



Szent István Egyetem

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Monoaromás szénhidrogének mikrobiális lebontása
oxigénlimitált közegekben

Farkas Milán

Gödöllő

2017

A doktori iskola

Megnevezése: Környezettudományi Doktori Iskola

Tudományága: Környezettudomány

Vezetője: Csákiné Dr. Michéli Erika
Tanszékvezető, egyetemi tanár
Szent István Egyetem
Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar
Környezettudományi Intézet
Talajtani és Agrokémiai Tanszék

Témavezetők: Dr. Táncsics András
Tudományos főmunkatárs
Szent István Egyetem
Regionális Egyetemi Tudásközpont

Dr. Szoboszlai Sándor
Egyetemi docens
Szent István Egyetem
Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet
Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszék

.....

Az iskolavezető jóváhagyása

.....

A témavezetők jóváhagyása

Tartalom

1.	A munka előzményei, a kitűzött célok.....	4
2.	Anyag és módszer	5
2.1	Hipoxikus talajvíz mikrobaközösségének hosszútávú monitoringja.....	5
2.2	A stabil C izotópot tartalmazó toluol biodegradációs vizsgálatának körülményei.....	6
2.3	Vasredukáló mikroorganizmusok dúsításának körülményei.....	7
3.	Eredmények	10
3.1	A siklósi BTEX-vegyületekkel szennyezett, hipoxikus talajvíz mikrobaközösségének hosszútávú monitoringja	10
3.2	A siklósi mikrobaközösség stabil izotópos toluol lebontó vizsgálata hipoxikus körülmények között	12
3.3	Vasredukáló mikroorganizmusok dúsítása a siklósi, BTEX-vegyületekkel szennyezett kárhelyről.....	15
3.4	Az új baktériumfaj -Zoogloea oleivorans sp nov.- leírásának bemutatása... ..	16
4.	Következtetések és a javaslatok.....	17
5.	Irodalomjegyzék.....	19
6.	Az értekezés témaköréhez kapcsolódó publikációk	25

1. A munka előzményei, a kitűzött célok

Egyes előrejelzések szerint napjainkra elértük az olajkitermelés csúcsát, valószínű, hogy a szárazföldön már nem fognak újabb óriásmezőket feltárni. Azonban a kitermelés, feldolgozás radikális csökkenése még évtizedeket várthat magára, és amíg kőolaj van, addig az általa okozott szennyezésekkel is számolnunk kell. A legtöbb környezeti szennyezést, akárcsak a világon, hazánkban is a kőolajszármazékok okozzák. A kőolaj és származékai számos olyan komponenst tartalmaznak, amelyek károsak az emberi egészségre, karcinogén, teratogén és mutagén hatásúak lehetnek.

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

Ennek megfelelően célul tűztük ki:

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

2. Anyag és módszer

Célkitűzéseinknek megfelelően három különböző vizsgálatot, kísérletet hajtottunk végre. Az első során egy BTEX-vegyületekkel szennyezett, korábbi munkáink alapján jól ismert, hipoxikus talajvíz mikrobaközösségét és az aromás szénhidrogének bontásában szerepet játszó extradiol dioxigenáz funkciógéneket monitoroztuk 13 hónapon keresztül havi rendszerességgel. Ezt követően oxigénlimitált, stabil izotópos dúsító tenyészetekkel azonosítottuk a toluol hipoxikus biodegradációjában részt vevő mikroorganizmusokat. Végül pedig anaerob mikrokozmosz kísérleteket állítottunk össze, hogy egyes feltételezett, fakultatív anaerob lebontó mikroszervezeteket feldúsítsuk a közösségből. A doktori munka alatt a kísérleti mintákból és egyéb kárhelyekről is folyamatosan próbáltunk klasszikus mikrobiológiai módszerekkel olyan törzseket izolálni, amelyek rendelkeznek az aromás szénhidrogének hipoxikus bontásáért felelős enzimekkel.

2.1 Hipoxikus talajvíz mikrobaközösségének hosszútávú monitoringja

A kutatás céljára kiválasztott siklósi kárhelyen a szennyezést egy korábbi benzinkút földalatti tárolótartályainak a szivárgása okozta. Az általunk vizsgált talajvízminták a terület monitoring rendszerének ST2-es jelű kútjából származtak, amely a szennyezési csóva közepén helyezkedik el. Az oldott oxigén koncentráció, redox potenciál, pH és hőmérséklet értékeket HANNA HI 9828 (HANNA Instruments®, USA) készülék helyszíni alkalmazásával állapítottuk meg. Az egyéb vízkémiai paraméterek és szennyezőanyag koncentrációk meghatározását a Wessling Hungary Kft. végezte.

Az éves monitoring során a területről havi rendszerességgel mintát vettünk, majd abból RNS-t izoláltunk. Az RNS-ből a további vizsgálatokhoz reverz transzkriptáz enzim segítségével cDNS-t készítettünk.

Az extradiol dioxigenáz gének aktivitásának vizsgálata során a *Pseudomonas* nemzetséghez köthető I.2.A, valamint a nagy részben *Sphingomonasokhoz* köthető I.2.B alcsaládba tartozó katekol 2,3-dioxigenáz (C23O) enzimeket kódoló gének kimutatására a XYLE1 és XYLE2 forward és reverz primereket (Hendrickx et al., 2006) használtuk. Az I.2.C alcsalád kimutatására az NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázisában fellelhető funkciógén szekvenciák alapján egy új degenerált, "XYLE3" nevű primerpár terveztünk. Mivel az etil-benzol volt az egyik legfőbb szennyezőanyag az általunk vizsgált kárhelyen ezért a Brennerova és munkatársai (2009) által leírt 3-izopropilkatekol (3-IPC) 2,3-dioxigenáz gének expresszióját is vizsgáltuk, ehhez az általuk fejlesztett EXDO-K2 primerpárt használtuk.

A 16S rDNS szakaszok amplifikációja a klónkönyvtárakhoz a 27f (Lane 1991) és 519r (Turner et al. 1999) primerekkel történt, a T-RFLP esetében a forward primernél VIC fluoreszcens jelölést alkalmaztunk. A molekuláris ujjlenyomatok elkészítéséhez RsaI (GT↓AC) enzimet (Thermo Scientific) alkalmaztunk. A 16S rDNS klónkönyvtárak során több mint 100, a funkciógén könyvtárak esetén 48-48 klónt szekvenáltunk meg. A klónkönyvtárak 6 különböző I.2.C alcsaládba tartozó katekol 2,3-dioxigenáz csoport jelenlétét mutatták ki. E gének havi expressziós dinamikájának feltárásához a SNUPE (Single Nucleotid Primer Extension- differenciált dideoxi primerhosszabítás) ujjlenyomat módszert alkalmaztunk. Végül a 16S rDNS T-RFLP és I.2.C C23O SNUPE adatok közti összefüggéseket főkomponens analízissel vizsgáltuk.

2.2 A stabil C izotópot tartalmazó toluol biodegradációs vizsgálatának körülményei

A siklósi mintaterület ST2-es kútjából 2015 áprilisában vettünk üledékben gazdag talajvíz mintát. A kísérlet során összesen 15 darab, három-három párhuzamos mikrokozmoszt állítottunk be 100 ml-es szérüművegekben. 5-5 g

nedves tömegű homogén üledékhez 50 ml nátrium-hidrogénkarbonát alapú mesterséges talajvíz tápoldatot mértünk, melyet cAMP, vitamin és ásványi tápanyag törzsoldatokkal egészítettünk ki (Winderl et al. 2010, Bruns et al. 2002). A mikrokozmoszokban az oxigén koncentrációját 0,5 mg/l-re állítottuk be és mindvégig 0,5 és 0 mg/L között tartottuk. Hat-hat mikrokozmoszhoz 5 µl jelöletlen ($^{12}\text{C}_7$), illetve minden szénatomon izotóposan jelölt ($^{13}\text{C}_7$) toluolt (Sigma-Aldrich)adtunk. További három mikrokozmoszhoz, melyek autoklávozás után abiotikus kontrollként szolgáltak szintén 5 µl jelöletlen toluolt mértünk.

Ahogy azt vártuk, a toluol gyors biodegradációja volt megfigyelhető a biotikus mikrokozmoszokban. Hogy elkerüljük a másodlagos metabolitokkal táplálkozó baktériumok felszaporodását a harmadik és a hetedik napon a dúsító tenyészetek DNS-ét kinyertük, majd cézium-kloridos ultracentrifugálásnak vetettük alá (180 000 g, ~68 h). A cézium-kloridos gradiensekből tizenkét DNS frakciót izoláltunk vissza a „nehéztől” a „könnyűig”. Különböző mennyiségi és minőségi ellenőrzések után a grádiensekből nyolc-nyolc frakció 16S rDNS T-RFLP mintázatát készítettük el FAM fluoreszcensen jelölt Ba27F és 907R primerekkel (Muyzer és Smalla 1998), valamint *RsaI* enzimmel. A 16S rDNS amplikon pirosekvenálást három frakció (könnyű, közepes és nehéz) esetében, mindkét mintavételi ponton (3. és 7. nap), valamint a kiindulási minta esetében is elvégeztük. A pirosekvenálásra kiválasztott mintákból katekol 2,3-dioxigenáz funkciógén klónkönyvtárakat is készítettünk XYLE3F/XYLE3R primerek segítségével.

2.3 Vasredukáló mikroorganizmusok dúsításának körülményei

Eredményeink alapján a szennyezési csóvában többek között egy, a *Rhodofera* nemzetséghez köthető, feltehetően fakultatív anaerob baktérium változó dominanciáját tudtuk kimutatni. A statisztikai elemzések szerint e

mikroszervezet szerepet játszhat a BTEX-vegyületek lebontásában. Ezen felül a folyamatos monitoring tevékenység során 2013-tól a területen a *Geobacter* nemzetség jelenlétét is detektáltuk. Ahhoz, hogy e mikroorganizmusok szerepét tisztázhassuk vas(III)-redukáló mikrokozmoszokat hoztunk létre. A kiindulási talajvíz mintát a már előzőekben bemutatott siklói terület ST2-es kútjából vettük. A mintavételi üveget hermetikusan lezártuk és sötétben 15°C-on 2 hétig inkubáltuk, hogy a nitrát fogyasztását elősegítsük a dúsító tenyészetek elkészítése előtt.

Mivel az elsődleges cél a *Rhodospirillum rubrum* nemzetség egyes fajainak feldúsítása volt, ezért alapvetően a bíbor nemkén baktériumok izolálására használt szakmai útmutatásokat próbáltuk követni. Négy különböző, foszfát puffer alapú, acetátot tartalmazó minimál tápoldatot állítottunk össze eltérő nitrogénforrással. A táplevesek I. típusában 0,05% (w/v) élesztőkivonatot és NH₄Cl-ot (1 g/L) alkalmaztunk; a II. típusában kizárólag élesztőkivonatot; a III. típusában kizárólag NH₄Cl-ot, míg a IV. típusból hiányzott mind az élesztőkivonat mind a fix nitrogén forma. Az oldatokhoz 5 mM Fe(III)NTA (nitrilo-triacetsav-vas(III)) komplexet adtunk, biztosítva a szükséges elektron akceptor megfelelő koncentrációját. A dúsító tenyészeteket öt héten keresztül hetente átoltottuk, majd végül a baktériumokkal teli tápoldatokat lecentrifugáltuk és DNS-t izoláltunk belőlük. A kiindulási minta, valamint a dúsító tenyészetek mikrobaközösségét T-RFLP módszerrel *FspBI* enzim segítségével (C↓TAG) és 16S rRNS klónkönyvtárakkal (~50-50 klón) tártuk fel.

Hogy pontosabb képet kapjunk a kiindulási minta mikrobiális összetételéről azt Ion Torrent PGM platform (Life Technologies) segítségével is vizsgáltuk.

Az egyes baktériumcsoportok jelenléte és a tápoldatok összetétele közötti összefüggések feltárását kanonikus korrelációelemzéssel végeztük. Az I.2.C típusú katekol 2,3-dioxigenázok jelenlétét a XYLE3F/XYLE3R primerekkel vizsgáltuk. A benzil szukcinát szintáz (*bssA*) funkciógének kimutatásához, majd

a klónkönyvtárak készítéséhez a Winderl és munkatársai (2007) által tervezett 7772F és 8546R primereket alkalmaztuk.

3. Eredmények

3.1 A siklói BTEX-vegyületekkel szennyezett, hipoxikus talajvíz mikrobaközösségének hosszútávú monitoringja

Az általunk vizsgált talajvizet a Bétaproteobaktériumok, elsősorban a *Rhodoferax*, *Azoarcus* és egy ismeretlen Rhodocyclaceae családba tartozó genusz tagjai dominálták. Az éves monitoring alatt jelentős dominanciabeli változásokat figyeltünk meg a fent említett mikrobacsoportok között. E változások háttérben valószínűleg, a talajvíz sekély mivoltából fakadóan, a külső környezeti paraméterek változása állhatott.

Az eredményeinkhez hasonlóan más kutatások is igazolták a Bétaproteobaktériumok gyakoriságát az oxigénlimitált, aromás szénhidrogénnel szennyezett talajvizekben (Fahy et al. 2006, Martin et al. 2012, Nestler et al. 2007, Tánicsics et al. 2010). Számos Rhodocyclaceae családba sorolt baktériumról már jól ismert, hogy képes az aromás szénhidrogének bontására nitrátredukáló körülmények között (Anders et al. 1995, Song et al. 1999, 2001, Zhou et al. 1995). A Comamonadaceae családban a *Rhodoferax* és azzal közeli rokon mikroszervezetek e képességét csak a közelmúlt vizsgálatai valószínűsítik (Martin et al. 2012, Aburto és Peimbert 2011). Az általunk kimutatott *Rhodoferax* klónok 100%-os 16S rRNS hasonlóságot mutattak a szintén BTEX-vegyületekkel szennyezett és oxigénlimitált angliai SIREn kárhelyről (Fahy et al. 2006), és 99,7–100% homológiát a szintén szénhidrogén kontaminált németországi Zeitz kárhelyről (Alfreider és Vogt 2007) azonosított klónokkal.

A Rhodocyclaceae családba tartozó *Azoarcus* klónok legtöbbje 100%-os 16S rRNS gén hasonlóságot mutatott a nitrátredukáló körülmények között etil- és a propil-benzol bontására képes *Azoarcus* sp. PbN1-el, ahogy ezt egy korábbi vizsgálatunkban is tapasztaltuk (Tánicsics et al. 2012). A szintén

Rhodocyclaceae családba sorolt és a monitoring időszak végén dominánssá váló klón az *Uliginosibacterium* nemzetséggel mutatta a legnagyobb hasonlóságot. Továbbá e klónok azonosak voltak számos környezeti szekvenciával, mint például a Casper kárhelyen (WY, USA) Callaghan és munkatársai által (2010), vagy a Düsseldorf-Flingern területen (Németország) Pilloni és munkatársai által kimutatott szekvenciákkal (2011).

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

A meta gyűrűhasítási útvonal dioxigenáz gényeinek átíródását monitorozva azt tapasztaltuk, hogy az I.2.C C23O és 3-IPC 2,3-dioxigenáz gének expressziója folyamatos volt. Az újonnan tervezett XYLE3 nevű degenerált primer szett az I.2.C alcsaládba tartozó C23O gének széles skáláját volt képes amplifikálni a PCR során, még ezidáig ismeretlen, kitenyésztett baktériumokhoz nem köthető típusokat is. Az eredményeink alapján a Brennerova és munkatársai (2009) által leírt 3-IPC 2,3-dioxigenáz gének is széleskörűen elterjedtek a BTEX-vegyületekkel szennyezett talajvizekben. Ezenfelül, tudunk szerint ez volt az első alkalom, hogy e funkciógének mRNS transzkriptumait kimutatták környezeti mintákból. Az I.2.A alcsaládba tartozó C23O gének aktivitását vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy egy TOL plazmidon hordozott két homológ C23O gén jelenléte valószínűsíthető a közösségben.

Mivel az I.2.C alcsaládba tartozó C23O gének nagy diverzitását és eltérő expresszióját tapasztaltuk a klónkönyvtárak alapján, SNUPE próbákat terveztünk az egyes klaszterekre, hogy a gének átíródását feltárhassuk az egész monitoring időszak alatt. A B és C klaszter aktivitása folyamatosan kimutatható volt, így

ezen C23O gének és az általuk kódolt enzimek szerepe a BTEX-vegyületek lebontásában valószínűsíthető. Eredményeink alapján a B klaszter jelenléte valószínűleg a Rhodocyclaceae családba tartozó ezidáig ismeretlen baktériumhoz, míg a C klaszteré a szintén ismeretlen *Rhodoferax* (Comamonadaceae) fajhoz köthető.

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

3.2 A siklói mikrobaközösség stabil izotópos toluol lebontó vizsgálata hipoxikus körülmények között

Noha a siklói kárhely baktériumközösségét és az I.2.C alcsaládba tartozó katekol 2,3-dioxigenáz funkciógének diverzitását már több esetben is megpróbáltuk feltárni (Táncsics et al. 2012, 2013), a degradációban való részvételük még továbbra is kérdéses volt számunkra. Hogy minden kételyt kizáróan igazolhassuk az egyes funkciógének, valamint baktériumfajok aktivitását oxigénlimitált körülmények között, stabil izotópos toluol bontási kísérletet állítottunk össze. A mikrokozmoszok közösségét két időpontban vizsgálva a 16S rDNS amplikon piroszekvenálás a Rhodocyclaceae családba tartozó baktériumok dominanciáját mutatta ki a nehéz frakciókban. Elsősorban egy *Quatrionicoccus* rokon baktériumfajt azonosítottunk, mint legfőbb mikroaerob toluol lebontó mikroszervezetet. A nemzetségben egyetlen baktériumfajt találhatunk, a szigorúan aerob, Gram-negatív coccus *Q. australiensis*, melyet egy eleveniszapos szennyvíztisztító rendszerből izoláltak (Maszenan et al. 2002). Sajnos a típustörzs szénhidrogén bontó képességéről

nincsenek információk, valamint a leíróktól és az általuk megjelölt törzsgyűjteményekből a faj nem beszerezhető.

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

Egy ezidáig ismeretlen *Rhodocyclaceae* rokon baktériumot szintén magas arányban tudunk kimutatni a nehéz frakcióból. E faj a legközelebbi rokonságot (~93%-os 16S rDNS hasonlóság) *Uliginosibacterium gangwonense*-vel mutatta és úgy tűnik széleskörűen elterjedt a szénhidrogénekkal szennyezett felszín alatti közegekben. A mikroorganizmus jelenlétét az egyéves monitoring időszak alatt is kimutattuk és statisztikai elemzéseink alapján valószínűsítettük, hogy rendelkezhet I.2.C típusú katekol 2,3-dioxigenázzal. Az, hogy ez a funkciógén genotípus (B klaszter) jelen dúsításunk során a második legabundánsabbnak mutatkozott a nehéz DNS frakcióban szintén alátámasztja korábbi feltevésünket. Az ultracentrifugálás után egy-egy köztes frakciót is tudunk detektálni. E frakciók elkülönülését egy a *Rhodoferax ferrireducens*-szel 96%-os 16S rDNS homológiát mutató baktérium jelenléte okozta. A mikroorganizmust mi és mások is gyakran mutatták ki anaerob vagy oxigénlimitált szénhidrogénekkal szennyezett kárhelyekről (Callaghan et al. 2010, Táncsics et al. 2010, Táncsics et al. 2013, Larentis et al. 2013, Tischer et al. 2013). Annak ellenére, hogy a

mikroszervezet nem jelölődött olyan mértékben, mint a korábban említett baktériumok, valószínűsíthető, hogy szerepet játszik a toluol mikroaerob lebontásában.

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

Szintén meglepő módon a jelöletlen frakcióban detektáltuk a *Pseudoxanthomonas spadix* baktériumfajt és a hozzá köthető katekol dioxigenáz géneket, e mikroorganizmus genomjában három különböző I.2. C típusú C23O funkciógen is kódolt (Kim et al., 2008; Lee et al. 2012).

A könnyű DNS frakciókban leginkább domináns katekol 2,3-dioxigenáz genotípus (802 bp T-RF) a legnagyobb hasonlóságot egy Brennerova és munkatársai (2009) által kimutatott metagenom klónnal mutatta. A kutatásuk során megállapították, hogy a funkciógen által kódolt enzim a toluol aerob degradációja során keletkező 3-metilcatekol köztitermékének bontásában játszik szerepet. Ennek ellenére az ezt a típust hordozó baktérium nem vett részt a mikrokozmoszainkban a toluol biodegradációjában. Ennek egy magyarázata lehet, hogy esetleg ezen ismeretlen baktériumok oxigénlimitált körülmények között inkább nitrátot használnak elektron akceptorként és a minimális mennyiségű oxigént csak a gyűrű hasításához használják fel (Wilson et al. 1997). Mivel a mikrokozmoszokhoz nem adtunk nitrátot és a vizsgált talajvíz

alapvetően nitrátszegény volt, ezért az ilyen módon metabolizáló baktériumok inaktívak maradhattak a kísérlet alatt.

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

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

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

Új tudományos eredmény (III. tézis): Sikerült olyan dúsítási körülményeket létrehozni, melyek alkalmasak voltak az általunk vizsgált közegből különböző *Geobacter* fajok feldúsítására. Igazoltuk, hogy a *Geobacter* populáció nem játszik szignifikáns szerepet a siklói kárhelyen a toluol anaerob biodegradációjában.

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

A doktori munkám során a kísérleti mintákból és egyéb kárhelyekről is folyamatosan próbáltunk olyan baktériumtörzseket izolálni, amelyek rendelkeznek a BTEX vegyületek hipoxikus bontásáért felelős enzimekkel. Egy esetben sikerült egy ezidáig ismeretlen *Zoogloea* nemzetségbe tartozó baktériumfajt izolálnunk, mely rendelkezik a I.2.C alcsaládba tartozó katekol 2,3 dioxigenáz enzimtípussal.

Elvégeztük az új faj nemzetközi követelményeknek megfelelő leírását, mely során a mikroorganizmusnak a *Zoogloea oleivorans* nevet adtuk.

Új tudományos eredmény (IV tézis): Sikerült egy ezidáig ismeretlen *Zoogloea* baktériumfajt izolálnunk, mely rendelkezik az I.2.C alcsaládba tartozó katekol 2,3 dioxigenáz enzimtípussal. Elvégeztük az új faj nemzetközi követelményeknek megfelelő leírását, mely során a mikroorganizmusnak a *Zoogloea oleivorans* nevet adtuk.

4. Következtetések és a javaslatok.

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

nitrátot használnak elektron akceptorként és a minimális mennyiségű oxigént csak a gyűrű hasításához használják fel. Tovább árnyalja a képet azonban az, hogy a *Pseudoxantomonas spadix*-hoz tartozó genotípus aktivitását, ha kis arányban is, de a hosszútávú monitoring alatt ki tudtuk mutatni.

A *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó mikroorganizmusok szerepe sem egyértelmű a hipoxikus közegekben. Sok esetben a közösségben igen jelentős arányban (~10%) voltak jelen e baktériumok és a 2010. májusi-júniusi mintákban a hozzájuk köthető C23O funkciógének aktivitását is ki tudtuk mutatni, azonban a stabil izotópos kísérletek során a genusz tagjainak DNS-ét a könnyű frakcióban detektáltuk. Igaz ebben az esetben a nemzetséghez köthető I.2.C típusú katekol 2,3 dioxigenáz genotípusokat sem tudtunk kimutatni. Látható tehát, hogy az I.2. C típusú katekol 2,3-dioxigenázok megléte szükségesnek tűnik a BTEX vegyületek mikroaerob lebontásában, azonban az enzim és az őt hordozó baktérium szerepvállalása az adott közösségben számos más környezeti tényezőtől is függ.

5. Irodalomjegyzék

- Aburto A., Peimbert M. (2011) Degradation of a benzene-toluene mixture by hydrocarbon-adapted bacterial communities. *Annals of Microbiology* 61: 553–562
- Alfreider A., Vogt C. (2007) Bacterial diversity and aerobic biodegradation potential in a BTEX-contaminated aquifer. *Water Air and Soil Pollution* 183:415–426
- Anders H. J., Kaetzke A., Kampfer P., Ludwig W., Fuchs G. (1995) Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying *Pseudomonad* strains K 172 and Kb 740 and their description as new members of the genera *Thauera* ,as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus* ,as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45:327–333
- Barótfi I. (2000) Környezettechnika, Mezőgazda kiadó, Budapest, 981 p., 571-580 p.
- Brennerova M.V., Josefiova J., Brenner V., Pieper D.H., Junca H. (2009) Metagenomics reveals diversity and abundance of meta-cleavage pathways in microbial communities from soil highly contaminated with jet fuel under air-sparging bioremediation. *Environmental Microbiology* 11, 2216-2227.
- Callaghan A. V., Davidova I. A., Savage-Ashlock K., Parisi V. A., Gieg L. M., Suflita J. M., Kukor J. J., Wawrik B. (2010) Diversity of benzyl- and alkylsuccinate synthase genes in hydrocarbon-impacted environments and enrichment cultures. *Environmental Science & Technology* 44: 7287-7294.
- Fahy A., McGenity T. J., Timmis K. N., Ball A. S. (2006) Heterogeneous aerobic benzene-degrading communities in oxygen-depleted groundwaters. *FEMS Microbiology Ecology* 58, 260–270.

Farkas M., Tánacsics A., Kriszt B., Benedek T., Tóth E. M., Kéki Z., Veres P. G., Szoboszlay S. (2015) *Zoogloea oleivorans* sp. nov., a floc-forming, petroleum hydrocarbon-degrading bacterium isolated from biofilm. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65:274-279.

Hendrickx B., Junca H., Vosahlova J., Lindner A., Ruegg I., Bucheli-Witschel M., Faber F., Egli T., Mau M., Schlomann M., Brennerova M., Brenner V., Pieper D. H., Top E. M., Dejonghe W., Bastiaens L., Springael D. (2006). Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. *Journal of Microbiological Methods* 64, 250-65.

Kim J. M., Le N. T., Chung B.S., Park J.H., Bae J.W., Madsen E.L., Jeon C.O. (2008) Influence of soil components on the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-, m-, and p-xylenes by the newly isolated bacterium *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 7313-7320.

Lane D. J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115–175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: Wiley.

Larentis M., Hoermann K., Lueders T. (2013) Fine-scale degrader community profiling over an aerobic/anaerobic redox gradient in a toluene-contaminated aquifer *Environmental Microbiology Reports* 5:225-234.

Lee, S. H., Jin, H. M., Lee, H. J., Kim, J. M., Jeon, C. O. (2012) Complete genome sequence of the BTEX-degrading bacterium *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59. *Journal of Bacteriology* 194, 544.

Lueders T., Muyzer G. (2017) The ecology of anaerobic degraders of BTEX hydrocarbons in aquifers. *FEMS Microbiology Ecology* 93: fiw220.

- Martínez-Lavanchy P.M., Müller C., Nijenhuis I., Kappelmeyer U., Buffing M., McPherson K., Heipieper H.J. (2010) High stability and fast recovery of expression of the TOL plasmid-carried toluene catabolism genes of *Pseudomonas putida* mt-2 under conditions of oxygen limitation and oscillation. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 6715-6723.
- 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
- Maszenan A. M., Seviour R. J., Patel B. K. C., Schumann P. (2002) *Quadricoccus australiensis* gen. nov., sp. nov., a β -proteobacterium from activated sludge biomass. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:223-228.
- Mohn W. W., Wilson A. E., Bicho P., Moore, E. R. B. (1999) Physiological and phylogenetic diversity of bacteria growing on resin acids. *Systematic and Applied Microbiology* 22, 68–78.
- Muyzer G., Smalla K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek.* 73: 127-141
- Nestler H., Kiesel B., Kaschabek S.R., Mau M., Schlomann M., Balcke G.U. (2007) Biodegradation of chlorobenzene under hypoxic and mixed hypoxicdenitrifying conditions. *Biodegradation* 18, 755–767.
- Pilloni G., von Netzer F., Engel M., Lueders T. (2011) Electron acceptor-dependent identification of key anaerobic toluene degraders at a tar-oil-contaminated aquifer by Pyro-SIP. *FEMS Microbiology Ecology* 78, 165-175.
- Song B., Haggblom M. M., Zhou J., Tiedje J.M., Palleroni N.J. (1999) Taxonomic characterization of denitrifying bacteria that degrade aromatic

compounds and description of *Azoarcus toluvorans* sp. nov. and *Azoarcus toluclasticus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49, 1129–1140.

Song B., Palleroni N. J., Kerkhof L. J., Haggblom M. M. (2001) Characterization of halobenzoate-degrading, denitrifying *Azoarcus* and *Thauera* isolates and description of *Thauera chlorobenzoica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 589–602.

Táncsics A., Farkas M., Szoboszlay S., Szabó I., Kukolya J., Vajna B., Kovács B., Benedek T., Kriszt B. (2013) One-year monitoring of meta-cleavage dioxygenase gene expression and microbial community dynamics reveals the relevance of subfamily I.2.C. extradiol dioxygenases in hypoxic, BTEX-contaminated groundwater. *Systematic and Applied Microbiology* 36:339-350.

Táncsics A., Szabó I., Baka I., Szoboszlay S., Kukolya J., Kriszt B., Márialigeti K. (2010) Investigation of catechol 2,3-dioxygenase and 16S rRNA gene diversity in hypoxic, petroleum hydrocarbon contaminated groundwater. *Systematic and Applied Microbiology* 33:398-406.

Táncsics A., Szoboszlay S., Szabó I., Farkas M., Kovács B., Kukolya J., Mayer Z., Kriszt B. (2012) Quantification of subfamily I.2.C catechol 2,3-dioxygenase mRNA transcripts in groundwater samples of an oxygen-limited BTEX-contaminated site. *Environmental Science and Technology* 46: 232-240.

Tischer K., Kleinstaub S., Schleinitz K. M., Fetzer I., Spott O., Stange F., Lohse U., Franz J., Neumann F., Gerling S., Schmidt C., Hasselwander E., Harms H., Wendeberg A. (2013) Microbial communities along biogeochemical gradients in a hydrocarbon contaminated aquifer. *Environmental Microbiology* 15, 2603–2615.

Tribelli P.M, Di Martino C., López N. I., Raiger Iustman L. J. (2012) Biofilm lifestyle enhances diesel bioremediation and biosurfactant production in the

Antarctic polyhydroxyalkanoate producer *Pseudomonas extremaustralis*. *Biodegradation* (5):645-51.

Turner S., Pryer K. M., Miao V. P., Palmer J. D. (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46(4):327-38.

Wilson L.P., Bouwer E.J. (1997) Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 18:116-130.

Winderl C., Anneser B., Griebler C., Meckenstock R. U., Lueders T. (2008) Depth-resolved quantification of anaerobic toluene degraders and aquifer microbial community patterns in distinct redox zones of a tar oil contaminant plume. *Applied and Environmental Microbiology* 74:792–801

Winderl C., Schaefer S., Lueders T. (2007) Detection of anaerobic toluene and hydrocarbon degraders in contaminated aquifers using benzylsuccinate synthase (bssA) genes as a functional marker. *Environmental Microbiology* 9:1035–1046

Zhou J., Fries M.R., Chee-Sanford J.C., Tiedje J.M. (1995) Phylogenetic analyses of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth on toluene and description of *Azoarcus tolulyticus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45, 500– 506

6. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó publikációk

Tudományos folyóiratokban megjelent, lektorált, teljes szövegű tudományos közlemény:

Táncsics A., **Farkas M.**, Szoboszlay S., Szabó I., Kukolya J., Vajna B., Kovács B., Benedek T., Kriszt B. (2013): One-year monitoring of *meta*-cleavage dioxygenase gene expression and microbial community dynamics reveals the relevance of subfamily I.2.C extradiol dioxygenases in hypoxic, BTEX-contaminated groundwater. *Systematic and Applied Microbiology*, 36:339-350. **IF:3,31**

Farkas M., Táncsics A., Kriszt B., Benedek T., Tóth E. M., Kéki Z., Veres P. G., Szoboszlay S. (2015): *Zoogloea oleivorans* sp. nov., a new floc-forming, petroleum hydrocarbon degrading bacterium isolated from biofilm. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65:274-279. **IF:2,439**

Farkas M., Szoboszlay S., Benedek T., Révész F., Veres P. G., Kriszt B., Táncsics A. (2017) Enrichment of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria from groundwater of the Siklós BTEX-contaminated site (Hungary). *Folia Microbiologica* 62:63-71. **IF:1,521**

Kongresszusi kiadványokban megjelent közlemény (az ISBN, ISSN vagy más, hitelesített kiadványaira vonatkozóan):

Farkas M., Táncsics A., Szoboszlay S., Szabó I., Kukolya J., Vajna B., Kovács B., Kriszt B. (2012) Long-term monitoring of microbial community dynamics and cathecol 2,3-dioxygenase gene expression in hypoxic, petroleum hydrocarbon contaminated groundwater, *Annual Meeting of the Hungarian Society of Microbiology, Book of abstracts*, p. 11.

Farkas M., Táncsics A., Szoboszlay S., Kriszt B. (2013) Low diversity of aerobically cultivable bacteria was observed in hypoxic, BTEX contaminated groundwater. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 60 (supplement) p.134

Táncsics A, **Farkas M**, Szoboszlay S, Benedek T, Kriszt B (2013) Aerobic and anaerobic degradation pathways of aromatic hydrocarbons are both active under microaerobic and anaerobic conditions as revealed by microcosm experiments. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 60 (supplement) p.247

Táncsics A, **Farkas M**, Szoboszlay S, Vajna B, Benedek T, Kriszt B. (2014) Single-Nucleotide Primer Extension Assays to Reveal Key Microbes and Functional Genes Taking Part in the Degradation of BTEX Compounds under Oxygen-Limited Conditions In: *Ninth International Symposium on Subsurface Microbiology*. Pacific Grove, USA, 2014.10.05.10.p. 23. 1 p.

Farkas M., Szoboszlay S., Kriszt B., Táncsics A. (2014) Selective enrichment of Fe(III)-reducing bacteria from microaerobic, BTEX contaminated groundwater- A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése és EU FP7 PROMISE Regional Meeting: Absztraktfüzet. pp. 15-16.

Farkas M., Veres P.G., Szobaszlay S., Kriszt B., Táncsics A. (2015) Selective enrichment of Fe(III)-reducing bacteria from microaerobic, BTEX-contaminated groundwater - Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology - *BIOspektrum Tagungsband* pp 160-161.