapján)

V.4.4. Az I.2.C-típusú C23O gén kimutatása, és a szénhidrogén-lebontási képesség igazolása

Mivel a Buc^T törzs aromás szénhidrogéneket is tartalmazó közegből származott és a közeli rokon nemzetségek többségéről ismert, hogy egyes törzseik fontos szerepet játszanak a BTEX-vegyületek lebontásában (pl. *Azoarcus* és *Thauera*), indokoltnak tűnt megvizsgálni, hogy a törzs rendelkezik-e olyan génnel, amelyik az aromás gyűrű hasításában szerepet játszó enzimet kódol. Mivel a *Zoogloea* nemzetség a Betaproteobacteria osztályba tartozik (újabban Burkholderiales rend), kézenfekvő volt, hogy elsőként az I.2.C-típusú *C230* gén kimutatásával próbálkozzunk. Meglepve tapasztaltuk, hogy a XylE3 primerpár segítségével egy specifikus, nagyjából 800 bp hosszúságú PCR terméket lehetett amplifikálni a törzs genomi DNS-éből. A PCR termék Sanger-szekvenálása fényt derített arra, hogy ténylegesen egy I.2.C-típusú *C230*

gén fragmentjét sikerült amplifikálni, amely egy korábban ismeretlen *C230* genotípushoz tartozik (Genbank hivatkozási szám: KJ433487), és meglehetősen alacsony homológiát mutatott az akkor ismert *C230* génekkel. A legnagyobb hasonlóságot nukleinsav szinten a *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59-es egyik *C230* génjével mutatta, azonban nagyon alacsony, mindössze 81,6%-os szinten.

A szénhidrogén-lebontási képesség vizsgálata először egy egyszerű gravimetriás módszerrel történt meg. Ennek során egy kőolaj/gázolaj keverék Buc^T törzs általi lebontását vizsgáltuk, és a törzs 18,6 \pm 1,6%-os bontási hatékonyságot mutatott a 120 órás vizsgálati időtartam végéig, szemben a referencia törzsként használt *Zoogloea caeni* EMB43^T-vel, amely egyáltalán nem mutatott szénhidrogén lebontást. Később GC-MS vizsgálatok segítségével fény derült arra is, hogy a Buc^T-törzs képes aerob körülmények között a benzolt, a toluol, valamint az etilbenzolt is egyedüli szén-, és energiaforrásként hasznosítani (nem publikált eredmény).

V.4.5. A Buc^T törzs kemotaxonómiai vizsgálata

A Buc^T törzs új fajként történő valid leírásához kemotaxonómiai vizsgálatokat, úgymint DNS G+C arány meghatározás, zsírsavprofil analízis, légzési kinonok analízise, illetve zsírsavprofil elemzést kellett elvégezni. E vizsgálatokat a DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures Identification Service részlege végezte el számunkra. A Buc^T törzs DNS állományának G+C aránya 63,2 mol%-nak adódott, ami kissé alacsonyabb a *Zoogloea* nemzetség többi tagjára jellemző 65% körüli értéknél (Shao és mtsai, 2009). A fő légzési kinonnak az ubikinon-8 (Q-8) adódott (91%), de mellette kis mennyiségű ubikinon-7-et (Q-7) is ki lehetett mutatni (9%). A Buc^T törzs sejtmembránjában előforduló fő poláris lipid a foszfatidil-etanolamin volt (35. ábra). A sejtmembránban előforduló főbb zsírsavak a következőek voltak: C_{16:0}, C_{10:0} 3-OH, C_{12:0} és "summed feature 3" (C_{16:1} ω 7*c* és/vagy iso-C_{15:0} 2-OH) (11. táblázat). Ezek a kemotaxonómiai tulajdonságok megegyeznek azzal, amelyet a *Zoogloea caeni* EMB43^T törzs esetében is megfigyeltek. Ez alapján kétségtelennek tűnt, hogy a Buc^T törzs besorolható a *Zoogloea* nemzetségbe.

11. táblázat. A Buc^T törzs és közeli rokonainak zsírsavprofilja.

Taxonok: 1, Buc^T (Farkas és mtsai, 2015); 2, *Zoogloea caeni* EMB43^T (Farkas és mtsai, 2015); 3, *Zoogloea resiniphila* DhA-35^T (Shao és mtsai, 2009); 4, *Zoogloea oryzae* A-7^T (Xie és Yokota, 2006); 5, *Zoogloea ramigera* ATCC 19544^T (Xie és Yokota, 2006). Az adatok százalékos megoszlást fejeznek ki. -, Nem detektált.

Zsírsav	1	2	3	4	5
Telített zsírsavak					
C10:0	0.71	0.39	-	0.5	0.9
C _{12:0}	4.57	3.32	4.15	3.1	4.4
C _{14:0}	1.45	2.36	-	0.6	2.3
C _{15:0}	-	1.41	0.66	-	-
C _{16:0}	34.84	20.80	32.94	25.9	25.1
C _{18:0}	-	0.57	-	-	1.1
Hidroxi zsírsavak					
C _{10:0} 3-OH	5.20	3.54	4.39	2.8	4.4
C _{12:0} 3-OH	2.17	1.18	2.63	1.8	2.5
C _{16:0} 3-OH	0.96	-	-	-	-
Elágazó szénláncú					
zsírsavak					
iso-C _{11:0} 3-OH	-	-	-	-	0.5
iso-C _{15:0}	-	-	0.74	-	-
iso-C _{16:0}	-	-	0.93	-	-
Telítetlen zsírsavak					
$C_{18:1}$ $\omega7c$	3.23	2.03	3.53	2.5	2.6
Nem elváló zsírsavak*					
3	45.74	62.05	50.02	61.6	56.6
7	1.12	2.37	-	1.1	-

*A nem elváló zsírsavak olyan zsírsav együttesek, amelyek olyan két vagy három zsírsavat tartalmaznak, amelyek a gázkromatográfiás mérés során nem különíthetőek el egymástól a kromatogramon. A "3"-as jelű csoport összetétele: $C_{16:1}\omega7c$ és/vagy iso- $C_{15:0}$ 2-OH. A "7"-es jelű csoport összetétele: egy ismeretlen zsírsav és $C_{19:0}$ cyclo $\omega10c$ és/vagy $C_{19:1}\omega6c$.



35. ábra: A Buc^T törzs sejtmembránjában előforduló fő poláris lipidek. PL, foszfolipid; AL, aminolipid; PE, foszfatidil etanolamin; PG, foszfatidil glicerol; PN, aminofoszfolipid. (Farkas és mtsai, 2015 alapján)

V.4.6. A Buc^T törzs fenotípusos jellemzése

A Buc^T törzs mezofil hőmérsékleti tartományban mutatott szignifikáns növekedést (5-35°C), és a tenyésztéséhez szükséges hőmérsékleti optimum 25-30°C közöttinek adódott. A pH toleranciája meglehetősen szűk, pH 6-9 között képes növekedni, pH optimuma 6,5-7,5 közötti. A sejtek Gram-negatív festődésűek, poláris flagellummal aktív mozgásra képesek. A nitrátot csak nitritig volt képes redukálni, nitrogén gáz képződése nem volt megfigyelhető. A nitrátot anaerob körülmények között képes volt alternatív elektron akceptorként haszonsítani és ezáltal szaporodni R2A táplevesben. Ugyanakkor nitrát hiányában, anaerob közegben nem mutatott növekedést. Metabolikus aktivitása az API tesztekben nagyon alacsonynak mutatkozott, a legtöbb szénhidrát bontására, vagy acetát felhasználására nem volt képes. A 12. táblázatban láthatóak azok a fenotípusos bélyegek, amelyek alapján a Buc^T törzs elkülöníthető a *Zoogloea* nemzetség többi tagjától.

 táblázat. Azon fenotípusos bélyegek listája, amelyek alapján a Buc^T törzs elkülöníthető a Zoogloea nemzetség többi tagjától (Farkas és mtsai, 2015 alapján)

Törzsek:1, Buc^T (Farksa és mtsai, 2015); 2, *Z. caeni* EMB43^T (Farksa és mtsai, 2015; Shao és mtsai, 2009); 3, *Z. resiniphila* DhA-35^T (Mohn és mtsai, 1999; Shao és mtsai, 2009); 4, *Z. oryzae* A-7^T (Xie és Yokota, 2006); 5, *Z. ramigera* ATCC 19544^T (Unz, 1984; Xie és Yokota, 2006). Szimbólumok: +, pozitív; -, negatív; NA, nincs adat.

Fenotípusos bélyeg	1*	2	3	4	5
Sejt átmérő (µm)	1,2-1,4	0,6-0,9	0,5-0,7	1,0	1,0-1,2
	szürkés-	~ (n ~ (~ f ~ h / n*	falsán	~~ <u>{</u> ~totolog	szürkés-
Telepek színe	fehér	sargastener*	lener	szintelen	fehér
Növekedés 37°C-on	-	+*	+	+	+
Növekedés 45°C-on	-	_*	+	-	-
Denitrifikáció N2-ig	-	+*	-	+	+
Kataláz	+	+*	-	+	+
Ureáz	+/-	_*	-	+	+
Denitrifikáció	+	+*	-	+	+
Zselatin hidrolízis	-	_*	+	-	+
Kazein hidrolízis	-	_*	+	-	+
Szénforrás					
hasznosítás:					
acetát	-	+*	+	-	+
citrát	-	_*	-	-	+
glükóz	-	_*	+	-	-
mannitol	-	_*	+	-	+

*Farkas és mtsai, 2015.

V.4.7. A Buc^T törzs elnevezése

A Buc^T törzs a fenotipikai, kemotaxonómiai, illetve molekuláris filogenetikai vizsgálatok eredményei alapján tehát egyértelműen leírható volt a *Zoogloea* nemzetség új képviselőjeként. Mivel kőolajszármazékokkal szennyezett közegből került izolálásra, és képesnek bizonyult egyes kőolaj/gázolaj komponensek lebontására, a törzs a *Zoogloea oleivorans* nevet kapta. A típustörzs elhelyezésre került a németországi DSMZ törzsgyűjteményben (DSM 28387), valamint a magyarországi Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében (NCAIM B 02570).

V.5. Mikroaerob toluol lebontásra képes mikroszervezetek azonosítása a siklósi kárhelyen stabil izotópos jelölés (stable isotope probing - SIP) módszerével

V.5.1. Problémafelvetés és a stabil izotópos jelölés módszerének rövid ismertetése

Ahogy azt korábban láthattuk, pusztán molekuláris ökológiai módszerekkel nem sikerült minden kétséget kizáróan feltárni a mikroaerob BTEX-lebontásban résztvevő mikroszervezetek körét. Az eddig részletezett eredmények alapján egyértelmű, hogy ennek egyik legfőbb oka az lehet, hogy a potenciálisan mikroaerob lebontásra képes baktériumok tenyésztése nehézségbe ütközik, emiatt metabolikus képességeik rejtve vannak előttünk. A stabil izotópos jelölés az egyik legelterjedtebb módszer, amellyel tenyésztés nélkül is képesek lehetünk mikroszervezetek bizonyos metabolikus képességeinek vizsgálatára. A módszert elsőként Radajewski és munkatársai írták le közel két évtizeddel ezelőtt (Radajewski és mtsai, 2000). Az alapelgondolás szerint olyan mesterségesen előállított szerves szubsztrátot adagolnak egy környezeti mintához (általában talaj, vagy talajvíz üledék), amelyben a szénatomok közül legalább egy a szén stabil 13-as izotópjaként van jelen (¹³C). Azok a mikroszervezetek, amelyek a vizsgált körülmények között képesek a felkínált szubsztrátot szénforrásként hasznosítani, a nehéz szénizotópot beépítik a DNS-ükbe. Az így kezelt környezeti mintából izolált közösségi DNS-t izopiknikus grádiens centrifugálás alá vetik, amely során a nehéz izotópot tartalmazó DNS elkülöníthető és vizsgálható a jól ismert molekuláris ökológiai vizsgálómódszerekkel. Radajewski és munkatársai a módszer kidolgozásakor metanol asszimilációjára képes metilotróf szervezetek diverzitását és metabolikus aktivitását vizsgálták erdei talajban oly módon, hogy 13-as szénizotópot tartalmazó metanolt adagoltak a környezeti mintához (Radajewski és mtsai, 2000). A stabil izotópos jelölés módszere gyorsan nagy népszerűségre tett szert a mikrobiális ökológiával fogalkozó kutatók körében, hiszen nyilvánvaló volt, hogy e módszer segítségével a tenyésztésbe nem vonható mikroszervezetekhez is funkciót lehet kötni (Dumont és Murrell, 2005). Köszönhetően annak, hogy az egyszerű kémiai szerkezettel rendelkező monoaromás szénhidrogének, mint a benzol vagy a toluol aránylag könnyen hozzáférhetőek stabil szénizotópot tartalmazó formában (akár mind a hat vagy hét szénatom lehet ¹³C), az e vegyületek biodegradációjának vizsgálatára irányuló kutatások egyik kedvelt eszközévé vált a SIP (Herrmann és mtsai, 2010; Sun és Cupples, 2012). Később komplexebb vegyületek is elérhetővé váltak 13-as szénizotóp tartalommal, így vizsgálhatóvá váltak például PAH-, vagy akár cellulóz-lebontó mikrobaközösségek is (Haichar és mtsai, 2007; Jones és mtsai, 2011). Az izotóposan jelölt DNS vizsgálata mellett megjelentek az RNS, illetve fehérje dc_1786_20

alapú stabil izotópos módszerek is, amelyek még pontosabb képet adtak a vizsgált mikrobaközösségek működéséről (Manefield és mtsai, 2002; Seifert és mtsai, 2012). A 13-as szénizotóp használata mellett megjelentek a 15-ös nitrogén, illetve a 18-s oxigén izotóp használatára alapuló módszerek, így vizsgálhatóvá váltak például talajok szabadonélő nitrogénfixáló mikrobaközösségei (Buckley és mtsai, 2007), illetve az az egyszerűnek tűnő kérdés, hogy talajok mikrobaközösségein belül mekkora a dormans állapotban lévő mikroszervezetek aránya (Papp és mtsai, 2018).

V.5.2. A ¹³C₇-toluol mikroaerob biodegradációjának vizsgálatához kialakított mikrokozmosz kísérlet menetének rövid leírása

Ahhoz, hogy a siklósi kárhely esetében minden kétséget kizáróan meg tudjuk állapítani, hogy mely baktériumok képesek mikroaerob körülmények mellett is a monoaromás modellvegyületnek számító toluol lebontására, mikrokozmosz kísérletet végeztünk stabil szénizotópot tartalmazó tolul (¹³C7-toluol) segítségével. A siklósi kárhely szennyezési csóvájának közepét feltáró, és a korábbiakban már részletesen ismertetett ST2-es talajvízmintavételi kút aljáról vett üledékminta segítségével mikroaerob mikrokozmoszokat készítettünk, az Anyag és Módszer fejezetben leírtak szerint. A mikrokozmoszokban a toluol koncentrációját GC-MS segítségével követtük nyomon, és az adatok értékelése alapján az inkubáció 3. és 7. napján izoláltunk DNS-t és RNS-t a mikrokozmoszokból. A nukleinsav izolálást követően CsCl oldatban történő izopiknikus grádiens centrifugálás segítségével frakcionáltuk a közösségi DNS-t, majd T-RFLP, illetve 16S rDNS amplikon piroszekvenálás segítségével vizsgáltuk a könnyű, átmeneti, illetve nehéz DNS frakciókat.

V.5.3. A ¹³C₇-toluol biodegradációja a mikrokozmoszokban

A mikrokozmoszok inkubációja során a toluol gyors biodegradációját lehetet megfigyelni. Az inkubáció 3. napjára a toluol nagyjából 70%-a lebontásra került, míg a 7. napon már egyáltalán nem lehetett toluolt kimutatni a mikrokozmoszokban (36. ábra). Eközben az abiotikus kontrollokban a toluol abiotikus fogyása a lebontáshoz képes elhanyagolható volt.



36. ábra: A toluol koncentrációja a mikrokozmoszokban (Táncsics és mtsai, 2018 alapján).

A toluol mellett az oldott oxigén koncentrációját is nyomon követtük, és elmondható, hogy az inkubáció 6. napjáig 24 óránként kellett utápótolni az oxigént, hogy annak koncentrációját a folyadékfázisban 0,0 és 0,5 mg/L között tartsuk. A toluol kimerülése után az oldott oxigén koncentrációjának csökkenése is megállt. Az inkubáció ideje alatt összesen 7,8 ml oxigént juttattunk a mikrokozmoszokba, amely elegendő kellett, hogy legyen az 1 mM koncentrációban jelenlévő toluol (ez mennyiségileg 4,7 x 10⁻⁵ mol) aerob biodegradációjához (Wiedemeier és mtsai, 1999).

V.5.4. A mikroaerob lebontó mikroszervezetek kimutatása és diverzitása DNS alapon

A mikrokozmoszokból izolált DNS izopiknikus grádiens centrifugálása után frakcionáltuk a CsCl oldatot, majd 16S rRNS génre specifikus qPCR segítségével állapítottuk meg, hogy sikerült-e a könnyű és nehéz DNS frakciók elválasztása, illetve, hogy melyik CsCl frakciók tartalmazzák a 13-as, illetve a 12-es szénizotópot tartalmazó DNS-t. A qPCR eredményét a 37. ábra mutatja, amelyen jól megfigyelhető, hogy a "könnyű" (K) és a "nehéz" (N) DNS jól elváltak egymástól, illetve ezek között egy átmeneti frakciót is ki lehetett mutatni (Á).


37. ábra: A 16S rRNS gén relatív mennyisége a CsCl frakciókban (Táncsics és mtsai, 2018 alapján).

Ezt követően minden CsCl frakcióból visszaizoláltuk a DNS-t, majd amplifikáltuk a 16S rRNS génszekvenciákat fluoreszcensen jelölt 27F PCR primer használata mellett. Ezután T-RFLP elemzést végeztünk, hogy megállapítsuk az egyes frakciók 16S rRNS gén összetételét. Az ennek a vizsgálatnak az eredményét bemutató 38. ábrán jól látható, hogy a qPCR segítségével megállapított nehéz (N), átmeneti (Á) és könnyű (K) DNS frakciók T-RFLP mintázata jelentős eltérést mutatott.

(a)



38. ábra: Az egyes CsCl frakciókból kinyert DNS minták 16S rDNS T-RFLP mintázata (Táncsics és mtsai, 2018 alapján).

A nehéz DNS frakciókban három domináns T-RF volt kimutatható: a 117-bp, a 119-bp és a 475-bp hosszúsággal jellemezhető T-RF-ek. Az átmeneti frakciókban e T-RF-ek mellett a 430bp hosszúsággal jellemezhető T-RF is jelentős abundanciával volt kimutatható. A könnyű DNS frakciókra kettő, az előzőektől eltérő T-RF volt jellemző: a 242-bp és 306-bp hosszúságokkal jellemzhető T-RF-ek. A csak 12-es C-izotópot tartalmazó toluollal kezelt kontroll minták esetében az összes DNS frakció hasonló T-RFLP mintázatot mutatott, és a 117-bp, illetve a dc_1786_20

475-bp hosszúságokkal jellemezhető T-RF-ek voltak dominánsak, de a 119-bp és a 430-bp hosszúságokkal jellmezhető T-RF-ek is jelentős abundanciával voltak kimutathatóak.

A T-RFLP vizsgálatot követően a nehéz, átmeneti és könnyű DNS frakciók, illetve az inokulumként használt kiindulási szediment 16S rDNS diverzitását piroszekvenálás segítségével tártuk fel. Az eredmények megerősítették, hogy a nehéz DNS frakció esetében 3-4 baktériumcsoport DNS-e volt megtalálható jelentős mennyiségben (39. ábra). A leggyakoribb taxonnak a Quatrionicoccus adódott (korábban Rhodocyclaceae család, jelenleg Azonexaceae család), amelynek DNS-e átlagosan ~60% körüli abundanciával volt jelen a 3., illetve 7. napi minták nehéz DNS frakciójában. E nemzetség egyetlen validként leírt fajt tartalmaz, a Qutrionicoccus australiensis-t, amelyet mikromanipulációs módszerrel izoláltak egy ausztráliai kommunális szennyvíztisztító eleveniszapjából (Maszenan és mtsai, 2002). Sajnos e baktériumról a szakirodalomban elenyésző információ áll rendelkezésre, így ökológiai szerepe teljesen ismeretlen. A feltárt Quatrionicoccus-rokon 16S rDNS szekvenciák többsége e faj 16S rDNS-ével >99%-os hasonlóságot mutatott, így a filogenetikai fán is e fajhoz közel helyezkedtek el (40. ábra). A faj leírása óta nem ismert, hogy akárcsak egyetlen környezeti törzsét izolálták és vizsgálták volna. A típustörzs pedig már sem az Egyesült Királyságbeli NCIMB (National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria), sem pedig a franciaországi CIP (Collection of Institut Pasteur) törzsgyűjteményből nem szerezhető be. E baktérium valószínűleg nem izolálható a konvencionális tenyésztési technikákkal és fenntartása is nehézségekbe ütközhet, ez pedig a letétbe helyezett sejtvonalak elvesztéséhez vezethetett. A nemzetség legközelebbi rokonai a Dechloromonas nemzetségben találhatóak, amelynek szerepe az aromás szénhidrogének lebontásában jól ismert. Ennek fényében pedig már nem annyira meglepő, hogy a Quatrionicoccus nemzetség képviselői is képesek lehetnek egyes aromás vegyületeket szén-, és energiaforrásként hasznosítani. Míg azonban a Dechloromonas nemzetség képviselői fakultatív anaerob mikroszervezetek (nitrát- és klorát-redukcióra lehetnek képesek), addig a Q. australiensis-t obligát aerob baktériumként írták le (Maszenan és mtsai, 2002). E nemzetség képviselői egyébként a kiindulási szediment mikrobaközösségén belül is jelentős csoportnak számítottak, a maguk ~13%-os abundanciájával. Jelen vizsgálat eredménye alapján kijelenthető, hogy e baktériumcsoportnak volt a legnagyobb szerepe a toluol mikroaerob lebontásában a kísérletünk során.

A második legyakoribb taxonnak a nehéz DNS frakciókban a Zoogloea nemzetség adódott (~16%), azon belül is a Zoogloea oleivorans faj volt a legnagyobb mennyiségben kimutatható (39. és 40. ábra). A Zoogloea nemzetség képviselői a kiindulási szediment

mikrobaközösségén belül is ~12%-os abundanciával voltak jelen. E baktériumokat szintén jelentős mikroaerob toluol lebontó szervezetekként sikerült tehát azonosítanunk.



39. ábra: A piroszekvenálással vizsgált DNS frakciók 16S rRNS gén összetétele (Táncsics és mtsai, 2018 alapján).

A harmadik leggyakoribb csoportot olyan 16S rDNS szekvenciák alkották, amelyek egy ismeretlen, a mai napig tenyésztésbe nem vont, Rhodocyclaceae családba (de legalább is a Rhodocyclales rendbe) tartozó baktériumhoz voltak köthetőek (39. és 40. ábra). Ez a tenyésztésbe nem vont, Rhodocyclaceae családba tartozó baktérium pedig ugyanaz a mikroszervezet volt, amelyet korábban statisztikai úton azonosítottunk, mint lehetséges mikroaerob BTEX-lebontó baktérium (lásd V.3.7. fejezet, valamint Táncsics és mtsai, 2013).



40. ábra: Az egyes frakciókban domináns OTU-k egy-egy reprezentatív 16S rDNS szekvenciájának filogenetikai helyzetét ábrázoló neighbor-joining fa (Táncsics és mtsai, 2018 alapján).

Bár az átmeneti frakciók esetében továbbra is a Rhodocyclaceae (illetve újabban az Azonexaceae és Zoogloeaceae) családhoz köthető 16S rDNS szekvenciák voltak a meghatározóak, jelentős abundanciát mutattak a Comamonadaceae családhoz köthető szekvenciák is, azon belül is a *Rhodoferax* nemzetséghez tartozóak. E 16S rDNS szekvenciák többsége ugyanahhoz, a mai napig tenyésztésbe nem vont *Rhodoferax* baktériumhoz voltak köthetőek, amely korábban is gyakran mutatkozott dominánsnak a siklósi kárhely ST2-es mintavételi kútjában (430-bp hosszúságú T-RF-fel), és amelyet szintén statisztikai úton

azonosítottunk korábban, mint lehetséges mikroaerob BTEX-lebontó baktérium (lásd V.3.7. fejezet, valamint Táncsics és mtsai, 2013).

A könnyű DNS frakciók 16S rDNS összetétele jelentősen eltért a nehéz és átmeneti frakciók összetételétől. A legnagyobb különbséget az Azoarcus eredetű 16S rDNS szekvenciáknak a könnyű frakciókban detektálható ~16%-os abundanciája jelentette. E mikroszervezetek közismert toluol lebontó baktériumok, azonban elsősorban nitrát-redukáló körülmények között, anaerob lebontási útvonalat használva hasznosítják a toluolt. Ismert, hogy az anaerob toluol-lebontás kulcsenzime, a benzilszukcinát-szintáz érzékeny az oxigén jelenlétére, mivel glicil gyököt tartalmaz, amely oxigén jelenlétében irreverzibilisen sérül, gátolva ezáltal az enzim működését (Leuthner és mtsai, 1998). Nem meglepő tehát, hogy e baktériumok nem vettek részt a toluol lebontásában, mivel mikroaerob körülmények uralkodtak a mikrokozmoszokban, ráadásul a mesterséges talajvíz médium nitrátot sem tartalmazott. E csoporton kívül a szigorúan anaerob életmódot folytató, vas-redukáló Geobacter nemzetségbe tartozó baktériumok (Deltaproteobacteria osztály) 16S rDNS-e is a könnyű frakciókban volt kimutatható, akárcsak a Sulfurospirillum nemzetségbe (Epsilonproeobacteria osztály), illetve a Bacteroidetes törzsbe tartozó baktériumoké. Bár egyes Geobacter törzsek képesek a toluol lebontására, erre csak vas-redukáló körülmények között képesek. Jóval meglepőbb eredmény ugyanakkor, hogy Pseudomonas eredetű 16S rDNS szekvenciákat is szinte kizárólag a könnyű DNS frakciókból lehetett kimutatni. Habár az aerob toluol-lebontás modellszervezete a Pseudomonas putida, illetve a faj közeli rokonai, eredményeink azt mutatják, hogy mikroaerob körülmények között többségük nem képes erre a metabolikus folyamatra.

V.5.5. Az I.2.C-típusú C23O gének diverzitásának vizsgálata a különböző DNS frakciókban

Az I.2.C-típusú *C230* gének diverzitását T-RFLP, illetve klóntárak segítségével tártuk fel. Ellentétben a 16S rDNS alapú T-RFLP vizsgálat eredményével, az I.2.C-típusú *C230* gének tekintetében a nehéz és az átmeneti DNS frakciók T-RFLP mintázatai nagyon hasonló képet mutattak. Ezekben a DNS frakciókban (a 3. és a 7. napon egyaránt) a 333-bp és a 806-bp hosszúsággal jellemezhető *C230* T-RF-ek voltak a dominánsak (41. ábra). Emellett meg kell még említeni a 469-bp hosszúsággal jellemezhető T-RF-et, mivel ez kizárólag a nehéz és az átmeneti DNS frakciókban volt kimutatható, illetve a 157-bp hosszúsággal jellemezhető T-RF-et, ami, ha nem is kizárólag, de döntően ugyancsak e két frakcióból volt kimutatható. A könnyű DNS frakciók meghatározó T-RF-e 802-bp hosszúsággal volt jellemezhető, és négy T-RF: a 778-bp, a 101-bp, a 446-bp, valamint a 794-bp hosszúsággal jellemezhetőek kizárólag a könnyű DNS frakciókból voltak kimutathatóak.



41. ábra: A vizsgált DNS frakciók, illetve az inokulum I.2.C C23O T-RFLP fragment eloszlása (Táncsics és mtsai, 2018 alapján).

Az inokulumból származó, illetve a 3. napi nehéz és könnyű DNS frakciókból nyert I.2.C-típusú *C230* amplikonokból klóntárakat hoztunk létre, majd meghatároztuk az egyes klónok T-RF hosszát. Ez alapján sikerült megállapítani, hogy a 333-bp hosszúságú *C230* T-RF a *Zoogloea oleivorans* I.2.C-típusú *C230* amplikon szekvenciájához köthető (42. ábra). Emellett a 806-bp hosszúságú T-RF egy olyan *C230* génhez tartozik, amely nem köthető ismert baktériumhoz. A hozzá leghasonlóbb *C230* gén, amelyet ismert baktérium kódol, a *Pseudomonas putida* MT15 *cdo* génje 86%-os nukleotid szekvencia azonossággal. Ugyanakkor e *C230* gént korábban is kimutattuk a siklósi talajvízből (lásd "B"-jelű klaszter a 27. ábrán), és akkor a tenyésztésbe nem vont Rhodocyclaceae baktériumhoz kötöttük ezt a genotípust statisztikai eredmények alapján (lásd V.3.7. fejezet, illetve Táncsics és mtsai, 2013). Mivel ez az ismeretlen Rhodocyclaceae családba tartozó baktérium egyértelműen képes volt a toluolt mikroaerob körülmények között hasznosítani, ezek az eredmények tovább erősítik azt a feltételezést, hogy e baktérium kódolta a 806-bp hosszúságú T-RF-fel jellemezhető I.2.C-típusú *C230* gént.



42. ábra: A nehéz és a könnyű DNS frakciókban domináns I.2.C C23O klónszekvenciák egy-egy reprezentatív képviselőjének filogenetikai helyzetét bemutató neighbor joining fa. A klónok elnevezése tartalmazza a szekvenciához tartozó T-RF hosszot, AluI enzimmel történő hasítás esetén. A fa gyökereztetéséhez a pWW53-as jelű TOL plazmidon elhelyezkedő I.2.A-típusú C23O gén szekvenciáját használtuk (Táncsics és mtsai, 2018 alapján). Sajnos a két másik, szintén a nehéz DNS frakciókban kimutatott, bár jóval kisebb abundanciájú T-RF-et (157-bp és 469-bp T-RF), illetve a hozzájuk tartozó *C230* szekvenciákat (clone 157 és clone 469 a 42. ábrán) nem lehetett semmilyen ismert baktériumcsoporthoz kötni.

Ami a könnyű DNS frakciókat jellemző T-RF-eket illeti, a 802-bp hosszúsággal jellemezhető T-RF azokkal a *C230* génekkel mutatott több mint 99%-os nukleotid szekvencia hasonlóságot, amelyeket korábbi vizsgálataink során is kimutattunk a siklósi kárhelyről, és "C"-jelű klaszterbe tartozó *C230* génekként hivatkozunk rájuk (27. ábra és 42. ábra, illetve Táncsics és mtsai, 2013). E géneket statisztikai úton akkor a *Rhodoferax* nemzetségbe tartozó baktériumokhoz kötöttük, azonban jelen eredmények ennek a megállapításnak élesen ellentmondanak. Valószínű tehát, hogy másik nemzetségbe tartozó mikroszervezet kódolja ezeket a géneket. Három, a könnyű frakciókra jellemző, ám aránylag kis abundanciával rendelkező T-RF-et azonban sikerült konkrét baktériumhoz kötnünk. A 101-bp, 446-bp és 778-bp hosszúsággal jellemezhető T-RF-ek a *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59 egy-egy *C230* génjéhez tartoztak (a *Pseudoxanthomonas spadix* törzsek jellemzően 3 különböző I.2.C-típusú *C230* gént kódolnak a genomjukban).

V.5.6. A mikroaerob lebontó mikroszervezetek kimutatása és diverzitása RNS alapon

Mivel a mikrokozmoszokból a DNS mellett jelentős mennyiségű RNS-t is sikerült izolálni, adódott a lehetőség, hogy RNS alapon is megvizsgáljuk, mely mikroszervezetek és lebontási útvonalak voltak résztvevői a toluol mikroaerob körülmények közötti lebontásának. Akárcsak a DNS alapú vizsgálatok esetében, itt is azt lehetett tapasztalni, hogy a közösség jelentős részét a proteobaktériumok alkották (a szekvencia "read"-ek 98%-a tartozozott ide), és mellettük kis mennyiségben a Bacteroidetes törzsbe tartozó baktériumokat lehetett még detektálni. A Proteobacteria törzshöz tartozó szekvenciák túlnyomó többsége pedig a Betaproteobacteria osztályhoz (újabban Burkholderiales rend) volt köthető, azon belül is a Rhodocyclaceae családhoz (vagy az újabb felosztás szerint az Azonexaceae és Zoogloeaceae családokhoz). Hasonlóan a DNS alapú vizsgálatokhoz, azt lehetett látni, hogy a *Quatrionicoccus, Zoogloea*, illetve a tenyésztésbe nem vont Rhodocyclaceae rokonsági körbe sorolható baktériumokból származó RNS molekulák jelölődtek a kísérlet során 13-as szénizotóppal (43. ábra). E csoportokon kívül azonban megfigyelhető volt az *Azonexus* és *Dechloromonas* eredetű RNS molekulák jelölődése is, ami új információ volt a DNS alapú vizsgálatokhoz képest. Az e nemzetségekhez köthető RNS molekulák tehát a nehéz RNS

117

dc_1786_20

frakcióban voltak megtalálhatóak. A könnyű RNS frakcióra az *Azoarcus* és a *Pseudomonas* nemzetségekhez köthető, nem jelölődött RNS molekulák feldúsulása volt jellemző, amely jól egybevág a DNS alapú eredményekkel.



rRNS dúsulási faktor

43. ábra: A ¹³C-izotópot tartalmazó RNS frakcióban lévő 16S rRNS szekvenciák relatív feldúsulása a ¹²C-izotópot tartalmazó RNS mintához képest (Bradford és mtsai, 2018 alapján).

Az mRNS frakciók vizsgálatával a lebontásban résztvevő mikroszervezetek sejtműködését is vizsgálni is lehetett. A nehéz mRNS frakcióban a legnagyobb számban olyan gének mRNS-ei voltak kimutathatóak, amelyek a sejtmozgáshoz voltak köthetőek (44. ábra), így például flagellin (*fliC*) gének transzkriptumai. A második legnagyobb csoportot a másodlagos anyagcseretermékek bioszintéziséhez köthető mRNS-ek alkották. E csoporton belül a kataláz-peroxidáz gének transzkripumai voltak a meghatározóak. Számunkra azonban főleg a negyedik legnagyobb csoport volt érdekes, mivel ide tartoztak a xenobiotikum-lebontásért felelős gének transzkriptumai. E csoporton belül a katekol 2,3-dioxigenáz génekhez köthető transzkripumok igen jelentős számban voltak jelen a könnyű RNS frakcióhoz képest. E transzkriptumok többségét csak törzs (phylum) szinten lehetett baktérium csoporthoz kötni,

de az elmondható, hogy a C23O transzkriptumok 16%-a Zoogloea oleivorans eredetű volt. Az orto-típusú gyűrűhasítást katalizáló katekol 1,2-dioxigenázokhoz (C12O) köthető transzkriptumok jellemzően nem voltak kimutathatóak. A gyűrűhasítást azonban aerob lebontási útvonalak esetében meg kell, hogy előzze a gyűrű aktiválása. Mikroaerob közegekben ezt jellemzően moonooxigenáz enzimek végzik, mint például fenol-monooxigenáz (egy több komponensű fenol-hidroxiláz rendszer részeként), vagy tolul-monooxigenáz (Martínez-Lavanchy és mtsai, 2015). Ennek megfelelően a nehéz mRNS frakcióban nagy mennyiségben lehetett kimutatni fenol-hidroxiláz transzkriptumokat, viszont toluol-monooxigenázhoz köthető transzkriptumok csak kis számban voltak detektálhatóak. Az anaerob toluol-lebontás kulcsenzimét, a benzilszukcinát-szintázt kódoló génekhez köthető transzkriptumok nem jelölődtek a kísérlet során, ami bizonyítja, hogy a toluol-lebontás végig aerob útvonalon történt a kísérlet során.



44. ábra: A ¹³C-izotópot tartalmazó RNS frakcióban lévő mRNS-ek relatív feldúsulása a ¹²C-izotópot tartalmazó RNS mintához képest (Bradford és mtsai, 2018 alapján).

V.5.7. Összegzés

A stabil izotópos jelölés módszerének segítségével sikerült minden kétséget kizáróan megállapítanunk, hogy melyek azok a baktériumok a siklósi kárhelyen, amelyek mikroaerob körülmények között is képesek lehetnek egyes aromás szénhidrogének, jelen esetben a toluol lebontására. A DNS alapú vizsgálatok alapján három a Burkholderiales rendbe tartozó baktériumcsoportot azonosítottunk egyértelműen mikroaerob toluol-lebontóként: а Quatrionicoccus australiensis, a Zoogloea oleivorans és egy tenyésztésbe nem vont Rhodocyclaceae rokonsági körbe tartozó baktériumot. Ezen túlmenően az RNS alapú vizsgálatok rámutattak arra, hogy egyes Azonexus és Dechloromonas nemzetségekbe tartozó baktériumoknak is jelentős szerepük lehetett a lebontásban. Az mRNS alapú elemzések alapján pedig nyilvánvalóvá vált, hogy a Zoogloea oleivorans azért lehet képes a toluolt mikroaerob körülmények között is szén- és energiaforrásként hasznosítani, mert rendelkezik olyan C230 génnel, amely a hipoxikus körülményekhez adaptálódott I.2.C-típusú katekol 2,3-dioxigenáz enzimet kódol. Egyszersmind sikerült bizonyítani, hogy a Pseudomonas nemzetségbe tartozó baktériumok hiába kiváló toluol-lebontók, mikroaerob körülmények között, I.2.C-típusú C23O hiányában nem vesznek részt e szennyezőanyag lebontásában.

V.6. A *Zoogloea oleivorans* Buc^T törzs genomjának feltárása és vizsgálata – a mikroaerob toluol lebontás képességének genetikai háttere

V.6.1. A genom feltárásának célja

A *Zoogloea oleivorans* Buc^T törzs teljes genom szekvenálásának kettős célja volt. Egyrészt szerettük volna feltárni, hogy az I.2.C-típusú *C230* gén hol és milyen más gének társaságában helyezkedik el a genomban. Másrészt, a stabil izotópos kísérlet során a *Z. oleivorans* volt az egyik legjelentősebb toluol lebontó mikroszervezet a mikrokozmoszainkban, és rendelkezésünkre álltak a metatranszkriptóma adatok, amelyeknek segítségével pontos képet kaphattunk arról, hogy a *Z. oleivorans* mely génjei voltak aktívak a lebontás során. Ennélfogva pedig reményeink szerint felépíthettük a mikroaerob toluol lebontás anyagcsereútvonalát.

V.6.2. A Z. oleivorans Buc^T trözs genomjának jellemzése

A Buc^T törzs teljes genomja 5 678 157 bázispár nagyságúnak adódott, 62,5%-os G+C tartalommal. A fehérje kódoló gének száma az annotáció alapján 5005 darab, amelyek közül

legalább 66-ot lehet az aromás szénhidrogének lebontásához kötni. Sajnos ezidáig a *Zoogloea* nemzetségen belül a többi típustörzsnek még nem tárták fel a genomját, és a nem típustörzsek esetében is csak egy teljes genom ismert. E törzs, a *Zoogloea* sp. LCSB751 azonban nagyon távoli rokona a Buc^T törzsnek, így a két törzs genomjának részletes összehasonlítását nem végeztük el.

Elsőként az I.2.C-típusú *C230* gént kerestük meg a genomban, és nem várt felfedezést tettünk. Ez a *C230* gén egy olyan génklaszterben foglalt helyet, amely csak egy részleges *meta*-gyűrűhasítási útvonalat kódolt (45. ábra). A gyűrűhasításhoz és a további lépések katalizálásához szükséges gének voltak csak megtalálhatóak ugyanis e klaszterben, míg a gyűrű aktiválásához szükséges gének hiányoztak. Ráadásul a klaszter mindkét végén transzpozonokat kódoló gének helyezkedtek el (Tn3 családba tartozó transzpozon "upstream" helyzetben, illetve egy pontosan nem kategorizálható transzpozon génje "downstream" helyzetben). Ez arra utalt, hogy e génklasztert horizontális géntranszfer (HGT) útján szerezte a Buc^T törzs. A génklaszter egyébként 15 gént tartalmaz, olyan, egyedi elrendeződésben, amit még nem figyeltek meg más, tenyésztésbe vont baktérium esetében. Hasonló, transzpozonok által közvetített, részleges *meta*-gyűrűhasítási útvonalat kódoló génklasztert eddig csak klórbenzol lebontására képes *Pseudomonas* törzsek esetében mutattak ki. Ilyen példásul a *P. putida* GJ31-es törzse is, amely esetében egy plazmidon foglalt helyet a kérdéses génklaszter (Kunze és mtsai, 2009).



45. ábra: A Zoogloea oleivorans Buc^T törzs genomjában megtalálható, részleges meta-gyűrűhasító lebontási útvonalat kódoló klaszter. ORF 1: Tn3 családba tartozó transzpozon; ORF 2: ferredoxin; ORF 3: I.2.C-típusú katekol 2,3-dioxigenáz; ORF 4: hem-kötő fehérje; ORF 5: 2-hidroximukonsav-félaldehid dehidrogenáz; ORF 6: glutation-S-transzferáz; ORF 7: 2-hidroximukonsav-félaldehid hidroláz; ORF 8: 2-oxopent-4-enoát hidratáz; ORF 9: hipotetikus fehérje; ORF 10: SDR-családba tartozó oxidoreduktáz; ORF 11: acetaldehid-dehidrogenáz; ORF 12: 4-hidroxi-2-oxovalerát-aldoláz; ORF 13: 2-oxo-3-hexéndisav dekarboxiláz; ORF 14: piruvát karboxiláz (Táncsics és mtsai, 2020 alapján).

Az I.2.C-típusú *C230* gént tartalmazó klaszterben tehát nem voltak megtalálhatóak olyan gének, amelyek a gyűrű aktivációját katalizáló enzimet kódoltak volna. Ennélfogva a genomban máshol ugyan, de kellett, hogy találjunk ilyen funkciójú géneket. Ahogy korábban láthattuk, az aromás gyűrű aktivációját fenol-monooxigenáz enzim is el tudja végezni. Ez az enzim általában egy többkomponensű fenol-hidroxiláz rendszer részeként található meg az aromás

szénhidrogének lebontására képes baktériumok genomjában. Ilyen fenol-hidroxiláz rendszert kódoló gének pedig a Buc^T törzs genomjában is megtalálhatóak voltak, méghozzá egy teljes *meta*-gyűrűhasítási útvonalat kódoló génklaszter részeként. E génklaszter szintén egyedi génelrendeződést mutatott (46. ábra). Szokatlan módon ugyanis két *C230* gént tartalmazott (ORF 8 és ORF 23), amelyek mindegyike I.2.A-típusú katekol 2,3-dioxigenáz enzimet kódolt.



46. ábra: A Zoogloea oleivorans Buc^T törzs genomjában található, fenol-lebontásban résztvevő klaszter génjei. ORF 1: sigma-54 dependens Fis-családba tartozó transzkripciós regulátor; ORF 2: oxidoreduktáz; ORF 3: aromás gyűrű hidroxilációját végző dioxigenáz enzim alfa alegysége; ORF 4: DUF1302 – ismeretlen funkciójú fehérje; ORF 5: DUF1329 - ismeretlen funkciójú fehérje; ORF 6: YnfA családba tartozó fehérje; ORF 7: ferredoxin; ORF 8: katekol 2,3-dioxigenáz; ORF 9: fenol-hidroxiláz komponens (DmpK); ORF 10: fenol-hidroxiláz komponens (P1 oxigenáz komponens DmpL); ORF 11: fenol-hidroxiláz komponens (P2 szabályozó komponens DmpM); ORF 12: fenol-hidroxiláz komponens (P3 oxigenáz komponens DmpN); ORF 13: fenol-hidroxiláz komponens (P4 oxigenáz komponens DmpO); ORF 14: fenol-hidroxiláz komponens (DmpP); ORF 15: transzkripciós faktor (represszor); ORF 16: XRE családba tartozó transzkripciós regulátor; ORF 17: 2-hidroxinukonsav-félaldehid dehidrogenáz; ORF 18: 2-oxopent-4-enoát hidratáz; ORF 19: 2-oxo-3-hexéndisav dekarboxiláz; ORF 20: 4-oxalocrotonát tautomeráz; ORF 21: acetaldehid-dehidrogenáz; ORF 22: 4-hidroxi-2-oxovalerát-aldoláz; ORF 23: katekol 2,3-dioxigenáz; ORF 24: SDR családba tartozó oxidoreduktáz; ORF 25: 4-oxalocrotonát tautomeráz (Táncsics és mtsai, 2020 alapján).

Tovább vizsgálva a genomot, még egy klasztert találtunk, amelyben aromás gyűrű hidroxilációját végző enzimet kódoló gének voltak megtalálhatóak. Ez egy alapvetően bifenilek leontásában szerepet játszó génklaszter volt (a továbbiakben bifenil-degradációs klaszter), és ezt is mobilis genetikai elemek határolták, tehát HGT útján kerülhetett a Buc^T törzs genomjába. A klaszter egy része szinte teljes egyezést adott egy, a *Thauera* sp. DNT-1-es törzsben kimutatott DNS szakasszal, amely többek között toluol-dioxigenáz enzimet kódoló géneket tartalmazott (47.b ábra – ORF 1 és ORF 2 – toluol-dioxigenáz nagy és kis alegység). E baktériumtörzsről ismert, hogy képes a toluolt aerob és anerob úton is lebontani, és oxigén jelenlétében e toluol-dioxigenáz enzimet használja a toluol aromás gyűrűjének aktiválásához

(Shinoda és mtsai, 2004). Sajnos Shinoda és mtsai csak a klaszter egy részét tárták fel, de szinte biztosra vehető, hogy ugyanaz a bifenil-klaszter található meg mindkét baktériumtörzsben. Az összehasonlítható szakaszokon öt-öt ORF található jól meghatározható funkcióval, illetve a Buc^T törzs esetében található még egy további ORF, amely azonban csak hipotetikus fehérjét kódol (47.a ábra ORF 4). E hipotetikus fehérjét kódoló ORF csak részlegesen található meg a *Thauera* sp. DNT-1-es törzs esetében, ám ettől eltekintve 100%-os az egyezés a két DNS szakasz között.



47. ábra: A toluol dioxigenáz gént tartalmazó klaszterek a (a) Zoogloea oleivorans Buc^T (ORF 1: GntR családba tartozó transzkripciós regulátor; ORF 2: aromás gyűrű-hidroxiláló dioxigenáz enzim alfa alegysége; ORF 3: 3-fenilpropionát/fahéjsav dioxigenáz béta alegysége; ORF 4: hipotetikus fehérje; ORF 5: ferredoxin; ORF 6: piridin nukleotid-diszulfid oxidoreduktáz; ORF 7: cisz-2,3-dihidrobifenil-2,3-diol dehidrogenáz; ORF 8: 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenáz; ORF 9: 2-oxopent-4-enoát hidratáz; ORF 10: acetaldehid dehidrogenáz; ORF 11: 4-hidroxi-2-oxovalerát aldoláz; ORF 12: 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoát hidroláz; ORF 13: aromás szénhidrogén lebontásában résztvevő fehérje; ORF 14: alfa/béta hidroláz) és a (b) Thauera sp. DNT-1 (ORF 1 és ORF 2: terminális dioxigenáz vas-kén fehérje; ORF 3 ferredoxin; ORF 4: ferredoxin reduktáz; ORF 5: dehidrogenáz) törzsek esetében. Az azonos színnel jelölt ORF-ek azonos funkciójú enzimeket kódolnak. Az ORF-ek alatt feltüntetett százalékos értékek az egymásnak megfeleltethető ORF-ek hasonlósági étékeit mutatják. (Táncsics és mtsai, 2020 alapján)

V.6.3. A stabil izotópos kísérletből származó metatranszkriptóma adatok illesztése a *Zoogloea oleivorans* Buc^T törzs genomjára

A stabil izotópos kísérletből származó metatranszkriptóma adatokat, azok közül is a nehéz RNS frakcióból származó mRNS szekvenciákat a Buc^T törzs genomjára illesztettük, ami lehetővé tette, hogy feltárjuk mely génklaszterek vettek részt a toluol mikroaerob körülmények közötti lebontásában.

A részleges meta-gyűrűhasítási útvonalat kódoló génklaszter esetében azt találtuk, hogy mindegyik gén jelentős aktivitást mutatott, és különösen az I.2.C-típusú C23O, illetve a 2hidroximukonsav-félaldehid dehidrogenáz gén esetében lehetett aránylag nagy mRNS számot megfigyelni (86 és 88 db, illetve magas RPKM, azaz "reads per kilo base per million" illesztett szekvencia). Másrészt viszont a fenol-hidroxiláz rendszert kódoló gén klaszter esetében többnyire alacsony aktivitást tapasztaltunk. Ennek megfelelően, az ebben a klaszterben helyet foglaló I.2.A-típusú C23O gének esetében kis mRNS számokat kaptunk (5, illetve 9). Ez alapján feltételezhető, hogy az e gének által kódolt extradiol dioxigenáz enzimek nem vettek részt a toluol gyűrűjének hasításában. A fenol-hidroxilázt kódoló gének alacsony aktivitása pedig arra enged következtetni, hogy a toluol gyűrűjének hidroxilációja nem 2-hidroxitoluol (o-krezol) köztiterméken keresztül történt. Kérdés maradt tehát, hogy hogyan is történt a toluol gyűrűjének hidroxilációja mikroaerob körülmények között. A választ a bifenil-degradációs klaszter adta meg, ugyanis az itt található gének, de különösen a toluol-dioxigenáz-szerű enzimet kódoló két gén jelentős aktivitást mutatott (47.b ábra - ORF 1 és ORF 2 - toluoldioxigenáz nagy és kis alegység; 115 mRNS molekula a két génre együttesen a metatranszkriptomban). Ez alapján azt lehetett valószínűsíteni, hogy a 3-metilkatekol kialakulása toluol-cisz-dihidrodiol köztiterméken keresztül történt.

A toluol mikroaerob körülmények közötti lebomlásában tehát egy toluol-dioxigenáz aktivitást mutató enzim, illetve egy I.2.C-típusú extradiol dioxigenáz enzim játszották a főszerepet. A toluol-dioxigenáz szerepe e folyamatban kissé meglepő lehet a szakirodalmi adatok alapján, ugyanis számos adat utal arra, hogy oxigén-limitált közegekben elsősorban monooxigenázok felelősek a toluol gyűrűjének hidroxilációjáért. A Burkholderia cepacia G4 törzs esetében, amely monooxigenáz enzim segítségével aktiválja a tolul gyűrűjét, megfigyelték, hogy oxigén-limitált körülmények között túlnövi a Pseudomonas putida F1 törzset, amely ugyanezt dioxigenáz enzim segítségével végzi (Duetz és mtsai, 1994). Egy oxigénszegény mesterséges láp toluol-lebontó mikrobaközösségének vizsgálatakor is a monooxigenáz enzimeket kódoló gének dominanciáját lehetett megfigyelni (Martínez-Lavanchy és mtsai, 2015). A P. putida F1-es törzse esetében ugyanakkor azt is megfigyelték, hogy a toluol-dioxigenáz enzimét kodoló gének expressziójára, illetve az enzim életidejére nem volt hatással az oldott oxigén koncentrációjának csökkenése (Costura és Alvarez, 2000). A Thauera sp. DNT-1-es törzs esetében, amely gyakorlatilag ugyanazt a toluol-dioxigenáz enzimet használja a toluol gyűrűjének aktiválásához, mint a Z. oleivorans Buc^T, kimutatták, hogy mikroaerob körülmények között is képes a toluol lebontására (Shinoda és mtsai, 2004). Feltételezhető tehát, hogy a B. cepacia G4 sem feltétlenül azért volt képes túlnőni a P. putida F1 törzset, mert a monooxigenáz segítségével történő gyűrűaktiválás kedvezőbb lenne a dioxigenáz által katalizált folyamatnál oxigén-limitált körülmények között. A *Z. oleivorans* Buc^T törzs genomjának vizsgálata azt mutatja ugyanis, hogy ennél sokkal összetettebb kérdésről van szó, és nem lehet egyetlen gén, vagy enzim jelenlétéhez, illetve működéséhez kötni az aromás szénhidrogének mikroaerob lebontását.

V.6.4. Összegzés

A *Zoogloea oleivorans* Buc^T törzs genomjának vizsgálata rámutatott arra, hogy e törzs valóban azért volt képes a toluol mikroaerob körülmények közötti lebontására, mert rendelkezett olyan *C230* génnel, amely I.2.C-típusú extradiol dioxigenáz enzimet kódolt. Emellett azonban legalább olyan fontos szerepe volt a folyamatban egy toluol-dioxigenáz aktivitással rendelkező enzimnek is, amely a toluol aromás gyűrűjének hidroxilációjáért volt felelős. Fontos megfigyelés, hogy mindkét kulcsfontosságú enzim olyan gén klaszterben helyezkedett el, amelyeket mobilis genetikai elemek (transzpozonok) határoltak, tehát valószínűleg horizontális géntranszfer útján kerültek a Buc^T törzs genomjába.

V.7. A mikroaerob szénhidrogén-lebontó mikroszervezetek diverzitásának feltárása dúsító tenyésztések segítségével

V.7.1. Előszó a dúsító tenyésztések eredményeit tárgyaló fejezethez

A BTEX-vegyületekkel szennyezett közegek mikrobiális közösségeinek vizsgálata azt mutatta meg, hogy a mikroaerob lebontó szervezetek feldúsítása, illetve izolálása nélkül továbbra sem fogjuk tudni konkrét baktériumtörzsekhez kötni az I.2.C-típusú *C230* gének jelentős részét. Ebből kifolyólag a kutatás soron következő lépéseiben aerob és mikroaerob dúsító tenyészetek segítségével próbáltuk feltárni azon baktériumok diverzitását, amelyek a BTEX-vegyületek, illetve komplex szénhidrogén-szennyezések mikroaerob lebontásában részt vehetnek. A vizsgálatokhoz egy közép-magyarországi, kőolajszármazékokkal szennyezett kárhelyről származó biofilmet használtunk, mint inokulum a dúsító tenyészetekben. E biofilm egy "pump-and-treat" rendszer részeként működő búvárszivattyú rozsdamentes acél felszínén alakult ki, ahogy az a 48. ábrán is látható.



48. ábra: A talajvíz kitermelésére szolgáló szívattyú rozsdamentes acél felületén kialakuló mikrobiális biofilm (Dr. Benedek Tibor által készített felvétel).

A pump-and-treat rendszer beüzemelése előtt a vizsgált kitermelő kútban (BUT18) jelentős mennyiségben voltak jelen mind a BTEX-komponensek, mind pedig az alifás szénhidrogének (13. táblázat). A szivattyú felületén kialakuló és ott folyamatosan jelenlévő biofilmet először 2014 áprilisában mintáztuk, amikor is metagenom analízis, klóntárak, illetve baktériumtörzs izolálás segítségével feltártuk a biofilm mikrobaközösség faji és funkcionális diverzitását (Benedek és mtsai, 2016). Az eredmények azt mutatták, hogy a biofilmet túlnyomórészt a

Burkholderiales rend (korábban Betaproteobacteria osztály) képviselői dominálják, hiszen a metagenom szekvenciák 38%-át lehetett ehhez a taxonómiai csoporthoz kötni. Ennél is fontosabb eredmény volt azonban, hogy az I.2.C-típusú *C230* gének jelentős diverzitással voltak kimutathatóak, és legalább 9 különböző csoportjukat lehetett megkülönböztetni (49. ábra). Mindezek miatt úgy véltük, hogy e biofilm kitűnő alapot szolgáltathat a dúsítási kísérletekhez, és így inokulumként mindig ebből a forrásból származó friss biofilm mintát használtunk az alább részletezett vizsgálatokhoz.

Talajvíz paraméterek	2011 október	2014 április	2016 március
Általános vízkémiai adatok			
рН	7,8	7,5	7,26
oldott oxigén (mg/L)	2,9	1,9	NV*
nitrát (mg/L)	3	3	179
szulfát (mg/L)	66	174	190
Mn ²⁺ (mg/L)	ND	44,3	2,3
Fe^{2+} (mg/L)	<0,05	0,31	0,19
redox potenciál (mV)	-49,4	-19	NV
Szennyezettségi adatok			
benzol (µg/L)	7050	722	0,3
toluol (µg/L)	28500	90	<0,5
etilbenzol (µg/L)	981	4	<0,5
xilolok (µg/L)	10400	505	596
alkilbenzolok	2600	224	278
TAPH (C5-C40) (µg/L)	10000	1750	791

13. táblázat. A BUT18-as mintavételi kútból kinyert talajvíz fizikai-kémiai és szennyezettségi paraméterei.

*NV: nem vizsgált



0.1

49. ábra: A BUT18-as mintavételi kút talajvizében kimutatott I.2.C C230 gének diverzitása 2011 októberében (Benedek és mtsai, 2016 alapján).

V.7.2. Első kísérlet: BTEX-lebontó baktériumok összehasonlító dúsító tenyésztése aerob és mikroaerob körülmények között

V.7.2.1. A vizsgálat célja és menete

Az első dúsító kísérlet célja az volt, hogy általános képet kapjunk arról, hogy milyen hatással van az oxigén-limitáció a BTEX-lebontás során feldúsuló bakteriális közösség összetételére. A kísérletek során a fentiekben ismertetett biofilmet kiindulási inokulumként használtuk, és 100 mL-es, légmentesen zárható laboratóriumi szérumüvegekben aerob (7-8 mg/L oldott oxigén), illetve mikroaerob (0-0,5 mg/L oldott oxigén) körülmények között, az összes **BTEX-komponens** jelenlétében próbálkoztunk szénhidrogén lebontó mikrobaközösségek feldúsításával (50. ábra). Mind az aerob, mind pedig a mikroaerob dúsító tenyészetek esetében két-két párhuzamos mikrokozmosszal dolgoztunk. A mikrokozmoszokat egy hetes inkubációt követően átoltottuk és ezt a folyamatot öt héten át ismételtük. A mikrokozmoszok bakteriális közösségének összetételét, illetve annak változását minden átoltás során 16S rRNS és I.2.C C23O gén alapú T-RFLP ujjlenyomat módszer segítségével vizsgáltuk. A dúsítási folyamat végén egy-egy aerob, illetve mikroaerob módon feldúsított bakteriális közösség összetételét (akárcsak a kiindulási biofilmét) Illumina 16S rDNS amplikon szekvenálás segítségével tártuk fel, míg az I.2.C-típusú C230 gének diverzitását klasszikus molekuláris klónozás utján vizsgáltuk. A mikrokozmoszokból a dúsítási folyamat 1. és 5. hetének végén baktérium törzsizolálást végeztünk, és esetükben vizsgáltuk a kérdéses C23O gén meglétét.



50. ábra: A dúsító tenyésztésekhez használt, hermetikusan lezárt szérumüveg. Az üveg belső oldalán jól látható az oldott oxigén koncentrációjának méréséhez szükséges szpot. (A szerző saját felvétele.)

V.7.2.2. A bakteriális közösségek összetételének dinamikája a dúsítási folyamat során (16S rDNS alapon)

Az eltérő oxigén-ellátottság hatása a feldúsított mikrobaközösségek összetételére már az első dúsítási hét után is kimutatható volt. A kétféle közösségszerkezet folyamatos hasonlóságbeli eltávolodása mind a Bray-Curtis index alapján készült dendrogramon, mind pedig a főkomponens analízis során kapott diagramon is egyértelműen látható (51. és 52. ábra). Megfigyelhető az is, hogy bár a mintavételi kutakból származó talajvíz, illetve biofilm minták mikrobaközösségei a dendrogramon élesen elkülönülnek a feldúsított mikrobaközösségektől, a főkomponens analízis eredménye alapján a korai mikroaerob dúsító tenyészetek közösségeihez lehet őket hasonlítani. A párhuzamos minták esetében megfigyelhető, hogy a mikroaerob dúsítók esetében általában kisebb a variancia közöttük, míg az aerob dúsítok esetében nagyobb eltérések figyelhetőek meg (pl. BF1_4 és BF2_4, illetve BF1_3 ésBF2_3).



51. ábra: A 16S rDNS T-RFLP elektroferogramok Bray-Curtis alapú hasonlósági dendrogramja (Benedek és mtsai, 2018 alapján).



52. ábra: A 16S rDNS T-RFLP elektroferogramok főkomponens elemzése (Benedek és mtsai, 2018 alapján)

V.7.2.3. A végponti dúsító mikrobaközösségek összetétele az Illumina 16S rDNS amplikon szekvenálás alapján

A végponti mikroaerob dúsító tenyészetek közül a BFH2_5-jelűt választottuk ki részletes közösségelemzés céljából. Az Illumina 16S rDNS amplikon szekvenálás eredményeképpen 67 846 db szekvenciát kaptunk, amelyek elsődleges filogenetikai elemzése az aktuális SILVA rRNS adatbázis segítségével történt, majd a további, az eredmények vizualizációjához szükséges elemzéseket a MEGAN6 programcsomag segítségével végeztük el. A közösség jelentős részét a Betaproteobacteria osztályba (újabban Burkholderiales rend) tartozó mikroszervezetek alkották, mivel a 16S rDNS szekvenciák 58% e baktériumokhoz volt köthető. Jelentős csoportot alkottak még a (szűken értelmezett) Gammaproteobacteria, illetve az Actinobacteria osztályok képviselői (53. ábra). Nemzetség szinten az *Acidovorax* (18%), *Pseudomonas* (14%), *Giesbergeria* (11%), *Azotobacter* (6%), *Zoogloea* (5%) és *Rhodoferax* (4%) fajok uralták a közösséget.



MIKROAEROB DÚSÍTÓ TENYÉSZET (BFH2_5)

53. ábra: A mikroaerob dúsító tenyészet mikrobaközösségének osztály, illetve nemzetség szintű összetétele az Illumina 16S rDNS amplikon szekvenálási adatok alapján. (Benedek és mtsai, 2018 alapján)

A végponti aerob dúsító tenyészetek közül a BF1_5-jelűt választottuk ki részletes közösségelemzés céljából. Az Illumina 16S rDNS amplikon szekvenálás eredményeképpen 67 174 db szekvenciát kaptunk. Érdekes eredményként azt lehetett megfigyelni, hogy a mikrobaközösséget még a mikroaerob dúsító tenyészethez képest is nagyobb arányban dominálták a Betaproteobacteria osztályba (újabban Burkholderiales rend) tartozó mikroszervezetek, hiszen a 16S rDNS szekvenciák 76%-át lehetett ehhez a taxonómiai csoporthoz kötni (54. ábra). Hasonlóan a mikroaerob dúsító közösségéhez, említésre méltó csoportot alkottak még az Actinobacteria (11%) és Gammaproteobacteria (6%) osztályok képviselői. Nemzetség szinten már jól látható volt, hogy mi okozza ezt a hatalmas Betaproteobacteria fölényt a közösségben, ugyanis a 16S rDNS szekvenciák 61%-a a Comamonadaceae családba tartozó *Malikia* nemzetséghez volt köthető. Mellette egyetlen említésre méltó nemzetséget lehetett azonosítani, a szintén Comamonadaceae családba tartozó *Macromonas*-t (6%). Meglepő ugyanakkor, hogy a *Pseudomonas* nemzetséghez köthető 16S rDNS szekvenciák mindössze 1%-os abundanciával voltak kimutathatóak.



AEROB DÚSÍTÓ TENYÉSZET (BF1_5)

54. ábra: Az aerob dúsító tenyészet mikrobaközösségének osztály, illetve nemzetség szintű összetétele az Illumina 16S rDNS amplikon szekvenálási adatok alapján. (Benedek és mtsai, 2018 alapján)

V.7.2.4. Az I.2.C-típusú C23O gének diverzitásának változása a dúsítási folyamat során

A dúsítás során T-RFLP módszer segítségével folyamatosan monitoroztuk az I.2.Ctípusú C230 gének diverzitásának változását a feldúsított közösségeken belül. A T-RFLP adatok főkomponens analízise megmutatta, hogy a dúsítás során a harmadik hét után lehetett egyértelműen külön csoportba sorolni az aerob és a mikroaerob dúsító tenyészeteket (55. ábra). A dúsítási folyamat végére pedig szinte teljesen eltérő C23O diverzitás volt kimutatható az eltérő oxigenizáltságú tenyészetekben. Míg a mikroaerob tenyészetekben a 798-bp és a 765-bp hosszúsággal jellemezhető T-RF-ek voltak dominánsak, addig az aerob tenyészetekben ezek a T-RF-ek nem is voltak kimutathatóak, és helyettük a 189-bp és a 108-bp hosszúsággal jellemezhető T-RF-ek voltak az uralkodóak. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy a végponti minták C23O összetétele jelentősen eltért attól, mint amit a kiindulási biofilm minta, illetve a mintavételi kútban lévő talajvizben ki lehetett mutatni. E két minta esetében közös volt, hogy a 333-bp és a 802-bp hosszúságú T-RF-ek mindkettőben jelentős abundanciával voltak jelen (56. ábra). Ezen túl a biofilm mintában meghatározóak voltak még a 810-bp és 806-bp hosszúsággal jellemezhető T-RF-ek. Az 56. ábrán, amely a kiindulási minták és a dúsító tenyészetek (a párhuzamos tenyészetek átlagainak) C230 T-RFLP mintázatait hivatott bemutatni, látható, hogy a 333-bp és a 810-bp hosszúsággal jellmezhető T-RF-ek a mikroaerob tenyészetekben szinte végig jelen voltak, méghozzá aránylag jelentős abundanciával, ám az ötödik hétre

marginalizálódtak (bár kimutathatóak maradtak). Ezzel szemben az aerob tenyészetek esetében már a harmadik hét után marginalizálódtak ezek a *C230* T-RF-ek.



55. ábra: A dúsító tenyészetek I.2.C C23O T-RFLP adatainak főkomponens elemzése (Benedek és mtsai, 2018 alapján)

Az eredmények alapján feltételezhető volt, hogy a 189-bp és 108-bp hosszúsággal jellemezhető T-RF-ek olyan I.2.C-típusú *C230* géneket jelölnek, amelyek kizárólag aerob BTEX-lebontásra képes mikroszervezetekhez köthetőek. Ezzel szemben a 798-bp és a 765-bp hosszúsággal jellemezhető T-RF-ek pedig olyan baktériumokhoz köthetőek, amelyek valószínűleg képesek legalább egyes BTEX-komponensek mikroaerob körülmények közötti lebontására. Továbbá ugyanezt lehet valószínűsíteni a 333-bp és a 810-bp hosszúsággal jellemezhető T-RF-ekhez köthető *C230* génekről, illetve az azokat kódoló baktériumokról.



56. ábra: A dúsító tenyészetek, illetve a kiindulási biofilm minta I.2.C C23O T-RFLP fragmentjeinek relatív abundanciája. A diagramon a párhuzamos minták átlagai lettek feltüntetve. (Benedek és mtsai, 2018 alapján)

V.7.2.5. Az I.2.C-típusú C23O gének diverzitásának feltárása a végponti dúsító tenyészetekben klóntár segítségével

Annak érdekében, hogy a kimutatott *C230* T-RF-ekhez nukleotid szekvenciát, illetve esetleg baktérium fajokat tudjunk kötni, klóntárakat hoztunk létre azon dúsító tenyészetek esetében, amelyeknek bakteriális közösségét az előzőekben amplikon szekvenálás segítségével feltártuk (BFH2_5 és BF1_5).

A mikroaerob dúsító tenyészet (BFH2_5) esetében a klónszekvenciákat két nagy és három kisebb csoportba lehetett sorolni. A klónok legdominánsabb csoportjába a szekvenciák 66%-a tartozott, és aminosav szinten 100%-os egyezést mutattak egy olyan *Acidovorax* törzs által kódolt *C230* génnel, amit korábban a siklósi kárhelyről izoltunk (*Acidovorax* sp. A10-es törzs, folyóiratban nem publikált eredmény) (57. ábra). E klónszekvenciák T-RFLP vizsgálata rámutatott, hogy a 798-bp hosszúságú C230 T-RF, amely a legdominánsabb volt a mikroaerob dúsító tenyészetekben (56. ábra), ehhez a csoporthoz volt köthető. Elmondható tehát, hogy az *Acidovorax* dominancia nem csak 16S rRNS gén, hanem I.2.C-típusú *C230* gének szintjén is kimutatható volt a mikroaerob dúsító tenyészetekben. A második legnagyobb csoportba a klónok 25%-a tartozott, és a *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59-es törzs egyik *C230* génjével mutatta a legnagyobb hasonlóságot. Érdekes módon e klónok 92-bp hosszúságú T-RF-fel voltak jellemezhetőek, amely azonban csak marginális abundanciával volt kimutatható a mikroaerob tenyészetek T-RFLP elektroferogramjain. A három kisebb csoport a klónszekvenciáknak egyaránt 3%-át adta és nem lehetett őket konkrét baktériumokhoz kötni. Ugyanakkor elmondható, hogy két csoport (ezek képviselői a BFH2_5 X3_3, illetve a BFH2_5 X_32 jelű klónszekvenciák, 92-bp és 810-bp hosszúságú T-RF-fel) olyan *C230* szekvenciákkal adott egyezést, amelyeket korábban a siklósi kárhelyről mutattunk ki (Táncsics és mtsai, 2013), mint például az ismeretlen Rhodocyclaceae családhoz köthető *C230*-t (Táncsics és mtsai, 2018).

Az aerob dúsító tenyészet (BF1 5) esetében a klónszekvenciákat egy domináns és két marginális jelentőségű csoportba lehetett sorolni. A domináns csoportba a szekvenciák 94%-a tartozott (a filogenetikai fán a BF1 5 X3 3-jelű klón által képviselt csoport), és hozzájuk volt köthető a 189-bp hosszúságú T-RF, amelyet korábban, mint domináns C23O T-RF azonosítottunk az aerob dúsító tenyészetekben. E klónszekvenciákat ugyan nem lehetett ismert baktériumhoz kötni, de domináns jelenlétüket korábban is kimutattuk abban a mintavételi kútban (illetve onnan származó biofilmben), ahonnan a jelen vizsgálathoz felhasznált biofilm inokulum is származott (Benedek és mtsai, 2016). Ha feltételezzük, hogy e klónszekvenciák a domináns közösségalkotóhoz tartoznak, akkor elsősorban a Malikia nemzetséghez tartozó baktériumok jöhetnek szóba, mint e gének hordozói. A Malikia nemzetségről korábban láthattuk, hogy domináns közösségalkotók lehetnek olyan BTEX-vegyületekkel szennyezett felszín alatti közegekben, amelyek oxigénnel jól ellátottak (Táncsics és mtsai, 2010). A nemzetközi szakirodalomban is találni arra utaló eredményt, hogy e mikroszervezetek BTEXlebontók lehetnek (Aburto és Ball, 2009). Tovább erősítette ezt a feltételezést, hogy a legközelebbi rokon nemzetség, a Hydrogenophaga esetében ismert, hogy egyes képviselőik kiváló aromás szénhidrogén lebontók lehetnek (Fahy és mtsai, 2008). Ugyanakkor egyetlen környezeti Malikia izolátum sem volt még ekkor ismert, amely BTEX-lebontó lett volna, így ebbéli képességük továbbra is csak egy jól megalapozott feltételezés volt.

A két marginális csoportba a klónszekvenciák 3-3%-a tartozott. E két csoport klónszekvenciái között nagyfokú hasonlóság volt, és 91-93%-os aminosavszekvencia hasonlóságot mutattak egy metagenom vizsgálatból származó *C230* szekvenciával (w11 Tn2R6F-jelű klón, Brennerova és mtsai, 2009). Továbbá megállapítottuk, hogy mindkét csoport nukleotid szekvenciái a 108-bp hosszúságú T-RF-fel jellemezhetőek, amely a második legabundánsabb volt a végponti aerob dúsító tenyészetekben (56. ábra).



57. ábra: A dúsító tenyészetekből közvetlenül, illetve azokból kitenyésztett törzsekből származó I.2.C C230 szekvenciák filogenetikai helyzetét bemutató, aminosavszekvencia alapú neighbor joining fa (Benedek és mtsai, 2018 alapján).

V.7.2.6. Izolátumok

A dúsító tenyészetekből az első heti, illetve az ötödik heti, tehét végponti dúsítások során történt baktériumtörzs izolálás. Összesen 23 faj képviselőit sikerült így izolálni, ahogy az a 14. táblázatban látható. Mind az aerob, mind pedig a mikroaerob dúsítók esetében főleg a Gammaproteobacteria osztály képviselőit tudtuk izolálni. Ugyanakkor sajnálatos tény, hogy a végponti dúsítókban legdominánsabb nemzetségek, tehát az *Acidovorax* és a *Malikia* nemzetségek képviselőit nem sikerült izolálnunk. Jól ismert jelenség, hogy mikrobaközösségek tenyésztéses és tenyésztéstől független közösségelemző módszerekkel történő együttes vizsgálatakor, a két vizsgálati módszer által adott eredmények között kicsi az átfedés (Al-Awadhi és mtsai, 2013).

Amely törzs esetében relevánsnak tűnt (főleg a Gammaproteobacteria osztály, de azon belül is a Burkholderiales rend képviselői) megvizsgáltuk az I.2.C-típusú *C230* gén jelenlétét. Pozitív eredményt csak négy *Pseudomonas* törzs, illetve a *Variovorax paradoxus* BFB1_13-as törzs esetében kaptunk. A *Pseudomonas* törzsek, bár eltérő fajokhoz tartoztak, és eltérő oxigenizáltságú dúsító tenyészetekből származtak, ugyanazzal az I.2.C *C230* genotípussal rendelkeztek, így ez valószínűleg egy plazmidon kódolt gén, amely horizontális géntranszfer útján terjedhet a biofilm *Pseudomonas* közösségén belül. Megjegyzendő még, hogy ugyanezt a genotípust korábban a siklósi kárhelyről is kimutattuk (Táncsics és mtsai, 2013) (57. ábra). A *V. paradoxus* BFB1_13-as törzs esetében egy ezidáig ismeretlen I.2.C-típusú *C230* gént sikerült kimutatni (57. ábra). Az izolátumokból kimutatott *C230* genotípusokat a klóntárakban nem tudtuk kimutatni, így ezek valószínűleg marginális genotípusok voltak a dúsító tenyészetekben.

Törzs kódja	Dúsító	Legközelebbi rokon típustörzs (16S rRNS gén	I.2.C-
	tenyészet*	hasonlóság)	típusú
			C23O gén
BFB1_2	aerob, I.	<i>Micrococcus yunnanensis</i> YIM 65004 ^T (99,9%)	NV**
BFB1_4	aerob, I.	Flavobacterium cheonhonense ARSA-15 ^T	NV
		(99,9%)	
BFB1_6	aerob, 1.	<i>Thermomonas fusca</i> DSM 15424 ^T (100%)	-
BFB1_8	aerob, 1.	<i>Nocardioides aromaticivorans</i> H-1 ^T (98,9%)	NV

14. táblázat: A dúsító tenyészetekből izolált baktérium törzsek filogenetikai besorolása

BFB1_9	aerob, 1.	Flavobacterium aquatile LMG 4008 ^T (98,8%)	NV
BFB1_10	aerob, 1.	Pseudomonas mohnii DSM 18327 ^T 99,8%	+
BFB1_12	aerob, 1.	<i>Rhodococcus qingshengii</i> JCM 15477 ^T (99,7%)	NV
BFB1_13	aerob, 1.	Variovorax paradoxus NBRC 15149 ^T (99,2%)	+
BFB4_1	aerob, 5.	Pseudomonas umsongensis DSM 16611 ^T (99,9%)	+
BFB4_2	aerob, 5.	<i>Xanthobacter autotrophicus</i> $7c^{T}$ (97,5%)	-
BFHC1_1	mikr., 1.	Chryseobacterium haifense H38 ^T (98,7%)	NV
BFHC1_3	mikr., 1.	<i>Flavobacterium tructae</i> 435-08 ^T (97,2%)	NV
BFHC1_4	mikr., 1.	Rhizobium selenitireducens ATCC BAA-1503 ^T	-
		(99,6%)	
BFHC1_5	mikr., 1.	Achromobacter dolens LMG26840 ^T (99,7%)	-
BFHC1_7	mikr., 1.	Simplicispira limi EMB325 ^T (99,9%)	-
BFHC1_8	mikr., 1.	Acinetobacter calcoaceticus DSM 30006 ^T (100%)	-
BFHC1_9	mikr., 1.	Pseudomonas moorei RW10 ^T (99,9%)	+
BFHC1_10	mikr., 1.	Microbacterium oxydans DSM 20578 ^T (100%)	NV
BFHC1_11B	mikr., 1.	Pedobacter composti TR6-06 ^T (98,3%)	-
BFHA4_1	mikr., 5.	Ochrobactrum anthropi ATCC 49188 ^T (100%)	-
BFHA4_2	mikr., 5.	Achromobacter pulmonis LMG 26696 ^T (99,7%)	-
BFHA4_4	mikr., 5.	Castellaniella hirudinis E103 ^T (99,9%)	-
BFHA4_7	mikr., 5.	Pseudomonas veronii DSM 11331 ^T (99,9%)	+

*A dúsító tenyészet típusa (aerob vagy mikroaerob), illetve a dúsítás foka (1. vagy 5. heti dúsítás). mikr.: mikroaerob.

**NV: nem vizsgált

V.7.2.7. Összegzés

Az első dúsító tenyésztés eredményeképpen azt láthattuk tehát, hogy az összes BTEXvegyület jelenléte esetén a Burkholderiales rend (korábban Betaproteobacteria osztály) két eltérő nemzetsége, az *Acidovorax*, illetve a *Malikia* váltak dominánssá mikroaerob, illetve tisztán aerob körülmények között. A mikroaerob dúsító tenyészetekben egyértelműen az *Acidovorax* nemzetséghez volt köthető a domináns I.2.C *C230* genotípus, míg az aerob dúsító tenyészetekben feltételezhető, hogy a *Malikia* nemzetséghez. Ettől függetlenül az eredmények alapján kijelenthető, hogy nem lehet minden I.2.C *C230* genotípust a mikroaerob BTEXlebontáshoz kötni. A *Zoogloea oleivorans* Buc^T esetében is láthattuk, hogy a mikroaerob toluollebontásnak nem egyedüli feltétele az I.2.C *C230* gén megléte, mivel ehhez olyan gyűrűhidroxiláló enzim is szükséges, amely ugyancsak képes mikroaerob körülmények között is működni. Ahhoz, hogy az *Acidovorax* és a *Malikia* törzsek BTEX-lebontásban betöltött szerepét jobban megismerhessük, szükséges e baktériumok izolálása és genomjuk feltárása. A kutatás következő lépésében erre tettünk kísérletet.

V.7.3. Második kísérlet: a *Malikia spinosa* AB6-os törzs benzol-, toluol- és etilbenzol-lebontó képességének igazolása: dúsítás, izolálás és teljes genom analízis

V.7.3.1. A vizsgálat célja és menete

A második dúsító kísérlet célja az volt, hogy újra feldúsítsuk az előző kísérletben domináns Malikia és Acidovorax nemzetségbeli baktériumokat, majd izoláljuk őket BTEXlebontási vizsgálatokhoz. Ezen felül célunk volt további olyan baktériumtörzsek izolálása, amelyek ezidáig ismeretlen I.2.C C23O genotípussal rendelkeznek. E második dúsítási kísérlet az elsőhöz hasonló módon történt, kisebb változtatásokkal. A dúsító tenyészetek esetében nem BTEX-keveréket használtunk szénforrásként, hanem csak benzolt, vagy toluolt. Ennek célja főleg az volt, hogy csökkentsük a diverzitást a tenyészetekben, ezáltal növelve a domináns, de esetleg szilárd táptalajon lassan növekvő törzsek izolálásának esélyét. Mind a benzol, mind pedig a toluol esetében aerob és mikroaerob dúsító tenyészeteket egyaránt létrehoztunk, immár három párhuzamos szérumüvegben minden beállítás esetében (összesen tehát 12 db dúsító tenyészet). A dúsító tenyészeteket ugyanúgy hetente oltottuk át, öt héten keresztül, majd a kialakult mikrobaközösségek vizsgálata az előzőekben leírtakhoz hasonlóan történt. Jelen vizsgálat során a dúsító tenyészetek baktérium közösségeinek dinamikáját már nem volt célunk feltárni, így a közösségfeltárás során már csak a végponti mintákra összpontosítottunk. E végponti, tehát ötödik heti dúsító tenyészetek esetében GC-MS segítségével folyamatosan nyomon követtük az aromás szénforrások koncentrációját. Nem meglepő módon, az aerob dúsítókban a benzol és a toluol gyors fogyását lehetett megfigyelni (58. ábra A és B panel). Ezzel szemben a mikroaerob tenyészetekben a benzol biodegradációja nem volt megfigyelhető, míg a toluol esetében nagyjából 40%-os fogyást regisztráltunk (58. ábra C és D panel).



58. ábra: A benzol és a toluol koncentrációjának alakulása a dúsító tenyészetekben. (Révész és mtsai, 2020a alapján)

V.7.3.2. A végponti dúsító tenyészetek mikrobaközösségeinek vizsgálata 16S rDNS T-RFLP és amplikon szekvenálás segítségével

A végponti dúsító tenyészetek baktériumközösségeinek összetételét első lépésben 16S rDNS alapú T-RFLP segítségével vizsgáltuk. Az elektroferogramokból kinyert adatok alapján készült dendrogram megmutatta, hogy a dúsító tenyészetek elsősorban oxigenizáltságuk alapján különültek el egymástól. Ennek megfelelően két külön ágon voltak megtalálhatóak az aerob és a mikroaerob dúsító tenyészetek. Bár az aerob benzol- és toluol-lebontó dúsító tenyészetek nagyfokú hasonlóságot mutattak, az eltérő szénforrás alapján történő csoportosulás megfigyelhető a dendrogramon. Ezzel szemben a mikroaerob dúsítók esetében azt lehetett megfigyelni, hogy élesen elkülönültek egymástól a benzolt és a toluolt tartalmazó tenyészetek. Mivel a párhuzamos tenyészetek esetében többnyire nagyfokú hasonlóság volt kimutatható (bár kissé kiugró összetételű tenyészetek előfordultak), minden beállítás esetében egy reprezentáns tenyészet bakteriális közösségét tártuk fel 16S rDNS amplikon szekvenálás segítségével. Ezek a következőek voltak: aerob benzol-lebontó dúsító tenyészet AT2 (29721 db 16S rDNS szekvencia),

mikroaerob benzol-"lebontó" dúsító tenyészet MB1 (33056 db 16S rDNS szekvencia), illetve mikroaerob toluol-lebontó dúsító tenyészet MT3 (33823 db 16S rDNS szekvencia).



59. ábra: A dúsító tenyészetek 16S rDNS T-RFLP mintázatainak Bray-Curtis alapú hasonlósági dendrogramja. (Révész és mtsai, 2020a alapján)

Az aerob benzol-lebontó AB1-es dúsító esetében meglepően alacsony diverzitást tapasztaltunk, mivel a 16S rDNS szekvenciák 94%-át a *Malikia* nemzetséghez lehetett kötni (60. ábra A panel). Emellet még a *Pseudomonas, Acidovorax* és *Flavobacterium* nemzetségeket lehetett említésre méltó abundnaciával (> 0,5%) kimutatni. Azt a célt tehát, hogy csökkentsük a dúsító tenyészet diverzitását azáltal, hogy BTEX-keverék helyett csak egyféle aromás komponenst használjunk szénforrásként, sikerült elérnünk. A *Malikia* nemzetség ilyen fokú dominanciája pedig újabb bizonyíték volt arra, hogy e baktériumok kiváló benzol-lebontó mikroorganizmusok lehetnek felszín alatti közegekben.

Az aerob toluol-lebontó AT2-es dúsító tenyészet esetében valamivel nagyobb diverzitást tudtunk kimutatni (60. ábra B panel). E dúsítóban a *Pseudomonas* nemzetség volt a

legdominánsabb (66%), de mellette a *Malikia* (18,9%) és a *Flavobacterium* (10,2%) nemzetségek is jelentős abundanciával voltak kimutathatóak. Ez az eredmény előrevetítette, hogy egyes *Malikia* nemzetségbe tartozó baktériumok a toluol biodegradációjára is képesek lehetnek. A *Pseudomonas* nemzetség dominanciája nem meglepő, hiszen a legismertebb tolul-lebontó baktériumok tartoznak ide, míg a *Flavobacterium* nemzetség gyakran mutatható ki kőolajszármazékokkal szennyezett közegekből (Kaplan és Kitts, 2004).



60. ábra: A dúsító tenyészetek mikrobaközösségeinek nemzetség szintű összetétele az Illumina 16S rDNS amplikon szekvenálási adatok alapján. (Révész és mtsai, 2020a alapján)

A mikroaerob benzol-"lebontó" MB1-es dúsító tenyészet esetében végtelenül egyszerű bakteriális közösséget tártunk fel, ugyanis a 16S rDNS szekvenciák 100%-a a *Pseudomonas* nemzetséghez volt köthető (60. ábra C panel). Meg kell jegyezni, hogy e *Pseudomonas* nemzetségbeli baktériumok valószínűleg nem a benzol biodegradációját végezték, hiszen a mikroaerob dúsító tenyészetekben nem volt megfigyelhető a benzol biotikus folyamathoz köthető fogyása.

A mikroaerob toluol-lebontó MT3-as dúsító tenyészet baktérium közössége már kissé diverzebb képet mutatott, bár a 16S rDNS szekvenciák 81%-a e dúsító esetében is a *Pseudomonas* nemzetséghez volt köthető (60. ábra D panel). Említésre méltó abundanciával voltak még kimutathatóak a *Simplicispira* (9,1%), *Herminiimonas* (4,9%), illetve az *Acidovorax* (3,3%) nemzetségek képviselői. A *Simplicispira* nemzetség esetében nem ismert, hogy az ide tartozó baktériumok milyen szerepet töltenek be az aromás szénhidrogének lebontásában. Annyi azonban bizonyos, hogy szénhidrogén-lebontó dúsító tenyészetekben gyakran megfigyelhető a jelenlétük, akár nitrát-redukáló körülmények között is (Keller és mtsai, 2018). A *Herminiimonas* nemzetség tagjainak metabolikus képességei főleg fajleíró közleményekből ismertek, és elmondható, hogy szénhidrogén-lebontó képességre utaló szakirodalmi adat nem fordul elő bennük. Kim és mtsai (2014) azonban stabil izotópos vizsgálatok során kimutatták egy *Herminiimonas* nemzetségbe tartozó baktériumról, hogy képes lehetett a toluolt nitrát-redukáló körülmények között lebontani, és *bssA* gént is kimutattak e baktérium genomjában metagenom asszociált genom analízis segítségével.

V.7.3.3. Az I.2.C-típusú C23O gének diverzitása a dúsító tenyészetekben

A fenti dúsító tenyészetek esetében (amelyeknek bakteriális közösségét Illumina 16S rDNS amplikon szekvenálás segítségével vizsgáltuk) molekuláris klónozás útján tártuk fel az I.2.C *C23O* gének diverzitását (61. ábra). Az aerob dúsító tenyészetekben, függetlenül attól, hogy benzolt vagy toluolt tartalmaztak szénforrásként, ugyanazt az egyféle klónszekvenciát lehetett kimutatni (AB_OPU-1 és AT_OPU-2 a 61. ábrán). Ugyanezt a *C23O* klónszekvenciát mutattuk ki dominánsként az első dúsítási kísérlet során, az aerob BTEX-lebontó dúsító tenyészet esetében, és akkor feltételesen a *Malikia* nemzetséghez kötöttük jelenlétét (Benedek és mtsai, 2018). A mikroaerob dúsító tenyészet esetében a dúsítás ötödik hetére nem lehetett benzol biodegradációt megfigyelni, a legtöbb, számszerint öt különböző I.2.C C23O OPU-t itt lehetett kimutatni. A klónszekvenciák 69%-a azonban egy olyan I.2.C C23O enzimmel mutatott
hasonlóságot, amelyet nem lehetett ismert baktériumhoz kötni (MB_OPU-1). Hasonló volt a helyzet a klónszekvenciák második legnagyobb csoportjának esetében (MB_OPU-2, 16%), bár itt már 92%-os aminosav szekvencia hasonlóság volt kimutatható a *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59-es törzs egyik C23O enzimével. A harmadik legnagyobb csoportba tartozó szekvenciák (MB_OPU-3, 11%) teljes egyezést mutattak az előző dúsítási kísérlet során a mikroaerob BTEX-lebontó dúsító tenyészetből kimutatott domináns *C23O*-zal, amelyet akkor az *Acidovorax* nemzetségba tartozó baktériumokhoz kötöttünk. A két utolsó csoportba mindössze egy-egy klónszekvencia tartozott. A mikroaerob toluol-lebontó dúsító tenyészet esetében a klónszekvenciákat három csoportba lehetett sorolni. A legnagyobb csoportba tartozó *C23O* szekvenciák (MT_OPU-1, 82%) a mikroaerob, benzol tartalmú dúsító tenyészet domináns *C23O* szekvenciájával mutattak teljes egyezést. A második csoportba tartozó szekvenciákat (MT_OPU-2, 11%) az *Acidovorax* nemzetséghez lehetett kötni, míg a harmadik csoportba tartozó szekvenciákat (MT_OPU-3, 7%) nem lehetett egyértelműen ismert baktériumhoz kötni.



61. ábra: A dúsító tenyészetekből és az izolátumokból kimutatott I.2.C C23O szekvenciák filogenetikai helyzetét bemutató, aminosav alapú neighbor-joining fa. (Révész és mtsai, 2020a alapján)

V.7.3.4. A dúsító tenyészetekbő izolált baktériumtörzsek jellemzése

A dúsító tenyészetekből (AB1, AT2, MB1, MT3) izolált baktériumtörzsek diverzitása nem meglepő módon nagyon alacsony volt, és mindössze 22 db törzs izolálása történt meg (15. táblázat). Az aerob benzol-lebontó dúsító tenyészetből izolált törzsek a *Pseudomonas*, *Acidovorax* és *Malikia* nemzetségek képviselői voltak.

15. táblázat: A dúsító tenyészetekből izolált baktériumtörzsek filogenetikai besorolá

Törzs jele	Legközelebbi rokon típustörzs a 16S rRNS gén alapján	A feltárt 16S rDNS szekvencia hossza (bp)	16S rDNS hasonlóság (%)	I.2.C <i>C230</i> gén	
Aerob benzol-lebontó dúsító tenyészet AB1					
AB1	Pseudomonas arsenicoxydans	1437	99.4	-	

	-			
. – .	CECT 7543 ¹			
AB2	Malikia spinosa	1432	99.7	+
4.0.2	ATCC 14606 ¹	1 4 2 7	00.4	
AB3	Pseudomonas arsenicoxydans	1437	99.4	-
	CECT /543 ²	1424	00.8	
AB4	Pseudomonas veronii DSM 11221 ^T	1454	99.8	-
AB5	Acidovorar delafieldii	1444	0 00	Ŧ
ADJ	$DSM 64^{T}$	1+++)).)	Т
AB6	Malikia spinosa	1428	99.9	+
1120	ATCC 14606 ^T	1.20		
Aerob	toluol-lebontó dúsító tenyészet AT	2		
AT1	Pseudomonas umsongensis	1436	99.9	-
	DSM 16611 ^T			
AT2	Pseudomonas veronii	1435	99.7	-
	DSM 11331 ^T			
AT3	Pseudomonas moorei	1437	99.9	-
	$RW10^{T}$			
AT4	Flavobacterium oncorhynchi	1411	99.6	-
	CCUG 59446 ¹	1000	00.6	
A15	Flavobacterium oncorhynchi	1392	99.6	-
٨٣٢	Resendomonae umeonaonsie	1/25	00.0	
AIO	DSM 16611 ^T	1455	99.9	-
Mikro	aerob "benzol-lebontó" dúsító teny	észet MB1		
MB1	Pseudomonas veronii	1437	99.8	-
	DSM 11331 ^T			
MB2	Pseudomonas veronii	1435	99.8	-
	DSM 11331 ^T			
MB3	Pseudomonas veronii	1436	99.8	-
	DSM 11331 ^T			
MB4	Pseudomonas veronii	1411	99.8	-
	DSM 11331 ^T			
MB6	Pseudomonas extremaustralis	1330	99.6	-
	14-31			
Mikroa	aerob toluol-lebonto dúsito tenyesz	et MT3		
MIII	Pseuaomonas veronii	1429	00.8	-
мτэ	DSM 11331 ⁻ Psaudomonas varonii	1438	99.8	
IVI I Z	DSM 11331 ^T	1/138	99.8	-
МТЗ	Pseudomonas veronii	1430	77.0	_
	$DSM 11331^{T}$	1439	99.8	_
MT4	Pseudomonas veronii	1.07	<i>,,</i> ,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	_
•	DSM 11331 ^T	1438	99.7	

MT5	Pseudomonas veronii			-
	DSM 11331 ^T	1451	99.8	

A kísérlet céljának megfelelően a két *Malikia* izolátum keltette fel leginkább érdeklődésünket. Mindkét izolátum (AB2 és AB6-jelű izolátunok) a Malikia spinosa fajjal mutatott nagyfokú rokonságot a 16S rDNS szekvencia alapján (99,7 - 99,9%), ráadásul I.2.C-típusú C23O gént sikerült a genomi DNS-ükből kimutatni. A C230 amplikonok szekvenciaelemzése rámutatott, hogy mindkét törzs ugyanazt a C23O genotípust hordozta, de ennél is fontosabb eredmény volt, hogy ez volt az a C23O genotípus, amelyet az aerob dúsító tenyészetekből ki tudtunk mutatni, mind a jelen, mind az előző dúsítási kísérlet során (Benedek és mtsai, 2018) (AB_OPU-1 és AT_OPU-1, 61. ábra). Sikerült tehát bizonyítanunk, hogy a Malikia nemzetségbe tartozó baktériumok I.2.C-típusú C23O génnel rendelkezhetnek. Meg kell még említeni az Acidovorax delafieldii AB5-jelű izolátumot is, mivel e törzs is rendelkezett I.2.C-típusú C23O génnel. A kimutatott C23O genotípus pedig teljes egyezést mutatott az előző dúsítási kísérlet során, a mikroaerob BTEX-lebontó dúsító tenyészetben domináns C23O genotípussal. Az aerob toluollebontó dúsító tenyészetből izolált törzsek a Pseudomonas és a Flavobacterium nemzetségek képviselői voltak. Egyik törzs sem rendelkezett azonban I.2.C-típusú C230 génnel. A mikroaerob tenyészetekből, függetlenül attól, hogy benzolt, vagy toluolt tartalmaztak szénforrásként, csak és kizárólag a Pseudomonas veronii/extremaustralis fajokkal rokon törzseket sikerült izolálni. Sajnos azonban egyikük sem rendelkezett I.2.C-típusú C23O génnel, így további vizsgálatuktól eltekintettünk.

A továbbiakban vizsgálataink tárgya a *Malikia spinosa* AB6-os törzs lett, amely esetében megvizsgáltuk, hogy mely BTEX-komponenst képes egyedüli szén-, és energiaforrásként hasznosítani, illetve feltártuk a törzs teljes genomszekvenciáját.

V.7.3.5. A *Malikia spinosa* AB6-os törzs BTEX-lebontó képességének és teljes genomszekvenciájának feltárása

A *M. spinosa* AB6-os törzsének aromás szénhidrogén-lebontási képességét az aerob dúsító tenyészetekkel megegyező körülmények között vizsgáltuk GC-MS segítségével. A hat BTEX-komponens lebontását egyedileg vizsgáltuk, tehát egyszerre csak egyféle aromás vegyületet kínáltunk fel a törzsnek, mint szén-, és energiaforrást 5 mg/L koncentrációban, teljesen aerob körülmények között. Eredményeink alapján az AB6-os törzs a benzolt, a toluolt és az etilbenzolt is képes volt gyorsan lebontani (62. ábra). A xilol izomerek bontását viszont nem volt képes elvégezni. A dúsítási eredmények alapján számítani lehetett rá, hogy a benzolt képes hasznosítani, és a toluol-lebontó képessége sem volt meglepő, ugyanakkor az etibenzollebontó képessége meglepetésként ért bennünket. Ezzel a vizsgálattal, egy tíz évvel korábbi feltételezésünket sikerült bizonyítani, miszerint a *Malikia* nemzetség képviselői aromás szénhidrogén-lebontók lehetnek felszín alatti szennyezett közegekben (Táncsics és mtsai, 2010).



62. ábra: A Malikia spinosa AB6 benzol-, toluol-, és etilbenzol-lebontó képességét szemléltető ábra. (Révész és mtsai, 2020a alapján)

Annak érdekében, hogy az I.2.C-típusú *C230* gén helyét azonosítani tudjuk a genomban, illetve tisztázni tudjuk, hogy miért csak tisztán aerob körülmények között képes az

aromás szénhidrogének lebontására a M. spinosa AB6-os törzs, feltártuk a teljes genomszekvenciáját. A törzs genomja 4 110 698 bázispár hosszúságúnak adódott, G+C aránya 64,9%, és 3791 fehérje kódoló gént tartalmaz. A teljes genom szekvenciát A GenBank nyilvános adatbázisban tettük elérhetővé az alábbi nyilvántartási számon: VYSB00000000 (Bioproject: PRJNA572590; Biosample: SAMN12796314). Mivel ezen adatbázisban rendelkezésre állt a faj típustörzsének (Malikia spinosa 83^T) is a teljes genom szekvenciája, összehasonlító vizsgálatokra nyílt lehetőségünk. A két törzs genomméretét összehasonlítva azonnal látható volt, hogy az AB6-os törzs genomja nagyjából 300 kilobázissal nagyobb, mint a típustörzsnek (*M. spinosa* 83^T). Ekkor elsőként digitalis DNS-DNS hibridizációs (dDDH) vizsgálatot végeztünk, amely eredményül 79,4%-ot adott. Mivel két törzs akkor tekinthető egy fajhoz tartozónak, ha a dDDH vizsgálat eredménye nagyobb mint 70% (Meier-Kolthoff és mtsai, 2013), az AB6-os törzs egyértelműen a Malikai spinosa fajhoz tartozik, a nyilvánvaló genomi különbségek ellenére. Ezt az OrthoANI vizsgálat 97,7%-os eredménye is megerősítette. Ez utóbbi módszer esetében a faj szintű elkülönítésre 95-96%-osnál kisebb érték ad lehetőséget (Lee és mtsai, 2016). Ahhoz, hogy meg tudjuk állapítani, mégis milyen funkcionális különbséget rejt a 300 kilobázisnyi genomtöbblet az AB6-os törzs esetében, a két genomot az OrthoVenn2 (Xu és mtsai, 2019) segítségével hasonlítottuk össze. Az eredmények alapján 148 darab olyan fehérjét azonosítottunk, amelyekkel csak az AB6-os törzs rendelkezett, és ezen enzimeknek sem ortológjuk, sem paralógjuk nem volt megtalálható a típustörzs 83^T esetében. E 148 enzim nagy többsége pedig az aromás szénhidrogének lebontásához volt köthető.

Az AB6-os törzs genomjának részletes elemzése feltárta, hogy az I.2.C-típusú *C230* gén egy olyan klaszterben helyezkedik el, amely alapvetően a fenol lebontásában játszik szerepet, és ennek megfelelően egy többkomponensű fenol-hidroxilázt is kódol (63. ábra).



63. ábra: A M. spinosa AB6 genomjában kódolt fenol-lebontási klaszter sematikus ábrája. (Révész és mtsai, 2020a alapján)

dc_1786_20

Mivel a genomban nem találtunk kifejezetten benzol/toluol mono- vagy dioxigenázt, valószínűsíthető, hogy e génklaszter a felelős mind a benzol, mind pedig a toluol lebontásáért. Hasonló megfigyelést tettek az ugyancsak Comamonadaceae családba tartozó *Alicycliphilus denitrificans* benzol- és toluol-lebontó törzsei esetében (Oosterkamp és mtsai, 2013). Megjegyzendő továbbá, hogy a benzol aromás gyűrűjének fenol monooxigenázok általi hidroxilációja egy részletesen leírt folyamat (Pérez-Pantoja és mtsai, 2010), és a tolul-lebontásban betöltött szerepük is jól ismert (Cafaro és mtsai, 2004; Martínez-Lavanchy és mtsai, 2015).

Kérdés maradt ugyanakkor, hogy az etilbenzol lebontására milyen metabolikus útvonalat használ az AB6-os törzs. A legkézenfekvőbb az volt, hogy etilbenzol dioxigenáz enzimet kódoló gént keressünk a genomjában, azonban ilyen funkcióval bíró gént nem találtunk. Ismert ugyanakkor, hogy az etilbenzol lebontása nem csak az aromás gyűrű oxidációján keresztül, hanem az etil-csoport oxidációjának útján is lebontásra kerülhet. Ez utóbbi lépést a naftalin dioxigenáz enzim képes katalizálni (Lee és Gibson, 1996; Lee és mtsai. 2019). Ennek okán naftalin dioxigenázt kódoló géneket kerestünk a genomban, amelyeket (naftalin dioxigenáz kis és nagy alegységet kódoló gének) meg is találtunk, méghozzá egy teljes nag operonban elhelyezkedve. Ez az operon tartalmazta a szalicilát-5-hidroxiláz és a gentizát 1,2-dioxigenáz enzimeket kódoló géneket is, amelyek kulcsszerepet játszanak naftalin biodegradációjában (Park és mtsai, 2007; Pumphrey és Madsen ,2007; Zhou és mtsai, 2001). Ez alapján pedig valószínűsíthető, hogy az AB6-os törzs a naftalin lebontására is képes. További érdekesség, hogy a nag operon szomszédságában is mobilis genetikai elemek találhatóak, amelyek arra utalnak, hogy akárcsak a fenol-lebontásért felelős gén klaszter esetében, szintén HGT esemény útján került az AB6-os törzs genomjába ez az operon. Ezt a feltételezés tovább erősíti, hogy az AB6-os törzs által kódolt naftalin dioxigenázhoz leginkább hasonló enzimmel a Novosphingobium naphthalenivorans NBRC 102051^T törzs rendelkezik (>98%-os hasonlóság aminosav szinten).

V.7.3.6. Összegzés

A második dúsító tenyésztés során sikerült újra feldúsítanunk a *Malikia* nemzetségbe tartozó mikroszervezeteket, és az aerob benzol-lebontó dúsító tenyészetből sikerült izolálni két *Malikia spinosa* fajhoz tartozó törzset. Feltártuk, hogy e törzsek I.2.C-típusú *C230* génnel rendelkeznek. A *M. spinosa* AB6-os jelű törzzsel lefolytatott BTEX-degradációs vizsgálatok rámutattak, hogy képes a benzol, a toluol és az etilbenzol aerob úton történő lebontására. E törzs

teljes genomszekvenciájának vizsgálata során kimutattuk, hogy az I.2.C-típusú *C230* gén egy fenol-lebontásért felelős gén klaszter tagja, amelyet minden bizonnyal horizontális géntranszfer útján szerzett a törzs.

E második dúsító tenyésztés eredményeként két fontos megállapítást tehettünk:

- 1. Az I.2.C-típusú *C230* gén megléte önmagában nem elegendő feltétele a mikroaerob úton történő aromás szénhidrogén-lebontás képességének.
- Az I.2.C-típusú C23O géneket tartalmazó gén klaszterek valószínűleg könnyedén terjednek a Burkholderiales rend tagjai között transzpozonok által mediált horizontális géntranszfer útján.

V.7.4. Harmadik kísérlet: kőolaj/gázolaj keverékkel kigészített, aerob és mikroaerob dúsító tenyészetek összehasonlító vizsgálata

V.7.4.1. A vizsgálat célja és menete

A harmadik dúsító kísérlet célja az volt, hogy az aromás szénhidrogének mellett a komplex kőolajszármazékokban (pl. üzemanyagokban) sokkal dominánsabban jelenlévő alifás szénhidrogéneknek, tehát a nyílt szénláncú alkánoknak a mikroaerob biodegradációjában résztvevő mikrobaközösségeket is vizsgáljuk. E dúsító kísérletet az előzőekhez hasonlóan folytattuk le, 100 mL-es szérumüvegekben, azonban egyedüli szénforrásként adagolatlan gázolaj és nyers kőolaj 3:2 (v/v) arányú keverékéből 20 μL-t adtunk minden mikrokozmoszhoz. Az előzőekhez hasonlóan aerob és mikroaerob mikrokozmoszokat hoztunk létre, három párhuzamosban, majd öt héten keresztül hetente oltottuk át őket. A mikrobaközösségek struktúráját T-RFLP segítségével követtük nyomon 16S rRNS gén, illetve az aerob alkán biodegradáció kulcsgénje, az alkán-1 monooxigenáz alapján. A *C230* géneket e kísérlet során nem monitoroztuk, illetve baktérium törzsek izolálására sem tettünk kísérletet. Célunk a mikrobaközösségek összetételének feltárása volt kizárólag molekuláris módszerek segítségével.

V.7.4.2. A végponti dúsító tenyészetek mikrobaközösségeinek vizsgálata 16S rDNS T-RFLP és amplikon szekvenálás segítségével

A végponti dúsító tenyészetek mikrobaközösségeinek struktúráját első lépésben 16S rRNS gén alapú T-RFLP vizsgálat segítségével hasonlítottuk össze. Ahogy az a T-RFLP elektroferogramok alapján készült Bray-Curtis dendrogramon is látható, a mikrobaközösségek összetétele élesen elkülöníthető egymástól (64. ábra). Az is jól látható, hogy a három párhuzamos mikroaerob dúsító tenyészet mikrobiális közösségei nagyon hasonlóak, míg az aerob tenyészetek esetében jóval nagyobb változatosság figyelhető meg. Ez talán annak tudható be, hogy az aerob körülmények fenntartása folyamatosan nagymennyiségű oxigénutánpótlást igényelt, ami bár steril körülmények között történt, mégis jelentős zavaró hatás lehet. Részletes közösségi feltárást a mikroaerob MIK1-es és az aerob AER2-es tenyészetek, illetve a kiindulási biofilm inokulum esetében végeztünk Illumina16S rDNS amplikon szekvenálás segítségével.



64. ábra: Az alifás dúsító tenyészetek 16S rDNS T-RFLP mintázatainak Bray-Curtis alapú hasonlósági dendrogramja. (Révész és mtsai, 2020b alapján)

A kiindulási biofilm inokulum bakteriális közösségét továbbra is a Burkholderiales rend tagjai uralták, ennek megfelelően a Gammaproteobacteria osztály volt az egyeduralkodó a közösségen belül. A legdominánsabb Burkholderiales nemzetségek a következőek voltak: *Sulfuritalea* (a 16S rDNS szekvenciák 16%-a), *Azoarcus* (4,8%), *Acidovorax* (2,6%), *Simplicispira* (0,9%), *Thiobacillus* (0,9%), *Hydrogenophaga* (0,7%), *Thauera* (0,6%), *Zoogloea* (0,6%) és *Rhodoferax* (0,5%) (65. ábra). Érdekes módon az Alphaproteobacteria osztály, illetve a Pseudomonadales rend azon nemzetségei, amelyek gyakori közösségalkotói a szénhidrogénekkel szennyezett közegeknek (pl. *Pseudomonas, Sphingobium, Novosphingobium*), meglehetősen kis abundanciával voltak csak kimutathatóak.



65. ábra: A kiindulási biofilm bakteriális közösségének osztály, illetve nemzetség szintű összetétele az Illumina 16S rDNS amplikon szekvenálási adatok alapján. (Révész és mtsai, 2020b alapján)

Az AER2-es aerob dúsító tenyészet bakteriális közösségét túlnyomó részben a Gammaproteobacteria osztály képviselői dominálták (64,7%), azon belül is a Burkholderiales rend tagjai (36,5%) (66. ábra). Nem meglepő, hogy a legabundánsabb nemzetségek (*Polaromonas, Acidovorax, Janthinobacterium*) is e rend képviselői voltak. A *Polaromonas* nemzetség tagjairól jól ismert, hogy számos szénhidrogénfajta biodegradációjára képesek lehetenek, úgy, mint a monoaromás szénhidrogének (Sun és mtsai, 2010; Xie és mtsai, 2011), naftalin (Jeon és mtsai, 2004) vagy éppen az alkánok (Mattes és mtsai, 2008). Az *Acidovorax* nemzetség szénhidrogén-lebontásban betöltött szerepét korábban már láthattuk, míg a *Janthinobacterium* nemzetség esetében nem ismert, hogy részt vennének e vegyületek biodegradációjában. Tény azonban, az utóbbi nemzetség képviselőit gyakran mutatják ki alifás szénhidrogénekkel szennyezett közegekből, bár inkább, mint szénhidrogén-toleráns baktériumok hivatkoznak rájuk (Giebler és mtsai, 2013; Pham és mtsai, 2014). Nemzetség

szinten a második legabundánsabb csoport a Pseudomonas volt (10,5%). E nemzetség alkánlebontó képessége régóta jól ismert és dokumentált (van Beilen és mtsai, 1994). Az Alphaproteobacteria osztály képviselői között egy nemzetség érdemel említést, mégpedig a Sphingobium (2,3%), amelynek számos szénhidrogén-lebontó törzse ismert (Pinyakong és mtsai, 2003; Révész és mtsai, 2018). Ez utóbbi nemzetségnél azonban jóval abundánsabb volt az Actionobacteria osztályba tartozó Rhodococcus nemzetség, amely talán az egyik legjobban ismert alkán-lebontó csoport (Martínková és mtsai, 2009; Zampolli és mtsai, 2019). Megjegyzendő, hogy e nemzetség szinte összes képviselője esetében kimutatható az alkán-1 monooxigenáz gén(ek) jelenléte a genomjukban (Táncsics és mtsai, 2015). Nem véletlen tehát, hogy egyes Rhodococcus fajokat, de különösen az úgynevezett "erythropolis" klád tagjait szénhidrogénekkel szennyezett közegek generalista fajaiként tartanak számon (Hamamura és mtsai, 2006; Hamamura és mtsai, 2013). Meglepő módon, a Candidatus Saccharibacteria törzshöz tartozó szekvenciák is jelentős abundanciával voltak jelen az AER2-es aerob dúsító tenyészetben. E törzset egészen a közelmúltig kizárólag molekuláris szinten ismerték, de még napjainkban is csak egyetlen tenvésztésbe vont képviselője ismert, emiatt, mint a "mikrobiális sötét anyag" tagjai hivatkoznak a szakirodalomban e baktériumokra (He és mtsai, 2015). Habár e baktériumok diverz ökoszisztémákból mutathatóak ki, egy bizonyos csoportjuk (3. szubdivízió) jellemzően szénhidrogénekkel szennyezett közegekben van jelen. Winsley és munkatársai (2014) gázolajjal szennyezett talajból mutatták ki, míg egyes stabil izotópos kísérletek eredményei azt feltételezik, hogy szerepük lehet a benzol és a toluol lebontásában (Luo és mtsai, 2009; Xie és mtsai, 2011). Végül meg kell említeni a Flavobacteriia osztályt (3,8%), illetve az ide sorolható Chryseobacterium (2,5%) és Flavobacterium (1,3%) nemzetségeket, mint olyan baktériumokat, amelyek részt vehetnek szénhidrogének lebontásában (Szoboszlay és mtsai, 2008; Chaudhary és Kim, 2018).



66. ábra: Az AER2 dúsító tenyészet bakteriális közösségének osztály, illetve nemzetség szintű összetétele az Illumina 16S rDNS amplikon szekvenálási adatok alapján. (Révész és mtsai, 2020b alapján)

A MIK1-es mikroaerob tenyészet bakteriális közössége jóval egyszerűbb volt, mint az aerob tenyészeté, lévén a 16S rDNS szekvenciák 98,8%-a a Gammaproteobacteria osztályhoz volt köthető, azon belül is a Pseudomonadales rend képviselőihez (67. ábra). A leggyakoribb csoportnak az Acinetobacter nemzetség adódott, amely egyúttal dominálta is a közösséget több, mint 66%-os részesedésével. E nemzetség számos képviselőjéről ismert, hogy képesek az alkánok és az aromás szénhidrogének lebontására, ráadásul egyes törzseik kifejezetten a hosszú szénláncú alkánok degradációjához adaptálódtak (Lal és Khanna, 1996; Di Cello és mtsai, 1997; Tani és mtsai, 2001; Margesin és mtsai, 2003; Rojo, 2009; Czarny és mtsai, 2019). Annak a ténynek a tükrében, hogy e nemzetség vált dominánssá mikroaerob körülmények között, talán jobban érthetővé válik, hogy miért lehetnek abundánsak az Acinetobacter nemzetségbe tartozó baktériumok a mélyen fekvő kőolaj rezervoárokban, ahová minden bizonnyal a kitermelés során beinjektált vízzel jutnak (Orphan és mtsai, 2000; Zhao és mtsai, 2012). A kőolaj rezervoárok esetében elsősorban az anaerob alkán lebontás jöhet szóba, mint domináns folyamat, ám a kis mélységben fekvő rezervoárok nem tekinthetőek feltétlenül teljesen anaerobnak, lévén a csapadék útján lehet némi oxigén utánpótlásuk (Jones és mtsai, 2007). Emellett a mélyebben fekvő rezervoárokba is juthat oxigén a kitermelés során beinjektált vízzel. Ennek megfelelően a kőolaj rezervoárokban kialakulhatnak olyan mikronichek, ahol, ha csak nyomnyi mennyiségben is, de megtalálható oxigén. Ebből kifolyólag, da Cruz és munkatársai (2011) szerint a kőolaj rezervoárokban aerob és anaerob biodegradációs folyamatok egyaránt előfordulnak. Mindezeket összegezve azt lehet feltételezni, hogy az Acinetobacter nemzetség egyes képviselői alkalmazkodhattak az alkánok mikroaerob körülmények közötti lebontásához. E kérdés tisztázásához azonban további vizsgálatok elvégzésére lesz szükség. A második leggyakoribb Pseudomonadales rendbe tartozó csoportot maga a *Pseudomonas* nemzetség adta. Itt kell megemlíteni, hogy a közelmúltban került leírásra egy *Pseudomonas extremaustralis* törzs esetében, hogy kizárólag mikroaerob körülmények között képes az alkánok biodegradációjára (Tribelli és mtsai, 2018). A *P. extremaustralis* legközelebbi rokona a *P. veronii*, amelyről a korábbi dúsító tenyésztések során is láthattuk, hogy alapvetően mikroaerob körülmények között vált dominánssá.

Rend szinten a második legjelentősebb csoport a Burkholderiales volt, amelyet olyan nemzetségek képviseltek, mint az *Acidovorax*, *Variovorax*, illetve *Simplicispira*. Az előző dúsítási kísérletek során is azt láthattuk, hogy a mikroaerob tenyészetekben főleg e nemzetségek képviselték a Burkholderiales rendet. Ez az eredmény tovább erősíti azt a feltételezést, hogy e nemzetségek egyes képviselőinek kiemelt szerepe lehet a mikroaerob körülmények közötti szénhidrogén biodegradációban.



67. ábra: A MIK1 dúsító tenyészet bakteriális közösségének osztály, illetve nemzetség szintű összetétele az Illumina 16S rDNS amplikon szekvenálási adatok alapján. (Révész és mtsai, 2020b alapján)

V.7.4.3. Az alkB gének diverzitásának vizsgálata a dúsító tenyészetekben

Első lépésben T-RFLP vizsgálat segítségével vizsgáltuk az egyes végponti dúsító tenyészetek *alkB* diverzitását. Ehhez egy olyan *alkB* gén alapú T-RFLP módszert használtunk, amelyet Giebler és munkatársai (2014) dolgoztak ki. Az eredményül kapott elektroferogramok Bray-Curtis algoritmus alapján készült dendrogramja nagyon hasonló ahhoz, amit a 16S rRNS

gén alapú T-RFLP vizsgálat során kaptunk. Ennek megfelelően az aerob és a mikroaerob dúsító tenyészetek elkülönültek egymástól a dendrogramon, és ugyanúgy a mikroaerob tenyészetek mutattak kisebb változatosságot az aerobokhoz képest (68. ábra).



68. ábra: Az alifás dúsító tenyészetek alkB T-RFLP mintázatainak Bray-Curtis alapú hasonlósági dendrogramja. (Révész és mtsai, 2020b alapján)

Ahogy az a 69. ábrán is látható, mindhárom mikroaerob dúsító tenyészet esetében az 523-bp hosszúsággal jellemezhető T-RF volt a domináns (amely emellett hiányzott az aerob dúsítókból), és nagyjából azonos T-RF mintázat figyelhető meg mindhárom tenyészet esetében. Ezzel szemben az aerob dúsítók esetében a 89-bp hosszúsággal jellemezhető T-RF volt a domináns az AER2-es és AER3-as dúsítókban, míg ez a T-RF gyakorlatilag hiányzik az AER1- es dúsítóból. Ez utóbbiban az 552-bp, illetve a 283-bp hosszúsággal jellemezhető T-RF-ek voltak a dominánsak. Általánosságban elmondható még, hogy az 552-bp T-RF mind az aerob, mind pedig az anaerob dúsító tenyészetekben egyaránt jelen volt, nagyjából egyforma gyakorisággal, míg a 283-bp T-RF inkább az aerob dúsító tenyészetekben bírt jelentős abundanciával. Ahhoz, hogy ezekhez a T-RF-ekhez *alkB* szekvenciákat, illetve baktériumokat tudjunk kötni, klóntárak segítségével tártuk fel az AER2-es és a MIK1-es dúsító tenyészetek *alkB* diverzitását.



69. ábra: Az alifás dúsító tenyészetekben kimutatott alkb T-RF-ek relatív abundanciája. (Révész és mtsai, 2020b alapján)

Az AER2-es dúsító tenyészet esetében az *alkB* szekvenciákat hat csoportba (azaz "operational protein unit" – OPU-ba) lehetett sorolni. A legnagyobb csoportba (AER-OPU-1) a klónok 63%-át lehetett sorolni, viszont nagyon alacsony hasonlóságot mutattak az eddig ismert *alkB* szekvenciákkal (76-80%), emiatt nem lehetett őket baktériumhoz kötni (70. ábra). Ehhez a csoporthoz volt köthető a domináns, 89-bp hosszúságú T-RF. A leghasonlóbb *alkB* gént az *Agitococcus lubricus* DSM 5822^T genomjából lehetett kimutatni, illetve kőolajjal szennyezett tengervíz és talajmintákból (Powell és mtsai, 2010; Wang és mtsai, 2014). A második csoportba (AER-OPU-2) a klónok közel 17%-a tartozott, és egyértelműen a *Pseudomonas chlororaphis* egyik alfajához lehetett kötni e szekvenciákat. E klónok adták az 552-bp hosszúságú T-RF-et. Említésre érdemes még a harmadik csoport (AER-OPU-3), ahová a klónok több mint 10%-a tartozott, és egyértelműen alkán-lebontó, *Rhodococcus* nemzetségbeli baktériumokhoz lehetett kötni őket (pl. *R. erythropolis*). E klónok adták a 283-bp hosszúságú T-RF-et.

A MIK1-es dúsító tenyészet esetében az *alkB* szekvenciákat öt csoportba lehetett sorolni. A legnagyobb csoportba (MIK-OPU-1) a klónok 71%-a tartozott, és egy *Pseudomonas veronii* törzs *alkB* génjével mutattak nagy hasonlóságot (98,4%). E klónok többsége volt jellemezhető a domináns, és csak a mikroaerob tenyészetekben előforduló 523-bp hosszúságú

T-RF-fel. Ez az eredmény tovább erősíti azt a feltételezésünket, hogy a *P. veronii/extremaustralis* rokonságba tartozó baktériumok a *Pseudomonas* nemzetség mikroaerob közegekhez adaptálódott csoportját jelentik. Annak ellenére, hogy közösségi szinten az *Acinetobacter* nemzetség volt domináns, mindössze a klónok 10%-át lehetett e baktériumokhoz kötni (MIK-OPU-2), ráadásul a hozzájuk köthető 376-bp hosszúságú T-RF nem jelent meg az elektroferogramokon. Itt szükséges megemlíteni, hogy a T-RFLP-hez használt *alkB*-specifikus PCR primerpár nem univerziális, így nem alkalmas az összes ismert genotípus amplifikálására (univerzális *alkB* primerpár nem is létezik lásd Jurelevicius és mtsai, 2013). Továbbá számos alkán-lebontó *Acinetobacter* törzs alkM családba tartozó alkán hidroxiláz enzimmel rendelkezik alkB-típusú helyett (Ratajczak és mtsai, 1998), amelyek kimutatására nem tettünk kísérletet. A maradék klónszekvenciák többsége *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó baktériumokhoz volt köthető. Kiemelendő a MIK-OPU-3 csoport, amely az aerob AER-OPU-2-es csoport szekvenciával mutatott teljes egyezést. Ezen *alkB* genotípusok tehát az aerob és a mikroaerob tenyészetekben egyaránt jelen voltak, ráadásul hasonló abundanciával.



70. ábra: Az alifás dúsító tenyészetekben kimutatott alkB klónszekvenciák filogenetikai helyzetét bemutató, aminosav alapó, maximum-likelihood fa. (Révész és mtsai, 2020b alapján)

V.7.4.4. Az ismeretlen *alkB* genotípus (AER-OPU-1) filogenetikai azonosítása metagenom asszociált genom analízis segítségével

A dúsító tenyészetekben klóntárak segítségével feltárt alkB genotípusok közül egyedül az AER2-es aerob dúsítóban feltárt domináns szekvenciát nem sikerült ismert baktériumhoz kötni. Ezért az AER2-es mintából származó DNS-t nagy klaszterszámú metagenom szekvenálás segítségével vizsgáltuk tovább, és bioinformatikai módszerek segítségével próbáltuk felépíteni annak a baktériumnak a genomját, amely az új alkB genotípust hordozhatta. E bioinformatikai módszer a "genome-resolved metagenomics", amelyet magyarul metagenom asszociált genom analízisként fordíthatunk. A szekvenálás és a tetranukleotid eloszláson alapuló genom-építés (71. ábra A panel) eredményeképpen sikerült felépítenünk egy Gammaproteobacteria osztályba tartozó baktérum genomját (AER2_Gammaproteobacteria_44_116), amelynek G+C aránya 44%, és amely tartalmazta az új típusú alkB gént. A genom közel teljes összeszerelése sikerült (>99%), ugyanakkor 16S rRNS gént nem sikerült hozzárendelnünk. Az S3 riboszómális fehérje génje alapján ez volt a harmadik legabundánsabb mikroszervezet az AER2-es dúsító tenyészetben (71. ábra B panel). A baktérium filogenetikai helyzetét 16S rRNS gén hiányában a riboszómális fehérjék alapján állapítottuk meg (71. ábra C panel). E szerint a legközelebbi rokona az Agitococcus lubricus, amelyet tévesen a Firmicutes törzsbe sorolnak jelenleg. Valójában a teljes genom alapján a Gammaproteobacteria osztály Moraxellaceae családjába tartozik mindkét baktérium (akárcsak az Acinetobacter nemzetség). Itt szükséges megjegyezni, hogy már az alkB gén alapján is az Agitococcus lubricus adódott az egyik legközelebbi rokonnak.



71. ábra: Az AER2 dúsító tenyészetből kimutatott, ismeretlen alkB genotípus baktériumhoz rendelése metagenomikai adatok alapján: (a) az AER2-es dúsító ESOM ábrája, piros színnel jelölve azt a "bin"-t, amely tartalmazza az új alkB gént; (b) az ismeretlen alkB gént tartalmazó baktérium relatív abundanciája a közösségben az S3-as riboszómális fehérje alapján (piros oszlop);. (c) az új alkB génnel rendlekező Gammaproteobacteria_44_116-jelű baktérium filogenetikai helyzetét bemutató fa, amely 16 db riboszómális fehérje génjének összefűzése és filogenetikai vizsgálata alapján készült. (Révész és mtsai, 2020b alapján)

Az alkB gént tartalmazó gén klaszter vizsgálata feltárta, hogy az alkB géntől upstream helyzetben, ellentétes orientációval megtalálható egy AraC családba tartozó transzkripciós regulátort kódoló gén is (72. ábra). E gént alkR néven írták le az Acinetobacter sp. ADP1-es törzs esetében, és azt találták, hogy jelenléte esszenciális fontosságú az alkán-lebontás képességéhez (Ratajczak és mtsai, 1998). Ez alapján joggal feltételezhetjük, hogy az AER2_Gammaproteobacteria_44_116-jelű baktérium egy jelentős alkán-lebontó baktérium szerepét töltötte be az AER2-es dúsító tenyészetben.



72. ábra: Az alkB gént tartalmazó klaszter az AER2_Gammaproteobacteria_44_116-jelű baktérium genomjában. ORF1: tRNA (citidin(34)-2'-O)-metiltranszferáz, ORF2: alfa/béta hidroláz, ORF3: alkán-1 monooxigenáz, ORF4: AraC családba tartozó transzkripciós regulátor, ORF5: dehidrogenáz, ORF6 oxigéntől független koproporfirinogén III oxidáz. (Révész és mtsai, 2020b alapján)

V.7.4.5. A Candidatus Saccharibacteria törzsbe tartozó baktérium szerepének tisztázása

Ahogy azt feljebb láthattuk, az AER2-es dúsító tenyészet mikrobaközösségben jelentős abundanciával lehetett kimutatni *Candidatus* Saccharibacteria törzshöz (*phylum*) köthető mikroszervezetet. Ebből, illetve bizonyos szakirodalmi adatokból akár arra is lehetne következtetni, hogy e baktériumok szerepet játszottak egyes szénhidrogének lebontásában a kísérletünk során. Ismert, hogy egy csoportjukat jellemzően szénhidrogénekkel szennyezett talajokból lehet kimutatni (Winsley és mtsai, 2014), míg stabil izotópos kísérletek eredményei alapján benzol és toluol-lebontó képességüket feltételezték (Luo és mtsai, 2009; Xie és mtsai, 2011). Környezeti szerepüket azért is nehéz feltárni, mivel e törzsnek mindössze egy-két képviselőjét sikerült eddig tenyésztésbe vonni, jellemzően humán szájüregi mintákból (He és mtsai, 2015; Collins és mtsai, 2019; Murugkar és mtsai, 2019). Ráadásul az izolátumok genomjának meglehetősen kis mérete (<0,9 Mbp) és szimbionta, parazita életmódja ellentmond annak a feltételezésnek, hogy e törzs képviselőinek szerepük lehetne a szénhidrogének biodegradációjában. Ahhoz, hogy e kérdést tisztázhassuk, a Saccharibacteria törzsbe tartozó baktérium genomját is megkíséreltük feltárni az AER2-es dúsító tenyészet metagenom adatait felhasználva.

A metagenom adatokból egy ezidáig ismeretlen, Saccharibacteria törzsbe tartozó baktérium faj két törzsének a genomját sikerült rekonstruálnunk. A feltárt genomméret 1,06 Mbp nagyságú volt, ami tehát hasonló, mint a korábban feltárt Sacchariabacteria genomok esetében tapasztalható volt. A genomnak mindössze egy rövid szakaszán volt eltérés a két törzs között, és e szakasz is mindössze 10 db fehérje kódolásáért volt felelős. A metabolikus potenciált tekintve, e baktériumok nem lehettek képesek a zsírsavak, nukleotidok és

163

aminosavak de novo bioszintézisére, mivel az ezekhez szükséges gének többsége hiányzott a genomjukból. E tény mellett más eredmények is arra utaltak, hogy az életfolyamataikhoz szükséges szerves szenet, illetve molekuláris építőelemeket a környezetükből, méghozzá más mikroszervezetekből származik. A genomjukban proteáz, aminopeptidáz, karboxipeptidáz és metalloproteáz enzimek génjeit lehetett megtalálni, illetve olyan transzport fehérjék génjeit, amelyek aminosavak és oligopeptidek felvételét teszik lehetővé. Ezzel szemben nem találtunk olyan gént a genomban, amely szénhidrogének lebontásához lett volna köthető, sőt, a trikarbonsav (TCA) ciklus szinte összes génje hiányzott a genomból. Ugyanakkor a cukrok fermentációjához szükséges metabolikus útvonal szinte teljesen rekonstruálható volt. Sikerült annotálni mannóz és trehalóz transzportereket, és tovább tudták alakítani e vegyületeket glükóz-6-foszfáttá, illetve fruktóz-6-foszfáttá, amelyek aztán glikolízis útján alakulhattak tovább. Meg kell azonban jegyezni, hogy a glikolítikus útvonal sem volt teljesen megtalálható a genomban, viszont a hiányzó lépéseket kompenzálhatta a szintén csak részben feltárt pentózfoszfát útvonal. A laktát dehidrogenáz enzim jelenléte a genomban arra enged következtetni, hogy a cukrokból keletkező piruvátot laktáttá fermentálják tovább. A feltárt metabolikus útvonalakat a 73. ábra szemlélteti.

A kapott eredmények alapján tehát egyértelmű, hogy a *Candidatus* Saccharibacteria törzs képviselői az AER2-es dúsító tenyészetben nem vettek részt a szénhidrogének lebontásában, hanem egyszerűen szén elnyelőként funkcionáltak (Figueroa-Gonzalez és mtsai. 2020). Valószínűsíthető, hogy azokban a talajokban is, ahol Winsley és mtsai, (2014) gázolajszennyezés mellett találták abundánsnak e baktériumokat, hasonló szerepük volt a közösségen belül. A stabil izotópos kísérletekben (Luo és mtsai, 2009; Xie és mtsai, 2011) pedig egyszerűen a valódi lebontó szervezeteket parazitálva juthattak hozzá az izotóposan jelölt nukleotidokhoz, így klasszikus keresztjelölődés (*cross-feeding*) miatt tűnhettek benzol-, vagy toluol-lebontó mikroszervezeteknek, miközben a lebontásban ők maguk egyáltalán nem vettek részt.

164



73. ábra: A Candidatus Saccharibacteria törzsbe tartozó baktérium genomja alapján rekonstruált metabolikus térkép. (Figueroa-Gonzalez és mtsai, 2020 alapján)

V.7.4.6. Összegzés

A harmadik dúsítási kísérlet rámutatott arra, hogy nem csak az egyszerű aromás vegyületek (BTEX komponensek), hanem a nyílt szénláncú alkánok esetében is egymástól jelentősen eltérő összetételű bakteriális közösségek vesznek részt a lebontásban aerob, illetve mikroaerob körülmények között. Érdekes eredménye a kísérletnek, hogy a kiváló alkán-lebontó képességükről ismert *Rhodococcus* nemzetségbeli baktériumok csak teljesen aerob körülmények között váltak jelentős közösségalkotókká. Mikroaerob körülmények között váltak jelentős közösségalkotókká. Mikroaerob körülmények között 1%-nál kisebb mértékben voltak csak jelen, és az *alkB* gén alapú vizsgálatok eredményei is erre az eredményre vezettek. Ez azért is fontos eredmény, mivel alkán-lebontó *Rhodococcus* törzseket gyakran alkalmaznak szénhidrogénekkel szennyezett közegek biológiai kármentesítéséhez. Eredményeink azt mutatják, hogy e bioaugmentációs kármentesítési eljárások csak akkor

vezethetnek eredményre, ha megfelelő mennyiségű oxigént biztosítanak a Rhodococcus törzsek számára. További megerősítést nyert ugyanakkor, hogy a Pseudomonas veronii/extremaustralis rokonsági körbe tartozó baktériumok lehetnek a fő alkán-lebontó mikroszervezetek mikroaerob körülmények között, míg az Acidovorax, Variovorax, illetve Simplicispira nemzetségbe tartozó baktériumok szintén fontos mikroaerob (aromás) szénhidrogén-lebontók lehetnek. Ez utóbbi feltételezés igazolása azonban további vizsgálatokat igényel. A metagenom szekvenálási adatokat felhasználva sikerült felépítenünk egy Moraxellaceae családba tartozó, eddig ismeretlen baktérium genomját. E baktérium rendelkezik az aerob alkán-lebontás kulcsgénjeivel, és valószínűleg jelentős szerepet játszott az alkánok aerob úton történő biodegradációjában az aerob AER2-es dúsító tenyészetben. Az alkB T-RFLP eredmények alapján e baktérium az AER3-as dúsító tenyészetben is jelen volt, míg az AER1-es tenyészetből hiányzott valamilyen oknál fogya. Végül, de nem utolsósorban, sikerült tisztázni, hogy mi lehet a szerepe egyes Candidatus Saccharibacteria törzsbe tartozó baktériumoknak szénhidrogénlebontó mikrobaközösségekben. Bemutattuk, hogy e baktériumok korlátozott genommérettel és metabolikus potenciállal rendelkeznek és minden bizonnyal obligát paraziták. Közösségben betöltött szerepük szerint szén elnyelők és a lebontásban egyáltalán nem vesznek részt, ám arra parazita jellegüknél fogva jelentős (negatív) hatást gyakorolhatnak.

VI. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEGZŐ MEGBESZÉLÉSE

A fentiekben bemutatott több mint tíz évet felölelő kutatómunka eredményeként sikerült rávilágítani a szénhidrogénekkel szennyezett felszín alatti közegekben történő mikoerob lebontási útvonalak létezésére. A kezdeti lépések során megerősítést nyert, hogy e szennyezett közegek hipoxikus/mikroaerob, tehát mindenképpen oxigén-limitált régióiban а Burkholderiales rend képviselői dominálják a bakteriális közösségeket. Ezen belül is a Comamonadaceae és a Rhodocyclaceae (újabban Zoogloeaceae) családok nemzetségei a fő közösségalkotók. Ekkor még 16S rDNS alapú klóntárak segítségével olyan nemzetségek dominanciáját sikerült kimutatnunk, mint a Rhodoferax, Dechloromonas, Malikia, illetve Acidovorax. Már az első eredmények értékelése során bizonyítást nyert, hogy a főleg bétaproteobaktériumok által hordozott, I.2.C-típusú exradiol dioxigenáz enzimet kódoló C23O gének jelentős diverzitással vannak jelen a vizsgált közegekben (Táncsics és mtsai, 2010). Megállapítható volt ugyanakkor az is, hogy a kimutatott genotípusok jelentős része nem köthető ismert, tenyésztésbe vont baktériumtörzshöz, vagy akár csak nemzetséghez. Később, a további kutatások alapjául szolgáló siklósi kárhelyen igazolást nyert, hogy e gének in situ expressziója kimutatható, így minden bizonnyal szerepet játszanak a BTEX-vegyületek lebontásában. A siklósi, BTEX-vegyületekkel erősen szennyezett kárhelyen lehetőség nyílt a szennyezési csóva közepén és szélén is vizsgálni a mikrobaközösségek összetételét, habár ekkor még nem volt előttünk ismert az úgynevezett "plume fringe concept" (Meckenstock és mtsai, 2015), amit talán szennyezés-határ modellként lehetne magyarra fordítani. Ez a modell azt feltételezi, hogy a BTEX-vegyületek szignifikáns mértékű biodegradációjára csak a szennyezési csóva szélén van lehetőség, mivel a lebontáshoz szükséges elektronakceptorok (oxigén, nitrát, szulfát) megfelelő koncentrációban csak itt állnak rendelkezésre. E zóna kiterjedése szélsőséges esetben pár centiméternyire korlátozódik csupán, míg a csóva belsejében egy kiterjedt, erősen redukált zóna jön létre, amelyet vas-redukáló, illetve metanogén mikroszervezetek uralnak. Ez utóbbi mikroszervezetek csak erősen korlátozottan vesznek részt a szénhidrogének lebontásában, vagy kimondottan csak egy-egy komponens lebontására képesek (lásd például a toluol-lebontó Geobacter metallireducens), ami a természetes biodegradáció időtartamát emberi léptékben mérve beláthatatlan távra nyújtja el. Ha máshol nem is, a szennyezési csóva szélén, ahol szignifikáns lebontást feltételezünk, mindenképpen jelen kell lennie egy hipoxikus rétegnek, amelyet a mikroaerob lebontásra képes szervezetek uralhatnak. Eredményeink alapján egyértelműen megmutatkozott, hogy a siklósi kárhelyen is eltérő mikrobaközösségekkel volt

167

jellemezhető a szennyezési csóva széle, illetve annak középpontja. Meg kell jegyezni ugyanakkor, hogy a siklósi kárhely esetében a szennyezési csóva középpontjában is inkább erősen mikroaerob, illetve nitrát-redukáló körülmények uralkodtak és nem klasszikus vasredukáló vagy metanogén körülmények. Sikerült azt is bizonyítanunk, hogy a Sei és mtsai, (1999) által tervezett, és a szakirodalomban a C230 gének általános kimutatására használt PCR primerek nem alkalmasak arra, hogy a siklósi talajvíz mikrobaközösségeiben jelenlévő I.2.Ctípusú C23O géneket amplifikálják. Szükségessé vált tehát, hogy e gének kimutatásához új PCR primereket tervezzünk. Az ekkor megjelenő, majd egyre elterjedtebbé váló metagenomikai vizsgálatoknak is köszönhetően egyre több I.2.C-típusú C23O gén DNS szekvenciája vált elérhetővé a GenBank adatbázisban. Ennek köszönhetően pedig már meg lehetett próbálkozni egy, az extradiol dioxigenázok I.2.C alcsaládjára specifikus PCR primerpár tervezésével. A primertervezés eredményeképpen egy többszörösen degenerált primerpárt alkottunk, majd ezzel folytattuk tovább vizsgálatainkat a siklósi kárhelyen. E primerpár segítségével további, addig ismeretlen genotípusokat sikerült feltárnunk, és kijelenthettük, hogy sikerült egy jól működő, csoportspecifikusnak nevezhető primerpárt alkotni (Táncsics és mtsai, 2013). Részben e primerpár segítségével 13 hónapon át RNS alapon monitoroztuk a siklósi kárhely középpontjában a mikrobaközösség összetételét és az I.2.C-típusú C23O gének aktivitását. A kimutatott C23O genotípusokat hat jól elkülönülő csoportba lehetett sorolni, ami lehetőséget biztosított arra, hogy az egyes csoportok aktivitását külön-külön vizsgáljuk. Ehhez egy fragment-analízis alapú módszert, a "Single Nucleotide Primer Extension" (SNuPE) technikát választottuk. Bár e módszert korábban elsősorban humán genetikai célokra használták, méghozzá SNP-k kimutatásához, Nikolausz és munkatársai (2009) mikrobiális ökológiai célokra történő használhatóságát is demonstrálták. Köszönhetően annak, hogy e módszer is a fragment-analízis elvein alapszik, a kapott eredményeket párhuzamba lehetett állítani a 16S rRNS gén alapú T-RFLP vizsgálatok eredményeivel és statisztikai összefüggéseket lehetett közöttük keresni. Az így kapott eredmények alapján két taxont tudtunk azonosítani, amelyek a monitoring időszak alatt részt vehettek a BTEX-vegyületek lebontásában és I.2.C-típusú C23O génnel rendelkezhettek. E két taxon egyike egy olyan, máig tenyésztésbe nem vont, Rhodocyclaceae családba tartozó mikroszervezet, amely egyértelműen BTEX-vegyületekkel szennyezett felszín alatti közegből mutatható ki. Teljesen azonos 16S rDNS szekvenciákat mutattak ki Callaghan és munkatársai. (2010) kőolajszármazékokkal szennyezett talajvíz üledékből (Casper, WY, USA), míg Pilloni és munkatársai. (2011) stabil-izotópos vizsgálatok alapján a toluol vas-redukáló körülmények közötti biodegradációját kötötték mikroszervezethez. A másik taxon egy szintén máig tenyésztésbe nem vont mikroszervezet, amely minden bizonnyal a *Rhodoferax* nemzetség tagja, de legalább is annak egyik nagyon közeli rokona. A *Rhodoferax* nemzetség egyes tagjairól ismert, hogy részt vehetnek a fenantrén biodegradációjában (Martin és mtsai, 2012), de már Aburto és Peimbert (2011) mikrokozmosz kísérleteinek eredményei is arra engedtek következtetni, hogy a benzol és a toluol lebontásában is szerepet játszhatnak. Az a tény azonban, hogy e taxonokat a mai napig nem sikerült kitenyészteni, meggátolta azt, hogy minden kétséget kizáróan mikroaerob lebontókként azonosíthassuk őket, és I.2.C *C230* genotípust kössünk hozzájuk. E pontban úgy éreztük, hogy elértük az egyszerű molekuláris ökológiai vizsgálómódszerek teljesítőképességének határait, így más irányokba kellett tovább lépnünk, hogy a vizsgálatok megkezdésekor feltett kérdésekre egyértelmű válaszokat leljünk. A továbblépés két irányba történt. Egyrészt egyszerű direkt izolálásos technikával próbáltuk feltárni BTEX-szennyezett közegek mikrobaközösségeit, majd az izolátumok között kerestük azokat, amelyek I.2.C-típusú *C230* génnel rendelkeznek. Másrészt stabil izotópos módszer segítségével kíséreltük meg feltárni a siklósi kárhely mikroaerob toluol-lebontásra képes közösségalkotóit.

A folyamatos törzsizolálások során mondhatni mellénk szegődött a vakszerencse. A 2014-ben, egy közép-magyarországi kárhely biofilm mintájából izolált, viaszszerű telepeket fejlesztő, "Buc" laborjelű törzs alapos vizsgálata szolgáltatott ugyanis meglepő eredményt. A törzs 16S rDNS szekvenciájának filogenetikai vizsgálata azt mutatta, hogy e törzs a Zoogloea nemzetségbe tartozhat, ráadásul I.2.C-típusú C230 gént is sikerült kimutatnunk a genomjából. Ez az eredmény azért volt váratlan, mert a Zoogloea nemzetség képviselőit elsősorban szennyvíztisztítói eleveniszapokból izolálják és alapvetően, mint flokkulumképző baktériumok tekintünk rájuk e közegekben. Felszín alatti közegekben való előfordulásuk és ott betöltött szerepük még ma is kevéssé feltárt. A szakirodalmat átnézve leltünk rá Jechalke és munkatársainak (2013) munkájára, amely során stabil izotópos vizsgálattal tárták fel egy aerob benzol-lebontó mikrobaközösség összetételét. Eredményeik alapján a Zoogloea nemzetség képviselőit benzol-lebontókként lehetett azonosítani. A Buc törzs szénhidrogén-lebontó képességét először egyszerű gravimetriás módszerrel vizsgáltuk meg, amely bizonyította, hogy képes lehet egyes kőolajkomponensek biodegradációjára. Mivel a Buc törzs a Zoogloea nemzetség egy meglehetősen különálló leszármazási vonalát képviselte, új fajként írtuk le és a Zoogloea oleivorans nevet adtuk neki (Farkas és mtsai, 2015).

A stabil izotópos jelölés módszerével a siklósi BTEX szennyezett talajvíz, illeve ez esetben a mintavételi kút alján lévő üledék mikrobaközösségét kíséreltük meg vallatóra fogni és kimutatni azokat a mikroszervezeteket, amelyek mikroaerob körülmények között is képesek a toluol lebontására. Már a kiindulási üledék mikrobaközösségének vizsgálata is újabb

meglepetéssel szolgált, hiszen itt is megtaláltuk a közösségben a Zoogloea oleivoranst és az általa hordozott I.2.C-típusú C23O gént. A stabil C-izotópot (C13) tartalmazó toluollal történő, mikroaerob körülmények közötti inkubációt követően DNS és RNS alapon kíséreltük meg azonosítani azokat a taxonokat, amelyek részt vehettek a lebontásban. A DNS alapú eredmények három taxon szerepét igazolták a folyamatban (Táncsics és mtsai, 2018). A jelölődött DNS jelentős része a Quatrionococcus nemzetséghez tartozott, amelyről nagyon kevés információnk áll rendelkezésre. Tény viszont, hogy a legközelebbi rokona e nemzetségnek a Dechloromonas, amelynek tagjai széles körben elterjedtek BTEXvegyületekkel szennyezett felszín alatti közegekben, és szerepük e vegyületek aerob, illetve anaerob lebontásában nagyon jól ismert (Chakraborty és mtsai, 2005; Salinero és mtsai, 2009). A második taxon a Zoogloea volt, egészen pontosan az általunk leírt Z. oleivorans faj. Ez az eredmény tovább erősítette a feltételezést, hogy az I.2.C-típusú C23O génnel rendelkező mikroszervezetek képesek a monoaromás vegyületek mikroaerob körülmények közötti lebontására. A harmadik taxon pedig az általunk már korábban is kimutatott (Táncsics és mtsai, 2013), máig kitenyésztetlen, Rhodocyclaceae családba tartozó mikroszervezet volt. Ez utóbbi eredmény azért is jelentett nagy örömet számunkra, mert altámasztotta a korábbi, csupán statisztikai összefüggéseken alapuló feltételezésünket, miszerint e baktérium szintén szerepet játszik a BTEX-vegyületek mikroaerob lebontásában (Táncsics és mtsai, 2013). Az I.2.C-típusú C23O gének vizsgálata is megerősítette a Z. oleivorans mikroaerob toluol-lebontó képességét, mivel a hozzá köthető genotípus volt a legabundánsabb a "nehéz" DNS frakcióban. Ugyancsak itt volt döntően kimutatható az a C23O genotípus, amelyet korábban statisztikai úton a kitenyésztetlen Rhodocyclaceae baktériumhoz kötöttünk, tehát a közöttük lévő összefüggés újabb megerősítést nyert. Megfigyelhető volt ugyanakkor, hogy bizonyos I.2.C-típusú C23O genotípusok - kizárólag, vagy döntő részben - de a jelöletlen, tehát "könnyű" DNS frakcióból voltak kimutathatóak. Ez az eredmény azt valószínűsítette, hogy az I.2.C-típusú C230 gén jelenléte önmagában nem elégséges feltétele annak, hogy egy baktériumról a mikroaerob BTEX-lebontás képességét feltételezzük. Az RNS alapú vizsgálatok részben megerősítették a DNS alapú vizsgálatok eredményeit, részben pedig új információval is szolgáltak. A három fő taxon (Quatrionicoccus, Zoogloea, tenyésztésbe nem vont Rhodocyclaceae) mellett újabbakat sikerült azonosítani, amelyek minden bizonnyal részt vettek a toluol mikroaerob körülmények közötti lebontásában, ám talán lassabb növekedésük miatt csak RNS alapon lehetett őket azonosítani. E taxonok voltak a Dechloromonas, illetve az Azonexus (Bradford és mtsai, 2018). Köszönhetően annak a szerencsés körülménynek, hogy a mikrokozmoszainkban a Z. oleivorans nagyon aktív mikroaerob toluol-lebontónak bizonyult, a "nehéz" RNS frakcióból nyert transzkriptómot fel lehetett használni arra, hogy megkíséreljük feltárni a lebontási útvonalat e baktérium esetében. Ehhez első lépésként elvégeztük a típustörzs *Z. oleivorans* Buc^T teljes genom szekvenálását, majd ráillesztettük a transzkriptómból származó szekvenciákat. Ezzel sikerült feltárnunk, hogy az I.2.C-típusú *C230* gén mellett egy hipoxikus körülmények közötti is aktív toluol-dioxigenáz enzim is szerepet játszott a mikroaerob körülmények közötti lebontásban (Táncsics és mtsai, 2020). Ráadásul mindkét gén olyan klaszterekben foglalt helyet a genomban, amelyeket mobilis genetikai elemek fogtak közre, tehát minden bizonnyal horizontális géntranszferek útján kerültek a Buc^T törzs genomjába. Ily módon tehát bizonyítottuk, hogy egyrészt az I.2.C-típusú *C230* gén tényleg előfeltétele a mirkoaerob toluol-lebontás képességének, de az is bizonyítást nyert, hogy nem elégséges feltétele. Mindenképpen szükség van ugyanis olyan enzim közreműködésére is, amely mikroaerob körülmények között is képes az aromás gyűrű aktiválására, jelen esetben hidroxilációjára.

A kutatásaink során már a stabil izotópos vizsgálat eredményei is azt mutatták, hogy nem lehet minden I.2.C-típusú C23O genotípust automatikusan a mikroaerob BTEXlebontáshoz kötni. Ahhoz, hogy ezt a kérdést tovább vizsgáljuk, egyszerű dúsítási kísérleteket végeztünk, amelyek során párhuzamosan próbáltunk aerob és mikroaerob körülmények között szénhidrogén-lebontó baktérium közösségeket feldúsítani, majd feltárni. Ehhez kiindulási mintának biofilm mintát használtunk, amely minden esetben ugyanabból a talajvíz kitermelő kútból származott, mint ahonnan a Z. oleivorans Buc^T törzset is izoláltuk. Vizsgálataink alapján e biofilm mikrobaközösség jelentős I.2.C C23O diverzitással rendelkezett, emiatt esett rá a válsztásunk (Benedek és mtsai, 2016). Első lépésben BTEX-keveréket felhasználva végeztünk aerob, illetve mikroaerob körülmények közötti dúsító tenyésztést. Már ekkor megmutatkozott, hogy más-más I.2.C C23O genotípusok lettek dominánsak az aerob, illetve a mikroaerob dúsítókban. Míg az aerob tenyészetekben a Malikia nemzetség képviselői, és egy ismeretlen C23O genotípus voltak egyeduralkodóak, addig a mikroaerob tenyészetekben az Acidovorax nemzetség képviselői, és a hozzájuk kapcsolható I.2.C C23O genotípus voltak a dominánsak (Benedek és mtsai, 2018). A Malikia nemzetség képviselőit korábban is kimutattuk BTEXszennyezett felszín alatti közegből, mint domináns mikroszervezeteket (Táncsics és mtsai, 2010), ám a szakirodalomban nem találtunk e baktériumok BTEX-lebontó képességéről tudósító közleményt. Annak ellenére azonban, hogy dominánsak voltak e mikroszervezetek az aerob dúsítókban, nem sikerült egyetlen képviselőjüket sem kitenyésztenünk, így feltevésünket, miszerint e baktériumok BTEX-lebontók, és az aerob dúsítókban domináns I.2.C C23O genotípus hozzájuk köthető, nem tudtuk alátámasztani. Ahhoz, hogy a Malikia nemzetség képviselőit ki tudjuk tenyészteni a biofilm mintából, újabb dúsítási kísérletet indítottunk. E második kísérlet során azonban nem BTEX-keveréket, hanem csak benzolt, vagy toluolt adtunk az aerob, illetve mikroaerob dúsító tenyészetekhez, mint egyedüli szénforrást. Ezzel kíséreltük meg csökkenteni a dúsító tenyészetekben kialakuló bakteriális diverzitást, remélve, hogy így nagyobb eséllyel tudjuk kitenyészteni a Malikia nemzetség képviselőit feldúsulásuk esetén. Elgondolásunk sikeres volt, és a benzol-lebontó aerob dúsító tenyészetekben szinte egyeduralkodóvá vált a Malikia spinosa nevű baktérium faj, és két törzsét izolálnunk is sikerült (Révész és mtsai, 2020a). Mindkét törzs ugyanazzal az I.2.C C23O genotípussal rendelkezett, amelyet az előző dúsítási kísérlet során dominánsnak találtunk az aerob dúsító tenyészetekben. A két törzs közül a *M. spinosa* AB6-os jelű törzset vizsgáltuk behatóbban, és azt találtuk, hogy képes a benzol, a toluol és az etilbenzol biodegradációjára. Teljes genomszekvenciájának feltárása rámutatott arra, hogy a faj típustözséhez képest nagyjából 300 Kb-sal nagyobb genommal rendelkezik, és főleg az aromás szénhidrogének lebontásához köthető gének feldúsulása figyelhető meg a genomban. Az I.2.C-típusú C230 gén egy alapvetően fenollebontásban résztvevő klaszterben foglalt helyet, és feltűnő volt, hogy mobilis genetikai elemek fogták közre, tehát minden bizonnyal horizontális géntranszfer útján tett rá szert az AB6-os törzs. E klaszter jelenlétének volt tulajdonítható az AB6-os törzs benzol-, és toluol-lebontó képessége. Ám hiába rendelkezett I.2.C-típusú C23O génnel, mégis csak az aerob dúsító tenyészetekből lehetett e baktériumot kimutatni, ott tudott abundánssá válni. Ez minden bizonnyal annak volt köszönhető, hogy a fenol-hidroxiláz rendszeren kívül nem találtunk a genomban más olyan gént, amely benzol/toluol-mono-, vagy dioxigenázt kódolt volna, így nem rendelkezett olyan enzimmel, amely képes lett volna mikroaerob körülmények között hidroxilálni a benzol, vagy a toluol aromás gyűrűjét. Újra beigazolódott tehát az az okfejtésünk, hogy bár az I.2.C-típusú C23O gének jelentős diverzitással lehetnek jelen BTEX-vegyületekkel szennyezett felszín alatti közegekben, a kimutatott genotípusok nem mindegyike köthető az aromás szennyezők mikroaerob lebontásához, mivel kiegészítő feltételeknek is teljesülniük kell. Ilyen kiegészítő feltétel a megfelelő gyűrűhidroxiláló enzim megléte a genomban. Az I.2.C-típusú C23O gének diverzitását pedig nagymértékben növelheti az a tény, hogy gyakran fordulnak elő olyan gén klaszterekben, amelyeket mobilis genetikai elemek fognak közre, így könnyen terjednek a Burkholderiales rend tagjai között horizontális géntranszfer útján.

Habár sok fontos kérdésre választ kaptunk e két dúsítási kísérlet során, egy újabb, utolsó vizsgálatra szántuk el magunkat. Gyakran érte ugyanis az a kritika a kutatócsoportomat, hogy kizárólag az aromás szénhidrogének biodegradációját vizsgáljuk, miközben például egy gázolajjal történő szennyezést követően az alifás komponensek jóval nagyobb mennyiségben vannak jelen, és azok biodegradációja legalább annyira fontos, mint az aromás komponenseké.

172

Emiatt gondoltuk azt, hogy dúsító tenyésztéses vizsgálatainkat kiterjesztjük kőolaj/gázolaj keverékre is. E harmadik kísérletben arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a hipoxikus körülmények milyen hatással vannak az alifás szénhidrogének lebontásában résztvevő mikrobaközösségek, és a lebontás kulcslépését katalizáló alkán 1-monooxigenáz gének diverzitására. Eredményeink azt mutatták, hogy a kiváló alkán-lebontó Rhodococcus nemzetség elsősorban az aerob dúsító közösségekben tudott abundáns közösségalkotóvá válni, míg mikroaerob körülmények között az Acinetobacter nemzetség képviselői váltak egyeduralkodóvá, és a Rhodococcus nemzetség képviselői meglehetősen visszaszorultak (Révész és mtsai, 2020b). Meg kell még említeni, hogy a mikroaerob dúsító tenyészetekben jelentős abundanciával bírtak olyan Burkholderiales rendbe tartozó nemzetségek, amelyek korábban is főleg a mikroaerob, aromás szénhidrogén-lebontó dúsító tenyészeteinkben voltak jelen (pl. Acidovorax, Variovorax, illetve Simplicispira). Érdekes eredmény volt, hogy az aerob dúsító tenyészetek közül kettőben egy olyan alkán-1 monooxigenáz gén volt a domináns, amelyet nem lehetett ismert baktériumhoz kötni. Metagenom szekvenálással kapott adatok bioinformatikai elemzésével azonban sikerült felépíteni egy még tenyésztésbe nem vont, Moraxellaceae családba tartozó baktérium genomját, amely magában hordozta ezt a gént. Így újgenerációs szekvenálási módszer, illetve bioinformatikai alkalmazások segítségével, tenyésztés nélkül sikerült egy addig ismeretlen alkán-lebontó baktériumot azonosítanunk. Később a metagenom adatok további vizsgálata segített abban is, hogy a szénhidrogénlebontásban közvetlenül részt nem vevő, de abundáns, ugyanakkor tenyésztésbe nem vont mikroszervezeteknek (lásd Saccharibacteria törzsbe tartozó baktériumok) a közösségben betöltött szerepére is rávilágítsunk.

Végére érve e több mint tíz éves munkaszakasznak láthatjuk, hogy az időközben ránk köszöntő metagenomikai éra olyan új utakat nyitott meg előttünk, amelyek lehetővé teszik számunkra, hogy feltárhassuk a mikrobiális sötét anyag, vagy másképpen fogalmazva a tenyésztésbe nem vont többség metabolikus potenciálját is. A kérdések megválaszolásához azonban továbbra is elengedhetetlenül fontosak a laboratóriumi dúsítási kísérletek, amelyek kiváló alapanyagot szolgáltathatnak ehhez az új genomikai, metagenomikai korszakhoz.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

A kőolaj és a kőolajeredetű szénhidrogének a legveszélyesebb és egyben leggyakoribb szennyezők melyekkel környezetünket károsítjuk. A leggyakoribb szennyező iparágak és tevékenységek a kőolajbányászat (fúrótornyok és kutak), kőolaj feldolgozás (finomítók), szállítás (tankerek, csővezetékek), tárolás (tartályparkok) és forgalmazás (töltőállomások), a laktanyák területe, a közlekedés és a műanyaggyártás (petrolkémia). Habár Magyarországon a kőolajkitermelés elenyésző mértékű, a leggyakoribb talaj- és talajvíz szennyezőnek a különböző szénhidrogén vegyületek számítanak. Ide tartoznak az egyszerű aromás vegyületek is, mint a bizonyítottan rákkeltő benzol, illetve a toluol, etilbenzol és a xilolok (összefoglalóan BTEX-vegyületek). Köszönhetően annak, hogy e vegyületek aránylag nagy vízoldékonysággal rendelkeznek, a szennyezés könnyedén terjed a talajvízben, ezáltal veszélyt jelentve a felszín alatti vízkészletekre. Ebből kifolyólag a szennyezett közegek kármentesítése Magyarországon törvényileg kötelező. A kármentesítési eljárások egyik legkörnyezetkímélőbb és egyben legköltséghatékonyabb módja a biológai kármentesítés, vagy másnéven bioremediáció. E folyamat során a mikroszervezetek azon képességét használjuk ki, hogy a szennyezőanyagot képesek az életfolyamataik során lebontani vagy átalakítani. Számos mikroba képes szén- és energiaforrásként hasznosítani a kőolajeredetű szénhidrogéneket, mégpedig elsősorban aerob körülmények között. Emiatt viszont a szennyezett felszín alatti közegben gyorsan megindul a rendelkezésre álló oldott oxigén koncentrációjának csökkenése, végül pedig anaerob viszonyok alakulnak ki. Oxigén hiányában azonban a legtöbb kőolajeredetű szénhidrogén biodegradációja lelassul, aminek következtében például a benzol és a xilolok perzisztens szennyezőkké válhatnak. Ennek köszönhetően a szennyezett felszín alatti közegek kármentesítése során bevett gyakorlat a közeg oxigénnel való ellátása. Kérdésként merül fel ugyanakkor, hogy léteznek-e olyan mikroszervezetek, amelyek mikroaerob körülmények mellett is képesek a szennyezőanyagok teljes lebontására.

A disszertációban bemutatott eredményeknek köszönhetően ma már ismert, hogy a régóta szennyezett, oxigén-limitált talajvizek mikrobaközösségeiben többnyire a Burkholderiales rend tagjai a dominánsak, illetve az elsősorban általuk kódolt, a szennyezőanyagok lebontásában kulcsszerepet játszó katekol dioxigenáz gének mutathatóak ki a legnagyobb diverzitásban. E katekol 2,3-dioxigenáz enzimekről, amelyek az extradiol dioxigenázok I.2.C alcsaládjába tartoznak, feltételezik, hogy alacsony szubsztrát koncentrációhoz adaptálódtak, ennek megfelelően hipoxikus körülmények között is képesek az aromás gyűrű hasítását katalizálni.

174

dc_1786_20

Közel tíz éves kutatómunka segítségével sikerült bizonyítanunk, hogy e feltételezés megállja a BTEX-vegyületekkel szennyezett helyét. Két magyarországi kárhely mélyreható mikrobiológiai vizsgálata során számtalan új I.2.C C23O genotípust azonosítottunk, rámutatva e gén nagyfokú diverzitására a vizsgált közösségekben. Magyarországon elsőként alkalmaztuk a stabil izotópos jelölés (SIP) módszerét mikrobiális ökológiai vizsgálatok során, és segítségével azonosítottunk olyan taxonokat, amelyek képesek voltak a toluol mikroaerob körülmények közötti lebontására, illetve azokat az I.2.C C230 géneket, amelyek szerepet játszhattak e folyamatban. Az azonosított taxonok közül sikerrel izoláltuk a Zoogloea nemzetség egyik új képviselőjét, amelyet Z. oleivorans néven írtunk le. E baktérium teljes genom szekvenciájának feltárása segítségével rekonstruáltuk, hogy hogyan lehet képes a toluol mikroaerob körülmények közötti biodegradációjára. A stabil izotópos jelöléssel végzett kísérletből származó metatranszkriptom adatok segítségével pedig sikerült megerősíteni, hogy a toluol aromás gyűrűjének aktivációját egy toluol-dioxigenáz enzim végzi, míg a gyűrű hasításáért valóban az I.2.C-típusú C23O enzim felelős. E kulcsenzimeket kódoló gének a genomban egymástól távol elhelyezkedő klaszterekben voltak megtalálhatóak, amelyeket ráadásul mobilis genetikai elemek határoltak. Eredményeink rámutattak arra, hogy az I.2.Ctípusú C23O gén megléte nem elegendő feltétele a mikroaerob BTEX-lebontási képességnek. Ezt tovább erősítették mikrokozmosz kísérleteink eredményei, amelyek során bemutattuk, hogy eltérő I.2.C C230 gének válnak dominánssá aerob, illetve mikroaerob körülmények között. Sikerült izolálnunk a Malikia spinosa faj képviselőit (Comamonadaceae család), és teljes genom analízis segítségével magyaráztuk meg azt a jelenséget, hogy bár rendelkezik I.2.C C230 génnel, kizárólag tisztán aerob körülmények között képes egyes aromás vegyületek biodegradációjára.

Eredményeinknek köszönhetően ma már pontosabb képet alkothatunk a kőolajjal, illetve a kőolajeredetű szénhidrogénekkel szennyezett felszín alatti közegek mikrobiális közösségeiről, illetve a közösségalkotó mikroszervezetek szerepéről. Világossá vált, hogy a *Zoogloea* nemzetség képviselői nem csak a kommunális szennyvíztisztítás során játszhatnak fontos ökológiai szerepet, hanem szénhidrogénekkel szennyezett felszín alatti közegekben is. Tudjuk, hogy elsősorban mely taxonok megjelenésére számíthatunk e közegekben mikroaerob körülmények mellett (pl. *Rhodoferax, Acidovorax, Variovorax, Quatrionococcus, Simplicispira, Pseudomonas extremaustralis/veronii, Acinetobacter*), illetve melyek azok, amelyek kizárólag jó oxigénellátottság mellett válnak dominánssá (pl. *Malikia, Rhodococcus, Polaromonas*). A metagenom adatok segítségével felépített teljes bakteriális genomok pedig

175

lehetőséget adtak arra, hogy egyes, a tenyésztésbe nem vont többséghez tartozó mikroszervezetek ökológiai szerepét is tisztázhassuk.

dc_1786_20

VIII. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

16S rRNS / rDNS	a riboszómában található 16s alegységi RNS molekula, ill. az azt kódoló gén
	prokariótákban
alkB	alkán 1-monooxigenáz
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	bázispár
bss	benzilszukcinát-szintáz
bssA	benzilszukcinát-szintáz alfa alegység
BTEX	a benzol, toluol, etilbenzol és xilolok összefoglaló megnevezése
C12O	katekol 1,2-dioxgenáz
C23O	katekol 2,3-dioxigenáz
dNTP	deoxynucleotide triphosphates (dezoxinukleotid trifoszfátok)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EPH	Extractable Petroleum Hydrocarbon (nem illékony szénhidrogének)
FH	fenol hidroxiláz
GC-MS	gázkromatográfhoz kapcsolt tömegspektrométer
HGT	horizontális géntranszfer
OPU	operational protein unit (operatív protein egység)
РАН	poliaromás szénhidrogének
PCR	polymerase chain reaction (polimeráz-láncreakció)
PHA	polihidroxialkanoát
SNuPE	single-nucleotide primer extension
T-nMO	toluol <i>n</i> -monooxigenáz
ТРН	total petroleum hydrocarbons (a szénhidrogének összefoglaló neve
	analitikai kémiai mérésekben)
T-RF	terminal restriction fragment (restrikciós enzimmel hasított darabok
	terminális része)
T-RFLP	terminal restriction fragment-lenght polimorphism (terminális restrikciós
	fragmethossz polimorfizmus)
unc.	uncultured (kitenyésztetlen)
VALPH	Volatile Aliphatic Petroleum Hydrocarbon (illékony alifás
szénhidrogének)	

IX. IRODALOMJEGYZÉK

- Aburto A, Ball AS (2009) Bacterial population dynamics and separation of active degraders by stable isotope probing during benzene degradation in a BTEX-impacted aquifer. Rev Int Contam Ambient 25:147-156.
- Aburto A, Peimbert M (2011) Degradation of a benzene-toluene mixture by hydrocarbonadapted bacterial communities. Ann Microbiol 61:553-562.
- Agrawal A, Gieg LM (2013) *In situ* detection of anaerobic alkane metabolites in subsurface environments. Front Microbiol 4:140.
- Al-Awadhi H, Dashti N, Khanafer M, Al-Mailem D, Ali N, Radwan S (2013) Bias problems in culture-independent analysis of environmental bacterial communities: a representative study on hydrocarbonoclastic bacteria. SpringerPlus 2:369.
- Alfreider A, Vogt C, Babel W (2002) Microbial diversity in an *in situ* reactor system treating monochlorobenzene contaminated groundwater as revealed by 16S ribosomal DNA analysis. Syst Appl Microbiol 25:232-240.
- Atlas RM (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbiological Reviews 45:180-209.
- Axcell BC, Geary PJ (1975) Purification and some properties of a soluble benzene-oxidizing system from a strain of *Pseudomonas*. Biochem J 146:173-183.
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O (2008) The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. BMC Genomics 9:75.
- Balcke GU, Wegener S, Kiesel B, Benndorf D, Schlömann M, Vogt C (2008) Kinetics of chlorobenzene biodegradation under reduced oxygen levels. Biodegradation 19:507-518.
- Bartha R, Atlas RM (1977) The microbiology of aquatic oil spills. Adv Appl Microbiol 22:225-266.
- Benedek T, Szentgyörgyi F, Szabó I, Kriszt B, Révész F, Radó J, Maróti G, Táncsics A (2018) Aerobic and oxygen-limited enrichment of BTEX-degrading biofilm bacteria: dominance of *Malikia* versus *Acidovorax* species. Environ Sci Pollut Res 25:32178-32195.

- Benedek T, Táncsics A, Szabó I, Farkas M, Szoboszlay S, Fábián K, Maróti G, Kriszt B (2016) Polyphasic analysis of an Azoarcus-Leptothrix-dominated bacterial biofilm developed on stainless steel surface in a gasoline-contaminated hypoxic groundwater. Environ Sci Pollut Res 23:9019-9035.
- Bertoni G, Martino M, Galli E, Barbieri P (1998) Analysis of the gene cluster encoding toluene/o-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1. Appl Environ Microbiol 64:3626–3632.
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol 37:911-917.
- Boden R., Hutt LP, Rae AW (2017) Reclassification of *Thiobacullus aquaesulis* (Wood & Kelly, 1995) as *Annwoodia aquaesulis* gen. nov., comb. nov., transfer of *Thiobacillus* (Beijerinck, 1904) from the *Hydrogenophilales* to the *Nitrosomonadales*, proposal of *Hydrogenophilalia* class. nov. within the 'Proteobacteria', and four new families within the orders *Nitrosomonadales* and *Rhodocyclales*". Int J Syst Evol Microbiol 67: 1191–1205.
- Bossert I, Bartha R (1984) The fate of petroleum in soil ecosystems. Petroleum microbiology. Atlas RM, New York, Macmillan Publishing Co. pp 434-476.
- Bradford LM, Vestergaard G, Táncsics A, Zhu B, Schloter M, Lueders T (2018) Transcriptomestable isotope probing provides targeted functional and taxonomic insights into microaerobic pollutant-degrading aquifer microbiota. Front Microbiol 9:2696.
- Brennerova MV, Josefiova J, Brenner V, Pieper DH, 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. Environ Microbiol 11: 2216-2227.
- Brettin T, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Olsen GJ, Olson R, Overbeek R, Parrello B, Pusch GD, Shukla M, Thomason JA, Stevens R, Vonstein V, Wattam AR, Xia F (2015) *RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes.* Sci Rep 5:8365.
- Bruns A, Cypionka H, Overmann J (2002) Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea. Appl Environ Microbiol 68:3978-3987.
- Buchfink B, Xie C, Huson DH (2015) Fast and sensitive protein alignment using Diamond. Nat Methods 12:59-60.

- Buckley DH, Huangyutitham V, Hsu SF, Nelson TA (2007) Stable isotope probing with ¹⁵N₂ reveals novel noncultivated diazotrophs in soil. Appl Environ Microbiol 73:3196-3204.
- Bushnell LD, Haas HF (1941) The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. J Bacteriol 41:653-673
- van Beilen JB, Li Z, Duetz WA, Smits THM, Witholt B (2003) Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. Oil Gas Sci Technol 58:427–440
- van Beilen JB, Wubbolts MG, Witholt B (1994) Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. Biodegradation 5:161–174
- van Beilen JB, Funhoff EG (2007) Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. Appl Microbiol Biotechnol 74: 13-21.
- Cafaro V, Izzo V, Scognamiglio R, Notomista E, Capasso P, et al. (2004) Phenol hydroxylase and toluene/o-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1: interplay between two enzymes. Appl Environ Microbiol 70: 2211–2219.
- Callaghan AV, Davidova IA, Savage-Ashlock K, Parisi VA, Gieg LM, Suflita JM, Kukor JJ, Wawrik B (2010) Diversity of benzyl- and alkylsuccinate synthase genes in hydrocarbon-impacted environments and enrichment cultures. Environ Sci Technol 44:7287-7294.
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL (2009) BLAST+: architecture and applications. BMC Bioinformatics 10:1-9.
- Cashion P, Holder-Franklin MA, McCully J, Franklin M (1977) A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. Anal Biochem 81:461–466.
- Catelani D, Fiecchi A, Galli E (1971) (+)- γ -Carboxymethyl- γ -methyl- Δ^{α} -butenolide. A 1,2-ring –fission product of 4-methylcatechol by *Pseudomonas desmolyticum*. Biochem J 121: 89–92.
- Chakraborty R, Coates JD (2004) Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. Appl Microbiol Biotechnol 64:437-446.
- Chakraborty R, Coates JD (2005) Hydroxylation and carboxylation two crucial steps of anaerobic benzene degradation by *Dechloromonas* strain RCB. Appl Environ Microbiol 71:5427-5432.
- Chakraborty R, O'Connor SM, Chan E, Coates JD (2005) Anaerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene compounds by *Dechloromonas* strain RCB. Appl Environ Microbiol 71:8649-8655.
- Chaudhary DK, Kim J (2018) *Flavobacterium naphthae* sp. nov., isolated from oilcontaminated soil. Int J Syst Evol Microbiol 68:305-309.
- Claus D (1992) A standardized Gram staining procedure. World J Microbiol Biotechnol 8:451–452.
- Coates JD, Chakraborty R, Lack JG, O'Connor SM, Cole KA, Bender KS, Achenbach LA (2001) Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*. Nature 411:1039-1043.
- Collins AJ, Murugkar PP, Dewhirst FE (2019) Complete genome sequence of strain AC001, a novel cultured member of the human oral microbiome from the candidate phylum *Saccharibacteria* (TM7). Micobiol Resour Announc 8: 01158-19.
- Costura RK, Alvarez PJJ (2000) Expression and longevity of toluene dioxygenase in *Pseudomonas putida* F1 induced at different dissolved oxygen concentrations. Water Res 34:3014-3018.
- Cowan ST, Steel KJ (1974). Manual of Identification of Medical Bacteria. Cambridge: University Press.
- Crabtree K, McCoy E (1967). *Zoogloea ramigera* Itzigsohn, identification and description. Int J Syst Bacteriol 17:1—10.
- da Cruz GF, de Vasconcellos SP, Angolini CFF, Dellagnezze BM, Garcia INS, de Oliveira VM, dos Santos Neto EV, Marsaioli AJ (2011) Could petroleum biodegradation be a joint achievement of aerobic and anaerobic microorganisms in deep sea reservoirs? AMB Expr 1:47.
- Czarny J, Staninska-Pięta J, Piotrowska-Cyplik A, Juzwa W, Wolniewicz A, Marecik R, Ławniczak Ł, Chrzanowski Ł (2020) *Acinetobacter* sp. as the key player in diesel oil degrading community exposed to PAHs and heavy metals. J Hazard Mat 383:121168.
- De Ley J, Cattoir H, Reynaerts A (1970) The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. Eur J Biochem 12:133–142.
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. Appl Environ Microbiol 72:5069-5072.
- Dean BJ (1985) Recent findings on the genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols. Mut Res 154:153-181.
- Di Cello F, Pepi M, Baldi F, Fani R (1997) Molecular characterization of an n-alkane-degrading bacterial community and identification of a new species, *Acinetobacter venetianus*. Res Microbiol 148:237-249.

- Dick GJ, Andersson AF, Baker BJ, Simmons SL, Thomas BC, Yelton AP, Banfield JF (2009) Community-wide analysis of microbial genome sequence signatures. Genome Biol 10: R85.
- Duetz WA, de Jong C, Williams PA, van Andel JG (1994) Competition in chemostat culture between Pseudomonas strains that use different pathways for the degradation of toluene. Appl Environ Microbiol 60:2858-2863.
- Dugan PR, Stoner DL, Pickrum HM (1992). The genus *Zoogloea*. In *The Prokaryotes*, 2nd edn., pp. 3952—3964. Edited by Balows A., Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH. New York, Springer.
- Dumont MG, Murrell C (2005) Stable isotope probing linking microbial identity to function. Nat Rev Microbiol 3:499-504.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res 32:1792-1797.
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics 27:2194–2200.
- Eltis LD, Bolin JT (1996) Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases. J Bacteriol 178:5930-5937.
- Eriksson S, Ankner T, Abrahamsson K, Hallbeck T (2005) Propylphenols are metabolites in the anaerobic biodegradation of propylbenzene under iron-reducing conditions. Biodegradation 16:253-263.
- Evans CH (1977) Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments. Nature 270:17-22.
- Evans PJ, Ling W, Goldschmidt B, Ritter ER, Young LY (1992) Metabolites formed during anaerobic transformation of toluene and o-xylene and their proposed relationship to the initial steps of toluene mineralization. Appl Environ Microbiol 58:496-501.
- Evans PJ, Mang DT, Kim KS, Young LY (1991) Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. Appl Environ Microbiol 57:1139-1145.
- Fahy A, Ball AS, Lethbridge G, Timmis KN, McGenity TJ (2008) Isolation of alkali-tolerant benzene-degrading bacteria from a contaminated aquifer. Lett Appl Microbiol 47:60-66.
- Fahy A, McGenity TJ, Timmis KN, Ball AS (2006) Heterogeneous aerobic benzene-degrading communities in oxygen-depleted groundwaters. FEMS Microbiol Ecol 58:260-270.

- Farkas M, Táncsics A, Kriszt B, Benedek T, Tóth EM, Kéki Z, Veres PG, Szoboszlay S (2015) Zoogloea oleivorans sp. nov., a floc-forming, petroleum hydrocarbon-degrading bacterium isolated from biofilm. Int J Syst Evol Microbiol 65:274-279.
- Feist CF, Hegeman GD (1969) Phenol and benzoate metabolism by *Pseudomonas putida*: regulation of tangential pathways. J Bacteriol 100: 869–877.
- Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: maximum likelihood approach. J Mol Evol 17:368-376.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791.
- Finneran KT, Johnsen CV, Lovley DR (2003) *Rhodoferax ferrireducens* sp. nov., a psychrotolerant, facultatively anaerobic bacterium that oxidizes acetate with the reduction of Fe(III). Int J Syst Evol Microbiol 53:669-673.
- Floodgate G (1984) The fate of petroleum in marine ecosystems. Petroleum microbiology. Atlas RM, New York, Macmillan Publishing Co.: 355-398.
- Foght J (2008) Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: pathways and prospects. J Mol Microbiol Biotechnol 15:93-120.
- Francis CA, Francis A.K, Golet D.S, Ward BB (1998) Quantification of catechol 2,3dioxygenase gene homology and benzoate utilization in intertidal sediments. Aquat Microb Ecol 15:225-231.
- Gaines GL 3rd, Smith L, Neidle EL (1996) Novel nuclear magnetic resonance spectroscopy methods demonstrate preferential carbon source utilization by *Acinetobacter calcoaceticus*. J Bacteriol 178:6833-6841.
- Gibson J, Harwood CS (2002) Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. Annual Rev Microbiol 56:345-369.
- Gibson DT, Koch JR, Kallio RE (1968) Oxidative Degradation of Aromatic Hydrocarbons by Microorganisms. I. Enzymatic Formation of Catechol from Benzene. Biochemistry 7: 2653-2662.
- Gibson DT, Parales RE (2000) Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. Curr Opin Biotechnol 11: 236–243.
- Giebler J, Wick LY, Chatzinotas A, Harms H (2013) Alkane-degrading bacteria at the soil-litter interface: comparing isolates with T-RFLP-based community profiles. FEMS Microbiol Ecol 86:45-58.

- Giebler J, Wick LY, Harms H, Chatzinotas A (2014) Evaluating T-RFLP protocols to sensitively analyze the genetic diversity and community changes of soil alkane degrading bacteria. Eur J Soil Biol 65:107-113.
- Haichar FZ, Achouak W, Christen R, Heulin T, Marol C, Marais MF, Mougel C, Ranjard L, Balesdent J, Berge O (2007) Identification of cellulolytic bacteria in soil by stable isotope probing. Environ Microbiol 9:625-634.
- Hamamura N, Olson SH, Ward DM, Inskeep WP (2006) Microbial population dynamics associated with crude-oil biodegradation in diverse soils. Appl Envirol Microbiol 72:6316-6324.
- Hamamura N, Ward DM, Inskeep WP (2013) Effects of petroleum mixture types on soil bacterial population dynamics associated with the biodegradation of hydrocarbons in soil environments. FEMS Microbiol Ecol 85:168-178.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontol Electron 4:1-9.
- Harayama S, Mermod N, Rekik M, Lehrbach PR, Timmis KN (1987) Roles of the divergent branches of the meta-cleavage pathway in the degradation of benzoate and substituted benzoates. J Bacteriol 169: 558–564.
- He X, McLean JS, Edlund A, Yooseph S, Hall AP, Liu SY, Dorrestein PC, Esquenazi E, Hunter RC, Cheng G, Nelson KE, Lux R, Shi W (2015) Cultivation of a human-associated TM7 phylotype reveals a reduced genome and epibiotic parasitic lifestyle. PNAS 112:244-249.
- Hegeman GD (1966) Synthesis of enzymes of mandelate pathways by *Pseudomonas putida*. Synthesis of enzyme by wild type. J Bacteriol 91: 1140–1150.
- Hendrickx B, Junca H, Vosahlova J, Lindner A, Ruegg I, Bucheli-Witschel M, Faber F, Egli T, Mau M, Schlömann M, Brennerova M, Brenner V, Pieper DH, Top EM, 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. J Microbiol Methods 64: 250-265.
- Herrmann S, Kleinsteuber S, Chatzinotas A, Kuppardt S, Lueders T, Richnow HH, Vogt C (2010) Functional characterization of an anaerobic benzene-degrading enrichment culture by DNA stable isotope probing. Environ Microbiol 12:401-411.

- Huang TL, Zhou SL, Zhang HH, Bai SY, He XX, Yang X (2015) Nitrogen removal characteristics of a newly isolated indigenous aerobic denitrifier from oligotrophic drinking water reservoir, *Zoogloea* sp. N299. Int J Mol Sci 16:10038-10060.
- Hug LA, Baker BJ, Anantharaman K et al (2016) A new view of the tree of life. Nat Microbiol 1:16048.
- Hugh R, Leifson E (1953) The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. J Bacteriol 66:24-26.
- Huson DH, Auch AF, Qi J, Schuster SC (2007) MEGAN analysis of metagenomic data. Genome Res 17:377–386.
- Huß VAR, Festl H, Schleifer KH (1983) Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. Syst Appl Microbiol 4:184–192.
- Hyatt D, Chen GL, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ (2010) Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. BMC Bioinformatics 11:119.
- Jechalke S, Franchini AG, Bastida F, Bombach P, Rosell M, Seifert J, von Bergen M, Vogt C, Richnow HH (2013). Analysis of structure, function, and activity of a benzenedegrading microbial community. FEMS Microbiol Ecol 85:14—26.
- Jeon CO, Park W, Ghiorse WC, Madsen EL (2004) *Polaromonas naphthalenivorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from naphthalene-contaminated sediment. Int J Syst Evol Microbiol 54:93-97.
- Jones MD, Crandell DW, Singleton DR, Aitken MD (2011) Stable-isotope probing of the polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterial guild in a contaminated soil. Environ Microbiol 13:2623-2632.
- Jurelevicius D, Alvarez VM, Peixoto R, Rosado AS, Seldin L (2013) The use of combination of alkB primers to better characterize the distribution of alkane-degrading bacteria. PLoS One 8:e66565.
- Kanamori T, Rashid N, Morikawa M, Atomi H, Imanaka T (2002) Oleomonas sagaranensis gen. nov., sp. nov., represents a novel genus in the α-Proteobacteria. FEMS Microbiol Lett 210:255-261.
- Kaplan CW, Kitts CL (2004) Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. Appl Environ Microbiol 70:1777-1786.
- Karwautz C, Lueders T (2014) Impact of Hydraulic Well Restoration on Native Bacterial Communities in Drinking Water Wells. Microbes Environ 29:363-369.

- Kasuga I, Nakajima F, Furumai H (2007) Diversity of catechol 2,3-dioxygenase genes of bacteria responding to dissolved organic matter derived from different sources in a eutrophic lake. FEMS Microbiol Ecol 61:449-458.
- Keil H, Lebens MR, Williams PA (1985) TOL plasmid pWW15 contains two nonhomologous, independently regulated catechol 2,3-oxygenase genes. J Bacteriol 163:248-255.
- Keller HA, Kleinsteuber S, Vogt C (2018) Anaerobic benzene mineralization by nitratereducing and sulfate-reducing microbial consortia enriched from the same site: comparison of community composition and degradation characteristics. Microb Ecol 75:941-953.
- Khanna S, Srivastava AK (2004) Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. Proc Biochem 2:607-619.
- Kiesel B, Balcke GU, Dietrich J, Vogt C, Gexer R (2008) Microbial community shift sas a response to efficient degradation of chlorobenzene under hypoxic conditions. Biodegradation 19:435-446.
- Kim JM, Le NT, Chung BS, Park JH, Bae JW, Madsen EL, Jeon CO (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. Appl Environ Microbiol 74:7313-7320.
- Kim SJ, Park SJ, Jung MY, Kim JG, Madsen EL, Rhee SK (2014) An uncultivated nitratereducing member of the genus *Herminiimonas* degrades toluene. Appl Environ Microbiol 80:3233-3243.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol 16:111-120.
- Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glöckner FO (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and nextgeneration sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Res 41:e1.
- Kloos K, Munch JC, Schloter M (2006) A new method for the detection of alkane monooxygenase homologous genes (*alkB*) in soils based on PCR-hybridization. J Microbiol Methods 66:486-496.
- Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD (2013) Development of a dualindex sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. Appl Environ Microbiol 79:5112–5120.
- Kraiselburd I, Brüls T, Heilmann G, Kaschani F, Kaiser M, MEckentock RU (2019) Metabolic reconstruction of the genome of candidate *Desulfatiglans* TRIP_1 and identification of

key candidate enzymes for anaerobic phenantrene degradation. Environ Microbiol 21:1267-1286.

- Kukor JJ, Olsen RH (1996) Catechol 2,3-dioxygenases functional in oxygen-limited (hypoxic) environments. Appl Environ Microbiol 62:1728–1740.
- Kunapuli U, Lueders T, Meckenstock RU (2007) The use of stable isotope probing to identify key iron-reducing microorganisms involved in anaerobic benzene degradation. ISME J 1:643-653.
- Kunin V, Engelbrektson A, Ochman H, Hugenholtz P (2010) Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. Environ Microbiol 12:118–123.
- Kunze M, Zerlin KF, Retzlaff A, Pohl JO, Schmidt E, Janssen DB, Vilchez-Vargas R, Pieper DH, Reineke W (2009) Degradation of chloroaromatics by *Pseudomonas putida* GJ31: assembled route for chlorobenzene degradation encoded by clusters on plasmid pKW1 and the chromosome. Microbiology 155:4069-4083.
- Kuykendall LD, Roy MA, O'Neill JJ, Devine TE (1988) Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. Int J Syst Bacteriol 38:358-361.
- Lal B, Khanna S (1996) Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*. J Appl Microbiol 81:355-362.
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (Eds.) Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Wiley, New York, pp. 115-147.
- Langmead B, Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods 9:357-359.
- Leahy JG, Batchelor PJ, Morcomb SM (2003) Evolution of the soluble diiron monooxygenases. FEMS Microbiol Rev 27: 449–479.
- Lee K, Gibson DT (1996) Toluene and ethylbenzene oxidation by purified naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816-4. Appl Environ Microbiol 62:3101-3106.
- Lee SH, Jin HM, Lee HJ, Kim JM, Jeon CO (2012) Complete genome sequence of the BTEXdegrading bacterium *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59. J. Bacteriol. 194, 544.
- Lee I, Ouk Kim Y, Park SC, Chun J (2016) OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. Int J Syst Evol Microbiol 66:1100-1103.
- Lee I, Kim YO, Park SC, Chun J (2016) OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. Int J Syst Evol Microbiol 66:1100-1103.

- Lee Y, Lee Y, Jeon CO (2019) Biodegradation of naphthalene, BTEX, and aliphatic hydrocarbons by *Paraburkholderia aromaticivorans* BN5 isolated from petroleum-contaminated soil. Sci Rep 9:860.
- Leuthner B, Leutwein C, Schulz H, Hörth P, Haehnel W, Schiltz E, Schägger, Heider J (1998) Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycyl radical enzyme catalyzing the first step in anaerobic toluene metabolism. Mol Microbiol 28:615-628.
- Li W, Godzik A (2006) Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. Bioinformatics 22:1658-1659.
- Lillis L, Clipson N, Doyle E (2010) Quantification of catechol dioxygenase gene expression in soil during degradation of 2,4-dichlorophenol. FEMS Microbiol Ecol 73: 363-369.
- Lu XM, Lu PZ (2018) Response of microbial communities to pesticide residues in soil restored with *Azolla imbricata*. Appl Microbiol Biotechnol 102:475-484.
- Luo C, Xie S, Sun W, Li X, Cupples AM (2009) Identification of a novel toluene-degrading bacterium from the Candidate Phylum TM7, as determined by DNA stable isotope probing. Appl Environ Microbiol 75:4644-4647.
- Madigan M, Jung DO, Woese CR, Achenbach LA (2000) *Rhodoferax antarcticus* sp. nov., a moderately psychrophilic purple nonsulfur bacterium isolated from an Antarctic mat. Arch Microbiol 173:269-277.
- Manefield M, Whiteley AS, Griffiths RI, Bailey MJ (2002) RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny. Appl Environ Microbiol 68:5367-5373.
- Margesin R, Labbé D, Schinner F, Greer CW, Whyte LG (2003) Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. Appl Environ Microbiol 69:3085-3092.
- Marozava S, Mouttaki H, Müller H, Laban NA, Probst AJ, Meckenstock RU (2018) Anaerobic degradation of 1-methylnaphthalene by a member of the Thermoanaerobacteraceae contained in an iron-reducing enrichment culture. Biodegradation 29:23-39.
- 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. Environ Pollut 162, 345-353.
- Martínez-Lavanchy PM, Chen Z, Lünsmann V, Marin-Cevada V, Vilches-Vargas R, Pieper DH, Reiche N, Kappelmeyer U, Imparato V, Junca H, Nijenhuis I, Müller JA, Kuschk

P, Heipieper HJ (2015) Microbial toluene removal in hypoxic model constructed wetlands occurs predominantly via the ring monooxygentation pathway. Appl Environ Microbiol 81:6241-6252.

- Martínková L, Uhnáková B, Pátek M, Nesvera J, Kren V (2009) Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. Environ Int 35:162-177.
- Mason OU, Hazen TC, Borglin S, Chain PSG, Dubinsky EA, Fortney JL, Han J, Holman HYN, Hultman J, Lamendella R, Mackelprang R, Malfatti S, Tom LM, Tringe SG, Woyke T, Zhou J, Rubin EM, Jansson JK (2012) Metagenome, metatranscritpome and single-cell sequencing reveal microbial response to Deepwater Horizon oil spill. ISME J 6:1715-1727.
- Maszenan AM, Seviour RJ, Patel BK, Schumann P (2002) *Quadricoccus australiensis* gen. nov., sp. nov., a beta-proteobacterium from activated sludge biomass. Int J Syst Evol Microbiol 52:223-228.
- Mattes TE, Alexander AK, Richardson PM, Munk AC, Han CS, Stothard P, Coleman NV (2008) The genome of *Polaromonas* sp. strain JS666: insights into the evolution of a hydrocarbon- and xenobiotic-degrading bacterium, and features of relevance to biotechnology. Appl Environ Microbiol 74:6405-6416.
- Mbadinga SM, Wang LY, Zhou L, Liu JF, Gu JD, Mu BZ (2011) Microbial communities involved in anaerobic degradation of alkanes. Int Biodeter Biodegr 65:1-13.
- Meckenstock RU, Elsner M, Griebler C, Lueders T, Stumpp C, Aamand J, Agathos SN,
 Albrechtsen HJ, Bastiaens L, Bjerg PL, Boon N, Dejonghe W, Huang WE, Schmidt SI,
 Smolders E, Sorensen SR, Springael D, van Breukelen BM (2015) Biodegradation:
 updating the concepts of control for microbial cleanup in contaminated aquifers.
 Environ Sci Technol 49:7073-7081.
- Meckenstock RU, Mouttaki H (2011) Anaerobic degradation of non-substituted aromatic hydrocarbons. Curr Opin Biotechnol 22:406-414.
- Meckenstock RU, von Netzer F, Stumpp C, Lueders T, Himmelberg AM, Hertkorn N, Schmitt-Kopplin P, Harir M, Hosein R, Haque S, Schulze-Makuch D (2014) Oil biodegradation. Water droplets in oil are microhabitats for mirobial life. Science 345:673-676.
- Meckenstock RU, Safinowski M, Griebler C (2004) Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. FEMS Microbiol Ecol 49:27-36.
- Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, Göker M (2013) Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. BMC Bioinformatics 14:60.

- Mesarch MB, Nakatsu CH, Nies L (2000) Development of catechol 2,3-dioxygenase-specific primers for monitoring bioremediation by competitive quantitative PCR. Appl Environ Microbiol 66:678-683.
- Mesarch MB, Nakatsu CH, Nies L (2004) Bench-scale and field-scale evaluation of catechol 2,3-dioxygenase specific primers for monitoring BTX bioremediation. Water Research 38:1281-1288.
- Mesbah M, Premachandran U, Whitman WB (1989). Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. Int J Syst Bacteriol 39:159–167.
- Miller LT (1982) A single derivatization method for bacterial fatty acid methylesters including hydroxyl acids. J Clin Microbiol 16:584-586.
- Mohn WW, Wilson AE, Bicho P, Moore ERB (1999). Physiological and phylogenetic diversity of bacteria growing on resin acids. Syst Appl Microbiol 22:68–78.
- Murugkar PP, Collins AJ, Dewhirst FE (2019) Complete genome sequence of strain PM004, a novel cultured member of the human oral microbiome from the candidate phylum *Saccharibacteria* (TM7). Micobiol Resour Announc 8:01159-19.
- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reactionamplified gene coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 59:695-700.
- Nestler H, Kiesel B, Kaschabek SR, Mau M, Schlömann M, Balcke GU (2007) Biodegradation of chlorobenzene under hypoxic and mixed hypoxic-denitrifying conditions. Biodegradation 18:755-767.
- Nešvera J, Rucká L, Pátek M (2015) Catabolism of phenol and its derivatives in bacteria: genes, their regulation, and use in the biodegradation of toxic pollutants. Adv Appl Microbiol 93:107-160.
- von Netzer F, Kuntze K, Vogt C, Richnow HH, Boll M, Lueders T (2016) Functional gene markers for fumarate-adding and dearomatizing key enzymes in anaerobic aromatic hydrocarbon degradation in terrestrial environments. J Mol Microbiol Biotechnol 26:180-194.
- Newman LM, Wackett LP (1995) Purification and characterization of toluene 2monooxygenase from *Burkholderia cepacia* G4. Biochemistry 34: 14066–14076.
- Ng LC, Shingler V, Sze CC, Poh CL (1994) Cloning and sequences of the first eight genes of the chromosomally encoded (methyl) phenol degradation pathway from *Pseudomonas putida* P35X. Gene 151:29–36.

- Nikolausz M, Chatzinotas A, Táncsics 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. Biochem Soc Trans 37:454-459.
- Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, Pevzner PA (2017) metaSPAdes: a new versatile metagenomics assembler. Genome Res 27:824-834.
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Wagner H (2010) vegan: Community Ecology Package. R package version 1.17-0, available at <u>http://CRAN.R-project.org/package=vegan</u>.
- Olsen RH, Kukor JJ, Kaphammer B (1994) A novel toluene-3-monooxygenase pathway cloned from *Pseudomonas pickettii* PKO1. J Bacteriol 176: 3749–3756.
- Oosterkamp MJ, Veuskens T, Talarico SF, Weelink SAB, Goodwin LA, Daligault HE, Bruce DC, Detter JC, Tapia R, Han CS, Land ML, Hauser LJ, Langehoff AAM, Gerritse J, van Berkel WJH, Pieper DH, Junca H, Smidt H, Schraa G, Davis M (2013) Genome analysis and physiological comparison of *Alicycliphilus denitrificans* strains BC and K601^T. PLoS One 8:e66971.
- Oren A (2019) Aerobic Hydrocarbon-Degrading Archaea. In: McGenity T. (eds) Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, Cham. pp 41-51.
- Orphan VJ, Taylor LT, Hafenbradl D, Delong EF (2000) Culture-dependent and cultureindependent characterization of microbial assemblages associated with hightemperature petroleum reservoirs. Appl Environ Microbiol 66:700-711.
- Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia F, Stevens R (2014) The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). Nucleic Acids Res 42:D206-D2014.
- Papp K, Mau RL, Hayer M, Koch BJ, Hungate BA, Schwartz E (2018) Quantitative stable isotope probing with H₂¹⁸O reveals that most bacterial taxa in soil synthesize new ribosomal RNA. ISME J 12:3043-3045.
- Parales RE, Parales JV, Pelletier DA, Ditty JL (2008) Diversity of microbial toluene degradation pathways. Adv Appl Microbiol 64: 1–73.
- Park M, Jeon Y, Jang HH, Ro HS, Park W, Madsen EL, Jeon CO (2007) Molecular and biochemical characterization of 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase from *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2. Appl Environ Microbiol 73:5146–5152.

- Pérez-de-Mora A, Engel M, Schloter M (2011) Abundance and diversity of *n*-alkane-degrading bacteria in a forest soil co-contaminated with hydrocarbons and metals: a molecular study on *alkB* homologous genes. Microb Ecol 62:959-972.
- Pérez-Pantoja D, González B, Pieper DH (2010) Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons. In: Timmis KN, editor. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Berlin, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 799–837.
- Peterson JA, Kusunose M, Kusunose E, Coon MJ (1967). "Enzymatic omega-oxidation. II. Function of rubredoxin as the electron carrier in omega-hydroxylation". J Biol Chem 242: 4334–40.
- Pham VHT, Kim J, Jeong SW (2014) Enhanced isolation and culture of highly efficient psychrophilic oil-degrading bacteria from oil-contaminated soils in South Korea. J Environ Biol 35:1145-1149.
- Pilloni G, Granitsiotis MS, Engel M, Lueders T (2012) Testing the limits of 454 pyrotag sequencing: reproducibility, quantitative assessment and comparison to T-RFLP fingerprinting of aquifer microbes. PLoS One 7:e40467.
- Pinyakong O, Habe H, Omori T (2003) The unique aromatic catabolic genes in sphingomonads degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). J Gen Appl Microbiol 49:1-19.
- Polz MF, Cavanaugh CM (1998) Bias in template to product ratios in multitemplate PCR. Appl Environ Microbiol 64:3724-3730.
- Powell SM, Bowman JP, Ferguson SH, Snape I (2010) The importance of soil characteristics to the structure of alkane-degrading bacterial communities on sub-Antarctic Macquarie Island. Soil Biol Biochem 42:2012-2021.
- Powlowski J, Shingler V (1994) Genetics and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF600. Biodegradation 5:219–236.
- Price MN, Dehal PS, Arkin AP (2010) FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. PLoS ONE 5:e9490
- Prince RC, Amande TJ, McGenity TJ (2019) Prokaryotic Hydrocarbon Degraders. In: McGenity T (eds) Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, Cham. pp 1-40.
- Prince RC, Gramain A, McGenity TJ (2010) Prokaryotic Hydrocarbon Degraders. In: Timmis KN (eds) Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 1669-1692.

- Probst AJ, Ladd B, Jarett JK et al (2018) Differential depth distribution of microbial function and putative symbionts through sediment-hosted aquifers in the deep terrestrial subsurface. Nat Microbiol 3:328-336.
- Pruesse E, Peplies J, Glöckner FO (2012) SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. Bioinformatics 28:1823-1829.
- Pumphrey GM, Madsen EL (2007) Naphthalene metabolism and growth inhibition by naphthalene in *Polaromonas naphthalenivorans* strain CJ2. Microbiology 153:3730–3738.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and webbased tools. Nucleic Acids Res 41:D590–D596
- Rabus R, Boll M, Heider J, Meckenstock RU, Buckel W, Einsle O, Ermler U, Golding BT, Gunsalus RP, Kroneck PMH, Krüger M, Lueders T, Martins BM, Musat F, Richnow HH, Schink B, Seifert J, Szaleniec M, Treude T, Ullmann GM, Vogt C, Von Bergen M, Wilkes H (2016) Anaerobic microbial degradation of hydrocarbons: from enzymatic reactions to the environment. J Mol Micorbiol Biotechnol 26: 5-28.
- Rabus R, Widdel F (1995) Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. Arch Microbiol 163:96-103.
- Radajewski S, Ineson P, Parekh NR, Murrell JC (2000) Stabel-isotope probing as a tool in microbial ecology. Nature 403:646-649.
- Ratajczak A, Geissdörfer W, Hillen W (1998) Alkane hydroxylase from *Acinetobacter sp.* strain ADp1 is encoded by alkM and belongs to a new family of bacterial integralmembrane hydrocarbon hydroxylases. Appl Environ Microbiol 64:1175-1179.
- Révész F, Farkas M, Kriszt B, Szoboszlay S, Benedek T, Táncsics A (2020a) Effect of oxygen limitation ont he enrichment of bacteria degrading benzene or toluene and the identification of *Malikia spinosa* (Comamonadaceae) as prominent aerobic benzene-, toluene-, and ethylbenzene-degrading bacterium: enrichment, isolation and wholegenome analysis. Environ Sci Pollut Res 27:31130-31142.
- Révész F, Figueroa-Gonzalez PA, Probst AJ, Kriszt B, Banerjee S, Szoboszlay S, Maróti G, Táncsics A (2020b) Microaerobic conditions caused the overwhelming dominance of *Acinetobacter* spp. and the marginalization of *Rhodococcus* spp. in diesel fuel/crude oil mixture-amended enrichment cultures. Arch Microbiol 202:329-342.
- Révész F, Tóth EM, Kriszt B, Bóka K, Benedek T, Sárkány O, Nagy Z, Táncsics A (2018) *Sphingobium aquiterrae* sp. nov., a toluene, meta- and para-xylene-degrading bacterium

isolated from petroleum hydrocarbon contaminated groundwater. Int J Syst Evol Microbiol 68:2807-2812.

- Rojo F (2009) Degradation of alkanes by bacteria. Environ Microbiol 11:2477-2490.
- Rossello-Mora R, Wagner M, Amann R, Schleifer K . (1995). The abundance of *Zoogloea ramigera* in sewage treatment plants. Appl Environ Microbiol 61:702-707.
- Röling WFM, Couto de Brito IR, Swannell RPJ, Head IM (2004) Response of Archaeal communities in beach sediments to spilled oil and bioremediation. Appl Environ Microbiol 70:2614–2620.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4: 406-425.
- Salinero KK, Keller K, Feil WS, Feil H, Trong S, Di Bartolo G, Lapidus A (2009) Metabolic analysis of the soil microbe *Dechloromonas aromatica* str. RCB: indications of a surprisingly complex life-style and cryptic anaerobic pathways for aromatic degradation. BMC Genomics 10:351.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF (2009) Introducing mothur: open-source platform-independent communitysupported software for describing and comparing microbial communities. Appl Environ Microbiol 75:7537–7541.
- Schulze-Makuch D, Wagner D, Kounavas SP et al (2018) Transitory microbial habitat in the hyperarid Atacama Desert. Proc Natl Acad Sci U S A. 115:2670-2675.
- Sei K, Asano K, Tateishi N, Mori K, Ike M, Fujita M (1999) Design of PCR primers and gene probes for the general detection of bacterial populations capable of degrading aromatic comounds via catechol cleavage pathways. J Biosci Bioeng 88:542-550.
- Seifert J, Taubert M, Jehmlich N, Schmidt F, Völker U, Vogt C, Richnow HH, von Bergen M (2012) Protein-based stable isotope probing (protein-SIP) in functional metaproteomics. Mass Spectrom Rev 31:683-697.
- Shanklin J, Whittle E (2003) Evidence linking the *Pseudomonas oleovorans* alkane omegahydroxylase, an integral membrane diiron enzyme, and the fatty acid desaturase family. FEBS Lett 545:188–192
- Shao Y, Chung BS, Lee SS, Park W, Lee SS, Jeon CO (2009). Zoogloea caeni sp. nov., a flocforming bacterium isolated from activated sludge. Int J Syst Evol Microbiol 59:526— 530.

- Shields MS, Montgomery SO, Chapman PJ, Cuskey SM, Pritchard PH (1989) Novel pathway of toluene catabolism in the trichloroethylene-degrading bacterium G4. Appl Environ Microbiol 55: 1624–1629.
- Shingler V, Powlowski J, Marklund U (1992) Nucleotide sequence and functional analysis of the complete phenol/3,4-dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain CF600. J Bacteriol 174: 711–724.
- Shinoda Y, Sakai Y, Uenishi H, Uchihashi Y, Hiraishi A, Yukawa H, Yurimoto H, Kato N (2004) Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera* sp. strain DNT-1. Appl Environ Microbiol 70:1385-1392.
- Smibert RM, Krieg NR (1994). Phenotypic characterization. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*. pp. 607–654. Edited by Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR, Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Solden L, Lloyd K, Wrighton K (2016) The bright side of microbial dark matter: lessons learned from the uncultivated majority. Curr Opin Microbiol 31:217-226.
- Song B, Young LY, Palleroni NJ (1998) Identification of denitrifier strain T1 as *Thauera aromatica* and proposal for emendation of the genus *Thauera* definition. Int J Syst Bacteriol 48:889-894.
- Söhngen NL (1913) Benzin, Petroleum, Paraffinöl und Paraffin als Kohlenstoff- und Energiequelle für Mikroben. Zentr Bacteriol Parasitenk Abt II 37:595–609.
- Smith CJ, Danilowicz BS, Clear AK, Costello FJ, Wilson B, Meijer WG (2005) T-Align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment length polymorphism profiles. FEMS Microbiol Ecol 54:375-380.
- Spring S, Wagner M, Schumann P, Kämpfer P (2005) *Malikia granosa* gen. nov., sp. nov., a novel polyhydroxyalkanoate- and polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge, and reclassification of *Pseudomonas spinosa* as *Malikia spinosa* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol 55:621-629.
- Stagars MH, Ruff SE, Amann R, Knittel K (2016) High diversity of anaerobic alkane-degrading microbial communities in marine seep sediments based on (1-methylalkyl)succinate synthase genes. Front Microbiol 6: 1511.
- Staley JT, Konopka A (1985) Measurements of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestriel habitats. Annu Rev Microbiol 39:321-346.
- Sun W, Cupples AM (2012) Diversity of five anaerobic toluene-degrading microbial communities investigated using stable isotope probing. Appl Environ Microbiol 78:972-980.

- Sun WM, Xie SG, Luo CL, Cupples AM (2010) Direct link between toluene degradation in contaminated-site microcosms and a *Polaromonas* strain. Appl Environ Microbiol 76:956–959.
- Suzek BE, Huang H, McGarvey P, Mazumder R, Wu CH (2007) UniRef: comprehensive and non-redundant UniProt reference clusters. Bioinformatics 23:1282-1288.
- Szoboszlay S, Atzél B, Kukolya J, Tóth EM, Márialigeti K, Schumann P, Kriszt B (2008) *Chryseobacterium hungaricum* sp. nov., isolated from hydrocarbon-contaminated soil. Int J Syst Evol Microbiol 58:2748-2754.
- Szoboszlay S, Kriszt B. (2010) Környezeti elemek védelme. Szent István Egyetemi Kiadó, Gödöllő, 107 p.
- Takei D, Washio K, Morikawa M (2008) Identification of alkane hydroxylase genes in *Rhodococcus* sp. strain TMP2 that degrades a branched alkane. Biotechnology Letters 30: 1447-1452.
- Tamaoka J, Komagata K (1984) Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett* 25:125–128.
- Tani A, Ishige T, Sakai Y, Kato N (2001) Gene structures and regulation of the alkane hydroxylase complex in *Acinetobacter* sp. strain M-1. J Bacteriol 183:1819-1823.
- Tao Y, Fishman A, Bentley WE, Wood TK (2004) Oxidation of benzene to phenol, catechol, and 1,2,3- trihydroxybenzene by toluene 4-monooxygenase of *Pseudomonas mendocina* KR1 and toluene 3-monooxygenase of *Ralstonia pickettii* PKO1. Appl Environ Microbiol 70:3814–3820.
- Táncsics A, Benedek T, Szoboszlay S, Veres PG, Farkas M, Máthé I, Márialigeti K, Kukolya J, Lányi S, Kriszt B (2015) The detection and phylogenetic analysis of the alkane 1-monooxygenase gene of members of the genus *Rhodococcus*. Syst Appl Microbiol 38:1-7.
- Táncsics A, Farkas M, Horváth B, Maróti G, Bradford LM, Lueders T, Kiszt B (2020) Genome analysis provides insights into microaerobic toluene-degradation pathway of *Zoogloea oleivorans* Buc^T. Arch Microbiol 202:421-426.
- Táncsics A, Farkas M, Szoboszlay S, Szabó I, Kukolya J, Vajna B, Kovács B, Benedek T, Kriszt B (2013) One-year monitoring of meta-cleavage dioxygenase gene expression and microbial community dynamics reveals the relevance of subfamily I.2.C extradiol dioxygenases in hypoxic, BTEX-contaminated groundwater. Syst Appl Microbiol 36:339-350.

- Táncsics A, Szabó I, Baka E, Márialigeti K, Révész S (2009) The role of Beta-Proteobacteria in aromatic hydrocarbon degradaton: fingerprinting of 16S rRNA gene and catechgol 2,3-dioxygenase gene by T-RFLP in BTEX degradative bacterial communities. In: Mendez-Vilas, A. (Ed.), Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology: Proceedings of the II International Conference on Environmental, Industrial, and Applied Microbiology (BioMicroWorld2007), World Scientific Publishing Co., Singapore, pp. 664–668.
- Táncsics A, Szabó, I, Baka E, Szoboszlay S, Kukolya J, Kriszt B, Márialigeti K (2010) Investigation of catechol 2,3-dioxygenase and 16S rRNA gene diversity in hypoxic, petroleum hydrocarbon contaminated groundwater. Syst Appl Microbiol 33: 398-406.
- Táncsics A, Szalay AR, Farkas M, Benedek T, Szoboszlay S, Szabó I, Lueders T (2018) Stable isotope probing of hypoxic toluene degradation at the Siklós aquifer reveals prominent role of Rhodocyclaceae. FEMS Microbiol Ecol 94:fiy088.
- Táncsics A, Szoboszlay S, Szabó I, Farkas M, Kovács B, Kukolya J, Mayer Z, Kriszt B (2012) Quantification of subfamily I.2.C catechol 2,3-dioxygenase mRNA transcripts in groundwater samples of an oxygen-limited BTEX-contaminated site. Environ Sci Technol 46:232-240.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA 4: Molecular Ecolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software version 4.0. Mol Biol Evol 24:1596-1599.
- Tarrand JJ, Gröschel DH (1982). Rapid, modified oxidase test for oxidase-variable bacterial isolates. J Clin Microbiol 16:772–774.
- Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, Lomsadze A, Pruitt KD, Borodovsky M, Ostell J (2016) NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. Nucleic Acids Res 44:6614-6624.
- Tierney M, Young LY (2010) Anaerobic degradation of aromatic hydrocarbons. In: Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology, pp 925-934. Edited by Timmis KN. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Tindall BJ (1990a) A comparative study of the lipid composition of *Halobacterium saccharovorum* from various sources. Syst Appl Microbiol 13:128-130.
- Tindall BJ (1990b) Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. FEMS Microbiol Letts 66:199-202.
- Tindall BJ, Rosselló-Móra R, Busse HJ, Ludwig W, Kämpfer P (2010) Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. Int J Syst Evol Microbiol 60:249–266.

- Tindall BJ, Sikorski J, Smibert RM, Kreig NR (2007) Phenotypic characterization and the principles of compaative systematics. In Methods for General and Molecular Microbiology 3rd edn. Pp. 330-393.
- Tribelli PM, Rossi L, Ricardi MM, Gomez-Lozano M, Molin S, Raiger Iustman LJ, Lopez NI (2018) Microaerophilic alkane degradation in *Pseudomonas extremaustralis*: a transcriptomic and physiological approach. J Ind Microbiol Biotechnol 45:15-23.
- Unz R. F. (1984;). Genus IV. Zoogloea Itzigsohn 1868, 30^{AL}. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1, pp. 214—219. Edited by Krieg NR, Holt JG Baltimore: Williams & Wilkins.
- Urata M, Uchida E, Nojiri H, Omori T, Obo R, Miyaura N, Ouchiyama N (2004) Genes involved in aniline degradation by *Delftia acidovorans* strain 7N and its distribution in the natural environment. Biosci Biotechnol Biochem 68:2457-2465.
- Wang W, Zhong R, Shan D, Shao Z (2014) Indigenous oil-degrading bacteria in crude oilcontaminated seaater of the Yellow sea, China. Appl Microbiol Biotechnol 98:7253-7269.
- Weissbrodt DG, Neu TR, Kuhlicke U, Rappaz Y, Holliger C (2013). Assessment of bacterial and structural dynamics in aerobic granular biofilms. Front Microbiol 4:175.
- Whited GM, Gibson DT (1991) Toluene-4-monooxygenase, a three-component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to p-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1. J Bacteriol 173: 3010–3016.
- Whyte LG, Smits THM, Labbé D, Witholt B, Greer CW, and van Beilen JB (2002) Cloning and Characterization of Multiple Alkane Hydroxylase Systems in *Rhodococcus* spp. Strains Q15 and 16531. Appl Environ Microbiol 68:5933-5942.
- Wiedemeier TH, Rifai HS, Newell CJ, Wilson JT (1999) Natural attenuation of fuels and chlorinated solvents in the subsurface. New York, Wiley.
- Winsley TJ, Snape I, McKinlay, Stark J, van Dorst JM, Ji M, Ferari BC, Siciliano SD (2014) The ecological controls ont he prevalence of candidate division TM7 in polar regions. Front Microbiol 5:345.
- Xie S, Sun W, Luo C, Cupples AM (2011) Novel aerobic benzene degrading microorganisms identified in three soils by stable isotope probing. Biodegradation 22:71-81.
- Xie CH, Yokota A (2006). *Zoogloea oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from rice paddy soil, and reclassification of the strain ATCC 19623 as *Crabtreella saccharophila* gen. nov., sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 56:619–624.

- Xu L, Dong Z, Fang L, Luo Y, Wei Z, Guo H, Zhang G, Gu YQ, Coleman-Derr D, Xia Q, Wang Y (2019) ORthoVenn2: a web server for whole-genome comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. Nucleic Acid Res 47:W52-W58.
- Yakimov MM, Timmis KN, Golyshin PN (2007) Obligate oil-degrading marine bacteria. Curr Opin Biotechnol 18:257-266.
- Yeh WK, Gibson DT, Liu TN (1977) Toluene dioxygenase: a multicomponent enzyme system. Biochem Biophys Res Commun 78:401-410.
- Young LY, Phelps CD (2005) Metabolic biomarkers for monitoring in situ anaerobic hydrocaebon degradation. Environ Health Perspect 113:62-67.
- Yu Z, Mohn WW (2002) Bioaugmentation with the resin acid-degrading bacterium *Zoogloea resiniphila* DhA-35 to counteract pH stress in an aerated lagoon treating pulp and paper mill effluent. Water Res 36:2793-2801.
- Zampolli J, Zeaiter Z, Di Canito A, Di Gennaro P (2019) Genome analysis and –omics approaches provide new insights into the biodegradation potential of *Rhodococcus*. Appl Microbiol Biotechnol 103:1069-1080.
- Zhang L, Lueders T (2017) Micropredator niche differentiation between bulk soil and rhizosphere of an agricultural soil depends on bacterial prey. FEMS Microbiol Ecol 93:fix103.
- Zhan T, Tremblay PL, Chaurasia AK, Smith JA, Bain TS, Lovley DR (2013) Anaerobic benzene oxidation via phenol in *Geobacter metallireducens*. Appl Environ Microbiol 79:7800-7806.
- 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. Bioresour Technol 143:439—446.
- Zhao L, Ma T, Gao M, Gao P, Cao M, Zhu X, Li G (2012) Characterization of microbial diversity and community in water flooding oil reservoirs in China. W J Microbiol Biotechnol 28:3039-3052.
- Zhou NY, Fuenmayor SL, Williams PA (2001) nag Genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. J Bacteriol 183:700–708.
- ZoBell CE (1946) Action of microorganisms on hydrocarbons. Bacteriol Rev 10:1-49.
- ZoBell CE (1963) The occurrence, effects and fate of oil polluting the sea. Int J Air Water Poll 7:173-198.