

SZENT ISTVÁN EGYETEM

**ADALÉKANYAGOK HATÁSA KÜLÖNBÖZŐ SZENNYEZŐANYAGOK
LEBONTÁSÁRA**

Doktori értekezés

Révész Sára

Gödöllő

2009.

A doktori iskola

megnevezése:

Környezettudományi Doktori Iskola

tudományága:

Mezőgazdasági-, környezeti mikrobiológia és talaj biotechnológia

vezetője:

Dr. Heltai György

tanszékvezető egyetemi tanár

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar

Környezettudományi Intézet, Kémiai és Biokémiai Tanszék

Témavezető:

Dr. Márialigeti Károly

tanszékvezető, habil. egyetemi docens

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Biológiai Intézet Mikrobiológiai Tanszék

.....
a programvezető jóváhagyása

.....
a témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	1
1.1 A téma aktualitása, jelentősége	1
1.2 Célkitűzések	1
2. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÁS	3
2.1 A bioremediációs technológiák mikrobiológiai háttere	3
2.1.1 A szennyezőanyagok mikrobiológiai lebontásának típusai	3
2.1.2 A mikrobiális ökológia tapasztalatainak alkalmazása a bioremediációban	5
2.2 A szénhidrogének és származékaik bontási folyamatai	5
2.2.1 Az alifás szénhidrogének mikrobiális bontása	6
2.2.2 A monoaromás szénhidrogének mikrobiális bontása	8
2.2.3 A poliaromás szénhidrogének mikrobiális bontása	11
2.2.4 Az oxigén tartalmú szénhidrogének mikrobiális bontása	12
2.2.5 A halogénezett szénhidrogének mikrobiális bontása	13
2.3 A szénhidrogének lebontását befolyásoló környezeti tényezők	18
2.3.1 A hőmérséklet hatása	18
2.3.2 A redox-potenciál tartományok befolyásoló hatása	19
2.3.3 A felvehető tápanyagok hatása a biodegradációra	21
2.3.4 A szennyezőanyag toxicitása	22
2.3.5 A szénhidrogének fizikai állapota	23
2.3.6 Biológiai hozzáférhetőség	24
2.4 A vizsgálatok során alkalmazott módszerek rövid bemutatása	31
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	37
3.1 Mintavétel	37
3.1.1 I. terület (Gázolaj szennyezés)	37
3.1.2 II. terület (Gázolaj szennyezés)	37
3.1.3 III-VII. mintavételi területek (Klórozott szénhidrogén szennyezés)	37
3.2 Törzsgyűjteményből származó szervezetek	38
3.3 Felhasznált anyagok	38
3.3.1 Táptalajok	38
3.4 Klasszikus mikrobiológiai módszerek	39
3.4.1 Gázolajbontó baktériumok izolálása	39
3.4.2 Mikrokozmoszok összeállítása	40
3.4.3 Csíraszám becslés szélesztéses technikával	40
3.4.4 Biomassza növekedés spektrofotometriás vizsgálata	41
3.4.5 Közösségi szénforrás értékesítési vizsgálat	41
3.4.6 Enzimaktivitás mérés	41
3.5 Molekuláris biológiai módszerek	43
3.5.1 DNS izolálás törzsekből	43
3.5.2 DNS izolálás talajból, talajvízből	43
3.5.3 RNS izolálás	43
3.5.4 Nukleinsavak detektálása gélelektroforézissel	43
3.5.5 A munkák során alkalmazott polimeráz láncreakciók protokolljai	44
3.5.6 Reverz transzkripció	47

3.5.7	PCR termék tisztítása	47
3.5.8	Bázissorrend elemzés	48
3.5.9	Klónkönyvtár létrehozása	49
3.5.10	Ujjlenyomat módszerek	50
3.6	Statisztikai módszerek	53
3.7	Kémiai elemzések	53
4.	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEŚÜK	55
4.1	A gázolaj bontásának serkentése laboratóriumi körülmények között	55
4.1.1	A I. területről származó minták csíraszámának meghatározása	55
4.1.2	Az I. területről izolált törzsek azonosítása	55
4.1.3	A vizsgálatba bevont törzsek gázolajbontó képességének elemzése OxiTop rendszerben	58
4.1.4	A vizsgálatba vont törzsek monoaromás vegyületek bontásának képessége	59
4.1.5	Az aromás gyűrűt hasító enzimek aktivitásának meghatározása	59
4.1.6	A C12O enzim génjének kimutatása PCR segítségével	61
4.2	A szénhidrogének bontásának serkentése ciklodextrin adagolással	63
4.2.1	Az <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> SM5T4 törzs gázolaj bontásának változása HPCD hatására	63
4.2.2	Szennyezett területről származó közösség gázolaj bontásának serkentése HPCD-vel	67
4.2.3	Az <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> SM5T4 törzs BTX bontó képességének vizsgálata HPCD hatására	72
4.3	A halogénezett szénhidrogének bontásának serkentése mikrokozmosz kísérletekben	74
4.3.1	A dehalorespiráló szervezetek molekuláris módszerrel történő kimutatásának optimalizálása	74
4.3.2	A különböző területekről származó minták összehasonlítása	75
4.3.3	A megfelelő adalékanyag kiválasztása mikrokozmosz kísérletekben	81
4.4	Új tudományos eredmények	102
5.	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	103
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	107
IRODALOMJEGYZÉK		
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS		

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ARDRA	amplified ribosomal DNA restriction analysis – amplifikált riboszómális DNS restrikciós analízise
BTX	benzol, toluol, xilol
C12O	katekol 1,2 dioxigenáz
C23O	katekol 2,3 dioxigenáz
CD	ciklodextrin
cDCE	cisz-diklór etilén
DGGE	denaturáló grádiens gél elektroforézis
DNS	dezoxiribonukleinsav
ETBE	etil-tercier-butil-éter
HPCD	hidroxipropil- β -ciklodextrin
ld.	lásd
mp.	másodperc
MTBE	metil-tercier-butil-éter
NAPL	non-aquatic phase liquid – vízzel nem elegyedő folyadék
PAA	poliakrilamid
PCA	principal component analysis – főkomponens elemzés
PCE	perklóretilén
pl.	például
RAMEB	random metilált ciklodextrin
rDNS	riboszómális DNS
RDP II	ribosomal database project II – riboszóma adatbázis projekt II
RNS	ribonukleinsav
RT	reverz transzkripció
T-RFLP	terminal restriction fragment length polymorphism – terminális restrikciós fragment hossz polimorfizmus
TAME	tercier-amil-metil-éter
TBA	tercier-butil-alkohol

TARTALOMJEGYZÉK

TCE	triklóretilén
tke	telepképző egység
TOC	total organic carbon – az összes szerves eredetű szén
TPH	total petroleum hydrocarbon – teljes petróleum szénhidrogén
TRF	terminális restrikciós fragment
VC	vinilklorid

ÁBRÁK JEGYZÉKE

2.1. Az aerob mikrobiológiai alkán bontás fontosabb útvonalai	7
2.2. A monoaromás vegyületek aerob mikrobiológiai lebontása	9
2.3. Az aromás gyűrű aerob mikrobiológiai hasításának két útvonala	10
2.4. A halogénezett szénhidrogének direkt oxidációjának sematikus ábrája	14
2.5. A halogénezett szénhidrogének kometabolikus oxidációja	15
2.6. A halogénezett szénhidrogének redukzív deklorinációjának sematikus ábrája. A halogénezett szénhidrogén elektron akceptorként hasznosul (EPA 1998).	16
2.7. A perklóretilén teljes redukzív deklorinációja eténig	16
2.8. A különböző redox-potenciálú zónákban elérhető elektronakceptorok	19
2.9. A β -ciklodextrin térbeli szerkezete	26
2.10. A ciklodextrinek glükopiranoz egységekből álló ciklikus szerkezete	26
2.11. A zárványkomplex kialakulásának sematikus ábrája	28
2.12. A terminális restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus (T-RFLP)	35
3.1. II. mintavételi hely	37
3.2. A mikrokozmosz üveg sematikus ábrája	41
3.3. A T-RFLP eredmények kiértékelése és a dolgozat során alkalmazott ábrázolási megoldások	52
4.1. Az izolált és laboratóriumi körülmények között fenntartható 37 törzs ARDRA mintázata	56
4.2. A izolált és azonosított törzsek elhelyezkedése a filogenetikai fán	57
4.3. A vizsgálatba vont 15 törzs gázolaj bontásából származó széndioxid termelése az idő függvényében	58
4.4. Törzsfa a C12O katabolikus gén alapján	62
4.5. Törzsfa a 16S rRNS gén alapján	62
4.6. A HPCD szénforrásként történő hasznosulásának vizsgálata	63
4.7. Az SM5T4 törzs gázolaj bontásából származó széndioxid mennyisége	64
4.8. A különböző mólarányban adagolt ciklodextrin hatása	65
4.9. Adott mennyiségű ciklodextrin hatása	66
4.10. A II. területről származó két közösség gázolaj bontó képességének vizsgálata	67
4.11. A 1. számú közösség szénforrás hasznosítása	68
4.12. Az adalékanyagok bontása az 1. közösség esetén	69
4.13. A keményítő hatása a gázolaj bontására	70
4.14. A Tween-80 hatása a gázolaj bontására	70
4.15. A CD hatása a gázolaj bontására	71
4.16. A CD hatása a benzol és a toluol bontására	72
4.17. A CD hatása a benzol és a toluol 1:1 arányú keverékének bontására	72
4.18. A különböző területekről származó talajvíz minták szennyezettségi adatai	75
4.19. A különböző területekről származó talajvíz minták pH értéke és összes szerves anyag tartalma (TOC)	76
4.20. A különböző területekről származó talajvíz minták oldott vas és oldott mangán tartalma	76
4.21. A különböző területekről származó talajvíz minták nitrát és nitrit tartalma	77
4.22. A különböző területekről származó talajvíz minták klorid és szulfát tartalma	77

4.23. A különböző területekről származó talajvíz minták kémiai eredményeinek főkomponens elemzése	78
4.24. A vizsgált területek talajvíz mintáinak T-RFLP mintázata. Az egyes színek a különböző TRF-eket jelöli. Egy TRF jelenlétéből, vagy hiányából egy adott baktériumcsoport jelenlétére vagy hiányára következtethetünk.	80
4.25. A vizsgált területek talajvíz mintáiból származó T-RFLP mintázatok főkomponens elemzése. A színes teli körök az egyes mintákat jelölik, a kereszt jelek a számokkal az adott TRF-eket mutatják.	81
4.26. A halogénezett szénhidrogén koncentrációja a K7 mikrokozmoszokban; A: biotikus kontroll; B: A adalékanyag; C: B adalékanyag; D: C adalékanyag	82
4.27. A halogénezett szénhidrogének koncentrációja a J18-2 mikrokozmoszokban; A: biotikus kontroll; B: A adalékanyag; C: B adalékanyag; D: C adalékanyag. VC: vinil-klorid; cDCE: cisz-diklór etilén, TCE: triklóretilén, PCE: perklóretilén	83
4.28. A két mikrokozmosz fontosabb vízkémiai paraméterei. A: pH; B: szulfát mennyiség; C: klorid mennyiség; D: TOC. VC: vinil-klorid; cDCE: cisz-diklór etilén, TCE: triklóretilén, PCE: perklóretilén	84
4.29. Az mikrokozmosz minták T-RFLP mintázata alapján számolt Shannon diverzitásindex értékei.	87
4.30. A J18-2 mikrokozmoszok T-RFLP elemzésének eredménye	88
4.31. A K7 mikrokozmoszok T-RFLP elemzésének eredménye	89
4.32. A mikrokozmoszok T-RFLP mintázatának főkomponens elemzése	90
4.33. A c1, Myxococcales rendbe tartozó klón filogenetikai fán történő ábrázolása	91
4.34. A c3, Lentisphaerae családba tartozó klón filogenetikai fán történő ábrázolása . . .	91
4.35. A c10, TM7 csoportban tartozó klónok filogenetikai fán történő ábrázolása	91
4.36. A c41, c198, <i>Leuconostoc</i> nemzetségbe tartozó klónok filogenetikai fán történő ábrázolása	92
4.37. A c88, c107 és c206, <i>Clostridium</i> nemzetségbe tartozó klónok filogenetikai fán történő ábrázolása	93
4.38. A c147, <i>Trichococcus</i> nemzetségbe tartozó klón filogenetikai fán történő ábrázolása	93
4.39. A c172, Acidaminococcaceae családba tartozó klón filogenetikai fán történő ábrázolása	94
4.40. A c229, Acidaminococcaceae családba tartozó klón filogenetikai fán történő ábrázolása	94
4.41. A <i>Sulfurrospirillum</i> nemzetségbe tartozó c316 klón filogenetikai fán történő ábrázolása	95
4.42. A J18.2 és a K7 mikrokozmoszok 318. napi mintájának RNS és DNS alapú vizsgálata DGGE-vel.	96
4.43. A <i>Pseudomonas</i> génuszba tartozó szekvencia filogenetikai fán történő ábrázolása .	97
4.44. A <i>Tolomonas</i> taxonba tartozó rs13 szekvencia filogenetikai fán történő ábrázolása .	97
4.45. A <i>Bacterioidetes</i> taxonba tartozó rs20 szekvencia filogenetikai fán történő ábrázolása	98
4.46. A <i>Bacterioidetes</i> taxonba tartozó rs26 szekvencia filogenetikai fán történő ábrázolása	98
4.47. A <i>Acidovorax</i> taxonba tartozó szekvencia filogenetikai fán történő ábrázolása . . .	99

TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

3.1.	A speciálisan beszerzett vegyületek és főbb tulajdonságaik	38
3.2.	Alaptáptalaj (húspepton agar)	38
3.3.	Gázolajos dúsító	39
3.4.	Nyomelemoldat a gázolajos dúsítóhoz	39
3.5.	Bushnell-Haas Broth (BHB) tápoldat	39
3.6.	A 16S rDNS PCR összemérési protokollja	44
3.7.	A 1. PCR típus hőprofilja	44
3.8.	A 2. PCR típus hőprofilja	44
3.9.	A munkák során alkalmazott primerek és adataik	45
3.10.	A DGGE munkák során alkalmazott primerek és adataik	45
3.11.	A katekol 1,2 dioxigenáz gén kimutatására szolgáló PCR ciklus hőprofilja	46
3.12.	A katekol 1,2-dioxigenáz kimutatásakor használt primerek	46
3.13.	A dehalorespiráló szervezetek kimutatására szolgáló PCR ciklus hőprofilja	47
3.14.	A dehalorespiráló szervezetek specifikus kimutatásához használt primerek	47
3.15.	Az RT-reakció összemérési protokollja	48
3.16.	Az etanol precipitáció során használt reakcióelegy összetétele	48
3.17.	A szekvenáló reakció összetétele	49
3.18.	A szekvenáló reakció hőprofilja	49
3.19.	A 8%-s poliakrilamid denaturáló gradiens gél összeállítása	51
3.20.	A PCR termékek restriktációs enzimekkel történő emésztésének protokollja	52
3.21.	Az ARDRA és T-RFLP vizsgálatok során alkalmazott restriktációs enzimek	52
3.22.	Az akkreditált laboratórium által végzett vizsgálatok	54
4.1.	Az első területről származó talajminták csíraszámai	55
4.2.	A táblázatban a két enzimmel kapott mintázat alapján kialakított ARDRA csoportok találhatóak. A mindkét enzimmel azonos hasítási képet adó törzseket egy ARDRA csoportba soroltuk. A táblázatban vastagon szedve a később bázissorrend elemzéssel azonosított törzseket emeltük ki.	56
4.3.	Az izolált törzsek BTX bontásának eredményei	60
4.4.	A C12O enzim aktivitása	60
4.5.	Az adagolt ciklodextrin hatékonysága	66
4.6.	A <i>Dehalobacter restrictus</i> specifikus és <i>Desulfuromonas chloroethenica</i> specifikus primerek <i>in silico</i> vizsgálata	74
4.7.	A <i>Dehalococcoides</i> sp. specifikus primerek <i>in silico</i> vizsgálata	74
4.8.	Az egyes primerpárok kimutatási határértékei	75
4.9.	A minták dehalorespiráló szervezet tartalmának PCR alapú kimutatási eredménye	79
4.10.	A specifikus primerekkel végzett PCR-ek eredményei a mikrokozmoszokban	86

1. BEVEZETÉS

1.1 A téma aktualitása, jelentősége

Az elmúlt évszázadban környezetünk szennyeződése óriási mértékben megnövekedett. Az emberi populáció növekedése, az ipari fejlődés, az urbanizáció, vagy akár a környezetünkbe kibocsátott vegyületek hatásairól szóló végeláthatatlan viták mind hozzájárultak környezetünk szennyezettségéhez, amely ma már – a természetes (biogén, vagy geokémiai) anyagokon felül – különböző, az élő szervezetekre mérgező, antropogén forrásból származó anyagokkal terhelt.

Az Egyesült Államokban már a 70-es években felmerült az igény olyan technológiákra, melyek csökkentik a szennyezéseket, illetve egyre fokozódott a közösségi nyomás a szennyezett területek helyreállítása érdekében (Atlas 1981). Magyarországon a 80-as évek elejéig az ipari fejlesztések szigorú környezetvédelmi szabályok korlátozó hatása nélkül mentek végbe (Puzder et al. 2001). Az országban mintegy harmincezerre becsülhető a szennyezett területek száma (közel 80000 ha), melynek nagyságrendileg a felét azonosították (EUSTAT 2006). A hazai környezetvédelemben a kilencvenes évek eleje óta alkalmazzák azokat a kármentesítési technológiákat, amelyekkel a földtani közegek és a felszín alatti vizek eredményesen kezelhetők, illetve a bekövetkezett károk mérsékelhetők.

Magyarországon a lakossági vízhasználat több mint 90%-a felszín alatti vízből származik (Puzder et al. 2001), ezért különösen fontos azon szennyeződések kezelése, mely során a talajvíz illetve a talajba került szennyező anyagok eltávolítása a cél.

A szennyezett természeti elemek (pl. földtani közeg, felszín alatti vizek) állapotának megismerése és a megtisztításukra irányuló tevékenység az eltelt két évtizedben rohamos fejlődésnek indult. A megismert szennyeződések gyarapodó száma, az egyre pontosabb tényfeltárási módszerek, a szennyezést okozó kockázatos anyagok hatásmechanizmusának és sorsának feltárása és nem utolsósorban a gyakorlati tapasztalatok a talaj és a felszín alatti vizek tisztítási eljárásainak széles körét eredményezték. Így a környezetvédelem keretein belül a kármentesítés fokozatosan sajátos iparággá fejlődött ki, amely iránt fokozódó társadalmi és gazdasági igény jelentkezik.

Minden egyes szennyezett területen a helyi adottságok alapján döntenek el a szakemberek, melyik technológia a megfelelő. Egyre elterjedtebbek az olyan módszerek, melyeknél az élő rendszerek folyamatait használjuk fel céljaink eléréséhez.

A bioremediáció fogalma olyan technológiákat foglal magába, melyek biológiai folyamatokat használnak a szennyezett közeg (talaj vagy talajvíz) megtisztítására. Ez a tudományterület a mikrobiológia, a biotechnológia és a környezettudomány határterületeit öleli fel.

1.2 Célkitűzések

Napjainkban a talaj különböző eredetű és típusú szennyezése igen gyakori. A nagy mennyiségben a talajba jutott gázolaj mérgező hatása a talaj élővilágára, ezért szükséges olyan eljárások kidolgozása, amelyekkel könnyen, gyorsan és megfelelő hatékonysággal tudjuk a szennyezést megszüntetni. Az egyik kínálgató megoldás a talajban jelenlevő mikrobióta szénhidrogén degradációs aktivitásának fokozása. Mivel a szénhidrogének vízben nem oldható vegyületek, ezért fontos beavatkozó lépés, hogy a molekulák a sejtek számára hozzáférhetővé váljanak.

Vizsgálataink egyik célja volt, hogy egy gázolajjal erősen szennyezett talajból olyan mikrobákat izoláljunk, amelyek képesek tolerálni a gázolajat alkotó vegyületek jelenlétét, illetve potenciálisan részt vesznek azok lebontásában, és/vagy kizárólagos szénforrásként is képesek azokat hasznosítani. Fontosnak tartottuk, hogy az általunk izolált, a komponensek degradációjában részt

1.2. CÉLKITŰZÉSEK

vevő törzsek közül elsősorban azokra koncentráljunk, amelyek az aromás vegyületek széles spektrumát képesek hasznosítani, és azok nagy koncentrációit tolerálni. További célunk volt, hogy a "legsikeresebb" törzsek esetében megállapítsuk, hogy egy adott aromás vegyület hatására milyen anyagcsere útvonal aktiválódik, és hogy a specifikus gyűrűhasító enzim milyen mértékben fejlődik ki. Ez utóbbi vizsgálataink eredményeiből pedig az egyes törzsek lebontási potenciáljára szeretnénk következtetni. A katekol 1,2-dioxigenáz génjének kimutatásához primerek tervezését tűztük ki célul, hogy a gén jelenlétét ki tudjuk mutatni a vizsgált törzsekből.

Felületaktív tulajdonsága miatt a ciklodextrin (CD) a ásványi olaj komponenseit a sejt számára jobban elérhetővé teszi azáltal, hogy komplexet alakít ki vele, és így nagyobb mennyiségben képes a vizes fázisban jelen lenni. Ez a folyamat az ásványi olaj összetevőinél más-más módon jön létre, függ az adott összetevő hidrofóbicitásától, illetve méretétől, mivel a CD belső ürege csak adott méretű molekulákat képes befogadni. Megfelelő mennyiségű CD hozzáadásával, egy egyensúlyi folyamat eredményeként a sejtek számára az eddig nem elérhető szénforrás hozzáférhetővé válik.

Vizsgálatainkkal szintén célul tűztük ki, hogy bebizonyítsuk, hogy a hidroxipropil- β -ciklodextrin (HPCD) segítségével gyorsítható a gázolaj mikroorganizmusok általi lebontása, illetve hogy összehasonlítsuk a HPCD, a Tween 80 és a keményítő hatását a gázolaj biodegradációjára. A HPCD az olajat alkotó molekulákkal zárványkomplexet alkot, a Tween 80 pedig micellákat képez. A keményítő azért kapott helyet a kísérletben, hogy megvizsgálhassuk, milyen hatással van a gázolaj biodegradációjára egy alternatív szénforrás jelenléte, illetve mert a keményítő nagy molekulatömegű vegyület, ugyanazokkal az alegységekkel, mint a β -ciklodextrin, de más térszerkezettel.

Az üzemanyagként alkalmazott szénhidrogén szennyezések – mint pl. a gázolaj – mellett egy másik jelentős szennyező forrása a talajvíznek a klórozott alifás szénhidrogének nem megfelelő kezelése. Az ilyen típusú szennyeződések komoly károkat okoznak, a kármentesítés pedig a halogénezett szénhidrogének fizikai-kémiai tulajdonságai miatt idő- és költségigényes. A kémiai és fizikai kármentesítési technológiák mellett egyre nagyobb lehetőség rejlik a biológiai folyamatok kihasználásában is.

Célunk olyan molekuláris módszer kidolgozása és optimalizálása volt, amellyel a szennyezett területekről származó mintákból rutinszerűen lehet kimutatni a reduktív deklorinálásra jellemző szervezeteket, mint amilyen a *Dehalococcoides sp.*, a *Dehalobacter restrictus* és a *Desulfuromonas chloroethenica*.

Szándékunkban állt, hogy az eltérő sajátságú, triklóretilénnel (TCE-vel) szennyezett területekről mintát véve (különböző területekről, kutakból és mélységekből) feltérképezzük a jelen lévő baktérium közösségeket és meghatározzuk a domináns fajokat. Kerestük annak az okait, hogy a jelenlévő közösségek összetétele minek a függvénye, az esetlegesen jelen lévő deklorináló szervezetek után kutattunk. A területekről származó talajvizekből mikrokozmosz kísérleteket állítottunk össze, melyek segítségével az általunk választott módszerhez, a biostimulációhoz választottunk megfelelő adalékanyagot. Ennek keretében anaerob körülmények között, különböző elektrondonorok adagolásával serkentettük a mikrobákat a szennyező anyag reduktív lebontására, hogy megállapítsuk, melyik adalékanyag bizonyul a legalkalmasabbnak a kármentesítéshez.

2. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÁS

2.1 *A bioremediációs technológiák mikrobiológiai háttere*

A kármentesítési technológiák olyan természetes, vagy tervezett folyamatokból épülnek fel, amelyeket a szennyezett környezeti elemek, mint például víz, talaj vagy üledékek mentesítésére használnak. A biológiai folyamatokat alkalmazó kárenyhítési technológiák (bioremediáció) a szerves és szervetlen szennyezők széles körére kiterjednek, a bioremediációt gyakran más fizikai és kémiai kezelésekkel együtt alkalmazzák. A különböző bioremediáción alapuló technológiáknak egy közös feladatuk mindig van: a mikrobiális anyagcsere serkentése és fenntartása.

Az ökoszisztémában a mikrobáknak kiemelt szerep jut a szerves vegyületek lebontásában. Már az 1950-es években megállapították, hogy minden természetes úton keletkezett szerves vegyület mikrobiológiailag bontható (Kluyver és van Niel 1956). Ezt az elméletet Alexander (1965) kiegészítette azzal, hogy a mikrobák jelentős adaptációs képességgel rendelkeznek a szintetikus vegyületek lebontásához is.

A bioremediációs technológiák lehetővé teszik, hogy bizonyos szennyezett területeket olcsón, mégis hatékonyan tisztítsanak meg. Ennek ellenére a lehetőségekhez képest ma még ritkán alkalmazzák ezeket, mert hiányoznak a szennyezett területen jelenlévő mikroorganizmusok anyagcseréjét szabályozó tényezőkről azok információk, melyek a döntéseket és a tervezést segítenék (Lovley 2003).

A természetben előforduló szerves vegyületek bontásához a mikroorganizmusok nagyon széles körű anyagcsere aktivitással rendelkeznek. Az anyagcsere diverzitás kiterjed számos antropogén szerves vegyületre is, melyek gyakran szennyezik a környezetünket. Ugyanakkor nem szabad elfelejteni arról sem, hogy az egyes mikroba fajok csak a kollektív anyagcsere diverzitás egy részével (és néha igencsak szűk tartományával) rendelkeznek. A természetben a mikrobák kevert tenyészetekben jelennek meg, melyek a résztvevő fajok anyagcsere képességeinek egyszerű összeillesztésénél több, olykor jóval bővebb tulajdonságokkal jellemezhetőek; a bioremediációs technológiáknak a célja a mikrobaközösség egy részhalmaza anyagcsere aktivitásának serkentése (Hughes et al. 2002).

A mikroorganizmusok anyagcsere stratégiáinak jellemzése segíthet abban, hogy megfelelően tudjuk serkenteni a szennyezőanyag lebontását. Ehhez szükséges a mikroorganizmusok anyagcseréjének részletes ismerete, az egyes vegyülettípusok bontási feltételeinek meghatározása.

A mikrobiális anyagcsere-típusokat többféleképpen lehet csoportosítani. Az energetikai anyagcsere folyamatokban részt vevő anyagok csoportosításának alapja, hogy az adott vegyület a bontás során oxidálódik (elektron donor) vagy redukálódik (elektron akceptor). A szennyezőanyag hasznosulhat a felépítő anyagcsere folyamatok során (energia- vagy tápanyag forrásként), vagy véletlenszerű, nem-termelő (nem energiaszerző) szubsztrátja a kometabolikus folyamatoknak. Bizonyos vegyületek pedig az anyagcsere folyamatokban nem vesznek részt, azonban a mikroba képes a sejten belüli felhalmozásukra (bioakkumuláció).

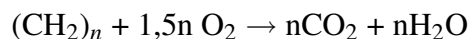
A szennyezőanyagok biológiai bonthatósága számos tényezőtől függ, a legfontosabb az anyag fizikai-kémiai tulajdonsága, a molekula kémiai szerkezete, a bontani képes mikrobacsoportok jelenléte és aktivitása, illetve a lebontáshoz szükséges környezeti feltételek (Lederberg 2000).

2.1.1 *A szennyezőanyagok mikrobiológiai lebontásának típusai*

A mikroorganizmusok a szerves szennyező anyagok széles körét képesek szén- és/vagy energiaforrásként hasznosítani. A lebontás ezen formája gyakran a szennyezőanyag mineralizációját

2.1. A BIOREMEDIÁCIÓS TECHNOLÓGIÁK MIKROBIOLÓGIAI HÁTTERE

eredményezi, azaz a szerves molekula széndioxiddá és vízzé alakul át:



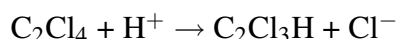
Bizonyos esetekben az oxidáció nem teljes, és szerves anyagcseretermékek vagy melléktermékek maradnak (pl. acetát), mint további lehetséges elsődleges szubsztrátok más mikrobák számára. Ilyen feltételek mellett a mineralizáció helyett biotranszformáció zajlik.

Minden esetben, amikor a szennyezőanyag elsődleges szubsztrátként hasznosul, a lebontó szervezeteknek szükségük van elegendő mennyiségű egyéb tápanyagokra is az teljes anyagcsere fenntartásához (Hughes et al. 2002). Ilyenek például: (i) a megfelelő terminális elektronakceptor (pl. oxigén, nitrát, ferri-vas, szulfát, széndioxid); (ii) a makrotápanyagok (pl. nitrogén, foszfor); (iii) a mikrotápanyagok (pl. anionok, kationok, nyomelemek).

Számos szennyeződést képesek a mikrobák elsődleges szubsztrátként hasznosítani, ilyenek például a:

- telített- és telítetlen szénhidrogének;
- mono-aromás szénhidrogének;
- karbonsavak, aldehidek, alkoholok, ketonok, fenolok;
- bifenilek;
- diklór-metán, vinil-klorid, cisz-diklór-etén;
- klórbenzolok, klór-fenolok;
- metil-*tercier*-butil-éter (MTBE);
- nitrobenzol, nitrotoluol.

Néhány általánosan elterjedt szerves szennyező lebontása redukció útján történik, azaz a vegyület elektronakceptorként szolgál a mikrobák számára.



Az ilyen típusú reakcióknak a fiziológiai alapja az elsődleges szubsztrátok (elektron-donorok) bontásának közvetlen támogatása. Ezekben az esetekben a szennyező anyag redukciója a sejtben lévő redox-egyensúly fenntartására szolgál. A szennyezőanyag terminális (vagy respiratorikus) elektronakceptorként szerepel ugyanúgy, mint az oxigén vagy más általános terminális elektronakceptor.

Bár a szennyezőanyagoknak csak kevés típusa megy keresztül az ilyen típusú lebontási útvonalakon, mégis gyakran fontos lehet mind a természetes, mind a mesterséges bioremediációs rendszerekben, mivel néhány igen gyakori talajvízszennyező, mint a klór-etének, ezen az útvonalon bomlanak le.

Sok szerves szennyezőanyag transzformációja az enzimek és kofaktorok nem-specifikus katalitikus képessége következtében a baktériumsejt energia termelése és tápanyag nyeresége nélkül is végbemehet. A kometabolikus folyamatok a szennyező anyagtól és a biokatalizátortól függően lehetnek oxidatív vagy reduktyvák. Az ilyen típusú reakciók jellemzően lassabbak, mint a metabolikus folyamatok, és a mikrobasejt nem nyer energiát ezekből a folyamatokból (Hughes et al. 2002).

2.1.2 A mikrobiális ökológia tapasztalatainak alkalmazása a bioremediációban

A mikrobiális ökológia tudományterülete a mikroorganizmusok közötti kölcsönhatásokat, a mikrobák és más élő illetve nem-élő komponensek közötti kapcsolatokat elemzi. Magába foglalja a jelenlévő szervezetek meghatározását, a különböző populációk közötti interakciók feltérképezését, és az abiotikus feltételeknek a biológiai folyamatokra gyakorolt hatásainak meghatározását. A bioremediáció sikere függ a jelenlévő mikrobák típusaitól, pontosabban az adott szennyezőanyag bioremediációjához szükséges anyagcsere-típust tartalmazó genetikai kapacitás jelenlététől illetve hiányától. Ha az adott genetikai kapacitás a területen jelen van, lehetséges a degradáció sebességét serkenteni, megfelelő irányba változtatva a terület biotikus vagy abiotikus paramétereit. Ha a megfelelő genetikai kapacitással rendelkező szervezetek a területen nincsenek jelen, szükséges lehet olyan kultúrákkal oltani, melyek tartalmazzák a megfelelő anyagcsere képességeket. Ugyancsak szükséges lehet az oltás, ha a specifikus lebontó szervezetek jelenlévő populációja nagyon kis egyedszámú és/vagy a növekedési sebességük nagyon lassú. A legtöbb esetben azonban az oltás nem szükséges, mert a sok szerves szennyezőanyag erős szelekciós nyomást gyakorol az adott mikrobaközösségekre, miáltal a lebontásra képes szervezetek kerülnek előnybe. Sok esetben a bioaugmentáció (talajoltás) csak kis előnnyel jár a bennszülött mikrobaközösség biodegradációjával szemben (Suthersan 2005).

A közösségen belüli kölcsönhatásoknak egyaránt lehet pozitív és negatív hatása a specifikus lebontó szervezetre és a degradáció sebességére. A mikrobiális közösségi szerkezet szinergista hatására jó példa a fermentáló baktériumok és a klórozott etének respirációjára (halorespirációra) képes szervezetek közötti kölcsönhatás. A fermentatív anyagcsere-folyamatokra képes baktériumok ritkán képesek a klórozott etének reduktív bontására, de anaerob körülmények között számos szerves molekulát oxidálnak, melynek során molekuláris hidrogént és egyszerű, rövid szénláncú zsírsavakat képeznek termékként. A halorespiráló szervezetek gyorsan redukálják a klórozott eténeket, de szükségük van egyszerű elektrondonorokra, mint például acetátra vagy molekuláris hidrogénre. Így a fermentatív szervezetek segítségével lehetőség nyílik a klórozott szénhidrogének bioremediációjára számos összetettebb szerves vegyület felhasználásával (Watanabe és Hamamura 2003, Briones és Raskin 2003).

A mikrobiális közösségen belüli kölcsönhatásokra negatív példa a specifikus lebontó szervezetek és más, a lebontási folyamatokban részt nem vevő mikrobapopulációk közötti versengés ugyanazért a növekedési faktorért (pl. elektronakceptorok, tápanyagok stb.). Ilyen versengés figyelhető meg a kőolaj-alkotó szénhidrogének, mint például a gázolaj, gázolaj aerob bioremediációja során. Az ilyen összetett keverékekben biológiailag bontható szénhidrogének ezrei vannak jelen, melyek többsége aerob körülmények között elsődleges szubsztrátként szolgál. A nem veszélyes szénhidrogének lebontása során fellépő oxigénfogyasztás hátrányos a bioremediáció hatékonysága szempontjából. Kimutatták, hogy a könnyen bontható szerves vegyületek jelenléte gátolja az MTBE bontását (Yeh és Novak 1994). Anaerob körülmények között ugyancsak káros hatása lehet a klórozott alifás szénhidrogének bontására a molekuláris hidrogénért történő versengésnek a szulfátredukáló, a metanogén és a halorespiráló szervezetek között (Suthersan 2005).

2.2 A szénhidrogének és származékaik bontási folyamatai

Mennyiségileg a legfontosabb szerves szennyezők a szénhidrogének különböző változatai. A legáltalánosabban elterjedt vegyületek a kőolajból származó szénhidrogének (n-alkánok, egyéb

2.2. A SZÉNHIDROGÉNEK ÉS SZÁRMAZÉKAIK BONTÁSI FOLYAMATAI

alifások, mono-, di- és poliaromás vegyületek, heterociklikus aromások és más kevésbé gyakori vegyületek keveréke), a klórozott oldószerek (mint pl. a triklóretilén), a felületaktív anyagok, a biocidok (pl. klórozott fenolok) és akár a N-tartalmú aromás vegyületek. Ezen vegyületek egyes tagjainak mérgező hatása, karcinogén tulajdonsága közismert. Szerencsére, a talajban és a talajvízben élő mikroorganizmusok e vegyületek közül számosat bontanak.

2007-ben nagyságrendileg 4 milliárd tonna nyersolajat termeltek ki világszerte (IEA 2007). A szénhidrogének okozta természeti katasztrófákból eredő nagymértékű környezetszennyezés rendszerint nagy visszhangot kelt, ám az ilyen balesetek valójában kevesebb mint a 10%-át adják a kőolaj-származékokból származó szennyezéseknek. A szennyeződések több mint 90%-a az üzemszerű használat során keletkezik minden olyan helyen, ahol a szénhidrogéneket kitermelik, tárolják, szállítják vagy felhasználják, pl. a benzinkutaknál, repülőtereken illetve ipari létesítmények környékén (Atlas és Philp 2005).

A szennyező vegyületek ártalmatlanítása különösen problematikus, ha a molekulák lipofil tulajdonságúak, mert akkor könnyen felhalmozódhatnak a táplálékláncokban. Ugyancsak gondot okozhat, hogy számos szennyezőanyag még mérgezőbb vegyületekké alakulhat át különböző anyagcsereutakon. A poliaromás vegyületeket vagy a triklóretilént például az emlősök P450 monooxygenáz enzimjei epoxidokká oxidálják, melyek azután kovalens kötést képezhetnek a DNS-sel, mutációt eredményezve, mely tumorokat okozhat. A biológiai bonthatóságot a talajban leginkább meghatározó tényezők az adszorpció, volatilizáció, degradáció és a kilúgzás (Atlas és Philp 2005).

2.2.1 Az alifás szénhidrogének mikrobiális bontása

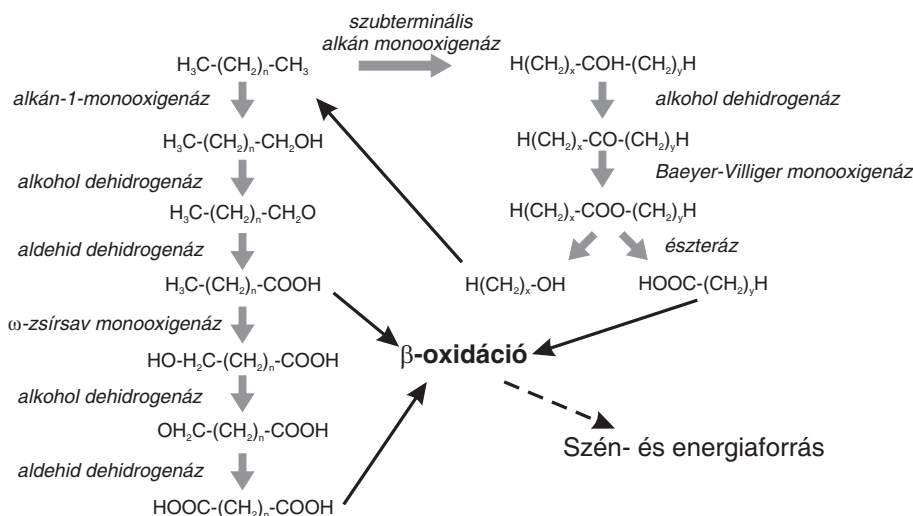
A gázolaj nagy mennyiségben tartalmaz egyszerű, nem elágazó n-alkánokat. Az n-alkánok a kőolaj legkönnyebben bontható alkotói, ezek biológiai bontását még 44 szénatomos molekulák esetében is kimutatták. Bontásuk többnyire aerob körülmények között (2.1. ábra), monoterminális támadással történik valamilyen monooxygenáz segítségével: első lépésben az alkán alkohollá oxidálódik, mely aldehiden keresztül monokarbonsavvá alakul. A monokarbonsav további lebontása β -oxidációval zajlik, miközben két szénatommal rövidebb zsírsav és acetyl-coenzim-A keletkezik, CO_2 kilépése közben. A folyamat közben egyes esetekben toxikus zsírsav-felhalmozódást is megfigyeltek, illetve ismertek példák az omega (diterminális) oxidációra is (Atlas 1981).

A legjobban feltárt alkán-degradációs útvonal az OCT plazmid által kódolt, *Pseudomonas putida* GPO1 törzsben leírt anyagcsere-folyamat. Ebben az esetben egy membránkötött monooxygenáz és egy oldott állapotban lévő rubredoxin és rubredoxin reduktáz szolgál elektronsöntként NADH-n keresztül a hidroxiláznak egy alkán alkohollá konvertálása során. Az alkohol később tovább oxidálódhat aldehiddé és szerves savvá mielőtt a β -oxidáció és a trikarbonsav-ciklus folyamataiba jutna.

Az *alkBFGHJKL* operon kódolja az alkánok acetyl-CoA-vá alakításához szükséges enzimeket, míg az *alkST* kódolja a rubredoxin reduktázt (*alkT*) és az *alkBFGHJKL* operon (*alkS*) pozitív regulátorát. Ez a két operon egymás után helyezkedik el, egy 9.7 kb DNS szakasszal elválasztva, melyen belül van az *alkN*, egy metilcsoportot fogadó-átalakító fehérjét kódoló gén, mely az alkánok kemotaxisában vehet részt. A *P. putida* P1-be inzertált szekvenciák és az *alk* gének előzőleg megállapított G+C tartalma kisebb, mint akár a gazda törzsé, akár az OCT plazmidé. Ez arra enged következtetni, hogy ezek a gének egy integrált mobil elem részei lehetnek (van Beilen et al. 1994, 2001).

Két másik plazmid rendszert részlegesen jellemeztek. A *Pseudomonas maltophilia*-ban az OCT

2.2. A SZÉNHIDROGÉNEK ÉS SZÁRMAZÉKAIK BONTÁSI FOLYAMATAI



2.1. ábra. Az aerob mikrobiológiai alkán bontás fontosabb útvonalai

plazmidot (Lee et al. 1996), amely egy olyan *alkA* gént tartalmaz, ami különbözik a *P. putida* génjétől, és az egyedi pDEC plazmidot a *Pseudomonas* sp. C12B törzsben (Kostal et al. 1998).

Amikor más törzseket is jellemeztek, feltűnt, hogy az alkán lebontó gének szabályozása és csoportosulása a baktériumok között változik. *Burkholderia cepacia*nak van egy *alkB* génje, mely nem kapcsolható más alkán bontó génekhez, mint ami pl. a *P. putida*-ban is megtalálható (Marin et al. 2001). A *alkB* promóter ebben a szervezetben katabolikusan sokkal erősebben represszált, mint a *P. putida* GPO1 esetében (Yuste és Rojo 2001).

Az *Acinetobacter* ADP1 törzsben az *alkM*, a terminális alkán hidroxiláz kódoló gén, az *alkR* gén által szabályozott, ami nem mutat hasonlóságot a *P. putida*-ban található LuxR-UhpA-szerű *alkS* regulátorral. Ráadásul, az *Acinetobacter* ADP1 törzs génjei nem egy nagy operonban vagy plazmidon találhatóak. Ugyanakkor ezek a gének 366 kb-ra vannak a *rubA* és *rubB* génektől, melyek a rubredoxint és a rubredoxin reduktázt kódolják (Geissdorfer et al. 1999, Ratajczak et al. 1998). A *alkM*, *rubA* és *rubB* gének az *Acinetobacter* M1 törzsben homológok a nekik megfelelő génekkel az *Acinetobacter* ADP1 törzsben. Érdekes, hogy ebben a törzsben két alkán hidroxiláz komplex (*alkMa* és *alkMb*) is jelen van, melyek expressziója az *n*-alkán lánc hosszúságával szabályozott. Ennek megfelelően, a rubredoxin és a rubredoxin reduktáz konstitutívan expresszálódnak. Az *alkMa* és az *alkMb* fehérjék hasonlóak a *P. putida*-ban leírt membránkötött *alkB*-hez (Tani et al. 2001).

A többszörös alkán hidroxiláz gének jelenléte egy törzsben nem egyedi eset. Két különálló monoxygenázt, egy Cu-tartalmú monoxygenázt és egy belső-membrán, Fe(II)-monoxygenázt a *P. putida* GMO1-hez hasonlóan a *Nocardioide* sp. CF8 törzsben is leírtak (Hamamura et al. 2001). Míg a réztartalmú monoxygenáz az alkánok széles tartományának eleget téve expresszálódik, addig a Fe(II)-monoxygenáz csak a több, mint hat szénatomot tartalmazó alkánok hatására indukálódik.

A alkán lebontó rendszerek fontossága ellenére kevés az információnk a nem aerob monoxygenáz közvetített anyagcsere-utakról. Az *Acinetobacter* sp. M1 törzs esetén írták le a Finnerty-útvonalt, ahol egy dioxigenáz enzim az alkánokat aldehiddé konvertálja *n*-alkil-hidroperoxidon keresztül, alkohol köztestermék nélkül (Maeng et al. 1996, Sakai et al. 1996). A dioxigenáz molekuláris oxigént igényel a *n*-alkánok (C10-C30) oxidálásának oxigén szabadgyökök termelése nél-

2.2. A SZÉNHIDROGÉNEK ÉS SZÁRMAZÉKAIK BONTÁSI FOLYAMATAI

küli katalizálásához. Egy flavin-adenin-dinukleotid kromofórt találtak, és az enzim valószínűleg Cu^{2+} -t tartalmaz. Rubredoxin és NAD(P)H nem szükséges a reakcióhoz.

Más új anyagcsere útvonalat találtak egy *Rhodococcus* mutánsban (Koike et al. 1999). Ebben az esetben, az alifás szénhidrogénekből cisz-telítetlen, a metil csoporttól terminálisan a kilencedik szénatomnál kettős kötéssel rendelkező termékek keletkeztek. Feltételezhető, hogy egy koenzim-A független cisz-deszaturáz aktivitását tapasztalták. Dutta és Harayama (2001) megjegyezte, hogy a hosszú szénláncú n-alkilbenzolok és az n-alkilciklohexánok főleg β -oxidációval bomlanak le az *Alcanivorax* MBIC4326 törzs esetén. Ugyanakkor kis mennyiségben keletkezett termékek más anyagcsere útvonalak létezésének a lehetőségét is alátámasztják. Például, 4-ciklohexil-butánsavat 4-ciklohexil-2-buténsavon (β -oxidáció) keresztül metabolizálták és más köztestermékeket nem valószínűsítettek a β -oxidáció során (4-ciklohexil-3-buténsav és ciklohexilkarbonsav).

A cikloalkánok kiemelkedően ellenállóak a mikrobiális bontással szemben. A komplex aliciklusos vegyületek a legmaradandóbb olajkomponenseknek bizonyultak a környezetszennyezések vizsgálata során. Ismertek irodalmi adatok cikloalkánok direkt oxidációjáról és kooxidációjáról egyaránt. Egyes nem szubsztituált cikloalkánok esetében figyeltek meg kezdeti kooxidációs lépést, majd az oxidált cikloalkán gyűrűjének felhasítását. A szubsztituált cikloalkánok kevésbé ellenállóak a biodegradációval szemben, különösen, ha a szubsztituens egy megfelelő hosszúságú n-alkán. Ilyenkor a lebontás a szubsztituensnél kezdődik el (Atlas és Philp 2005).

Az aerob szénhidrogén hasznosító mikrobáknak nem csak mint terminális elektronakceptorra van szüksége a molekuláris oxigénre, de szintén nélkülözhetetlen az aktivációs mechanizmusok során is. A monooxigenázok és dioxigenázok hatására az egyik vagy mindkét oxigén atom közvetlenül a hidroxilált vegyületbe épül be. Ugyanakkor számos esetben az aerob kezelés a felszín alatt különböző okok miatt nehézségekbe ütközik. Az oxigén hozzáférés gátlása, többek között az alacsony oldhatósága miatt nemcsak az légzési folyamatokat gátolhatja, hanem magát a lebontási folyamatot is (Holliger et al. 1997).

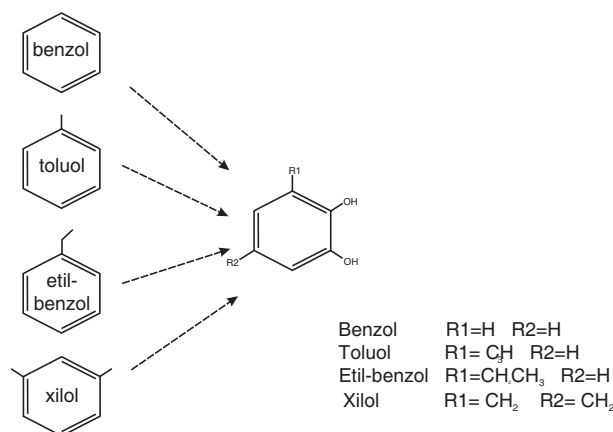
Az 1980-s évektől kezdve egyre több új mikrobát írtak le, melyek képesek voltak aromás illetve telített szénhidrogéneket hasznosítani anaerob körülmények között. Anaerob körülmények között az alkán-bontó szervezetek első sorban nitrátot, ferri-vasat vagy szulfátot használnak elektronakceptorokként. Néhány baktérium képes a szénhidrogének oxidációjára proton hidrogénné redukálása mellett is, azonban ezek a szervezetek csak a metanogén mikrobákkal szintróf kapcsolatban élnek. Egy másik csoportja az anaerob baktériumoknak, melyek képesek a szénhidrogének bontására az anoxikus fototróf szervezetek. Az első tiszta tenyészetet, mely anaerob körülmények között képes alkán bontására 1991-ben írták le. A szulfátredukáló Hxd3 törzs hexadekánon és más hosszúságú alkánokon képes volt nőni szigorúan anaerob körülmények között. A hexadekánt széndioxidig oxidálta szulfátredukció mellett (Aeckersberg et al. 1991). Azóta számos újabb tenyészetet írtak le, mely képes volt hat vagy több szénatomú alkánok hasznosítására (Aeckersberg et al. 1998, Rueter et al. 1994).

2.2.2 A monoaromás szénhidrogének mikrobiális bontása

A monoaromás szénhidrogének, mint a benzol, a toluol, az etilbenzol vagy a xilolok (a továbbiakban BTEX-vegyületek) a benzol-gyűrűn alapuló szerkezettel rendelkeznek. Ez a benzol gyűrű szintén megtalálható akár a lignin és humusz vegyületekben, akár az aromás aminosavakban, mint pl. a fenil-alanin, tirozin, triptofán. A BTEX vegyületek általánosan megtalálhatóak a gázolajban, de a kémiai ipar is nagy mennyiségben használja őket oldószerek formájában (Tsao et al.

2.2. A SZÉNHIDROGÉNEK ÉS SZÁRMAZÉKAIK BONTÁSI FOLYAMATAI

1998). Mindegyik BTEX vegyület szennyezőanyag, a benzol humán karcinogén. A többi vegyület is számos akut tünetet okozhat. A BTEX vegyületek nagyon illékonyak, de az agyagréscsészékhez könnyen adszorbeálódnak, így a talajban perzisztensek lehetnek. A talajvízbe beoldódhatnak a viszonylag nagy vízdékonyságuk miatt. A földfelszín alatti üzemanyagtartályok, csövek szivárgása, illetve a szállítás közben keletkezett csóvák miatt a BTEX vegyületek az egyik legnagyobb felszín alatti szennyezővé váltak.



2.2. ábra. A monoaromás vegyületek aerob mikrobiológiai lebontása

A mikrobák a monoaromás vegyületeket mind aerob mind anaerob úton bontani képesek. A szerkezetileg eltérő vegyületek számos különböző anyagcsere útvonalon bomlanak le néhány köz-titermékké (2.2. ábra), melyek aztán tovább bomlanak szintén néhány anyagcsere-útvonalon. Az aerob útvonalak nagyrésze oxidációs lépéseket tartalmaz, melyeket monooxigenázok és dioxigenázok végeznek. Ezen enzimeknek a termékei néhány jól meghatározható vegyület, mint például a katekol, a protokatekol, melyek szubsztitútjai azoknak a gyűrűhasító enzimeknek, melyek molekuláris oxigént használnak a gyűrű hasításához (Heinaru et al. 2000, Díz 2004).

Az ilyen típusú anyagcsere-útvonalakat két csoportba lehet sorolni. Az egyik csoport, ahol az aromás gyűrű hasításában dioxigenáz enzimek (pl. katekol dioxigenázok) vesznek részt, ezeket összefoglalóan "tod"-útvonalnak hívják. A másik csoport, ahol monooxigenáz enzimek (pl. toluol monooxigenázok) támadják az aromás gyűrű metil szubsztituenseit. Ez utóbbiakat nevezik "tol"-útvonalnak. A benzol csak a "tod"-útvonalon keresztül hasznosulhat, míg a toluol és a xilolok lebomlása mindkét anyagcsere-útvonalon keresztül megindulhat (Mikesell et al. 1993).

Dioxigenáz enzimek szerepelhetnek az aromás gyűrű bontásának számos lépésében. Egy általánosan elterjedt kezdő lépése az aromás gyűrű oxidálásának a hidroxiláció, melyet dioxigenázok végeznek, melyhez redukált kofaktorok - a katabolikus anyagcserében NADH - szükséges. A reakció termékei különböző cis-diolok. Ezután más dioxigenázok végzik a gyűrű hasítását, ezeknek nincs szükségük kofaktorokra, és a hidroxilált aromás gyűrűt hasítják fel.

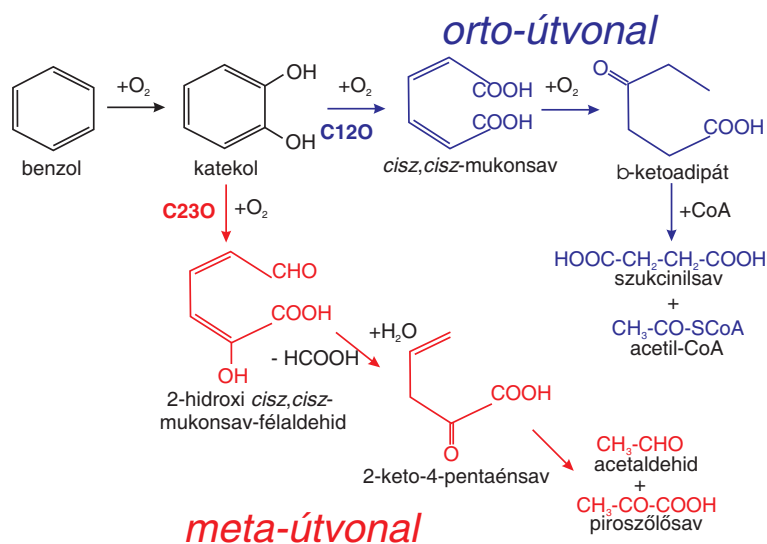
A dioxigenáz enzimek által fémjelzett lebontási útvonalak közös közti termékei a katekolok, amelyek reaktív dihidroxilált köz-titermékek, és amelyeknek aromás gyűrűje a lebontás következő lépésben felhasad. A katekol-dioxigenáz enzimek mononukleáris, nem-hem vas-tartalmú enzimek, melyek az aromás gyűrű hasítását katalizálják.

A lebontási anyagcsere-útvonalakat a gyűrűhasítás mechanizmusa alapján két csoportra lehet osztani: "orto"- és "meta"-útvonalra (Kim et al. 2003). Az "orto"-útvonalban intradiol-hasító enzimek vesznek részt, leggyakrabban a katekol 1,2-dioxigenáz, (a továbbiakban: C12O), melyek a

2.2. A SZÉNHIDROGÉNEK ÉS SZÁRMAZÉKAIK BONTÁSI FOLYAMATAI

katekol aromás gyűrűjét az C1 és C2 szénatomok között hasítják. A "meta"-útvonalban extradiol hasító enzimek vesznek részt (pl. katekol 2,3-dioxigenáz - C23O), amikor az aromás gyűrű a C2 és a C3 illetve a C1 és a C6 szénatomok között hasad fel (2.3. ábra). Az intradiol enzimek Fe(III)-t használnak, míg az extradiol enzimek Fe(II)-t vagy Mn(II)-t komplexálnak (Yamahara et al. 2002).

A két lebontási útvonalnak csupán egy közös pontja van, a katekol, a gyűrűhasítás során keletkező termékek azonban már nagyban különböznek egymástól. A C12O terméke a *cisz,cisz*-mukonsav, míg a C23O terméke a 2-hidroxi *cisz,cisz*-mukonsav-félaldehid. Ennek köszönhetően a két útvonal jól elkülöníthető egymástól, és a specifikus gyűrűhasító enzimek aktivitása, illetve azok expressziójának mértéke, valamint ezáltal az aromás vegyületek lebontásában résztvevő mikrobák lebontási potenciálja jól jellemezhető (Hegeman 1966).



2.3. ábra. Az aromás gyűrű aerob mikrobiológiai hasításának két útvonala (C12O: katekol 1,2-dioxigenáz; C23O: katekol 2,3-dioxigenáz)

Egyes kutatások kimutatták, hogy más a mineralizáció mértéke a természetben, valamint laboratóriumi körülmények között (Alvarez és Vogel 1991). Amikor szennyezett talajból izolált törzsek konzorciumához egyenlő mértékben adtak benzolt, toluolt és p-xilolt, akkor a mikrobák közössége csak a benzol és a toluol mineralizációjára volt képes, a p-xilol lebontása viszont zsákutcába jutott, és a belőle képződött 3,6-dimetilkatekol felhalmozódott a táptalajban, illetve polimerizálódott. Ennek oka a különböző szubsztrát interakciók kialakulása a BTEX-vegyületek között, illetve az, hogy számos mikroba nem tenyészthető laboratóriumi körülmények között, amelyek pedig kometabolizmus révén tovább tudnák vinni az egyébként zsákutcába jutó folyamatokat (Oh et al. 1994).

A szubsztrát-interakciók oka elsősorban az, hogy a BTEX-vegyületek lebontásában egyszerre több anyagcsere útvonal vehet részt (Tsao et al. 1998). Kimutatták azonban, hogy ha a xilolok lebomlása dioxigenáz enzimek segítségével történik ("tod"-útvonal), akkor, ahogy azt már korábban megfigyelték, reaktív dimetilkatekolok képződése és azok polimerizációja miatt zsákutcába jut a lebontás. Ez csak abban az esetben következik be, ha a táptalajban a xilolok, illetve a toluol mellett a benzol is jelen van (ami egyébként egy olaj, illetve gázolajszennyezés esetén általános), ugyanis ilyenkor mindkét anyagcsere-útvonal típus aktiválódik. Ennek hatására elkerülhetetlen, hogy a xilolok és a toluol egy részéből reaktív monometil- és dimetilkatekolok keletkezzenek, amelyek spontán polimerizálódnak egymással a táptalajban. Bár az így keletkező vegyületek még mindig

jelentős toxicitással bírnak, a szennyezett talajok esetén humuszkomponensekkel reakcióba lépve semlegesíthetnek. Ennek következtében a xiloloknak kisebb része fog beépülni a mikrobiális biomasszába, ugyanis a mikrobák a lebontás során a benzolt fogják előnyben részesíteni (Tsao et al. 1998).

Azt is megfigyelték, hogy laboratóriumi körülmények között egyes, aromás szénhidrogéneket hasznosító *Pseudomonas* törzsek esetében a "tod"-útvonalat használók válnak dominánssá a "tol"-útvonallal rendelkezők kárára (Duetz et al. 1994). Mára már az is ismertté vált, hogy a benzol és a toluol jelenléte a talajban elsősorban azon törzsek elterjedését fogja okozni, amelyek dioxigenáz enzimek ("tod"-útvonal) segítségével hasznosítják az aromás vegyületeket. Ha idővel is, de a xilolok, illetve a belőlük származó anyagcsere intermedierek is a mineralizáció sorsára jutnak. Ebben a folyamatban nagy szerep juthat a mikroszkopikus gombáknak, hiszen egyes fajok olyan lignin-lebontó enzimekkel rendelkeznek, amelyek az aromás vegyületek széles spektrumát képesek oxidálni, habár azok mineralizációjában nem vesznek részt közvetlenül. A BTX-lebontás ezen aspektusa azonban ma még kevésbé vizsgált (Prenafeta-Boldu et al. 2002).

Aromás vegyületeket anaerob körülmények között is bontanak a mikrobák. Toluolt, m-xilolt, etilbenzolt képesek denitrifikáló körülmények között bontani a *Thauera* és *Azoarcus* törzsek a β -Proteobacteria csoporton belül. Ezek a törzsek általában egy-két szubsztrátot képesek hasznosítani. A vas-redukáló szervezetek közül a *Geobacter metallireducens*-ről írták le, hogy képes a toluol bontására. Egyes szulfát-redukáló szervezetek esetén is említik, hogy képesek az aromás vegyületek degradációjára. Ilyenek a *Desulfobacula toluolica* és a *Desulfobacterium cetonium*. A toluol anaerob lebontásánál a benzoát-CoA a központi anyagcseretermék, melyet a legtöbb toluol bontó szervezetnél ki is mutattak. A *Thaurea aromatica* esetében a benzil-szukcinát szintázta a *bssABC* gének kódolják, melynek átírását a toluol indukálja (*bssD*) (Widdel és Rabus 2001).

2.2.3 A poliaromás szénhidrogének mikrobiális bontása

A poliaromás szénhidrogének (PAH-ok) szintén a dízelolaj alkotórészei, de megtalálhatóak a kátrány alkotórészeként, illetve magas hőmérsékletű ipari folyamatok, mint pl. olajfinomítás, kokszyártás során is keletkezhetnek. A csoportba 16 kiemelt szennyezőanyag tartozik, melyek feltételezeten karcinogén tulajdonságúak. A legegyszerűbb PAH a naftalin, mely két aromás gyűrűvel rendelkezik. Ahogyan nő a gyűrűk száma, úgy csökken a vízben való oldékonysága a molekulának. Kis oldékonyságuk miatt a felszín alatt elsősorban a talajban fordulnak elő, és kevésbé a talajvízben.

A mikroorganizmusok mind kometabolikus, mind metabolikus úton képesek bontani a PAH vegyületeket. A kometabolizmus elsősorban a nagy molekulatömegű vegyületek, illetve PAH keverékek bontása esetén fontos. Ezzel ellentétben számos PAH, főleg a 2-4 gyűrűt tartalmazó vegyületek, sok baktériumnak növekedési szubsztrátja. Bár izolált baktériumtörzsek esetén kimutatták, hogy egyes mikrobák képesek a naftalint anaerob környezetben is lebontani (Galushko et al. 1999, Rockne et al. 2000), a kutatók több figyelmet fordítanak az aerob bontási útvonalak feltárására.

Naftalinbontó képességet mutattak ki többek között *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa*, *P. stutzeri* (Yen és Serdar 1988), *Comamonas testosteroni* (Goyal és Zylstra 1996), *Ralstonia sp.* és *Rhodococcus* törzsek között (Boyd et al. 1997). Fenantrénbontó törzseket találtak többek között *P. putida* (Yen és Serdar 1988), *Comomonas testosteroni* (Goyal és Zylstra 1996), illetve *Burkholderia sp.* (Laurie és Lloyd-Jones 1999) törzsek között. A négy aromás gyűrűt tartalmazó pirén bontására képes a *Mycobacterium sp.* PYR-1 (Heitkamp et al. 1988) és a *Rhodococcus sp.* UW1

2.2. A SZÉNHIDROGÉNEK ÉS SZÁRMAZÉKAIK BONTÁSI FOLYAMATAI

(Walter et al. 1991) törzs, míg a fluorén bontását írták le a *Terrabacter* sp. DBF 63 (korábban *Staphylococcus auriculans*) törzsről (Monna et al. 1993).

A PAH vegyületek aerob lebontása során a kezdeti lépés általában a molekuláris oxigén beépítése az aromás magba egy többkomponensű dioxigenáz enzimrendszer segítségével, cisz-dihidrodolt képezve. Ezeket a vegyületeket aztán újra aromatizálják a cisz-diol dehidrogenázzal dihidroxilált köztestermékeket kialakítva. Ezek a szubsztrátok dioxigenázok által akár "orto"- akár "meta"-hasítási útvonalon felnyílhatnak, mely a legvégén aztán a trikarbonsav-ciklus köztestermékeinek kialakulásához vezet (Gibson és Parales 2000, Kanaly és Harayama 2000).

A naftalin bakteriális bontását sokan vizsgálták; az aerob oxidatív reakciót a naftalin dioxigenáz enzim végzi, mely naftalin dihidrodol köztestermékeket képez. Ezek a dihidrodolok aztán a naftalin dehidrogenáz enzim segítségével karbonsavvá alakulnak, majd a dihidroxinaftalin dihidrogenáz felhasítja a gyűrűt, azután több lépésben szalicilsavvá alakulnak a köztestermékek. A szalicilsav aztán katekolon keresztül tovább bomlik, akár vízzé és széndioxiddá (Cerniglia 1992).

A legtöbb esetben a naftalin transzformációját kódoló gének plazmidokon található meg. Ezek a plazmidok valószínűleg közreműködtek a naftalin-bontó géncsoport elterjedésében a *Pseudomonas* nemzetségen belül. A mobil plazmidok inzerciókon és deléciókon mehetnek keresztül miközben a gazdasejtek között átadódnak. Ugyanakkor számos esetben a naftalinbontó gén kromoszómán kódolva található (Takizawa et al. 1999).

A legjobban tanulmányozott plazmid a *Pseudomonas putida* G7 törzs NAH7 plazmidja. Ez a plazmid két operont tartalmaz, a *nah* operont, mely a naftalin lebontásának első lépéseire (naftalintól szalicilsavig) szükséges géneket tartalmazza, és a *sal* operont, mely a szalicilsavtól a katekolokig történő átalakítást kódolja. A *nahR* gén egy szabályozó fehérjét kódol (36 kDa tömegű polipeptid), mely a szalicilsav jelenlététől függ. Ez a fehérje indukálja a *nah* és a *sal* operonok transzkripcióját (Habe és Omori 2003).

A *Pseudomonas putida* G7 NAH plazmid *nah* génjei egy defektív II. osztályú transzpozonon (Tn4655) található, és így megtörténhet a katabolikus gének sejten belüli átrendeződése (Yen és Serdar 1988). Ezeket az eredményeket erősíti meg, hogy a *Comamonas*, *Ralstonia*, és *Sphingomonas* fajoknak a génjei szintén hasonlóak a klasszikus naftalin bontó génekhez. Az is nyilvánvaló, hogy valamilyen konjugatív transzfer vagy transzpozíció történt a csoportok között (Habe és Omori 2003).

A heteroatomot tartalmazó PAH-ok gátolják a csak C és H atomokat tartalmazó PAH molekulák bontását. Növelik a lag-periódust, a maradék koncentráció mennyiségét, illetve csökkentik a degradáció mértékét (Meyer és Steinhart 2000).

2.2.4 Az oxigén tartalmú szénhidrogének mikrobiális bontása

Az oxigén tartalmú szénhidrogének, mint például a metil-tercier-butil-éter (MTBE), az etil-tercier-butil-éter (ETBE) a terciér-amil-metil-éter (TAME), di-isopropil-éter (DIPE), a terciér-butil-alkohol (TBA), a metanol és az etanol nem kőolaj alkotók, de gyakran alkalmazzák őket adalékanyagként az üzemanyagokhoz, ezzel elősegítve a még teljesebb égést. A legáltalánosabban alkalmazott vegyület a MTBE, magas oktánszáma, alacsony előállítási költsége, könnyű szállítása és a gázolajhoz adagolhatósága, oktánszámnövelő ("kopogásgátló") hatása miatt. Az MTBE biodegradációjának folyamata még nem teljesen ismert. Általánosan, az alkil-éterek viszonylag stabil, nem reaktív molekulák az éterkötés nehéz hasíthatósága és a terciér- és quaterner-szén szerkezetének a mikrobiológiai támadással szembeni ellenállósága miatt.

2.2. A SZÉNHIDROGÉNEK ÉS SZÁRMAZÉKAIK BONTÁSI FOLYAMATAI

Az elmúlt évtizedben számos kísérleti eredmény bizonyította, hogy mind a baktériumok, mind a gombák között akadnak olyanok, akik képesek bontani az MTBE-t, anaerob vagy aerob módon, kometabolikusan vagy szén- és energiaforrásként.

Kimutatták a MTBE bontását metanogén környezetben, kis szerves anyag tartalmú talajban. A könnyen bontható szerves vegyületek jelenléte gátolta az MTBE lebontását (Yeh és Novak 1994). Számos laboratóriumi és terepi tanulmány számolt be arról, hogy az MTBE aerob feltételek között mikrobiológiailag bontható. Az eredmények azt a feltételezést támasztották alá, hogy egy monooxygenáz enzim felelős az MTBE TBA-vá alakításáért (Steffan et al. 1997, Hardison et al. 1997).

Mo és munkatársai (1997) három tiszta tenyészetet izoláltak, amelyek képesek az MTBE-t szénforrásként hasznosítani. Az egyik törzs a *Methylobacterium mesophilum*, melyet egy eleve-niszap közösségből izoláltak, a második *Arthrobacter ilicis*, melyet a Gingko fa terméséből, és a harmadik egy *Rhodococcus* sp., melyet a Gingko fa körül talajból izoláltak. A Gingko fa *tercier*-butil csoportot tartalmazó vegyületeket választ ki a termésében.

Egy *Graphium* nemzetségbe tartozó fonalas gombáról kimutatták, hogy n-alkán jelenlétében képes volt az MTBE-t kometabolikusan bontani. Garnier és munkatársai (1999) egy *Pseudomonas aeruginosa*-t izoláltak, mely pentán jelenlétében képes volt az MTBE-t kometabolikusan bontani.

A propán bontó *Nocardia* sp. ENV25 törzs szintén bontotta az MTBE-t, 30 óra alatt a kiindulási 20mg/l koncentrációjú vegyület 60%-át átalakította széndioxiddá. Az MTBE és a ETBE oxidációja során TBA volt a termék, míg TAME bontásakor *tercier*-amil-alkohol (TAA). A MTBE metoxi-metil csoportját formaldehiddé, majd széndioxiddá oxidálta. A TBA-t szintén tovább oxidálta 2-metil-2-hidroxi-1 propanollá, amit aztán 2-hidroxi-izovajsavvá alakított. Egyik végtermék sem szolgált a törzsnek növekedési szubsztrátjaként. Az enzimvizsgálatok megállapították, hogy a szolubilis P450 enzim oxidálta mind a MTBE-t, mind a TBA-t (Steffan et al. 1997).

A *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012 szintén képes az MTBE-t, a TAME-t és a TAA-t lebontani, *tercier*-butil-formiát és 2-hidroxi-izovajsav köztestermékeken keresztül. Ugyanakkor nem sikerült a citokróm P450 enzimet kimutatni (Francois et al. 2002).

A *Mycobacterium vaccae* JOB5, propánon növesztve, a MTBE-t *tercier*-butil-formiáttá és TBA-vá oxidálja. Ezek a termékek gyorsan felhalmozódtak extracellulárisan. Kisebb TBF és TBA termelés volt megfigyelhető, amikor a sejtek 1- vagy 2-propanolt kaptak elsődleges szubsztrátként. Nem volt MTBE lebontás, amikor a sejtek elsődleges szubsztrátja kazein-élesztő kivonat-dextróz volt (Johnson et al. 2004).

2.2.5 A halogénezett szénhidrogének mikrobiális bontása

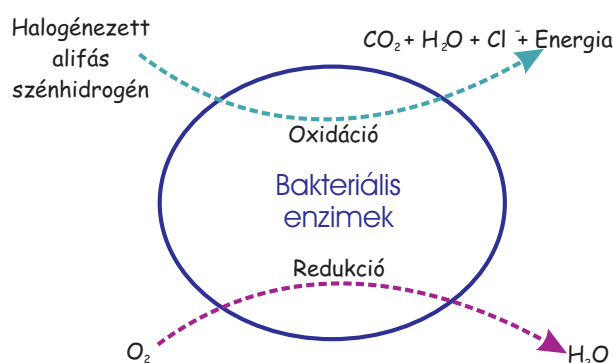
A halogénatomot tartalmazó szerves vegyületek a legelterjedtebb szennyezőanyagok közé tartoznak. Bár évtizedekig a halogén atomot tartalmazó szerves vegyületeket (a jól ismert hormonhatású anyagokon kívül) kizárólag antropogén eredetűnek tartották, amelyeknek biológiai bontása nem lehetséges, az elmúlt években számos bizonyíték látott napvilágot a természetes úton keletkező halogén atomot tartalmazó szerves vegyületek létezéséről. Biológiai eredetű szerves halogén vegyület termelését tapasztalták mind tengeri, mind szárazföldi környezetben gombák, baktériumok, növények, szivacsok, rovarok és emlősök között (Gribble 1994, van Pée 1996, 2001), de halogénezett szénhidrogén keletkezhet vulkanikus tevékenység hatására is (Jordan et al. 2000).

A halogénezett vegyületeket többek között peszticideknek, oldószereknek fejlesztették speciális fiziko-kémiai tulajdonságaik miatt. A halogén atomoknak nagy az elektronegativitása, a ki-

2.2. A SZÉNHIDROGÉNEK ÉS SZÁRMAZÉKAIK BONTÁSI FOLYAMATAI

alakult C-R kötés igen erős, a kötés ereje a halogén atom növekvő molekulatömegével csökken. A halogén atom elektronmegtartó képessége befolyásolja a molekula reaktivitását, hővezetését és dielektromos tulajdonságát is. A halogén szubsztituens mennyisége, formája és mérete szintén hatással van a molekula fiziko-kémiai tulajdonságaira, amely a sejtekbe való bejutást és az enzimatikus reakciókat alapvetően befolyásolják. A halogén szubsztituens csökkenti a vízdékonyságot és növeli a lipofil tulajdonságot, melynek következménye a biológiai hozzáférhetőség csökkenése, a táplálékláncban történő felhalmozódás növekedése, vagy a talajszemcsékhez történő szorbcója. A halogén szubsztituens közrejátszhat a szerves vegyület biológiai hatásaiban, növelve annak toxicitását, mutagén és más hátrányos tulajdonságait.

Ezeknek a vegyületeknek a mikrobiális lebontása az egyik fontos paraméter, mely meghatározza sorsukat a környezetben. A kritikus lépés a halogénezett szénhidrogének lebontásánál a halogén atom – szénatom közötti kötés megbontása. Először 1926-ban den Dooren de Jong mutatta ki a brómozott alifás savak szénforrásként történő hasznosítását (van der Meer 1994). Számos mikroorganizmus, különböző anyagcsere stratégiákkal a redox spektrum széles körében képes a halogénezett szénhidrogének lebontására. Általánosan, mikrobiális dehalogénező stratégiák közé tartozik az elimináció, az oxidáció, a redukció, a szubsztitúciós reakciók, a dehidrohalogénezés.



2.4. ábra. A halogénezett szénhidrogének direkt oxidációjának sematikus ábrája. A mikroba a halogénezett szénhidrogént szén- és energiaforrásként képes hasznosítani.

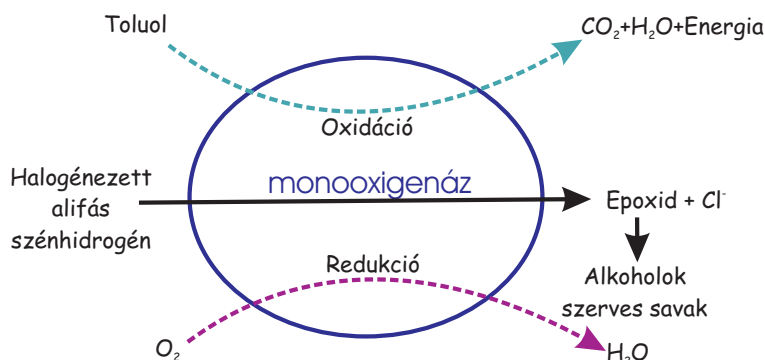
Számos aerob baktérium és gomba képes halogénezett szénhidrogént hasznosítani szén- és energiaforrásként. Általánosan elterjedt a szénváz megbontása, mind az alifás-, mind az aromás halogénezett szénhidrogének lebontásakor, melyet a dehalogénező reakció követ. Számos esetben történhet a halogénezett szénhidrogén oxidatív bontása kometabolikus folyamat révén. Néhány aerob szervezet adaptálódott az oxigén-független degradációhoz is, mint pl. a redukzív- és a hidrolitikus dehalogenálás. Az alifás halogénezett szénhidrogének dehalogénező reakciói aerob körülmények között eléggé diverzek. Hidrolitikus és szubsztitútív dehalogenáz enzimek általánosan elterjedtek számos szerves halogénezett molekulát bontó mikroorganizmus között (2.4. ábra).

Részletesen vizsgálták a *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 törzsnek (*DhlA*), a *Rhodococcus erythropolis*nak (*DhaA*) és a *Sphingomonas paucimobilis*nak (*LinB*) a haloalkán dehalogenáz enzimét is. A haloalkán dehalogenázok az α/β -hidroláz enzimsaládba tartoznak, a szén-halogén kötést egy kovalens kötésű alkil-enzim köztesterméken keresztül hasítják. A *Xanthobacter autotrophicus* *DhlA* enzimje két nagy domént tartalmaz, a fő doménben nyolc, majdnem párhuzamos β -lemezt, α -hélixekkel összekapcsolva. A másik, a fedő-domén α helikális szerkezetű. A katalízis egy Asp-His-Asp triád segítségével történik, mely funkcionálisan hasonlít a szerin-proteázokhoz, csak itt a nukleofil aminosav szerin helyett aszpartát. Az enzim kinetikájának vizsgálatakor megállapították,

2.2. A SZÉNHIDROGÉNEK ÉS SZÁRMAZÉKAIK BONTÁSI FOLYAMATAI

hogy magának a szén-halogén kötésnek a hasítása gyorsabb, mint ahogyan a halid eltávozik az aktív helyről. A *DhaA* és a *LinB* enzimek szerkezete nagyon hasonlít a *DhlA* enzimhez, néhány különbséggel az enzimek geometriájában, az aktív hely üregében és a termék stabilizációjának mechanizmusában (Janssen et al. 2001, de Jong és Dijkstra 2003).

A halosav-dehalogenázok az α -halogénezett karbonsavakat katalizálják (pl. 2-kloroacetát – az 1,2-diklóretán köztesterméke). Ezek az enzimek a halosav dehalogenáz szupercsalád tagjai, ahová a Mg-függő foszfatázok és a P-típusú ATP-ázok is tartoznak. A halosav dehalogenázok dimerek, melyek két vagy három domént tartalmaznak. Ezek az enzimek nagyon eltérnek a haloalkán dehalogenázoktól. Bár szintén aszpartát-alapú katalitikus mechanizmussal működnek, de nincs hisztidin, mely a nukleofil vizet aktiválná. A halid kötő helyük szintén eltér az előző csoport enzimjeitől (de Jong és Dijkstra 2003).



2.5. ábra. A halogénezett szénhidrogének kometabolikus oxidációjának sematikus ábrája toluol-monooxygenáz enzimmel

Aerob kometabolizmus megfigyelhető minden kloro-etén esetén, de a folyamathoz szükséges egy elsődleges szubsztrát, mint például a toluol, vagy a metán, ami azt jelenti, hogy a célvegyület degradációját csak indirekt módon lehet szabályozni (2.5. ábra). Az oxidatív halogenációt általában mono- és dioxigenázok (például metán monooxygenáz, ammónia monooxygenáz, fenol hidroxiláz, toluol monooxygenáz, toluol dioxigenáz) katalizálják, ahol egy-, vagy mindkét oxigénatom beépül a szubsztrát molekulába. Az oxigén beépülése epoxidok és halohidrinek kialakulásához vezethetnek, amelyek spontán lebomolhatnak (Anderson és McCarty 1997, Chauhan et al. 1998, Hopkins et al. 1993, Shim et al. 2001).

Az aromás halogénezett szénhidrogének esetén két fő bontási útvonalat figyeltek meg: (i) az első lépés reduktív, a dehalogénezés hidrolitikus vagy oxigenolitikus mechanizmussal történik; (ii) a dehalogénezés az aromás gyűrű hasítása után, az alifás anyagcsere-terméknél történik. Néhány szervezet esetén a kezdeti dioxigenáz támadás egy halogénezett cisz-dihidrodiolt eredményez, mely spontán tovább bomlik, ahol a halogén szubsztituens eliminálódik (Janssen et al. 2001).

Az egy- vagy két klóratomot tartalmazó aromás vegyületeket a klóratom dehalogénezése nélkül, halokatekol képződés során bontják a mikrobák. A halogénezett katekol bontása aztán hasonló útvonalon történik, mint az aromás szénhidrogének lebontása (ld. 2.2.2 fejezet). Ezzel ellentétben a poliklórozott aromás vegyületek, mint például a pentaklórfenol (PCP), bontása aerob baktériumok által egy oxigenáz támadással történik, melynek a terméke egy klorohidrokinon, azonban az aromás gyűrű hasítása általában csak az oxidatív, hidrolitikus vagy reduktív úton történő dehalogénezés után valósul meg. A *Shingobium chloropholicum* esetén egy vízdékony flavoprotein monooxygenáz katalizálja a NADPH-függő deklorinációt tetrakloro-p-hidrokinont eredményezve.

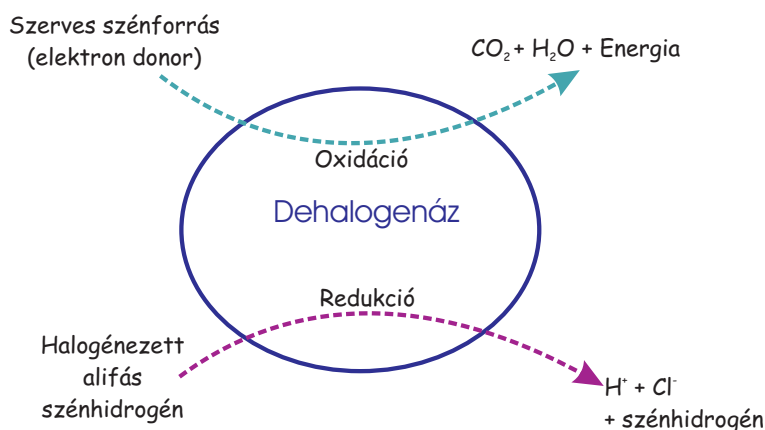
2.2. A SZÉNHIDROGÉNEK ÉS SZÁRMAZÉKAIK BONTÁSI FOLYAMATAI

Ezzel ellentétben a PCP transzformációja tetrakloro-p-hidrokinonná a *Mycobacterium chlorophenolicum* és a *M. fortuitum* esetén egy membrán-kötött citokróm P450-típusú enzim által katalizált (Fetzner 1998).

Bár a klórozott szénhidrogének oxidációja mind aerob mind anaerob környezetben bizonyított (Bradley et al. 1998, Hartmans és De Bont 1992, Singh és Ward 2004, Verce et al. 2000), az oxidáció csak a kevésbé klórozott etének (pl. cDCE ill. VC) esetén hatásos. A mai napig nem írtak le olyan szervezetet, mely aerob körülmények között képes volt a PCE-t illetve a TCE-t, mint egyedüli szénforrást hasznosítani.

Az anoxikus környezetekben a kloroetének energiaszerző oxidációja még kevésbé ismert. Bár Bradley és munkatársai (1998, 1996) leírták a cDCE és a VC mineralizációját vas- illetve mangán-redukáló környezetben, ezeknek a folyamatoknak a bioremediációban betöltött szerepét még nehéz felbecsülni. Az *Acetobacterium dehalogenans* homoacetogén baktérium és a *Dehalobacterium fromicoaceticum* képes hasznosítani a klórmetánt és a diklór-metánt szén- és energiaforrásként (Mägli et al. 1996, Traunecker et al. 1991).

Az anaerob környezetekben az uralkodó anyagcsere folyamat a reduktív deklorináció (Holliger et al. 1998, Löffler et al. 1996, 1999, Smidt és de Vos 2004). Bár ezt a stratégiát aerob szervezetek is alkalmazzák, az alifás- és aromás halogénezett szénhidrogének reduktív dehalogenációja elsősorban anaerob környezetekben ismert (2.6. ábra). Ezekben a folyamatokban a halogénezett szénhidrogén terminális elektronakceptorként szolgál a mikroba számára. Az első izolált törzs, melynél bizonyították, hogy a 3-klorobenzoát dehalogénezése energiaszerző folyamat, a *Desulfomonile tiedjei* volt (DeWeerd et al. 1990).



2.6. ábra. A halogénezett szénhidrogének reduktív deklorinációjának sematikus ábrája. A halogénezett szénhidrogén elektron akceptorként hasznosul (EPA 1998).



2.7. ábra. A perklóretilén teljes reduktív deklorinációja eténig

Azóta más csoportok között is kimutattak a dehalorespirációra képes szervezeteket, ilyenek például a proteobaktériumok egyes csoportjai (*Sulfurospirillum* – ϵ -Proteobacteria; *Desulfomonile*,

2.2. A SZÉNHIDROGÉNEK ÉS SZÁRMAZÉKAIK BONTÁSI FOLYAMATAI

Desulfuromonas, *Desulfitobacterium* – δ -Proteobacteria); a Gram pozitív szervezetek közül a *Dehalobacter*, *Clostridium* (Firmicutes) és a *Dehalococcoides* csoport tagjai (Bradley 2003, Löffler et al. 2000, Smidt és de Vos 2004).

Ezeket a szervezeteket általában szennyezett területekről izolálták (Smidt és de Vos 2004), és szigorúan anaerob szervezetek, kivéve az *Enterobacter* MS-1 törzset, mely fakultatív anaerob (Sharma és McCarty 1996). A szervezetek közül számos képes a PCE-t és a TCE-t cDCE-ig alakítani, de a mai napig csak a *Dehalococcoides ethenogenes* fajról írták le, hogy képes a PCE-t illetve a TCE-t eténig alakítani (2.7.ábra), azaz a teljes redukzív deklorináció folyamatát véghezvinni (Cupples et al. 2003, He et al. 2003, Hendrickson et al. 2002, Maymo-Gatell et al. 1999, Ritalahti és Löffler 2003).

A *Dehalococcoides ethenogenes* 195 volt az első olyan törzs, melyről leírták, hogy a PCE-t eténig redukálja, de itt az utolsó lépés, ahol a VC eténé alakul, kometabolikus és lassú folyamat volt (Maymo-Gatell et al. 1999). A nagy áttörést a *Dehalococcoides* sp. BAV1 törzs jelentette, amely elsőként volt képes a cDCE összes izomerjét és a VC-t, mint elektronakceptort hasznosítani (He et al. 2003).

Bár eredetileg azt feltételezték, hogy a biotranszformáció folyamata a klórozott oldószer forrásának közelében a nagy koncentrációban előforduló szennyező anyagok mérgező hatása miatt nem valósul meg (Bouwer 1994, Robertson és Alexander 1996), a mostani klororespirációra irányuló laboratóriumi vizsgálatokban kimutatták, hogy deklorináló közösségek képesek a redukzív deklorinációra a PCE vizes oldatának telített koncentrációja esetén is (Yang és McCarty 2000). Nielsen és Keasling (1999) kimutatták, hogy ilyen nagy PCE koncentráció esetén a legtöbb az elektrondonorból származó (glükóz) redukáló ekvivalenst a redukzív deklorináció folyamata során használták el a mikrobák, talán éppen amiatt, hogy a nagy PCE koncentráció a többi mikrobiális anyagszere folyamatokat gátolta.

Az aromás halogénezett szénhidrogének bontását kimutatták nitrát-, szulfát-, Fe(III)-redukció során is, számos kloro-, bromo-, és fluorbenzoát-bontó szervezetet izoláltak a *Proteobacteria* közül, mint pl. *Acidovorax*, *Azoarcus*, *Bradyrhizobium*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, és *Thaurea* (Smidt és de Vos 2004).

Az első redukzív dehalogenáz, melyet izoláltak, a *Desulfomonile tiedjei* 3-klorobenzoát redukzív dehalogenáza volt. Ez az enzim egy membránkötött fehérje, amely az oxigénre nem érzékeny és egy hem-molekulát is tartalmaz (Ni et al. 1995). A 3-klorobenzoát alapú dehalogenációban egy citokróm *c* is részt vesz, míg minden más redukzív dehalogenáz enzimnél korrinoid kofaktort találtak. A *Desulfitobacterium* PCE-S PCE redukzív dehalogenáza is membrán kötött molekula. Az enzimet fumaráton és piruváton nevelt sejtekből izolálták, amely azt mutatja, hogy az enzim konstitutívan expresszálódik. Egy alegységből áll, egy korrinoid kofaktort és 8 Fe atomot ill. 8 savra bomló ként, mint kofaktort tartalmaz. Ez az enzim a klórozott aromás vegyületeket nem bontja. Az enzimet a cianid és a szulfid gátolja, amely arra utal, hogy a kobalamin(III) részt vesz a katalitikus reakcióban. Ehhez az enzimhez nagyon hasonló enzimet tisztítottak a *Dehalobacter restrictus*ből is. A *Dehalospirillum multivorans* redukzív dehalogenáza hasonló aktív helyet tartalmaz, de a fehérje nem membránkötött, hanem a szolubilis frakcióban van a sejtben. Az enzimet kódoló gén vizsgálatakor megállapították, hogy két leolvasási keret van, a *pceA* és a *pceB*. A *pceA* kódolja a redukzív dehalogenázt, míg a *pceB* egy hidrofób fehérjét kódol, mely két transzmembrán hélix résszel horgonyként szerepel (Holliger et al. 1998).

Anaerob kometabolikus redukzív deklorinációt figyeltek meg metanogén (Fathepure és Boyd 1988), acetogén (Terzenbach és Blaut 1994), illetve szulfogén (Cole et al. 1995) környezetben PCE

2.3. A SZÉNHIDROGÉNEK LEBONTÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK

esetén. Számos anaerob baktérium tetrapirrol kofaktorokkal, flavoproteinekkal, ferredoxinokkal katalizálja a kometabolikus redukzív deklorinációt.

2.3 A szénhidrogének lebontását befolyásoló környezeti tényezők

Egy adott környezetben az anyagcsere folyamatokat a mikroba-közösség élettani képessége, a hőmérséklet, az uralkodó redox körülmények termodinamikai korlátai, az elérhető elektronakceptorok és donorok mennyisége és a szubsztrát elérhetősége befolyásolja.

2.3.1 A hőmérséklet hatása

A hőmérséklet befolyásolja a szénhidrogének fizikai és kémiai állapotát, így alapvetően hatással van azok biodegradációjára. Kis hőmérsékleten az olaj viszkozitása megnövekszik, a toxikus és volatilis komponensek párolgása lecsökken. Egyes kutatók szerint a lebontás optimális hőmérséklete 35°C (Deeb és Alvarez-Cohen 1999), ám a szénhidrogének biodegradációja tág hőmérsékleti határok között megtörténhet. Ismertek pszichrofil, mezofil és termofil mikrobák is, melyek képesek szénhidrogének hasznosítására. A legtöbb szennyezett terület hőmérséklete nem optimális, ezért feltétlenül szükséges olyan szervezetek megismerése és izolálása, melyek képesek alacsonyabb hőmérsékleten is a biodegradációra. Leírtak szénhidrogén degradációt 0°C alatti hőmérsékleten, de izoláltak már olyan *Rhodococcus* törzset is az Antarktiszról, mely számos n-alkánt volt képes lebontani -2°C-n, de nagyobb hőmérsékleten nem (Bej et al. 2000).

Whyte és munkatársai (1998) izoláltak olyan *Rhodococcus* törzset, mely 0-30°C között képes az alkánok lebontására. Klug és Markovetz (1967), valamint Mateles és munkatársai (1967) pedig 70°C-on folyó szénhidrogén lebontásról számoltak be. Számos szerző írt le mikrobiális deklorinációs folyamatokat és izolált törzseket boreális, vagy arktikus talajokból (Männistö et al. 1999, Mohn et al. 1997).

A mikrobaközösségek összetétele évszakos váltakozást mutat, ami a szénhidrogének adott hőmérsékleten történő lebontásának sebességében is tükröződik. Atlas és Bartha nagyobb mennyiségben tudtak kimutatni 5°C-on szénhidrogéneket bontani képes mikrobákat télen, mint az egyéb évszakban gyűjtött mintákból (Atlas 1981).

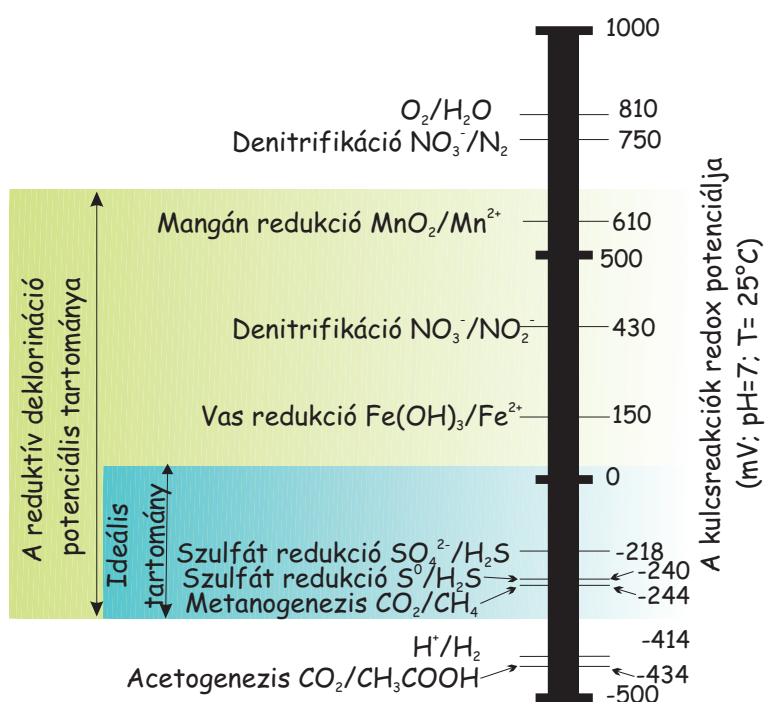
A hőmérséklet hatása az eltérő összetételű olajok esetében különböző. Kis hőmérsékleten a volatilis szénhidrogének, melyeknek egy része toxikus a mikrobákra, lassabban párolognak, ami a biodegradáció megindulását késlelteti. Egy későbbi tanulmányban Atlas hét különböző nyersolajat hasonlított össze. 20°C-n a kisebb átlagos molekulatömegű (könnyebb) olajok nagyobb abiotikus veszteséget szenvedtek és könnyebben indult meg biológiai lebontásuk, mint a nagyobb átlagos molekulatömegű (nehezebb) olajoké, melyek mineralizációjának sebessége is számottevően kisebbnek bizonyult. 10°C-on számottevő lag fázis volt megfigyelhető a könnyű olaj biodegradációjának megindulása előtt, míg a vizsgált nehéz olajban nem találtak toxikus volatilis frakciót. A könnyebb olajok több olyan volatilis összetevőt tartalmaznak, melyek a mikrobákra toxikusak és 10°C-on csak lassan távoznak, így gátolva a biodegradációt alacsonyabb hőmérsékleten. Horowitz és Atlas az Északi-sark felszíni vizeit tanulmányozva kimutatta, hogy nyáron a különféle szénhidrogének bontása azonos sebességgel folyik. Állításuk szerint alacsony hőmérsékleten a kometabolizmus fontos szerepet játszik a szénhidrogének lebomlási sebességének meghatározásában (Atlas 1981).

2.3. A SZÉNHIDROGÉNEK LEBONTÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK

A poliklórozott bifenil (PCB) deklorinációja is hőmérsékletfüggő. Wu és munkatársai (1997) megállapították, hogy 8 és 34°C között 28%–65% között csökkent a hexa- ill. nonaklorobifenilek mennyisége, és nőtt a tri- és tetrabifenileké. Az optimális hőmérséklet 20–27°C volt a teljes deklorinációhoz. Négy különböző mikrobiális deklorinációs folyamatot állapítottak meg, átfedő hőmérsékleti intervallumokkal. Holliger és munkatársai (1992) poliklórbenzolok mikrobiális biodegradációjánál az optimális hőmérsékletet 30°C-nál állapították meg. Kengen és munkatársai (1999) sikeresen kimutatták a PCE redukzív deklorinációját cDCE-re 65°C-n is.

2.3.2 A redox-potenciál tartományok befolyásoló hatása

Az egyes mikrobiális folyamatok eltérő termodinamikai feltételek között zajlanak le. A mikroorganizmusok azokat a folyamatokat preferálják, melyekből több energiát nyernek anyagcserejükhez. A környezet termodinamikai feltételei meghatározzák a környezetben történő anyagcseretípusokat.



2.8. ábra. A különböző redox-potenciálú zónákban elérhető elektronakceptorok, külön jelezve a redukzív deklorinációra alkalmas redox-potenciál tartományt

A terminális elektronakceptor folyamatok megoszlását a területre beáramló és onnan kiürülő elektronakceptorok aránya határozza meg. Az oldott elektronakceptorok (O_2 ; NO_3^- stb.) mennyiségének változása a talajvízáramlás sebességétől függően lehet gyors folyamat (O_2 ; NO_3^- stb.), míg az ásványokból származó elektronakceptorok (Mn, Fe) lassú változást okozhatnak a folyamatokban (Baedecker et al. 1993). Az elektronakceptorok kiürülésének üteme általában függ az elérhető elektrondonorok (ált. szerves szén és molekuláris hidrogén) mennyiségétől és összetételétől (McMahon és Bruce 1997).

Az egyes elektronakceptorok redukálásából származó Gibbs-féle szabad energia alapján a legtöbb energiát a mikrobák az oxigén redukálásából képesek nyerni, azt követi a nitrát, a vas(III), a

2.3. A SZÉNHIDROGÉNEK LEBONTÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK

szulfát és a karbonát.

Számos szennyezőanyag oxidatív körülmények között gyorsabban bomlik le, mint anaerob környezetben. A szénhidrogéneket aerob módon támadó első enzimek oxigenázok, melyeknek feltétlenül szükségük van a molekuláris oxigénre. A talajok esetében az oxigén bejutása számos esetben gátolt – például a talaj porozitása nem megfelelő – így a gázok beoldódása a vizes fázisban korlátozott. Ugyancsak akadálya lehet az oxigén kis mértékű oldódása vízben. Ha nincs megfelelő mennyiségű elérhető oxigén, akkor hiába lehet az adott vegyületet aerob körülmények között bontani, ezek a folyamatok nem fognak érvényesülni. Az aerob folyamatok serkentése céljából gyakori bioremediációs technológia a terület átlegegőztetése, vagy oxigén kibocsátó vegyületek (pl. hidrogén-peroxid) juttatása a területre.

Az aerob respiráció, mint az energetikailag legelőnyösebb folyamat hiánya, érdekes összetett biogeokémiai stratégiákat tud kialakítani anaerob környezetben. Anaerob körülmények között az elektron és szén útjának átfogó képe egy olyan szukcessziós folyamatot ábrázol, mely sok, különböző mikrobák által katalizált degradációs lépésből áll össze. A szerves makromolekulákat különböző mikrobacsoportok együttesen bontják (mint pl. elsődleges és másodlagos fermentálók és metanogének), a végső lépés ebben a hálózatban a terminális elektronakceptor folyamatok, melyekben elektronakceptorok redukálódnak kis molekulatömegű köztestermékekkel (pl. acetát, formiát), vagy molekuláris hidrogénnel (Löffler és Sanford 2005).

Az anaerob lebontás kulcsfontosságú köztesterméke az oldott molekuláris hidrogén, mely nem csak közös terméke számos fermentációs folyamatnak, de szintén elektrondonor lehet terminális elektronakceptor folyamatoknál. A molekuláris hidrogén rendelkezik a legrövidebb tartózkodási idővel az anoxikus környezetben. A H_2 fogyasztás és termelés mértékét az enzimatis reakciók termodinamikája irányítja. A több fajta, eltérő tulajdonságú hidrogenázok jelenléte miatt mind a H_2 fogyasztás, mind a H_2 termelés végbemehet párhuzamosan egyetlen mikroba-közösségen belül is, akár populációk között is. Természetes ökoszisztémákban a redukált szerves anyagok áramlása, a H_2 képző és a H_2 fogyasztó folyamatok egy állandósult H_2 koncentráció kialakulásához vezetnek. Ezt az állandósult H_2 koncentrációt a domináns terminális elektronakceptor folyamat energetikája szabályozza. A H_2 (fogyasztási) küszöb az a minimum H_2 koncentráció, mely egy terminális elektronakceptor redukálásából elérhető egy adott elektrondonor jelenlétében. A H_2 küszöbkonzentráció a redox reakciók Gibbs-fel szabad energiájával ellentétesen korrelál.

Ha egy adott szennyezőanyag elektronakceptorként szolgál (pl. PCE, TCE) egy mikroba számára, akkor a vegyület redukálásából származó energia illetve a H_2 küszöbkonzentráció alapján meghatározható milyen redox feltételek között történhet meg a molekula lebontása. Az egyes kompetitor elektronakceptorok (melyek redukálása nagyobb energiát eredményez) jelenléte gátolhatja a vegyületek lebontását. Számos esetben leírták, hogy a redukatív deklorináló folyamatokat a szulfát jelenléte gátolhatja, mert a szulfátredukáló szervezetek kiszorítják a dehalorespirálókat (Townsend és Suffita 1997, Sung et al. 2003). Ha egy adott szennyezőanyag elektrondonor a mikroba számára, akkor annak oxidációjához szükség van elérhető, energetikailag kedvező elektronakceptorra is. Ennek ismeretében, ha ismerjük az adott vegyületcsoport lebontási útvonalait, a terület részletes felmérése után megjósolható, milyen mikrobiológiai folyamatok fognak lezajlani. Elméletben a H_2 koncentrációt a domináns terminális elektronakceptor folyamat energetikája szabályozza.

2.3.3 A felvehető tápanyagok hatása a biodegradációra

Az *Exxon Valdez* tankerhajó balesetéből származó olajfolt felszámolására alkalmazott műtrágya kezelések és egyéb hasonló témájú munkák rávilágítottak arra, hogy a tápanyaghiány limitáló tényező lehet a szénhidrogének biológiai lebontása során. Egy olajfolt egy behatárolt területen nagy mennyiségű elérhető szén jelenlétét jelent a mikrobák számára, azonban az adott területen a szén beépítéséhez szükséges mennyiségű nitrogén és a foszfor elérhetősége kritikus fontosságú. A vizes közegekben, az erősen turbulens vizeket kivéve, az olajfilm környezetének nitrogén és a foszfor ellátását csak a diffúzió biztosíthatja, ami viszont elégtelen lehet a mikrobák növekedése és anyagcseréje szempontjából ideális C/N és C/P arány fenntartásához.

Atlas szerint az optimális C/N és C/P arány tengervízben 10:1 és 100:1 (Atlas 1981). Dibble és Bartha (1979) a nyersolaj biodegradációját, illetve nitrogén, foszfor és vas hozzáadásának a degradációra kifejtett hatását vizsgálták szennyezett és viszonylag tiszta, litorális vizekben, amelyet a New Jersey-i partok mentén gyűjtöttek. A nitrogén, foszfor és a vas hozzáadása nélkül mindkét mintában elhanyagolható volt a nyersolaj biodegradációja. A nitrogén és foszfor adagolása rendkívül gyors biodegradációt tett lehetővé: az olaj több, mint 73%-a lebomlott három nap alatt a szennyezett vízben. Ha a vízminták vastartalma nagy volt (5,2 mM), a vas adagolása nem fokozta a lebontást. Kevésbé szennyezett és kisebb vastartalmú (1,2 mM Fe) vízminták esetében az olaj biodegradációja számottevően lassúbb volt (21% 3 nap alatt), de vasként hozzáadása stimulálta a lebontást (Atlas 1981). Fedorak és munkatársai (1981b, 1981a) ÉNy Kanada boreális talajaiban vizsgálta az *in-situ* olaj degradációt. Nitrogén és foszfor tartalmú műtrágya alkalmazása a baktériumok számának gyors növekedését okozta, miközben a gombák száma nem nőtt. Ezt az n-alkánok és az izoprenoidok gyors eltűnése, valamint a telített vegyületek tömegének folyamatos csökkenése követte.

Ha a szennyező vegyület elektronakceptorként szolgál a mikroorganizmusok számára, akkor a mikrobáknak szükségük van elektrondonorokra is az anyagcsere-folyamataik fenntartásához. Skubal és munkatársai (2001) azt tapasztalták, hogy BTEX vegyületekkel és TCE-vel egyaránt szennyezett területeken az aromás vegyületek hatására a TCE bontása is gyorsabb volt. Mások a talajvizet szerves anyaggal gazdag szilárd fázison vezetik keresztül, hogy a reduktív deklorinációhoz szükséges megfelelő mennyiségű elektrondonor a rendelkezésére álljon a mikrobáknak (Kao et al. 2003). Szintén megoldás lehet olyan vízzoldékony anyagok adagolása a területre, melyek elektrondonorként szolgálnak a bontó szervezeteknek (Borden és Rodriguez 2006, Freeborn et al. 2005). A megfelelő adalékanyag kiválasztása azonban nem egyszerű feladat. A szennyezett területen élő mikrobaközösség számos tagja hasznosíthatja ugyanazon vegyületeket szénforrásként. A sikeres bioremediációnak azonban az a célja, hogy azokat a mikrobákat serkentsük, melyek a szennyező anyagokat képesek lebontani. A halogénezett szénhidrogének reduktív deklorinációjára csak néhány szervezet képes, jellemzően molekuláris hidrogént és egyszerű szerves savakat hasznosítva elektrondonorként (Maymo-Gatell et al. 1999, Löffler et al. 2000, He et al. 2003). Ezeket a vegyületeket számos metanogén, szulfátredukáló, vagy vasredukáló mikroba is felhasználja anyagcsere-folyamataihoz. Ezért a megfelelő adalékanyag kiválasztása kétszeresen is fontos az ilyen típusú serkentett bioremediáció esetén. Egyrészt az adalékanyag serkenti a deklorináló szervezeteket, másrészt a megfelelő adalékanyag serkenti a H₂ termelő szervezeteket is (és áttételesen a dehalorespirálókat). Fennel és munkatársai négy különböző elektrondonort vizsgáltak laboratóriumi környezetben. A vajsav és a propionsav kisebb metanogén aktivitást eredményezett, mint az etanol vagy a tejsav adagolása. Az etanol hatására nem zajlott le a teljes deklorináció (Fennell et al.

2.3. A SZÉNHIDROGÉNEK LEBONTÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK

1997). Ebből kettő, a propionsav és a vajsav csak kis H_2 parciális nyomás mellett fermentálható, az etanol és a tejsav egy nagyságrenddel nagyobb parciális nyomás mellett is (Thauer et al. 1977).

2.3.4 A szennyezőanyag toxicitása

A szénhidrogén molekulák lipofil tulajdonsága fontos szerepet játszik a toxikus hatás kialakulásában is. A lipofil tulajdonság számos fizikai és kémiai karaktertől függ, mint pl. a molekuláris felület, a molekuláris térfogat, polaritás.

A lipofil anyagok akkumulációja a kettős-lipidmembránban növelheti a hozzáférhetőségüket a sejt számára, de ugyanakkor toxicitási problémákat is okozhat. A lipofil anyagok képesek a foszfolipidmembránt hidrofób interakcióval rombolni, növelik a passzív protonáramlást (Sikkema et al. 1994).

Az anyag lipidmembránba való beépülése erőteljesen megváltoztatja a membrán integritását (Sikkema et al. 1994). Intakt sejtek esetében a protonpumpa és az elektromos potenciál sérülése a citokróm c oxidáz gátlását is okozza. Ez gátolja a légzést, a pH csökken a sejten belül, ami működési zavarokat eredményez. A membrán szerkezetének megváltozásával működése is megváltozik, ami kihat természetesen a membránkötött enzimek működésére is. A növekedésgátlás egyik oka a légzés gátlása, mégpedig a membránkötött elektronszállító fehérjék szintjén (Sikkema et al. 1994).

A lipofil molekuláknak a beépülése észrevehetően új eloszlást okoz a membrán fehérjei és lipidjei között. A membránszerkezet megváltozása hatással lehet olyan speciális membránalkotók doménjeinek újraszerveződésére, mint pl. szupramolekuláris fehérjék és lipidfolyosók. A lipofil anyagok felhalmozódása a membránban a membrán tágulását eredményezi, amely hatás korrelál a molekula hidrofób tulajdonságával. A membránban lezajló változás függ a szénhidrogén összetevőinek a membránnal történő kölcsönhatásától. A lipofil anyagoknak a membránbeli koncentrációgrádiens szerinti eloszlása attól függ, hogy a lipid alkotórész mennyire poláris tulajdonságú. A lipofil anyagok beépülése a membránba hatással lehet a membránlipidek laterális heterogenitására illetve a csoportos előfordulásukra. Tehát azok a vegyületek, amelyek reagálnak a membránnal, különböző mértékben keltenek zavart benne, attól függően, hogy a kettős rétegnek mely szintjét preferálják (Sikkema et al. 1995).

A foszfolipidek szerkezetének megváltoztatásával nőhet a sejt toleranciája a lipofil anyagok iránt úgy, hogy csökkenti a membránba való akkumulációjuk lehetőségét. Egyik ilyen lehetőség a *cisz* konformáció *transz* konformációba való változtatása. Ez a folyamat, *Pseudomonas putida* esetén csökkenti a membrán fluiditását és a fenol toxikus hatását (Heipieper et al. 1992). A Gram-negatív baktériumok kevésbé érzékenyek a lipofil anyagokra, mint a Gram-pozitívak. A lipofil anyagok magasabb toleranciája a külső membrán rezisztenciájával magyarázható, mivel nem találtak különbséget azonban a Gram-pozitív és -negatív baktériumok citoplazma-membránjának toleranciájánál ugyanezen anyagok esetében (Vermue et al. 1992).

A mikroorganizmusok számára a finomított olaj sokkal toxikusabb, mint a nyersolaj, mert a volatilis szénhidrogének toxikusabbak, mint a nagy-szénatomszámúak (Walker 1975). Az alkánok toxicitása arányos a lánc hosszúságával, ami tökéletesen korrelál a vízben való oldhatóságukkal, illetve a hidrofóbicitásukkal (Gill és Ratledge 1972).

Liposzómával történt vizsgálatok azt bizonyították, hogy a ciklikus terpének - mint például a tetralin - beépülnek a sejtmembránba, és az az ionok számára permeabilis lesz. Ennek egyik következménye a protonpumpa sérülése, az elektromos potenciál és a pH megváltozása. *E. coli*-foszfolipidból készített liposzóma esetében a ciklikus szénhidrogének a membrán belső, lipofil

2.3. A SZÉNHIDROGÉNEK LEBONTÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK

régiójába épülnek be. A szénhidrogének beépülése a foszfolipidek közé erősen megváltoztatja a membrán fluiditását. A membránba süllyedt fehérjék körüli lipidgyűrű szerkezete is megváltozik, ami konformációváltozást okozhat (Sikkema et al. 1995).

A különböző amfipatikus anyagok képesek mind a külső, mind a belső rétegben felhalmozódni, attól függően, mennyire agresszívek. Ezt a tulajdonságukat befolyásolja a mindkét rétegben specifikusan elhelyezkedő foszfolipidekkel való kölcsönhatásuk. Ugyanakkor a membrán belső elasztikussága nagymértékben képes ellensúlyozni ezeknek az amfipatikus anyagoknak a beépülését. A kationos molekulák nagyrészt a külső rétegbe épülnek be, és ezek bekerülése a belső rétegbe flip-flop mozgással viszonylag ritka és lassú folyamat. Ez a beépülő anyagok aszimmetrikus eloszlásához vezet, leginkább akkor, amikor ezen anyagok anyagcseréjének sebessége gyorsabb, mint a flip-flop mozgás.

A naftalin nagy koncentrációja toxikus tud lenni bizonyos Gram-negatív mikrobák számára, de ehhez képesek alkalmazkodni is, ha előtte kis koncentrációjú táptalajon tenyésztjük őket (Volkering et al. 1995).

A klórozott alifás szénhidrogének nem csak az eukarióta szervezetekre lehetnek károsak. Bár számos mikroorganizmus képes bontani őket, nagy koncentrációban azonban gátolják bizonyos szervezetek működését. Wackett és munkatársai (1989) megállapították, hogy a TCE *Pseudomonas putida* F1 törzsre kifejtett toxicitását a toluol dioxigenáz aktivitás eredményeképpen felhalmozódó anyagcseretermékek okozzák. Ugyancsak toxikusak TCE illetve annak bomlástermékei a metanotróf mikrobákra (Alvarez-Cohen és McCarty 1991, Oldenhuis et al. 1991a).

A TCE nagy koncentrációban toxikus hatást fejtett ki a *Methylosinus trichosporium* OB3b törzs esetén is, amely kis koncentrációban képes volt a metán monooxygenáz enzimmal bontani a vegyületet. A TCE átalakítása szintén inaktíválta a sejteket. Az inaktiváció mértéke arányos volt a bontott TCE mennyiségével, a maximális degradációt 2 μmol TCE/1 mg sejt koncentráció esetén érték el. A radioaktív TCE-vel történt kísérletek alapján megállapították, hogy az inaktiváció a bomlástermék és a sejtfehérjék (a metán monooxygenáz hidroxiláz alegysége) közötti nem-specifikus kovalens kötés kialakulása okozta (Oldenhuis et al. 1991b).

2.3.5 A szénhidrogének fizikai állapota

A fizikai állapotnak kiemelt jelentősége van a szénhidrogének lebontásában. Nagyon kis koncentrációban a szénhidrogének képesek vízben oldódni, de a legtöbb olajszenyezés sok nagyságrenddel az oldhatósági határ feletti mennyiségű olaj környezetbe kerülésével jár. A szennyezés terjedése meghatározza az olajbontó mikrobák számára kolonizálható felületet. Vízben az olaj általában vékony filmet képezve terjed, ezt azonban az alacsony hőmérséklet az olaj viszkozitásának növekedése miatt lassíthatja. A talajban a szénhidrogének a növényi anyagok és a talajszemcsék felszínén megkötődnek, ami szintén lassítja a terjedést (Atlas 1981).

Wodzinski és LaRocca (1977) leírták, hogy a folyékony halmazállapotú aromás szénhidrogéneket a mikrobák képesek hasznosítani a víz-szénhidrogén határfelületen, a szilárdakat azonban nem. 30°C-on a folyékony difenil-metánt egy *Pseudomonas* faj képes lebontani, még 20°C-on ugyanaz a faj a szilárd difenil-metánt nem képes. A szilárd naftalin nem hasznosul, de ha egy folyékony szénhidrogénben feloldják, akkor már igen. Atlas szerint szilárd hexadekánon 5°C-on alig növekednek a baktériumok, ha viszont a hexadekánt más szénhidrogénben vagy nyersolajban feloldják, akkor a hexadekán számottevő degradációja figyelhető meg (Atlas 1981).

A szénhidrogén lebontó mikroorganizmusok jellemzően az olaj-víz határfelületen aktívak. Meg-

2.3. A SZÉNHIDROGÉNEK LEBONTÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK

figyelhetőek az olajcsepp teljes felszínén, az olajcsepp belsejében azonban csak akkor, ha az vízzárványt tartalmaz. A megnövelt határfelület fokozza a degradáció intenzitását. Az emulziós cseppek kialakulásának további előnye, hogy az oxigént és a tápanyagokat is könnyebben hozzáférhetővé teszi a mikrobák számára (Atlas 1981).

A vizes rendszerekben az olaj többnyire emulziót képez. Ez egy kémiai és fizikailag egyaránt heterogén rendszer, melynek kialakulásában a fotooxidáció és a mikrobiális oxidáció egyaránt szerepet játszik. A "hab" helyenként finom emulziót formál, ami jól hozzáférhetővé teszi a szénhidrogéneket a mikrobiális degradáció számára, megjelenhetnek azonban benne olyan olajbuborékok is, amelyek jóval nagyobb átmérővel rendelkeznek. Ez utóbbiak fajlagos felülete igen kicsi, ezért a mikrobiális degradáció számára szinte hozzáférhetetlenek. Davis és Gibbs azt tapasztalta, hogy a nagy tömegben felgyülemlett hab igen lassan bomlik le, több mint két év alatt sem szenved tényleges szénhidrogén veszteséget (Atlas 1981).

2.3.6 *Biológiai hozzáférhetőség*

Az egyes vegyületek életideje a talajban, vagy talajvízben nagymértékben függ a fizikai tulajdonságaiktól. Az egyes molekulák biológiai bontásának lehetőségét nem csak a megfelelő enzimkészlet jelenléte határozza meg, hanem a molekula elérhetősége is. Az alacsony polaritású, vízben nem oldódó, lipofil molekulák sokáig jelen lehetnek a közegben amiatt, hogy a bontására képes szervezetek nem férnek a molekulához.

Semple (2004) úgy határozta meg a biológiai elérhetőséget egy adott időpontban, mint a vegyületnek azt a frakcióját, amely szabadon át tud jutni abból a közegből, ahol a szervezet él, a szervezet sejtmembránján. A biológiai hozzáférhetőséget a szennyező anyag fizikai-kémiai tulajdonságai és az őt felvenni szándékozó szervezet típusa együttesen határozza meg. A biológiai hozzáférhetőség erősen függ a talaj típusától (Alexander 1999).

Az az arány, amelyben egy adott szerves vegyület a vízben oldódik, kritikus a biológiai bontathatósága szempontjából, minthogy befolyásolja a mikrobákhoz történő szállításának arányát. A transzfer arányát meghatározza az egyensúlyi és az aktuális koncentráció a vizes illetve a nem-vizes fázis között. A volatilis szénhidrogének esetén a másik fontos tényező a gázfázis és a vizes fázis közötti megoszlás, melyet a vegyület gőznyomása határoz meg. Általánosan a szénatomszám növekedésével, vagy a halogénatomszám növekedésével csökken a gőznyomás. Ugyancsak meghatározza a vegyületek hozzáférhetőségét a szorpciós képességük a szilárd felületekhez, mint például a talajszemcsékhez. A hidrofóbicitás növekedés általában nagyobb arányú kötődést okoz a talajszemcsékhez. A szubsztituált halogén atomok számának növelése csökkenti a vízdékonyságot, növeli a szorpciós potenciált.

A mikrobák egy része képes felületaktív anyag termelésére, amellyel képes növelni az oldott szerves anyagok koncentrációját a vizes fázisban, úgy hogy micellákba vagy aggregátumokba elegyíti. Egyes mikrobák, esszenciális, vízben nem oldódó alkánokon fenntartva, felületaktív vagy emulgeáló anyagot termelnek, melyek a szénhidrogéneket 0.1-1 mikronos cseppekké alakítják át (Einsele et al. 1975). Ezek a felületaktív anyagok növelik a szerves molekula látszólagos oldhatóságát, és serkenthetik azok hasznosítását a mikroba számára (Goswami és Singh 1991). A mikrobiális felületaktív anyagok általában poliszaccharidok, poliszaccharid-fehérje komplexek, vagy glikolipidek (Rosenberg 1986). Ezeket a vegyületeket keményítőtől és más sejtalkotókból enzimatis bontás révén állítják elő a mikroorganizmusok. Egy kutatás kimutatta, hogy egy biológiai felületaktív anyag két formája, egy monorhamnolipid és egy dirhamnolipid növelte a fenantrén

2.3. A SZÉNHIDROGÉNEK LEBONTÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK

látszólagos oldékonyságát (Zhang et al. 1997, Wang et al. 1998).

Ugyanakkor a toxikus molekulák esetén (TCE, poliklórozott fenolok), a csökkent biológiai hozzáférhetőség pozitív lehet a biológiai aktivitás szempontjából.

A PAH vegyületek állandósulnak a talajokban és az üledékekben, mert erős a szorbiós képességük a talajrészecskékhez. Ugyancsak hosszú az életidejük a különböző szilárd földtani közegekben a poliklórozott bifenileknek, melyek, mint pl. a DDT is gyakori peszticidek. A nitroaromások, mint pl. a TNT, természetes kioldódása is igen lassú folyamat (Stokes et al. 2005).

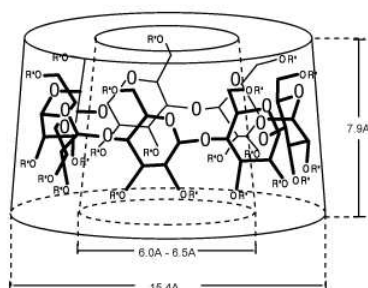
A felületaktív anyagok olyan szerves molekulák, amelyek egy hidrofób és egy hidrofil részt tartalmaznak. A hidrofil rész miatt a felületaktív anyagok képesek a vízben oldódni, amelynek felületén filmet, vagy benne micellákat (kisebb aggregátumok) képeznek. Ha filmet képeznek, akkor csökkentik a vizes oldat felületi feszültségét. A micellaképződés feltétele egy adott koncentráció elérése (ún. kritikus micellaképző koncentráció - CMC). A CMC értéke függ az adott molekula szerkezetétől és a hőmérséklettől is. A micellák jelenlétével a felületaktív anyagok képesek a szénhidrogének látszólagos oldhatóságát növelni, úgy hogy közrezárják a hidrofób molekulákat. Nem vízzel oldékony folyadék fázis esetén (NAPL) a felületaktív anyag a folyadék-vizesfázis határra koncentrálódik, csökkentve a határfelületi feszültséget. A felületaktív anyagok a szilárd felületek esetében is csökkentik a határfelületi feszültséget. A hidrofil csoportjuktól függően lehetnek anionos, kationos, ikerionos vagy nem-ionos anyagok. A mikrobákra gyakorolt káros hatásuk két faktorra vezethető vissza: a sejtmembrán lipidkomponenseivel történő kölcsönhatásra (és ezáltal annak integritásának megváltoztatására), illetve a sejt működéséhez szükséges fehérjékkel történő kölcsönhatásra. A kationos felületaktív anyagok elsősorban a bázikus, míg az anionos anyagok a savas tartományban toxikusabbak (Volkerling et al. 1997).

A felületaktív anyagok alkalmazása a bioremediációs technológiákban az anyag biológiai bonthatóságától függ. Ha egy anyag biológiailag bontható, annak pozitív és negatív hatása egyaránt jelentkezik. A negatív hatások közé tartozik az oxigén vagy egyéb tápelemek kiürülése, a köztes-termékek toxikus hatása (Holt et al. 1992), vagy előnyben részesített bontása a szennyező anyaghoz képest (Tiehm 1994). A biológiailag bontható felületaktív anyag legfontosabb pozitív hatása, hogy kiürül a kezelt területről, sőt a bontható anyagok hozzájárulhatnak a szénhidrogének felvételi sebességének növekedéséhez is. Bury és Miller (1993) megállapította, hogy a micelláris n-dekán és n-tetradodekán felvételét a felületaktív anyag serkentette, mely gyorsabb növekedési rátát is eredményezett. Ugyancsak pozitív hatása lehet annak, ha a felületaktív anyag elsődleges szubsztrátként hasznosul és a szennyezőanyag kometabolikusan bomlik le (Lee et al. 1995).

Breuil és Kushner (1980) kimutatta, hogy a C16 és C18 zsírsavak, lipidek és a szintetikus Triton X-100, Fl-70 illetve a Brij 35 serkentette az *Acinetobacter lwoffii* és a *Pseudomonas aeruginosa* növekedését hexadekánon. Ugyanakkor Efroymson és Alexander (1994) azt tapasztalta, hogy a Triton X-100 egy *Arthrobacter* sp. törzs növekedését gátolta heptametilnonánban oldott hexadekán esetében. A felületaktív anyag jelenlétében a csíraszám a vizes fázisban nagyobb volt, de megakadályozta a folyadék-folyadék határfelülethez való kötődést, ezzel gátolva a szénhidrogén lebontását. Ugyanakkor ugyanennél a szerkezetnél a Triton X-100 serkentette a naftalin bontását.

Számos esetben nem használhatók felületaktív anyagok, mert a természetes környezetet zavarásnak tennék ki. Ilyen esetekben alternatív megoldásokat kell keresni. Egy ilyen lehet a ciklodextrinek alkalmazása, amelyek molekuláris zárványkomplexeket képeznek bizonyos anyagokkal.

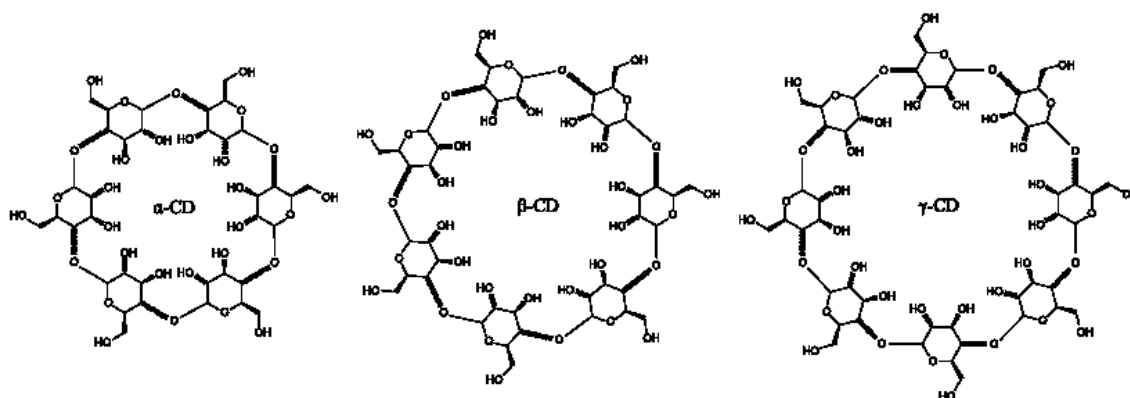
2.3. A SZÉNHIDROGÉNEK LEBONTÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK



2.9. ábra. A β -ciklodextrin térbeli szerkezete

2.3.6.1 A ciklodextrinek felépítése és tulajdonságai

A ciklodextrinek a cellulóz természetes úton történő bakteriális emésztése során keletkező termékek egy csoportja. Ezek a ciklikus oligoszachharidok α -1,4-kötésű α -D-glükopiranoz egységekből állnak, egy centrális lipofil üreget és egy külső hidofil felszínt tartalmaznak (2.9. ábra). A glükopiranoz egységek szék konformációja miatt, a ciklodextrinek alakja egy csonkakúphoz hasonlít. A CD molekulában a glükóz egységek C1 konformációban vannak, a hidroxil csoportok a kúptól elfelé állnak, a primer hidroxil csoportok szélesebb, a másodlagos hidroxil csoportok a gyűrű keskenyebb irányában helyezkednek el. Ebből a szerkezetből adódóan az üreget a szénatom váz és az éterkötésben lévő oxigénatomok határolják, amely lipofil tulajdonságot ad az üregnek. A molekuláris üreg belső felületén elhelyezkedő glikozidos oxigénhíd nemkötő elektronpárjainak nagy elektronsűrűsége miatt ez a felület gyenge Lewis bázisként viselkedik és apoláros karakterű.



2.10. ábra. A ciklodextrinek glükopiranoz egységekből álló ciklikus szerkezete

Az üreg polaritását a vizes etanol oldat polaritásával hasonló nagyságúnak becsülik. A ciklodextrin külső felületén helyezkednek el a C6-hoz kapcsolódó hidroxil csoportok, míg a gyűrű belső felszínén vannak a primer és szekunder hidroxil csoportok. Az egymás után következő C2 és C3 atomokhoz kapcsolódó hidroxil csoportok egymással H-kötést létesítenek, ezzel is stabilizálják a gyűrűs szerkezetet, ugyanakkor csökkentik az oldhatóságot. A felépítéséből adódóan a molekula külső felszíne hidofil, míg a belső felszíne hidrofób tulajdonságú. Enyhe Lewis-bázis tulajdonságuk miatt főleg kis mértékben savas karakterű és lipofil anyagokkal képeznek zárványkomplexeket. Az egységek száma különböző lehet, ezek növekedtével nő a molekulák belső át-

2.3. A SZÉNHIDROGÉNEK LEBONTÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK

mérője (2.10. ábra). A 6 egységből álló α -ciklodextrin (α -CD) 4,7-6 Å, a héttagú β - (β -CD) 8 Å, a 8 tagú γ - (γ -CD) pedig 10 Å átmérőjű. Hat tagnál kisebb gyűrű keletkezése szterikus okok miatt nem lehetséges, a nyolc tagnál több egységet tartalmazó vegyületek pedig nem jelentősek. Az α -CD tizenhatsz, a β -CD huszonegy hidroxil csoportot tartalmaz, amelyekből a primer hidroxil csoportok nagyon reakcióképesek. A C2-n levő hidroxil csoport reakcióképesebb a C3-nál. Ezekre a csoportokra képesek különböző gyökök addícióval kapcsolódni (Loftsson et al. 2005, Szejtli 1988).

- A fontosabb természetes CD-k:

α -CD Mt.: 972 g/mol; vízben való oldódása 25°C-n 14,5 g/100 ml

β -CD Mt.: 1135 g/mol; vízben való oldódása 25°C-n 18,5 g/100 ml

γ -CD Mt.: 1297 g/mol; vízben való oldódása 25°C-n 23,2 g/100 ml

- A kémiai módosított CD-k néhány típusa:

DIMEB (Heptakis(2,6-di-O-metil)- β -CD): a 21 hidroxil csoport 2/3-a szelektíven van metilézve, a C3 csoportok nincsenek. Korlátlanul oldódik vízben.

RAMEB (random metilált CD): adott szubsztitúciós fokkal (DS) metilált, azaz a glükóz-egységnek egy bizonyos százalékán van metilcsoport. Pl. DS: 1.8.

HP- β -CD (2-hidroxipropil- β -CD): estén különböző szubsztitúciós fokok (DS) léteznek, attól függően, hogy hány százaléka szubsztituált a hidroxil csoportoknak.

A természetes ciklodextrineknek, elsősorban az α -ciklodextrinnek jóval kisebb a vízdékonysága, mint az azonos szénatomszámú a ciklikus cukroké. Ez elsősorban a kristályos állapotban kialakuló, relatív erős intermolekuláris hidrogénhid kötések miatt lehetséges. Bármelyik hidrogénhid kialakító hidroxil csoport szubsztituálása, akár lipofil metoxi funkciócsoportokkal is, drámaian megnöveli a vegyület vízdékonyságát.

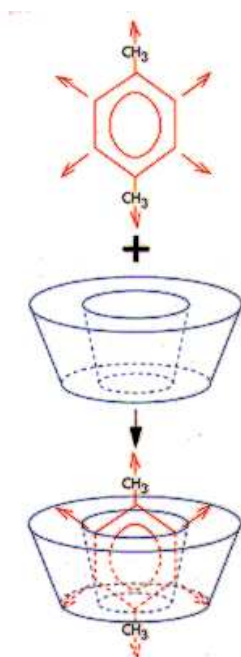
A természetes α - és β -ciklodextrint, ellentétben a γ -ciklodextrinnel, az emberi nyál és hasnyálmirigy amilázok nem képesek hidrolizálni. Ugyanakkor mind az α -, mind a β -ciklodextrint képesek fermentálni a bélben élő mikroorganizmusok. A ciklodextrin bontó enzimek (CD-áz enzimek) felelősek a CD gyűrű hasításáért, mely a CD-ek hidrolízisének sebességmeghatározó lépése. A CD-glikozil transzferáz enzimeket termelő baktériumok (*Bacillus macerans*, *B. subtilis*, *B. coagulans*), melyek a maltooligoszacccharidokból a CD ciklizációjáért felelősek, általában tartalmazzák a CD-áz enzimeket is ((Usanov et al. 1990, Pócsi 1999)). Vannak azonban olyan CD-t termelni nem képes baktériumok is, pl. *Flavoacterium* sp., *Agrobacterium* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Xanthomonas* sp. melyek mutatnak CD-áz aktivitást, és képesek a CD-eket szénforrásként hasznosítani. Az általános sorrend a CD-ek hasznosításában a γ -CD > α -CD > β -CD sorrend. A természetes β -CD mesterséges származékainál ez a sorrend a következő volt: nem szubsztituált > karboximetil > hidroxipropil > trimetil > polimer (keresztkötés etilén-glikol diepoxipropil-éterrel) > dimetil (Bender 1993, Oros et al. 1990)

A ciklodextrinek egyrészt nagyok (a molekulatömegük 1000-2000 Dalton felett van), másrészt hidrofilek, nagy mennyiségű hidrogén-donorral és -akceptorral, ezért nem abszorbeálódnak a gasztrointesztinális traktusból az intakt formájukban. A hidrofil ciklodextrinek kis és közepes dózisban, szájon át bejuttatott formában nem mérgezőek. A lipofil ciklodextrin származékok – mint

2.3. A SZÉNHIDROGÉNEK LEBONTÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK

a metilált ciklodextrinek – esetén kimutattak toxikus hatást, a véráramba történő abszorpció miatt (Loftsson et al. 2005, Szejtli 1988).

Fenyvesi és munkatársai megvizsgálták egyes ciklodextrin származékok biológiai bonthatóságát a talajban. Megállapították, hogy mindegyik ciklodextrin származék többé-kevésbé bontható biológiailag, még a leginkább ellenálló RAMEB is a kiindulási koncentráció 40%-ra csökkent a vizsgált két évben a szénhidrogénnel szennyezett, nagy szerves anyag tartalmú talajban (Fenyvesi et al. 2005).



2.11. ábra. A zárványkomplex kialakulásának sematikus ábrája. A hidrofób molekula a ciklodextrin molekulájának belső üregében helyezkedik el. A CD külső hidrophil tulajdonsága miatt a zárványkomplex vízdékony. A folyamat eredményeképpen a hidrofób molekula látszólagos oldékonysága megnő.

Vizes közegben a ciklodextrinek zárvány komplexeket képeznek lipofil vegyületekkel (2.11. ábra). A zárványkomplexekre jellemző, hogy kovalens kötés nélkül és a gazdamolekula szerkezetének változatlanul hagyása mellett alakulnak ki. A ciklodextrin gyűrű külső felülete hidratált, de a vízmolekulák a gyűrű üregében energetikailag kedvezőtlen helyzetben vannak az üreg apoláros felülete miatt. A lehetséges vendégmolekula hidrophil része nagymértékben hidratált, míg az apoláros aromás gyűrű taszítja a vízmolekulákat. A komplex kialakulásának eredményeképpen a vendégmolekula apoláros része behatol az apoláros üregbe, létrehozva ezáltal egy energetikailag kedvező apoláros-apoláros kölcsönhatást, míg a kiálló hidrophil rész kívül marad a saját hidratatorkával (Loftsson et al. 2005, Szejtli 1988).

Az addíciós vegyület két partnere közül az egyik a szerkezethordozó (gazdamolekula), amelynek molekuláris üregében helyezkedik el a másik komponens (vendégmolekula). A rendelkezésre álló üreg a kisebb deformációktól eltekintve változatlan méretű és alakú marad. A komplexképződés rendszerint vizes közegben megy végbe, függ a vendégmolekula polaritásától és méretétől.

2.3. A SZÉNHIDROGÉNEK LEBONTÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK

A molekula méretének kisebbnek kell lennie a CD üregének a méreténél ahhoz, hogy a zárványkomplex kialakulhasson. Az oldott anyag belépése a CD üregébe diffúzió kontrollált mechanizmus (Loftsson et al. 2005, Szejtli 1988).

$$\begin{aligned}(CD - G)_s &= (CD - G)_{aq} \\ (CD - G)_{aq} &= CD_{aq} + G_{aq}\end{aligned}$$

ahol:

CD a ciklodextrin molekula és **G** a vendégmolekula

CD-G a ciklodextrin-vendégmolekula alkotta komplex

s szilárd fázis és **aq** a vizes fázis

A HPCD üregének polaritása hasonló az etanoléhoz, de összehasonlítva a maszkírozó amfoter anyagokkal, sokkal erősebb oldási ereje van, különösen az alacsonyabb koncentrációknál. A HPCD szolubilizációs ereje kisebb mint egy tipikus felületaktív anyagé, ám más felületaktív anyagokkal ellentétben a HPCD-k rendkívül vízdékok. Nem képeznek emulziót, mint a legtöbb felületaktív anyag. Ez a tulajdonság jól kihasználható minden olyan esetben, amikor az emulzió kialakulása nem kívánatos. Nem toxikusak és biológiailag bonthatóak. Növelik a kis polaritású anyagok lebonthatóságát (Tanada et al. 1999).

Az oldatban kialakult zárványkomplex ideális esetben sztöchiometrikus komplex, ahol a vendégmolekula a gyűrűben helyezkedik el, és a komplexet hidrátburok veszi körbe.

2.3.6.2 A ciklodextrinek hatása a szénhidrogének hozzáférhetőségére, biodegradációjára

Bar (1990) kifejlesztett egy új szilárd agarlemezt, amelyben az egyébként vízben nem oldható hexadekánt illetve a nehezen oldódó benzaldehidet α - illetve β -CD-nel komplexálta. A benzaldehid esetében az oldhatóság megnőtt α -CD jelenlétében, míg a hexadekánnál az egyébként hidrofób anyag a komplexáció hatására szolid oldatot alkotott, ami könnyen diszpergálódott a vizes médiumban, és jól elkeverhető volt a meleg, folyékony tápagarban. A végén egy szilárd agar/CD-komplex gél kapott, egyenletes eloszlásban. Az egyébként a benzaldehidet hasznosító *Saccharomyces cerevisiae* illetve a hexadekánt hasznosító *Candida lipolytica* a CD-komplexet tartalmazó agarlemezekon nőtt, a szénhidrogéneket hasznosította.

A CD mesterséges származékai hatékonyabb gazda-molekulák. A β - és a γ -CD-nel kialakult komplexben a koleszterol nem hozzáférhető a mikrobák számára, míg az alkilált CD származékok esetében nő a mikrobiális oxidáció mértéke (Jadoun és Bar 1993).

A toxikus peszticidek β -CD-nel való komplexálása csökkentette a toxikus hatást. Adott mennyiségű β -CD adásakor az eleveniszap mikrobiológiai aktivitása nagyobb volt a kezeletlen kontrollhoz képest. Ezekkel a peszticidekkel szemben a mikrobák bizonyos koncentrációig toleránsak, és képesek őket lebontani, de egy bizonyos koncentráció felett a mikrobióta sérül, vagy akár el is pusztulhat, az iszap biológiai aktivitása lecsökken, sőt akár irreverzibilisen is károsodhat. Ezen kémiai anyagok részleges és átmeneti maszkírozásával a toxikus hatásuk csökkenthető azáltal, hogy nem toxikus CD zárványkomplexbe vesszük őket (Oláh et al. 1988).

A β -CD alkalmazása egyes hidrofób anyagoknál csökkentheti a mikrobákra kifejtett toxikus hatást. A folyékony toluol teljes mértékben toxikus a *Pseudomonas putida*-ra, a vízben oldott toluol gátolja a növekedésüket. β -CD adásakor ez a toxicitás nagymértékben csökkent, sokkal kisebb gátlás volt kimutatható a kontrollhoz képest. A toxicitás megszűnt, amikor kristályos β -CD-toluolt

2.3. A SZÉNHIDROGÉNEK LEBONTÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK

kínáltak szubsztrátként. A *P. putida* képes nőni toluol gőz jelenlétében, de ennek sebessége és mértéke a β -CD jelenlétében jelentősen megnőtt, eredményül annak, hogy csökken a molekuláris toxicitás, és a CD segítette a gáz halmazállapotú szubsztrát adszorpcióját. A β -CD ugyancsak csökkent a vízdékony p-toluolsav gátló hatását a *P. putida*-nál (Schwartz és Bar 1995).

Fava és Grassi (1996) növelték a 4-klorobifenil és az Aroclor 1221 aerob deklórozását HP β CD segítségével *Pseudomonas* sp. esetében. A kis mértékben klórozott bifenilek nagyon rosszul oldódnak vízben, ezért mikrobiológiai bontásuk nehézkes. Egyik lehetséges oldékonyság-növelő módszer a HP β CD-nel való komplexálás. A HP β CD-t különböző moláris arányban adták a tápoldathoz sterilizálás előtt. A HP β CD minden esetben gyorsította a klórmentesítést, a legjobb eredményt az 1:1 és az 1:1.5 arány adta. Azt is megfigyelték, hogy a különböző hosszúságú előzetes keverési idők nem voltak hatással a későbbi folyamatokra, ami azt jelenti, hogy a komplex kialakulásának ideje nem limitáló tényezője a szubsztrát mikrobiális oxidációjának.

A fenantrén látszólagos oldhatóságának növekedése a HP β CD-nel való komplexálás miatt nagy hatással volt biodegradációjának mértékére. A látszólagos oldhatóság 105 mg/l HP β CD jelenlétében 1,3 mg/l-ről 161,3 mg/l-re nőtt (Wang et al. 1998).

Az aromás szénhidrogének talajból való eltávolítása bonyolult folyamat. Egyik lehetséges módja, ha növeljük a vizes fázisban való látszólagos oldhatóságukat. A természetes CD-k nem növelik az aromásoknak a látszólagos oldhatóságát, míg a hidroxipropil származékai igen (Tanada et al. 1999). Ezek hatása a különböző molekulákra a molekula átmérőjétől, a CD molekula üregének méretétől és az aromások 1-oktanol-víz parciális koefficiensétől függ.

A benzol látszólagos oldódása vízben a HP α CD esetében a legnagyobb. A toluol látszólagos oldódásának mértéke a HP α CD, HP γ CD, HP β CD sorrendben nő. Mivel a toluol 1-oktanol parciális koefficiense 2.80, amely nagyobb, mint a benzolé, a toluol és a CD üreg közötti interakció nagyobb, mint a benzol esetében. A toluol komplexbe jutása a HP β CD-nél a legnagyobb mértékű, mivel a toluol molekula mérete hasonló a HP β CD üregének méretéhez. Amikor a HP γ CD koncentrációja nagyobb egy adott értéknél, a toluol látszólagos oldhatósága csökken, mivel a HP γ CD–toluol zárványkomplex kicsapódik. Az *orto*-, *meta*-, és *para*-xilol látszólagos oldhatósága vízben a HP γ CD és HP β CD esetében növekszik jelentősen. A HP α CD ürege kicsi ahhoz, hogy hatékonyan tudjon a xilollal komplexet alkotni.

A különböző ciklodextrineknek eltérő az asszociációs állandója, mely az aromás vegyületek esetén arányos az oldódás fokozásának mértékével. A RAMEB-nek nagyságrendekkel nagyobb, azt követi a HP γ CD, majd a természetes ciklodextrinek: α -CD, β -CD és a γ -CD. A különböző BTEX vegyületek esetén (5 v/w%-os ciklodextrin vizes oldatnál) a legnagyobb oldódás-növekedést az etil-benzolnál tapasztalták, majd az *o*-xilolnál, *m*-xilolnál. Jóval kisebb volt a toluol illetve annál is kisebb volt a benzol esetében. BTEX keverékből történő vizes-CD extrakció esetén csak a benzol koncentráció csökkent jelentősen, a nagy vízdékonyosságának megfelelően, és a legkevésbé vízdékony *m*-xilol koncentrációja nőtt. Az alkalmazott különböző mesterséges CD-k vizes oldata között nem volt jelentős különbség. Az benzol koncentrációja 5% CD koncentrációnál is legalább négyszeresére nőtt, míg 1% CD koncentráció esetén kétszeresére. Megállapították, hogy nem az asszociációs konstans (az oldékonyság fokozásból számolva) a legfontosabb faktor az extrakció során, hanem a komplex oldékonysága tűnt meghatározónak (Balogh et al. 2007).

A talaj remediációs technológiák során alkalmazott ciklodextrin származékoknál nagyon fontos, hogy a ciklodextrinek nem egyszerűen cseppfolyósítják az adott BTEX vegyületeket, de teljesen fel is oldják azokat. A CD komplexálás egyensúlyi folyamat. Minél kisebb az oldékonysága a vegyületnek, annál nagyobb a CD származékok hatékonysága. Az alacsony szelektivitásuk,

de nagy hatékonyságuk alkalmassá teszik a ciklodextrineket a talajmosásra és egyéb remediációs technológiákra (Balogh et al. 2007).

2.4 A vizsgálatok során alkalmazott módszerek rövid bemutatása

A szennyezőanyagok bontásáról szerzett tudásunkat elsősorban laboratóriumi kísérletek során szerezzük. Egy-egy terület biológiai potenciáljának felmérése, a biológiai beavatkozás lehetőségének a vizsgálata laboratóriumi körülmények között könnyebben kivitelezhető, a vizsgálati körülmények szigorúbban ellenőrizhetők. A mikrokozmosz kísérletekben tapasztaltak segíthetnek a területen található ökológiai folyamatokat megérteni.

A kutatók többsége a mikrokozmosz kísérletekben egy-egy szennyezőanyag biodegradációjának vizsgálatakor az adott vegyület kiürülését, vagy egy helyettesítő paraméter változását, mint pl. az oxigén vagy a széndioxid, követi nyomon.

A talaj biológiai vizsgálatai (pl. talajlégzés, biomassa, enzimaktivitás, mikrobaszám) információval szolgálnak az életképes mikroorganizmusok jelenlétéről és intenzitásukról, a szennyezőanyagok a metabolikus aktivitásra gyakorolt hatásáról (Margesin et al. 2000).

A zárt mikrokozmosz olyan tároló edény, mely a mintát (akár folyadék, akár szilárd, akár gőz fázisú) és minden hozzávalót tartalmaz az indulástól kezdve. Ezután a tárolóedényt a környezetétől teljesen izolálják. A mikrokozmoszokból rendszeresen mintát vesznek, és idősorosan nyomon követik a szennyezőanyag mennyiségének változását illetve a többi paraméterre gyakorolt hatását. A kapott eredményekből reakció- és kinetikai állandók is meghatározhatóak szükség esetén. Tipikusan olyan vegyületeket szoktak zárt mikrokozmoszokban vizsgálni, amelyek illékonyak, vagy egyes anyagcsere termékeik illékonyak (pl. BTEX) lehetnek. Szintén zárt mikrokozmosz rendszerekben vizsgálják természetesen a széndioxid termelésen alapuló biodegradációs tesztek is (Kao és Borden 1997, Baker et al. 2000). A respirometrikus OxiTop módszer megbízhatóan alkalmazható a szervesanyagok lebontásának nyomonkövetésére (Vähäoja et al. 2005).

A folyadékkultúrában végzett laboratóriumi dúsító tenyészetek általában egy, vagy nagyon kevés törzset eredményeznek, specifikus fenotípussal. Másik komoly korlátozó tényező, hogy a dúsító folyadék kultúrák általában a gyorsan növekvő mikrobákat szelektálják. Számos kutató kimutatta, hogy mind a gyorsan-, mind a lassan növekvő mikrobák hasonló fenotípussal rendelkezhetnek, és a természetes közösségekben jelen vannak, és ki is lehet őket mutatni különböző hígítási arányú mikrokozmoszokban, vagy közvetlenül lemezöntéssel technikával. A nagy szubsztrátkoncentráció eredményeként, az általános dúsító tenyészetekben a lassan növekvő mikrobákat elnyomják a nagyobb specifikus növekedési rátával rendelkező szervezetek (Dunbar et al. 1997). Dunbar és munkatársai bebizonyították, hogy bármilyen kicsi eltérés az eredeti környezeti paraméterektől a tenyésztés során megváltoztathatja a közösség szerkezetét. Közvetlen agar-lemezen történő tenyésztésből és folyékony táplevesből származó izolátumok 2,4-diklórfenoxi-acetát bontó képességének diverzitását hasonlították össze. Az eredmények azt mutatták, hogy a dúsítás során új közösség-szerkezet fejlődött, amely nem pontosan tükrözi vissza az eredeti mikrobiális közösség szerkezetét (Dunbar et al. 1997).

A molekuláris ökológiai technikák több, eltérő tulajdonságú mikrobát kimutatnak szennyezett területekről, melyek filogenetikailag különböznek a szennyezőanyagot laboratóriumi körülmények között bontani képes törzsektől. A molekuláris módszerek ugyanakkor nem képesek közvetlenül megállapítani, hogy a kimutatott mikroba képes-e a szennyezőanyag lebontására, vagy hatással van-e a szennyezőanyag sorsára a területen (Watanabe és Hamamura 2003).

2.4. A VIZSGÁLATOK SORÁN ALKALMAZOTT MÓDSZEREK RÖVID BEMUTATÁSA

A talajmikrobák közösségeit éveken keresztül tenyésztésen és izoláláson alapuló módszerekkel vizsgálták. Az elmúlt évtizedben a kutatók nagyon nagy diverzitás-különbségeket figyeltek meg, ha a tenyésztésen alapuló lemezöntéses eljárások, direkt mikroszkópos vizsgálatok eredményeit összehasonlították a riboszómális RNS alapú molekuláris vizsgálatokkal. A tenyésztéses módszereken alapuló vizsgálatok szelektívek, a tenyésztethető sejtek arányát 0,1%–10% közé becsülik (Amann et al. 1995). Ez az ellentmondás a talajlakó mikrobák ismeretlen fiziológiai tulajdonságaira és formáira utal.

A molekuláris módszerek (nukleinsavak extrakciója, polimeráz lánc reakció, DNS klónozás, DNS bázissorrend elemzés, ujjlenyomat módszerek) széles körű elterjedése miatt a mikrobiális diverzitásról alkotott képünk drámaian átalakult az elmúlt években.

A molekuláris módszerek két fő típusa áll rendelkezésre a mikrobiális közösségek vizsgálatánál, közvetlen DNS extrakció után (Ranjard et al. 2000):

- olyan molekuláris technikák, melyek a teljes genetikai információt próbálják vizsgálni az extrahált DNS-ben, ez az ún. teljes közösségi DNS analízis
- olyan molekuláris módszerek, melyek általában az információ egy részét vizsgálják a genom szekvenciák egy szakaszára koncentrálnak, melyet PCR segítségével szaporítanak, ez az ún. részleges közösség elemzés

A riboszómális RNS molekulák erősen konzervatív és különböző fokú variabilitást mutató régiókból állnak. A konzervatív régiók között azonosíthatóak olyan univerzális szekvenciák, amelyek mindhárom domén, a baktériumok, az ősbaktériumok (archeák) és eukarioták szervezetében is megtalálhatóak. A molekulák és a molekulákat kódoló gének, a molekula konzervatív jellegéből adódóan, filogenetikai célú vizsgálatokra alkalmasak. A ma legelterjedtebb mikrobiológiai molekuláris módszer a részleges közösségi analízisen alapuló 16S riboszómális RNS gén vizsgálata. A 16S rRNS molekula mérete már elegendő információt hordoz a filogenetikai összefüggések megállapításához, így a 16S rRNS szekvenciákra kiépült több, jól használható adatbázis is, pl.: a Ribosomal Database Project II (Maidak et al. 2001).

Minél több mikrobát ismerünk, annál több információ áll rendelkezésünkre az ökoszisztémák szerkezet és a funkció közötti összefüggéseinek megmagyarázására és megértésére. Lehetőségünk nyílik új tenyésztéses eljárások kidolgozására és új folyamatokat lehet feltárni (Hunter-Cevera 1998).

A molekuláris módszerek fejlődése azonban számos új problémát is felvetett az elmúlt évtizedekben. Hagyományosan a fenotipikai tulajdonságok alapján határozták meg a fajokat, ám a molekuláris mikrobiológiai technikák elterjedésével ezt a gyakorlatot felváltotta a polifázikus gondolkodás, mely a filogenetikai kapcsolatokat egyesíti a fenotipikai tulajdonságokkal. A választott molekuláris tulajdonságoknak két követelménynek kell megfelelniük: (i) genomi szinten igazolják a morfológiai, biokémiai és kemotaxonómiai összefüggéseket az egy fajon belüli törzsek hasonlósága (azonossága) alapján; (ii) határolja el a taxont a filogenetikailag szomszédos fajoktól a nemzetségen belül (Stackebrandt és Ebers 2006).

Ennek ellenére a fajok elkülönítésére alkalmazott módszerek kiválasztása gyakran tetszőleges és a többször helyezik előtérbe a gyakorlati szempontokat az elméleti háttérrel jobban alátámasztókkal szemben. A fajmeghatározáshoz használt számos módszer közül két technika vált "arany szabvány"-nyá, a DNS-DNS hibridizációs eltérések és a 16S rRNS szekvencia különbségek meghatározása. Ám a 16S rRNS gén bázissorrend hasonlóság mértéke és a DNS reasszociációs értékek között nem találtak lineáris kapcsolatot. A legelfogadottabb, hogy két törzs akkor tekinthető

2.4. A VIZSGÁLATOK SORÁN ALKALMAZOTT MÓDSZEREK RÖVID BEMUTATÁSA

külön fajba tartozónak, ha a DNS-DNS reasszociációs értékük kisebb, mint 70%. Ez az érték azonban nem elméleti alapokon nyugszik, hanem gyakorlati tapasztalat, a már ismert és fenotipikailag jellemzett fajok értékeinek alapján (Ward 2006).

Ugyancsak megállapították, hogy a 98,5%-os gén szekvencia hasonlóság érték alatt a DNS reasszociációs érték mindig kisebb volt, mint 70%. Ennek alapján Stackebrandt és Goebel (1994) azt javasolta, hogy csak a 97% feletti szekvenciahasonlósági érték felett érdemes a DNS hibridizációs vizsgálatokat elvégezni, mivel ez a technika költségigényes és bonyolult, nem minden laborban van megfelelő eszköztár ennek elvégzéséhez. Ezt a 97%-os értéket 2006-ban 98.7-99%-ra korrigálták az újabb eredmények alapján (Stackebrandt és Ebers 2006).

A csak 16S rRNS gén – mint filogenetikai marker – alapú klasszifikáció azonban nem helyénvaló. Az rRNS gén gyakran nem ad elég részletes felbontást a DNS-DNS hibridizációhoz képest. A 16S rRNS gén bázissorrendjének meghatározása alapján végzett identifikáció gyakran helytelen eredményekhez vezethet, mert az – annak tapasztalt megbízhatósága ellenére – egy egyszerű szekvencia hasonlóság érték, mely lehet egyszerű sztochasztikus variáció, a rekombináció vagy a horizontális gén transzfer oka is (Gevers et al. 2005).

A mikrobiális fajdefiníció nem tisztázott volta miatt a munkánk során nem végzünk pontos faj identifikációt, a 16S rRNS gén bázissorrend alapján a nemzetséget tekintjük valós információnak, a faji besorolást csak tájékoztató jelleggel értelmezzük.

A katabolikus gének (anyagcsere-folyamatokat katalizáló enzimeket kódoló gének) vizsgálata más kérdésekre is választ adhat a 16S rRNS gén használata mellett. A metán-monooxygenáz gént a metilotróf szervezetek, a reduktív dehalogenáz gént a dehalorespiráló mikroorganizmusok vizsgálata során használják a közösségek DNS illetve RNS alapú molekuláris módszerekkel történő feltérképezésére (Holmes et al. 1995, Nijenhuis és Zinder 2005).

A molekuláris módszereket alkalmazó vizsgálatok kezdeti lépése a mintákból történő nukleinsav izolálása, amely közösségi minták esetén elméletben a mintában található összes élőlény nukleinsavának feltárását eredményezi. Ezt követően az izolált genomiális DNS vizsgálni kívánt szakaszát polimeráz láncreakció (PCR, Polymerase Chain Reaction) segítségével szaporítjuk. A közösségek vizsgálatát végezhetjük 16S rDNS gént amplifikáló primerekkel, melyek lehetnek tág specificitásúak (minél több típusú 16S rDNS gént amplifikáló, ún. általános primerek), vagy szűkíthetjük a vizsgált kört taxonspecifikus - szűkebb specificitású - primerekkel egy bizonyos csoportra (archeákra, szulfátredukálóakra, ammónia-oxidálóakra, stb.), vagy végezhetjük a vizsgálatokat a anyagcsere tulajdonságokra jellemző katabolikus génekre tervezett primerekkel.

A PCR reakciók termékeként több fajból álló kevert mintát kapunk, amelyből a különböző szekvenciájú amplikonok elválasztása többféle módszerrel történhet. A kevert PCR termékek klónkönyvtárban történő feldolgozása mutatkozik az egyik legsikeresebb módszernek a komplex mikroba közösségek diverzitásának és faji összetételének vizsgálatára. Az rDNS klónok összehasonlító bázissorrend elemzése idő és költségigénye miatt azonban nem alkalmas nagy számú minta összevetésére, szezonális dinamika követésére.

A molekuláris ujjlenyomat módszerek a közösségi mintákból kivont nukleinsavak különböző fizikai szeparációs elven alapuló, gyors és hatékony elemzésére alkalmasak. A PCR segítségével kapott amplikonok elválasztása mindegyik ujjlenyomat módszer esetén egy speciális, csak az adott mikrobaközösségre jellemző mintázatot eredményez ('ujjlenyomat'). Az ujjlenyomat módszerek ezáltal lehetővé teszik (i) több minta egyidejű, gyors vizsgálatát; (ii) a különböző mikroba közösségek genetikai diverzitásának összehasonlítását; (iii) egy adott közösség időbeli változásának monitorozását. Az ujjlenyomat módszerek közé tartozik többek között a DGGE (denaturáló grádiens

2.4. A VIZSGÁLATOK SORÁN ALKALMAZOTT MÓDSZEREK RÖVID BEMUTATÁSA

gél-elektroforézis), a TGGE (hőmérséklet grádiens gél-elektroforézis), az SSCP (egyszálú DNS konformáció polimorfizmus), a RAPD (random amplifikált polimorf DNS), az ARDRA (amplifikált riboszómális DNS restrikciós analízise) és a T-RFLP (terminális restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus) (Sipos 2004).

Az ARDRA (amplifikált riboszómális DNS restrikciós analízise) (Massol-Deya et al. 1995) során a többféle amplikont tartalmazó, kevert PCR terméket restrikciós enzimekkel emésztjük és a kapott különböző hosszúságú fragmentumokat agaróz, vagy poliakrilamid gél-elektroforézis segítségével választjuk el. Az egyes mikrobafajoknál a 16S rDNS-en belül a restrikciós hasítási helyek száma és elhelyezkedése nem egyforma, így a kapott sávmintázat az eltérő fragmentumszám és méret miatt különbözik. A szeparáció eredménye a közösségre jellemző hasítási mintázat.

A T-RFLP (terminális restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus) módszer során méret szerint választjuk el a restrikciós enzimekkel emésztett PCR terméket. A restrikciós hasító helyek száma és elhelyezkedése miatt a PCR termékek emésztése más-más terminálisan jelölt fragmentumot eredményez. A módszer alapja, hogy csak a terminálisan jelölt fragmentumokat vizsgálja, melyet úgy érhetünk el, hogy a PCR során speciális, fluoreszcens festékkel jelölt primereket alkalmazunk. Az emésztett amplikonok elválasztása általában nagy hatékonyságú kapilláris elektroforézissel történik, a fluoreszcensen jelölt terminális fragmentumokat adott hullámhosszú lézer segítségével detektáljuk. A mintával együtt futtatott, eltérő fluoreszcens jelöléssel ellátott belső molekulású standard pontos fragmentumhossz meghatározást tesz lehetővé. A vizsgált mintáknál a primerek kötési, illetve a restrikciós enzimek hasítási helyeinek ismeretében adott fajokhoz, törzsekhez terminális fragmentumhosszak adhatók meg. A kalkulált adatok birtokában a különböző minták terminális fragmentum-hosszaihoz filogenetikai információ rendelhető, a görbe alatti területekből pedig a mennyiségi viszonyokra következtethetünk.

A DGGE (denaturáló grádiens gél-elektroforézis) egy vertikális PAGE-re (poliakrilamid gél-elektroforézis) alapuló szeparációs módszer, amely alkalmas azonos hosszúságú, de eltérő bázis-sorrendű amplikonok különbségének kimutatására. Formamid és urea denaturálószeres lineáris grádiensét tartalmazó poliakrilamid gélben a duplaszálú DNS szakaszok növekvő koncentrációjú denaturáló közegben vándorolnak. Az egyes DNS fragmentumok szekvenciája által meghatározott ponton a DNS szakaszok denaturálódnak. A DNS fragmentum részlegesen denaturálódik, szétkeredik, jelentősen lecsökken a molekula mobilitása, ezáltal vándorlási sebessége is.

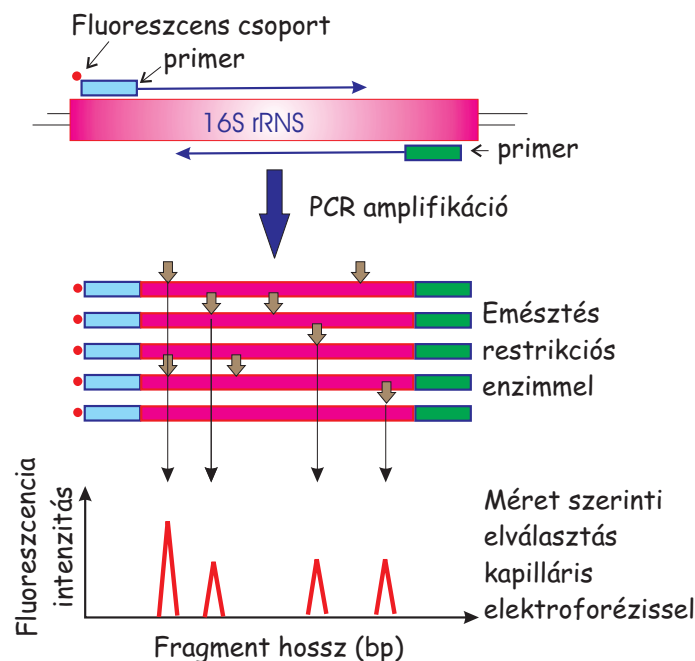
A DGGE-hez használt DNS-t speciális primerekkel szaporítjuk fel. A primerek egyike az 5' végén egy 30-50 bázispár hosszúságú úgynevezett GC-gazdag régiót, GC-kapcsot (GC-clamp) tartalmaz, amely csak guanin és citozin nukleotid bázisokból épül fel, és a PCR során a templáttal együtt amplifikálódik (Muyzer és Smalla 1998). A GC gazdag régió az elektroforézis során a duplaszálú DNS molekula két egyszálú DNS-re válását megakadályozza, ugyanis ez a GC-kapocs összefogja a szétkerülő szálakat.

A közösségek egyféle számszerű jellemzésének céljából kiindulhatunk a közösségben előforduló fajok egyedszámainak együtteséből. A megfigyelt egyedszámok és a fajszám nagymértékben függhet a vizsgált közösség, vagy az ebből származó minta nagyságától. A diverzitási index értékének kialakításában tehát két összetevő, az úgynevezett egyenletességi (evenness) komponens és a fajszám vagy fajgazdagsági (richness) komponens játszik szerepet. Mikrobiológiai ökológiai diverzitásvizsgálatokban gyakran használják a Shannon diverzitásindexet.

$$H = - \sum_{i=1}^S \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

- H a Shannon index;

2.4. A VIZSGÁLATOK SORÁN ALKALMAZOTT MÓDSZEREK RÖVID BEMUTATÁSA



2.12. ábra. A terminális restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus (T-RFLP). A módszer során a restrikciós enzimmekkel emésztett PCR termékek fluoreszcens festékkel jelölt terminális fragmentjeit kapilláris elektroforézis segítségével méret szerint választjuk el, a kapott jel a fragment mennyiségével arányos jelet ad.

- n_i az abundanciája (egyedszáma) az i fajnak;
- S a fajok száma;
- N az összes egyedszám

A Shannon index az információ mennyiségét méri a rendszerben, és így a következő egyedi minták azonosságának jóslási nehézségeit méri. Pozitívan korrelál a fajgazdagsággal és a kiegyensúlyozottsággal és jobban súlyozza a ritka egyedeket, mint az általánosakat.

Egy-egy szekvencia filogenetikai elhelyezkedésének bemutatására az egyik legelterjedtebb módszer az evolúciós távolságok fákkal történő ábrázolása. Az optimális fa az, ahol az élek összhosszúsága a lehető legkisebb (Podani 1997). Az egyik általánosan alkalmazott algoritmus, amelyet gyakran használnak filogenetikai fák készítésére a szomszéd összevonó módszer (neighbor-joining). Ez egy a távolságokból kiinduló kladsztikai eljárás, amely eltérő evolúciós változást tételez fel a kladogram egyes ágain, s végeredményben egy additív fához közelít. A fában egymás mellé kerülő objektumok kiválasztásánál nemcsak két objektum egymás közötti távolságának értékét, hanem az objektumok összes többivel alkotott távolságait is figyelembe veszi. A módosított "távolság" annál kisebb lesz, minél nagyobb a két objektum átlagos távolsága a többitől (Podani 1997, Saito és Nei 1987).

A bootstrap becslés lényege, hogy mintánkból n -elemű almintát veszünk ki, visszatevésees módszerrel. Minden ilyen almintából kiszámoljuk a kívánt statisztikai értéket (pl. átlag, variancia). Több száz ilyen becslésből már egy empirikus eloszlás rajzolható fel, amelyben megvizsgálható, hogy az eredeti mintából kapott érték hol helyezkedik el. Ilyen módon a statisztika torzítására, standard hibájára, megbízhatósági intervallumára, sőt szignifikanciájára is következtethetünk egyetlen

2.4. A VIZSGÁLATOK SORÁN ALKALMAZOTT MÓDSZEREK RÖVID BEMUTATÁSA

mintából (Manly 1997). A bootstrap konszenzus fa esetén a változók bootstrap újramintavételezésével az alternatív fák egyesítése történik, amely kiküszöböli a változók kiválasztásában jelentkező szubjektív elemeket, s alkalmas a leginkább stabilis osztályok felkutatására.

A adathalmazban rejlő összefüggések feltárására többváltozós statisztikai módszereket alkalmazunk. Az ordinációs módszerek esetében az adatstruktúra sok dimenzióját behelyettesítjük kevés számú, de az eredeti adatstruktúrát többé-kevésbé jól tükröző dimenzióval. Az ilyen elemzéseket Goodall nyomán ordináció néven foglalkozunk össze (Goodall 1978).

A főkomponens elemzés kifejlesztése (*principal components analysis*, PCA) Pearson (1901) és Hotelling (1933) nevéhez köthető. A PCA lényege, hogy az objektumok a változók által meghatározott dimenziókban elfoglalt helyét változatlanul hagyva az eredeti koordináta-rendszert egy új koordináta-rendszerrel helyettesítjük úgy, hogy az első tengely (komponens) maximális variációt sűrítson magába és a lehető legkevesebbet hagyja a második komponensre. Az átrendeződés hátterében a változók közötti lineáris korrelációk állnak, míg az új komponensek közötti lineáris korreláció értéke 0. Következésképpen, a PCA csak akkor eredményez lényeges változást, ha a változók között valamilyen lineáris korreláció van (Podani 1997).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

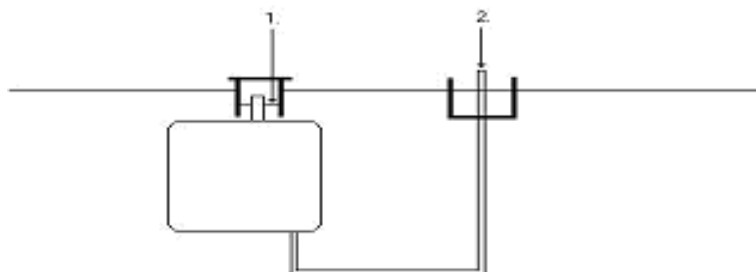
A vizsgálati területek helyszínét a terület tulajdonosára tekintettel nem áll módunkban nyilvánosságra hozni ezért csak a kémiai adatokat tudjuk a dolgozatban részletesen elemezni. Az ipari titkok védelme miatt az egyes területeket sorszámozással jelöltük.

3.1 Mintavétel

3.1.1 I. terület (Gázolaj szennyezés)

Az I. területünkről vett talajmintáink egy közlekedési társaság járműjavítójából származtak. A mintavételezést 4 méteres mélységből a Pyrus-Rumpold Kft. végezte. A mintákat tenyésztési vizsgálatoknál a mintavétel napján, a nukleinsav alapú vizsgálatok esetén egy héten belül feldolgoztuk, addig azokat -20°C -on tároltuk. A minták kémiai elemzését akkreditált laboratórium végezte.

3.1.2 II. terület (Gázolaj szennyezés)



3.1. ábra. II. mintavételi hely; 1. minta: a tartály betöltő csonkját védő kútgyűrű fenekét kitöltő homokból; 2. minta: az egykori kút helyén maradt kifolyócsőről steril kanállal lekapart réteg

Két mintát gyűjtöttünk egy budapesti katonai létesítmény leszerelt benzinkútjának környezetéből, az 3.1 ábrán látható helyekről. A mintákból a gázolaj hasznosítására képes közösségeket gázolajos dúsító tápoldatban dúsítottuk fel.

3.1.3 III-VII. mintavételi területek (Klórozott szénhidrogén szennyezés)

A triklóretilénnel szennyezett területek vizsgálatához öt területet (A; B; J; K; T) választottunk ki, amelyeken kiépített mintavevő kutakból alkalmanként 2 liter talajvíz mintát vettünk. Az O_2 beoldódás elkerülése érdekében a mintavétel N_2 ellenáramoltatás mellett történt. A mintákat még aznap feldolgoztuk.

3.2. TÖRZSGYŰJTEMÉNYBŐL SZÁRMAZÓ SZERVEZETEK

3.2 Törzsgyűjteményből származó szervezetek

A vizsgálatokhoz a frissen izolált szervezeteken túl törzsgyűjteményekből származó mikrobákat is felhasználtunk. A Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ - Német Mikroorganizmus- és Sejttenyésztési Gyűjtemény)-ből származnak a *Pseudomonas putida* DSM50202 és az *Acinetobacter* genospecies 11 DSM590 törzsek. Az ELTE Mikrobiológiai Tanszék törzsgyűjteményéből származik az SM5T4 jelű törzs. Mindhárom törzsről leírták a szénhidrogén bontó képességet (Evans 1947, Stanier et al. 1966, Mashreghi és Márialigeti 2005), ezért ezeket választottuk ki referenciatörzseknek a vizsgálatokhoz. A dehalorespiráló szervezetek kimutatásának optimalizálásához használt típus-törzsek a következők: *Desulfomonile tiedjei* DSM6799; *Desulfotobacterium dehalogenans* DSM9161; *Desulfotobacterium chlororespirans* DSM11544; *Dehalobacter restrictus* DSM 9455; *Desulfuromonas chloroethenica* DSM 12431. A *Dehalococcoides ethenogenes* törzs tiszta tenyészetének DNS-ét Nikolausz Marcell bocsátotta rendelkezésünkre a Helmholtz Zentrum für Umweltforschung-UFZ (Lipcse) intézetből.

3.3 Felhasznált anyagok

Az ebben a fejezetben külön nem szerepeltetett vegyületek (3.1. táblázat) esetén analitikai tisztaságú vegyszereket alkalmaztunk.

3.1. táblázat. A speciálisan beszerzett vegyületek és főbb tulajdonságaik

Anyag	Gyártó	Egyéb
gázolaj	Mol Rt.	Átlagos szénatomszám: 15; Számított molekulatömeg: 212 g/mol; Mért sűrűség: 0,8 g/cm ³
Tween 80 (polioxietilén(20)-szorbitán-monooleát)	Reanal	Hidroxilszám: 65-80; Molekulatömeg: 1310 g/mol; Kritikus micellaképző koncentráció (CMC): 1,2x10 ⁻⁵
Hidroxipropil-β-ciklodextrin	Cyclolab Kft.	Molekulatömeg: 1380 g/mol

3.3.1 Táptalajok

3.2. táblázat. ALAPTÁPTALAJ (HÚSPEPTON AGAR)

pepton	5,0 g
húskivonat	2,5 g
agar	20,0 g
desztillált víz	1000,0 ml
pH 7,0; sterilizálás autoklávban 121,1°C-on, 15 percig	

3.3. táblázat. GÁZOLAJOS DÚSÍTÓ

Gázolaj	10,0 g
NH ₄ Cl	0,5 g
Na ₂ H ₂ PO ₄ xH ₂ O	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ x7H ₂ O	0,5 g
NaCl	4,0 g
nyomelemoldat	1,0 ml
agar	20,0g
desztillált víz	1000,0 ml
pH 7,0; sterilizálás autoklávban 0,75 bar-on, 30 percig	

3.4. táblázat. NYOMELEMOLDAT A GÁZOLAJOS DÚSÍTÓHOZ

CuSO ₄ x5H ₂ O	0,64 g
FeSO ₄ x7H ₂ O	0,11 g
MnCl ₂ x4H ₂ O	0,79 g
ZnSO ₄ x7H ₂ O	0,15 g
desztillált víz	100,00 ml
sterilizálás szűréssel	

3.5. táblázat. BUSHNELL-HAAS BROTH (BHB) TÁPOLDAT

MgSO ₄	0,20 g
CaCl ₂	0,02 g
KH ₂ PO ₄	1,00 g
K ₂ HPO ₄	1,00 g
NH ₄ NO ₃	1,00 g
FeCl ₃ x6H ₂ O	0,05 g
Rezaurin festék (0,001 g/ 100ml)	1,00 ml
Desztillált víz	1000,00 ml
pH 7,0; sterilizálás autoklávban 121,1°C-on, 15 percig	

3.4 Klasszikus mikrobiológiai módszerek

3.4.1 Gázolajbontó baktériumok izolálása

A szennyezett talajból a törzsek izolálása gázolajos dúsító táptalajon történt, így eleve azokat a törzseket szelektáltuk, amelyek képesek a gázolaj különböző komponenseit szénforrásként hasznosítani. Az izolált törzseket a későbbiekben alaptáptalajon tartottuk fenn 4°C-on, havonta átoltva.

3.4. KLASSZIKUS MIKROBIOLÓGIAI MÓDSZEREK

3.4.2 Mikrokozmoszok összeállítása

3.4.2.1 *Respirometrikus mérések – Széndioxid termelés vizsgálata zárt, OxiTop rendszer segítségével*

A mérésorozatban a széndioxid-termelését mértük zárt rendszerben, OxiTop OC110 (WTW) segítségével.

250 ml BHB táplevesbe mértük be az adott mennyiségű adalékanyagot (HPCD-t, Tween 80-at, vagy keményítőt), ill. a gázolajat. Az edény zárófejébe NaOH pasztillát helyeztük el, hogy a keletkezett CO₂-t elnyelje, majd ráhelyeztük a nyomásváltozást mérő fejet. A mérőfejekkel lezárt edényeket 28°C-ra helyeztük, hogy felvegyék a megfelelő hőmérsékletet. Egy napi állás után, az abiotikus kontroll kivételével, beoltottuk őket 500 µl baktériumsuszpenzióval (8×10^6 CFU/ml) a méréshez kiválasztott késői logaritmikus növekedési fázisban lévő tenyészetből. A palackokban történő változásokat 28°C-on, állandó keverés mellett 7-14 napig figyeltük. A rendszerben a légköri nyomás volt a kiindulási érték.

3.4.2.2 *A HPCD hatásának vizsgálata a benzol és toluol bomlására*

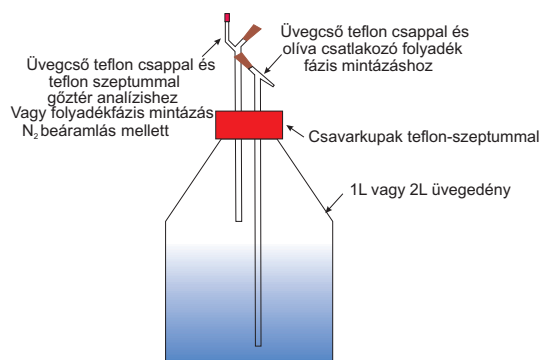
A bomlást 150 ml-s teflon-dugóval záródó üvegekben vizsgáltuk. Adott mennyiségű HPCD-t adtunk a tápközeghez, és 2, 5, 10, 15 g/l benzolt, toluolt, ill. 1:1 arányú keveréküket. A kontrollkísérleteket ciklodextrin nélkül végeztük. Az abiotikus kontroll hasonlóan készült a biotikus vizsgálatokhoz, csak nem oltottuk be a mikroorganizmussal. Minden sorozatot háromszor ismételtünk, az eredményeket átlagoltuk. A bomlást (a benzol és a toluol koncentrációját) hetente, gázkromatográfiás mérésekkel követtük nyomon.

3.4.2.3 *A klórozott alifás szénhidrogének anaerob bontásának vizsgálata laboratóriumi körülmények között*

A triklóretilén bontásának vizsgálatához mikrokozmosz kísérleteket készítettünk. A mikrokozmoszokat 2 literes üvegedényekben állítottuk össze, és légmentesen lezártuk, hogy a levegővel ne érintkezzen. Redox-indikátorként rezazurint alkalmaztunk. Minden kísérletet két párhuzamosban végeztünk és biotikus kontroll mikrokozmoszokat is indítottunk (K), amelyekhez nem adtunk adalékanyagot. A mintavételezés nitrogén gáz ellenáramoltatás mellett történt. A mintákat elküldtünk kémiai vizsgálatra, valamint közösségi DNS izolálás után közösségi analízist és specifikus kimutatásokat végeztünk.

3.4.3 Csíraszám becslés szélesztéses technikával

27 ml gázolajos dúsító táplevesbe, ill. húspepton levesbe 3-3 g talajmintát mértünk, majd tíz tagú, tízszeres hígítási sorozatot készítettünk kémcsövekben. A sorozat minden egyes tagjából 3x100 µl-nyi mennyiségeket ugyanilyen összetételű agarlemezre szélesztettünk. A tenyészeteket 72 órán át 28°C-on inkubáltuk. Azokon a lemezeken, ahol a telepszám 20-200 között volt, a telepeket megszámoltuk, majd a hígítási fok segítségével a csíraszámot meghatároztuk. A 3 párhuzamos eredményt átlagoltuk (Horváth 1980).



3.2. ábra. A klórozott alifás szénhidrogének anaerob bontásának vizsgálatához fejlesztett mikrokozmosz üveg sematikus rajza

3.4.4 Biomassza növekedés spektrofotometriás vizsgálata

A méréseket Hach DR/2000 spektrofotométerrel végeztük el. A 3.4.2.1 fejezetben összeállított mikrokozmoszokból rendszeresen mintát vettünk, és a denzitását 660 nm-n megmértük. Minden mikrokozmoszból az összeállítás után azonnal mintát vettünk, majd annak denzitását meghatároztuk. Ezek az értékeket tekintettük alapértékeknek.

3.4.5 Közösségi szénforrás értékesítési vizsgálat

A vizsgálathoz BIOLOG GN2 (Hayward, California, USA) lemezeket használtunk. A 96 lyukú mikrotiter-lemez 95 különböző szénforrást tartalmaz, valamint egy kontrollt (A1), ami csak a szénforrások mellé is betöltött tetrazólium redoxindikátort tartalmazza. A színtelen indikátor a baktériumközösség anyagcseréjének hatására lilás-rózsaszín formazánná alakul. A mintánkat először centrifugáltuk (5000g ; 10 perc), majd a felülúszót leöntöttük. Ezután a centrifugacső alján összegyűlt sejteket steril desztillált vízben szuszpendáltuk, majd a szuszpenzió optikai denzitását beállítottuk standardok segítségével. A szuszpenzióból a mikrotiter-lemez minden lyukába 150 μ l-t mértünk. A lemezeket 28°C-on inkubáltuk. A leolvasást 24, 48, 72 és 96 óra elteltével 590 nm-en végeztük, ELISA Reader (Labsystems Multiscan PLUS) készüléken. A mért értékeket akkor tekintettük pozitívnak, ha az OD590 értékek az átlag + szórás értéknél nagyobbak voltak.

3.4.6 Enzimaktivitás mérés

Az enzimaktivitás mérést Feist és munkatársai által kidolgozott protokoll szerint végeztük el, de azt helyenként módosítottuk (Feist és Hegeman 1969). A módosított protokoll három fő lépésből áll: az enzim izolálása, a fehérjekoncentráció meghatározása és az enzimaktivitás mérésének folyamata.

3.4.6.1 Az enzim izolálása

Az általunk vizsgálni szándékozott enzimek indukciója érdekében a korábban kiválasztott törzseket BHB táplevesben a megfelelő aromás vegyülettel inkubáltuk, különböző hosszúságú időintervallumon keresztül, egyféle aromás szénforrás jelenlétében. Az alaptáptalajról összegyűjtött

3.4. KLASSZIKUS MIKROBIOLÓGIAI MÓDSZEREK

sejtekből készült szuszpenzióval oltottuk be a BHB tápleveseket, amelyekben a sejteket 24, illetve 168 órán keresztül inkubáltuk. A megfelelő inkubációs idő letelte után végeztük el az enzim izolálását:

- a sejtek összegyűjtése a BHB táplevesből centrifugálással, 5000g-n 20 percen keresztül;
- az összegyűjtött sejtek szuszpendálása, illetve mosása 0,003 M Trisz-HCl mosó pufferrel, majd újbóli centrifugálás 5000g-n 20 percig;
- az összegyűjtött, és mosott sejtek újbóli szuszpendálása 0,03 M Trisz-HCl izoláló pufferrel (0,2 g sejthez 1,0 ml puffer);
- sejtfeltárás jégen, szonikátorban 5 percig ultrahang segítségével;
- a sejttörmelék, illetve a fel nem tört sejtek eltávolítása centrifugálással (15000g, 15 perc);
- a centrifugálás után kapott felülúszót használjuk a további vizsgálatokhoz jégen tárolva.

Az enzim izolálása során kapott felülúszó összfehérje kivonat, amely tartalmazza a gyűrűhasító enzimet, enzimeket. Ez az extraktum közvetlenül használható enzimaktivitás mérésre, további tisztítást nem igényel.

3.4.6.2 A fehérjekoncentráció meghatározása a Bradford módszer segítségével

A fehérjék megkötik a Coomassie Brilliant Blue (Bradford reagens) festéket, ami fotometriásan detektálható (595 nm). 1-20 μ g fehérje esetén az elnyelés arányos a fehérje mennyiséggel (Bradford et al. 1976). Szérum albumin standard fehérje (5, 10, 15, 20 μ l szérum albumin) segítségével kalibrációs görbét készítettünk, mellyel meghatároztuk az ismeretlen fehérje-extraktum koncentrációját.

3.4.6.3 Az enzimaktivitás mérés folyamata

A katekol 1,2-dioxigenáz enzim (az enzim nevezéktan számozás szerint - EC.1.13.11.1) hatására a katekolból cisz,cisz-mukonsav keletkezik, amelynek dúsulása a reakcióelegyben 260 nm-en detektálható [$\epsilon=16000$ (1/(mol x cm)) 25°C], ha a lebontási útvonal következő lépését katalizáló enzim működését gátoljuk. Ez kelátornak, jelen esetben EDTA-nak a reakcióelegyhez adásával érhető el.

A reakcióelegy összetétele:

- 0,3 ml Trisz-HCl puffer (0,033 M),
- 0,1 ml EDTA (0,03 g/ml),
- összfehérje extraktum - fehérje koncentrációtól függően 0,1 - 0,3 ml,
- 0,01 ml katekol-oldat (1 μ mol/ml),
- desztillált víz - annyi, amennyivel 1 ml-re egészítjük ki a reakcióelegy térfogatát.

A katekol 2,3-dioxigenáz enzim (EC. 1.13.1.2.) hatására a katekolból 2-hidroximukonsav félaldehyd keletkezik, amelynek feldúsulása a reakcióelegyben 375 nm-en detektálható ($\epsilon=12000$ (1/(mol x cm))25°C). A termék különösebb beavatkozás nélkül is megmarad a reakcióelegyben, mivel a lebontás következő lépését katalizáló enzim működése nagyon lassú.

A reakcióelegy összetétele:

- 0,3 ml Trisz-HCl puffer (0,033 M),
- összfehérje extraktum - fehérje koncentrációtól függően 0,1 - 0,3 ml,
- 0,01 ml katekol-oldat (1 μ mol/ml),
- desztillált víz - annyi, amennyivel 1 ml-re egészítjük ki a reakcióelegy térfogatát.

A katekolt közvetlenül a mérés elindítása előtt adtuk a reakcióelegyhez. A spektrofotométer (PerkinElmer Lambda 35) 5 másodpercenként automatikusan mérte a reakcióelegy abszorbanciáját. Az aktivitás értékét nmol elbontott szubsztrát /(perc x mg) összfehérje mértékegységben számoltuk ki a reakció első 5 – 10 perce alapján, ugyanis a termék keletkezése itt még közel lineáris volt.

3.5 Molekuláris biológiai módszerek

3.5.1 DNS izolálás törzsekből

A DNS izolálást V-gene Kittel (V-gene Biotechnology) végeztük, a gyártó által megadott protokoll szerint.

3.5.2 DNS izolálás talajból, talajvízből

A DNS izolálást UltraClean Soil DNA Kittel (MoBio) végeztük, a gyártó utasításai szerint. 100 ml talajvizet 5000g-n, 10 percig centrifugáltunk, hogy elegendő mennyiségű üledéket gyűjtünk össze az izoláláshoz. A sejteket tartalmazó üledéket (1g) kerámia gyöngyöket tartalmazó csövekbe helyeztük, és lízis puffer, detergens, ill. inhibitor eltávolító oldat hozzáadása után (a huminsavak ugyanis gátolhatják a PCR reakciót), sejtmalomban feltártuk (2x1,5 perc), majd centrifugáltuk (10000g; 5 perc), és a nukleinsavakat tartalmazó felülúszót új, steril csőbe mértük át. A megfelelő reagens hozzáadása után 5 percig 4°C-on inkubáltuk a mintákat, hogy a fehérjék kicsapódjanak. Ezután a mintákat ismét centrifugáltuk (10000g; 1perc) és a DNS-t tartalmazó felülúszó teljes mennyiségét új, steril filteres csőbe mértük át. Ezután magas sókoncentráció mellett a DNS-t megkötöttük a szűrőn, majd etanolos tisztítási lépés következett. A szűrő megszáritása után a filtercsövet új, steril mikrocentrifuga csőbe helyeztük, majd eluáltuk a DNS-t.

3.5.3 RNS izolálás

Az RNS izolálást RNeasy Mini Kittel (Qiagen) végeztük, a gyártó utasításai alapján. A talajvízből származó pelletet üveggyöngyök és lizáló oldat segítségével feltártuk, majd filteres mikrocentrifugacsőbe mértük át az elegyet. Centrifugálás (10000g; 1perc) után etanolos tisztítási lépések következtek. A szűrő megszáritása után az RNS-t RNáz mentes vízben vettük fel, és szükség esetén -70°C-on tároltuk. Az RNS tisztaságát rutin 16S PCR reakciókban ellenőriztük.

3.5.4 Nukleinsavak detektálása gélelektroforézissel

A kapott nukleinsavat agaróz gélelektroforézissel detektáltuk. 1%-os agaróz gél-t öntöttünk (1g agaróz, 10 ml 10xTBE, 90 ml ddH₂O, 0,5 μ l/ml etídium-bromid). A gél zsebeibe 5 μ l mintát és 3 μ l

3.5. MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREK

töltőpuffert (30 v/v % glicerín, 0,25mM brómfenolkék), az első zsebbe 1,8 μ l molekulasúly markert (Fermentas; Lambda DNA/EcoRI + HindIII Marker 3 vagy pUC Mix Marker 8; a nukleinsav méretétől függően) pipettáztunk. A gélt 1xTBE pufferben (TRIS-bázis 10,78 g/l; bórsav 5,5 g/l; EDTA 0,74 g/l; pH 8,3) 100 V feszültséggel, 20 percig futtattuk, majd UV fényben vizsgáltuk. A továbbiakban -20°C-on tároltuk az izolált DNS-t.

3.5.5 A munkák során alkalmazott polimeráz láncreakciók protokolljai

3.6. táblázat. A 16S rDNS PCR összemérési protokollja

premix	10 μ l	10x PCR puffer
	2 mM	MgCl ₂
	0.2 mM	dNTP
	0.3 μ M	forward primer
	0.3 μ M	reverz primer
	25-29 μ l	víz
	1U	Taq polimeráz
	1-5 μ l	templát
	50 μ l össztérfogat	

3.7. táblázat. A 1. PCR típus hőprofilja

98°C	Kezdeti denaturáció	5 perc	
94°C	Taq hozzáadása	10 mp	
52°C	Primer anelláció	30 mp	
72°C	extenzió	1 perc	32 ciklus
94°C	denaturáció	30 mp	
72°C	Végső extenzió	10 perc	

3.8. táblázat. A 2. PCR típus hőprofilja

95°C	Kezdeti denaturáció	3 perc	
52°C	Primer anelláció	30 mp	
72°C	extenzió	1 perc	32 ciklus
94°C	denaturáció	30 mp	
72°C	Végső extenzió	10 perc	

A polimeráz láncreakciót (PCR-t) GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) készülékel végeztük. A PCR-hez alkalmazott vegyszerek koncentrációit a 3.6 táblázat tartalmazza, a

3.9. táblázat. A munkák során alkalmazott primerek és adataik

primer	bázissorrend	referencia
27f	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	(Lane 1991)
63f	5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3'	(Marchesi et al. 1998)
519r	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'	(Stackebrandt és Liesack 1993)
1492r	5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	(Lane 1991)
1401r	5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3'	(Nubel et al. 1996)
M13f	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'	Stratagene
M13r	5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'	Stratagene

munkák során alkalmazott különböző hőprofilokat a 3.7 és 3.8 táblázatok tartalmazzák. Az amplifikáció során, a szükséges vizsgálatoktól függően, eltérő primereket választottunk, melyeket az *Escherichia coli* 16S rRNA gén nukleotid szekvenciája alapján jelöltünk (Brosius et al. 1978), vagy a tervezője által adott nevét alkalmaztuk (3.9 táblázat).

3.5.5.1 16S rDNS PCR a DGGE-hez

A DGGE módszer alapja, hogy a különböző bázisösszetételű szekvenciáknak más az olvadáspontja (Részletesen ld. később, a 3.5.10.2 fejezetben). Ahhoz azonban, hogy a denaturáció során a DNS szakasz két szála ne válhasson el egymástól teljesen, szükséges az amplifikált DNS szakasz végére egy nagy olvadáspontú részt beépíteni. Ez ún. GC-kapocs tartalmazó primerekkel történik (3.10 táblázat).

3.10. táblázat. A DGGE munkák során alkalmazott primerek és adataik

primer	bázissorrend	referencia
GC-63F	5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA GGG GGG CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3'	(Muyzer és Smalla 1998)
GC-27F	5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	(Lane 1991)*
GC-968F	5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC-3'	(Muyzer és Smalla 1998)

*módosítva

3.5. MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREK

3.5.5.2 16S rDNS PCR a T-RFLP-hez

A PCR során fluoreszcensen jelölt primereket használtunk, melyek a reakció során beépültek az amplifikált DNS egyik végére, így olyan PCR terméket kaptunk, mely a későbbi T-RFLP elemzés során detektálhatóvá vált. A jelölt primer mindenben megegyezett a 3.9 táblázatban szereplő primerekkel csak ellátták őket egy fluoreszcens festékkel (HEX).

3.5.5.3 A katekol 1,2-dioxigenáz gén (C12O) kimutatásához alkalmazott PCR

A C12O anyagcsere gén kimutatására egyrészt irodalmi, illetve saját tervezésű primereket is alkalmaztunk (3.12. táblázat). Az irodalmi adatokból származó és a saját tervezésű primereket a 3.11. táblázatban leírt hőprofilal rendelkező PCR-rel használtuk.

3.11. táblázat. A katekol 1,2 dioxigenáz gén kimutatására szolgáló PCR ciklus hőprofilja

98°C	Kezdeti denaturáció	5 perc	
94°C	Taq hozzáadása	10 mp	
57°C	primer anelláció	30 mp	
72°C	extenzió	1 perc	32 ciklus
94°C	denaturáció	30 mp	
72°C	Végső extenzió	10 perc	

3.12. táblázat. A katekol 1,2-dioxigenáz kimutatásakor használt primerek

primerek jelölése	bázissorrend	referencia
C12Of	5'-GCC AAC GTC GAC GTC TGG CA-3'	(Sei et al. 1999)
C12Or	5'-CGC CTT CAA AGT TGA TCT GCG TGG T-3'	(Sei et al. 1999)
RHOf	5'-GCC GCC ACC GAC AAG TT-3'	saját tervezés
RHOrA	5'-GTA GTA CGG GCC CTC GAT GCT-3'	saját tervezés
RHOrB	5'-CAC CAT GAG GTG CAG GTG-3'	saját tervezés
ACf	5'-ACA CCA CGA ACA ATT GAA GGA CCG-3'	saját tervezés
ACr	5'-TGC GAA GGG CGG TTA CCA TG-3'	saját tervezés

3.5.5.4 Dehalorespiráló szervezetek kimutatásához alkalmazott primerek

A triklóretilénnel szennyezett területeken molekuláris módszerekkel, PCR technika segítségével vizsgáltuk egyes dehalorespiráló szervezetek jelenlétét. Az ehhez szükséges hőprofilokat a 3.13. táblázat tartalmazza, a primerek bázisösszetételét a 3.14. táblázat.

3.13. táblázat. A dehalorespiráló szervezetek kimutatására szolgáló PCR ciklus hőprofilja

98°C	Kezdeti denaturáció	5 perc	
94°C	Taq hozzáadása	10 mp	
55°C ^a / 65°C ^b / 62°C ^c	Primer anelláció	1 perc	
72°C	extenzió	1 perc	32 ciklus
94°C	denaturáció	30 mp	
72°C	végső extenzió	10 perc	

(^a:*Dehalococcoides* sp., ^b:*Dehalobacter* sp. ^c:*Desulfuromonas* sp.)

3.14. táblázat. A dehalorespiráló szervezetek specifikus kimutatásához használt primerek

primerek jelölése	bázissorrend	referencia
DHC1	5'-GAT GAA CGC TAG CGG CG-3'	(Hendrickson et al. 2002)
DHC774	5'-GGG AGT ATC GAC CCT CTC-3'	(Hendrickson et al. 2002)
DHC1377	5'-GGT TGG CAC ATC GAC TTC AA-3'	(Hendrickson et al. 2002)
DHC1212	5'-GGA TTA GCT CCA GTT CAC ACT G-3'	(Hendrickson et al. 2002)
DR-F	5'-GTT AGG GAA GAA CGG CAT CTG T-3'	(Smits et al. 2004)*
DR-R	5'-CAT ATC TCT ACG GGA TTA GTT GG-3'	(Smits et al. 2004)*
DCE-F	5'-AAC CTT CGG GTC CTA CTG TC-3'	(Löffler et al. 2000)
DCE-R	5'-GCC GAA CTG ACC CCT ATG TT.3'	(Löffler et al. 2000)

*módosítva

3.5.6 Reverz transzkripció

Az első cDNS szál szintetizálása RNS-ről random hexamer primerrel, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit-tel, RevertAid M-MuLV reverz transzkriptáz enzimmal (Fermentas) történt.

3.5.7 PCR termék tisztítása

3.5.7.1 A DNS ill. PCR termékek tisztítása PCR-M Clean Up System (Viogene) kittel

Ezt a módszert alkalmaztuk, ha a kapott PCR mintát töményíteni kellett és a szekvenáló reakció előtti tisztítás esetén is.

- A PCR termék összekeverése 0,5 ml PX pufferrel, és a DNS-t megkötő szilikamátrix-szűrőt tartalmazó oszlopra mérés;
- Centrifugálás: 10000g; 1 percig, majd az átfolyt folyadék kiöntése;
- 500 µl Wash Solution bemérése a felső csőbe;
- Centrifugálás: 10000g; 1 percig, majd az átfolyt folyadék kiöntése;
- 700 µl Wash Solution bemérése a felső csőbe;
- Centrifugálás: 10000g; 1 percig, majd az átfolyt folyadék kiöntése;

3.5. MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREK

3.15. táblázat. Az RT-reakció összemérési protokollja

0,1-5 μ l	RNS
1,0 μ l	random hexamer primer
10,9-6 μ l	víz
70°C-n 5 perc inkubáció	
4 μ l	5x reakció puffer
1 μ l	RiboLock Ribonuclease Inhibitor (20u/ μ l)
2 μ l	10mM dNTP mix
25°C-n 5 perc inkubáció	
1 μ l	RevertAid M-MuLV Reverz Transzkriptáz
25°C-n 10 perc, majd 42°C-n 60 perc inkubáció	
A reakció leállítása 70°C-n 10 perc inkubációval	

- Centrifugálás: 10000g; 1 percig, majd az átfolyt folyadék kiöntése;
- Centrifugálás: 3 percig;
- A felső csövek áthelyezése steril Eppendorf-csövekbe;
- 40 μ l eluáló oldat (Elution Buffer) szűrőre mérése;
- 2 perc inkubáció szobahőmérsékleten;
- Centrifugálás: 10000g; 2 perc;
- szűrő eldobása, alsó cső tartalmából DNS detektálása agaróz gélelektroforézissel.

3.5.7.2 Etanol-precipitáció

Ezt a módszert alkalmaztuk, elsősorban az ABI PRISM 310 Genetikai Analizátor mintaelőkészítése során, ha csapadék formájában volt szükségünk a nukleinsavra. A pontos vegyszerarányok a 3.16 táblázatban találhatók.

3.16. táblázat. Az etanol precipitáció során használt reakcióelegy összetétele

3,0 μ l	Nátrium-acetát
62,5 μ l	95%-os etanol
14,5 μ l	steril dH ₂ O
20,0 μ l	PCR termék

Az elegyet 15 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd centrifugáltuk 20 percig 10000g-en 4°C-on. Ezután a felülúszót leszívtuk, majd ráértünk 250 μ l 70%-os etanolt, majd keverés után centrifugáltuk 10 percig 10000g-en 4°C-on. Ismét eltávolítottuk a felülúszót és a pelletet vákuumcentrifugában megszárítottuk. A pelletet -20°C-on tároltuk.

3.5.8 Bázissorrend elemzés

A bázissorrend elemzést a jelölt terminátorú ciklikus szekvenálás (Dye Terminator Cycle Sequencing, Perkin-Elmer) módszerrel és az ABI Prism 310 automata genetikai analizátorral (Applied

Biosystems) végeztük el. A módszer Sanger stop-nukleotid módszerének módosított változata. A reakció során a primertől kiindulva egy DNS polimeráz a bázispárosodás szabályai szerint nukleozidokat épít be. A reakció elegyben dideoxi-nukleozidok is vannak, melyek terminálják a reakciót, így különböző hosszúságú DNS szakaszok keletkeznek. Mind a négy termináló nukleotid más festékkel jelölt, ezért mindegyik szekvenciahosszhoz rendelhető egy fajta jelölés. A kapilláris gél-elektroforézis után kialakuló méretbeli sorrend megfelel a bázissorrendnek, amely a jelölések alapján egyszerűen leolvasható. A BigDye™ Terminator Cycle Sequencing 3.0 terméket (Applied Biosystems) használtuk. A kit tartalmazza az AmpliTaq® DNS polimeráz FS enzimet. A Gene Amp PCR System 2700 (Perkin Elmer) készülékben a alábbi táblázatokban leírt összetétel (3.17) és hőprofil (3.18) mellett végeztük el a szekvenáló reakciót.

3.17. táblázat. A szekvenáló reakció összetétele

Big Dye Terminator™ Ready Reaction Mix	2 μ l	premix
5X hígító puffer	3 μ l	
H ₂ O	6,5 μ l	
primer	0,5 μ l	
Viogene Kittel tisztított PCR termék	8 μ l	
Össztérfogat:	20 μ l	

3.18. táblázat. A szekvenáló reakció hőprofilja

denaturáció	96°C	10 sec	
anelláció	50°C	5 sec	26 ciklus
extenzió	60°C	4 min	

A reakció után etanol-precipitációval tisztítottuk meg a terméket (3.5.7.2. fejezet). Ezután 20 μ l formamidban (Promega) vettük fel a DNS-t. A jelölt fragmentumokat kapilláris elektroforézis segítségével választottuk el. A minták injektálását elektrokinetikusan 45 másodpercen keresztül 15kV-n végeztük. Az elválasztás 120 percig 15kV-n, POP-6 (Applied Biosystems) polimeren történt. Az elektroferogramokat Sequence Analysis 4.3.1. szoftver segítségével értékeltük ki.

3.5.9 Klónkönyvtár létrehozása

3.5.9.1 PCR termék klónozása, ligáló reakció

A klónkönyvtár létrehozását pGEM®-T Easy Vector Systemmel végeztük. Az alábbi összetevőket mértük össze 0,6 ml-es csövekbe: 5 μ l 2x ligáló puffer, 1 μ l pGEM®-T Easy klónozó vektor, 3 μ l PCR termék, 1 μ l T4 DNS ligáz és 10 μ l dH₂O. Pipettával összekevertük és egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk.

3.5.9.2 Transzformáció

Hozzáértünk jégen tartott 50 μ l JM 103 szuperkompetens sejthez 2 μ l-t a ligálási reakciómixból. Ezután jégen inkubáltuk 20 percig, majd a reakcióelegyet 50 másodperces hősokknak

3.5. MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREK

tettük ki 42°C-on. Ezt követően 2 percig inkubáltuk jégen, majd 950 µl SOC táplevest adtunk hozzá és 1,5 órán át ráztuk 37°C-on. Steril szélesztőbottal 100 µl-eket szélesztettünk a transzformált sejteket tartalmazó oldatból X-Gal-lal és IPTG-vel kiegészített LB-ampicillin agarra. A táplemezeket egy éjszakán át inkubáltuk 37°C-os termosztátban. A vektor felvételével a gazdasejtek rezisztenciát nyernek ampicillinre, az inzert (a vizsgált közösségi DNS-éből származó PCR termék egy molekulája) beépülésével pedig megszűnik a β-galaktoszidáz aktivitás. Azon telepek, amelyeknek megvan ez az aktivitása, nem hordoznak inzertet, és képesek a táplemezben lévő X-gal hasítására, ami kék színű festéket eredményez. A negatív telepek ezért kékek, a pozitívak pedig fehérek. A pozitív, beépült fragmentumot tartalmazó kolóniákat steril fogpiszkáló segítségével le-szedtük, 40 µl dH₂O-ben szuszpendáltuk. A sejteket 98°C-on, 3 percig inkubáltuk, majd 3 percig centrifugáltuk.

3.5.9.3 PCR a vektorba épített fragmentumokra

Az első PCR során M13f és M13r, vektorspecifikus primereket használtunk, így elkerülhető volt, hogy a kompetens sejt saját 16S rDNS régiója is amplifikálódjon. A reakció hőprofilja a 2. PCR hőprofil volt (3.8. táblázat).

Ezután a kapott PCR termékekre elvégeztünk a második PCR reakciót (2. hőprofil) a közösségi DNS szaporításához használt primerekkel, hogy a továbbiakban csak a közösségi DNS-ből származó egy-egy molekulájával dolgozzunk tovább.

3.5.10 Ujjlenyomat módszerek

3.5.10.1 ARDRA

Az ARDRA során gyakran hasító restrikciós enzimekkel emésztettük a PCR során kapott terméket. Az emésztéshez felhasznált enzimek a *Csp6I* és a *BsuRI* restrikciós enzimek voltak (3.21. táblázat). Az alábbi reakcióelegyeket kevertük össze mintánként: 0,3 µl enzim, 2 µl puffer, 7,7 µl dH₂O és 10 µl PCR termék. Az elegyeket keverés után 37°C-os vízfürdőbe helyeztük 3,5 órára. A mintákat 1,7 %-os agaróz gélen futtattuk: Az elektroforézist 1X TBE pufferben 2 órán keresztül 80 V feszültségen végeztük. A kialakuló sávmintázat UV-fény alatt válik láthatóvá. Az eredményeket digitális képrögzítéssel dokumentáltuk.

3.5.10.2 DGGE

Felhasznált reagensek:

- 40%-os akrilamid oldat (akrilamid:biszakrilamid 37,5:1; BIO-RAD)
- 50x TAE puffer (2M Tris, 1M ecetsav, 0,5M EDTA, pH 8,0; BIO-RAD)
- urea (BIO-RAD)
- formamid (BIO-RAD)
- TEMED (BIO-RAD)
- 10%-os ammónium-perszulfát (APS, BIO-RAD)
- HPLC tisztaságú víz

A denaturálószer lineáris gradiensét tartalmazó akrilamid gél INGEnYphorU (Ingeny) gél-öntő rendszerrel öntöttük a két különböző denaturáló koncentrációjú oldatból perisztaltikus pumpa

és grádiens keverő segítségével. Az oldatok elkészítése a törzsoldatokból a 3.19 táblázat alapján történt.

3.19. táblázat. A 8%-s poliakrilamid denaturáló grádiens gél összeállítása

8%-s PAA gél denaturálószer koncentrációja		40 %	70 %	töltő gél (0%)
törzsoldat	6%-os PAA 0%-os denaturáló koncentráció	7,2 ml	3,6 ml	3 ml
	6%-os PAA 100%-os denaturáló koncentráció	4,8 ml	8,4 ml	-
	10%-os PAA 0%-os denaturáló koncentráció	7,2 ml	3,6 ml	3 ml
	10%-os PAA 100%-os denaturáló koncentráció	4,8 ml	8,4 ml	-
TEMED		20 μ l	20 μ l	6 μ l
APS		100 μ l	100 μ l	27 μ l

Az APS-t csak közvetlenül a géöntés előtt adtuk az oldatokhoz (a polimerizáció az APS hatására indul meg). A denaturáló grádiens gél megöntését követően a gél tetejére denaturáló szert nem tartalmazó "töltő gél" rétegeztünk, ami elősegíti a DNS gélbe jutását a zsebekből. A függőleges állású gélben a denaturáló szer koncentrációja felülről lefelé nő. Az elektroforézis vertikális, iránya megegyezik a denaturálószer grádiens irányával. A futtatás 8%-os PAA gélen 40-70%-os denaturáló grádiens mellett történt. A zsebekbe az előzőleg töltőpufferrel összekevert PCR termékeket 50 μ l-es Hamilton fecskendővel juttattuk. A minták futtatása 60°C-on, 1%-os TAE pufferben az alábbi feszültség értékek mellett történt: 15 perc "befuttatás" 80V-on, 14 óra futtatás 200V-on.

Az elektroforézist követően a gél 40 percig etídium-bromidban festettük, majd 20 perc desztillált vízben történő mosás után a kialakuló sávmintázatot UV-fény alatt vizsgáltuk. Az eredményeket digitális képrögzítéssel dokumentáltuk. A PAA gél mintázatának elemzését a TL120 TotalLab gélelemző szoftver (Nonlinear Dynamics) segítségével végeztük (sávazonosítás).

Az egyes sávok DNS-ének taxon szintű meghatározásához a különálló sávokat a poliakrilamid gélből UV fénnel történt átvilágítás mellett, steril szikével vágunk ki, és steril Eppendorf csövekbe tettük. A géldarabokra mintánként 20 μ l steril bidesztillált vizet pipettáztunk és 12 órát 4°C-on inkubáltuk. Másnap a felulúszót átpipettáztuk új tesztcsövekbe és felhasználásig -20°C-on tároltuk.

Az egyes géldarabok tartalmazta DNS bázissorrendjét (3.5.8). fejezetben leírtak szerint határoztuk meg.

3.5.10.3 T-RFLP

A jelölt primerekkel felszaporított PCR termékeket, hasonlóan az ARDRA módszernél leírtakhoz, restrikciós enzimekkel hasítottuk. A felhasznált restrikciós enzimek hasítási helyeit illetve optimális működésükhöz szükséges hőmérsékleti értékeket és az összemérendő mennyiségeket a 3.20. és a 3.21. táblázatok tartalmazzák.

A restrikciós enzimekkel emésztett PCR terméket etanol precipitációs eljárással tisztítottuk, majd a pelletet felvettük 20 μ l steril dH₂O-ban, hogy feloldjuk a pelletben lévő DNS-t. A mintákat formamid-TAMRA elegyben vittük fel az ABI Prism 310 automata Genetikai Analizátor készülékre az alábbiak szerint:

A speciális mintatároló csövekben összemértük a reagenseket – 0,6 μ l TAMRA 500 molekulasúly standard (Applied Biosystems); 12 μ l formamid (Promega); 0,5-5 μ l minta – melyeket

3.5. MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREK

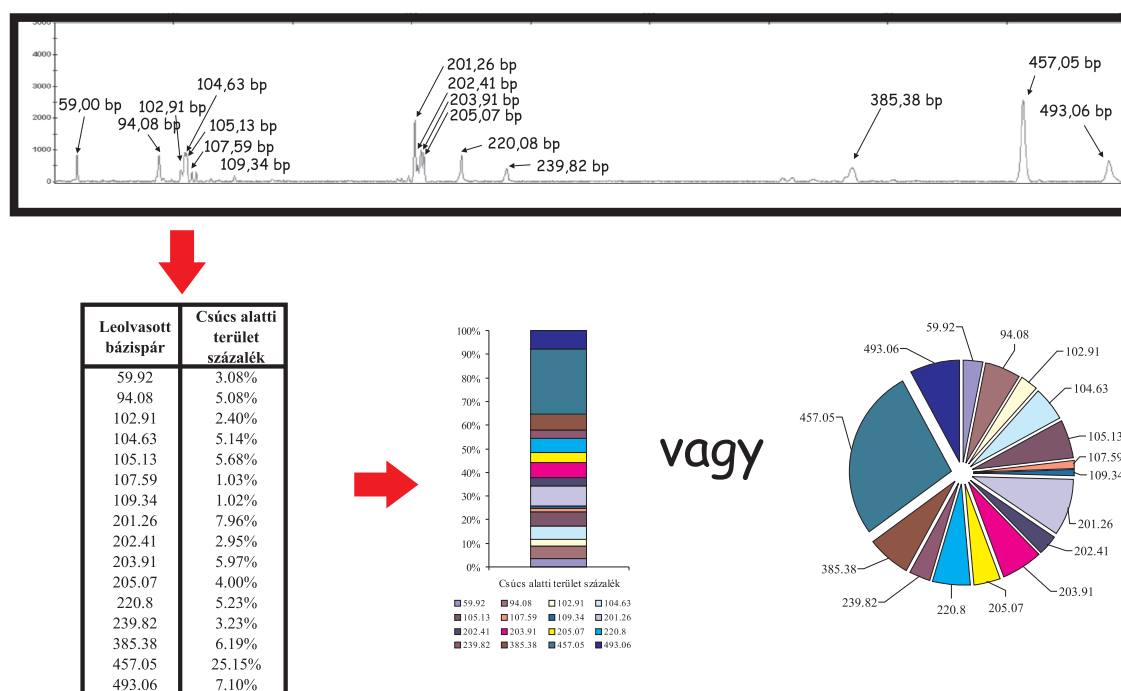
3.20. táblázat. A PCR termékek restrikciós enzimekkel történő emésztésének protokollja

puffer	2 μ l
dH ₂ O	5,5 μ l
PCR termék	10 μ l
enzim	2,5 μ l
össztérfogat	20 μ l

3.21. táblázat. Az ARDRA és T-RFLP vizsgálatok során alkalmazott restrikciós enzimek

Enzim	Puffer	Hasítási hely	Optimális hőfok és idő
Csp6 I	B	5'G↑TAC	37°C; 12h
BsuR I	R	5'GG↑CC	37°C; 12h
Bsh1236I	R	5'CG↑CG	37°C; 12h
AluI	Y	5'AG↑CT	37°C; 12h

ezután a formamid és melegítés (95°C-on 3 percig) segítségével denaturáltunk, majd rögtön jégre tettük. Ezután a kapilláris elektroforézist az ABI Prism 310 automata Genetikai Analizátor készüléken végeztük. A minták injektálása elektrokinetikusan 8 másodpercen keresztül, 15 kV feszültségen történt. Az elválasztás 28 percig 15 kV-on történt, POP-4 polimeren (Applied Biosystems). Elektroferogram elemzés GeneMapper 3.7 program segítségével történt. A T-RFLP során kapott értékek közül a fragmentumok méretét és a csúcsok területét használtuk fel, melyekből a T-align program segítségével kiszámoltuk relatív mennyiségüket (Smith et al. 2005).



3.3. ábra. A T-RFLP eredmények kiértékelése és a dolgozat során alkalmazott ábrázolási megoldások

A kapott elektroferogramon a különböző hosszúságú fragmentek hosszúsága belső standard segítségével meghatározható, a csúcsok területéből pedig következtethetünk a mennyiségi viszonyokra. Az oszlopdiagramokon az egyes TRF-ek különböző színekkel vannak jelölve, aminek a segítségével a közösségre jellemző mintázatot ábrázolni tudjuk. Minden egyes TRF egy-egy OTU-t (operational taxonomic unit) határoz meg. Ezek az egységek általában különálló taxonokat határoznak meg a közösségen belül, ám előfordulhat, hogy egy-egy TRF több taxonra is jellemző.

Az oszlopdiagramon ábrázolt mintázatok vizuálisan segítenek az egyes minták mikrobaközösségének összehasonlításában. Az egyes egyes TRF-ek arányainak készült adatmátrix segítségével pedig matematikai módszerekkel lehet értelmezni az egyes minták közötti különbségeket (3.3. ábra).

3.6 Statisztikai módszerek

Shannon diverzitás index

A Shannon diverzitás indexet a PAST programcsomag (Hammer et al. 2001) segítségével számoltuk ki a T-RFLP mintázatokból. Az egységek, az OTU-k a hasítási helyek alapján kapott csúcsok voltak. Az értéke 0, ha a közösségben csak egy taxon van sok egyeddel, a továbbiakban annál nagyobb az érték, minél több taxon található kis egyedszámmal.

Filogenetikai fák készítése

A kapott szekvenciákat az ARB-SILVA (Pruesse et al. 2007) internetes adatbázis segítségével illesztettük, majd a rokon fajok szekvenciáit az adatbázisból letöltöttük. Ezek után filogenetikai fát készítettünk, neighbour-joining módszerrel (Saito és Nei 1987), bootstrap becsléssel (500 ismétlés), Kimura-korrekcó mellett MEGA3 szoftvercsomag segítségével (Kumar et al. 2004).

Főkomponens-elemzés

A TCE szennyezett területek kémiai és biológiai paraméterei között a többváltozós ordinációs módszerek közé tartozó főkomponens-elemzés (principal component analysis; PCA) segítségével kerestünk összefüggést. A SYNTAX 2000 program által generált "biplot" diagram értelmezése a következő elv alapján történik: a színes pontokkal jelöltek az objektumok, a vonallal jelöltek a változók. Ha egy objektumot reprezentáló pont rajta van egy adott változóhoz vezető szakaszon, akkor azon objektum elválása esetében az illető változó a legmeghatározóbb, ez természetesen lehet egyszerre több is. Ha a szakasz az adott objektumhoz tart, de az nincs rajta a szakaszon, akkor a szakasz, valamint az adott pont és az origó között húzott képzeletbeli vonal által bezárt szög jelzi, hogy mely változó(k) meghatározó(k) az objektum elválásában. A kis szög szorosabb kapcsolatot jelez, a nagyobb lazábbat.

3.7 Kémiai elemzések

A folyadékfázis benzol és toluol koncentrációjának meghatározása 1 ml mintából történt. A kivett mintát 200 μ l diklórmétánra rétegeztük, majd a mintát 5 percig rázattuk, a két fázist centrifugálással szétválasztottuk majd a diklórmétán fázisból injektáltunk a gázkromatográfra 1 μ l-t. A

3.7. KÉMIAI ELEMZÉSEK

3.22. táblázat. Az akkreditált laboratórium által végzett vizsgálatok

mért komponens	mérési módszer
teljes petróleum szénhidrogének (TPH)	WBSE-1:2002; GC-EPH
pH	MSZ ISO 10523:2003
szulfát	EPA Method 9056:1994, MSZ EN ISO 10304:1998
nitrát	EPA Method 9056:1994, MSZ EN ISO 10304:1998
nitrit	MSZ EN 26777:1998
összes Fe, összes Mn	MSZ 1484-3:2006, EPA Method 6010b:1996, MSZ EN ISO 11885:2000
klórozott alifás szénhidrogének	DIN 38407 F5:1991, MSZ 1484-5:1998
etán, etilén és metán	WBSW-27:2002
összes szerves szén (TOC)	MSZ EN 1484:1998

benzol és a toluol koncentrációt HP 5890A gázkromatográffal, FID detektorral, HP-1 (25m x 0.22 mm x 0.25 μ m) kapilláris oszlopon határoztuk meg. A detektor hőmérséklete 180°C, az injektor hőmérséklete 45°C volt. Az oszlop hőmérséklete 60°C volt. Vivőgáznak héliumot alkalmaztunk.

Az akkreditált laborban, nem általunk mért paramétereket és mérési módszereiket a 3.22 táblázat foglalja össze.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1 A gázolaj bontásának serkentése laboratóriumi körülmények között

4.1.1 A I. területről származó minták csíraszámának meghatározása

4.1. táblázat. Az első területről származó talajminták csíraszámai. Az összcsíraszám meghatározása alaptáptalajon, míg a gázolajbontó csíraszám gázolajos dúsító táptalajon készített tíztagú, tízszeres hígítási sorozat alapján történt (tke: telepképző egység; TPH: total petroleum hydrocarbon).

Minta	összcsíraszám (tke/1g talaj)	gázolajbontó csíraszám (tke/1g talaj)	TPH (mg/kg)	izolátumok (db)
I.	$1,12 \times 10^8$	$8,32 \times 10^7$	50	8
II.	$1,88 \times 10^7$	$5,00 \times 10^6$	2990	7
III.	$3,58 \times 10^7$	$1,05 \times 10^7$	698	15
IV.	$1,22 \times 10^7$	$5,20 \times 10^6$	10600	8
V.	$1,79 \times 10^7$	$1,23 \times 10^6$	6440	7

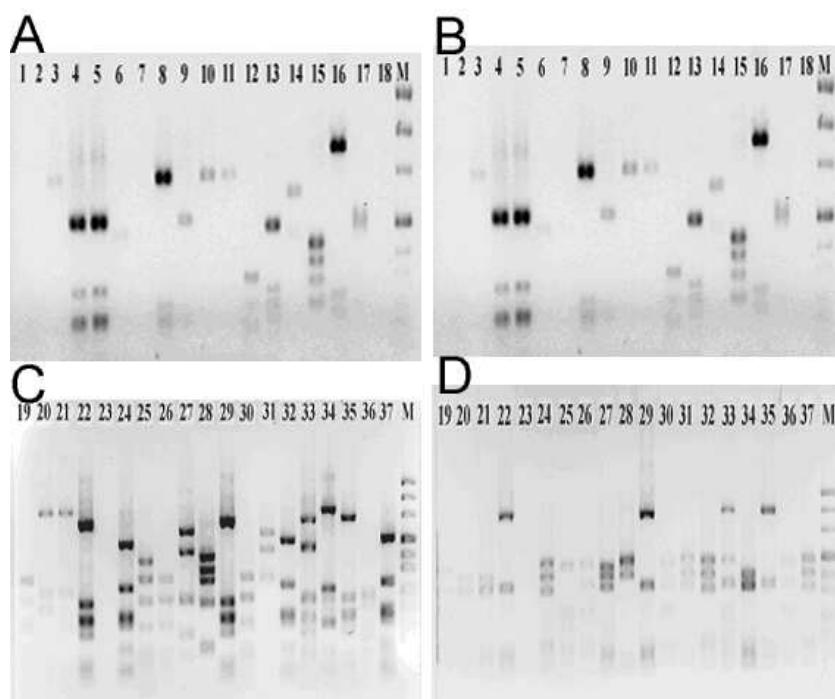
Első lépésként csíraszámbecslést végeztünk a vizsgált talajmintákból. Kétféle táptalajt alkalmaztunk, alaptáptalajt az összcsíraszám meghatározásához, míg a gázolajos dúsító táptalajt a gázolajbontó szervezetek csíraszámának meghatározásához. A kapott eredményeket a 4.1. táblázat foglalja össze.

Az adatokból látható, hogy a szennyezés hatására az összcsíraszám egy nagyságrendet csökkent az adott területen. A gázolajos dúsító lemezekén kapott csíraszám alapján a szennyezés egy adott TPH koncentráció felett szintén egy nagyságrenddel csökkentette a gázolajat bontani képes mikroorganizmusok mennyiségét. A gázolaj egyes alkotó elemei toxikusak lehetnek a mikroorganizmusokra (Sikkema et al. 1995), illetve a nagy mennyiségben jelenlevő hidrofób molekulák a talajvizen filmet alkotva megakadályozhatják az oxigén beoldódását, gátolva a mikrobák anyagcsere folyamatait (Atlas 1981). A gázolajos táptalajokról, telepmorfológiai különbségek alapján, összesen 45 darab különböző törzset izoláltunk.

4.1.2 Az I. területről izolált törzsek azonosítása

Az izolált szervezetek DNS-ének 16S rRNS génjének egy szakaszát 27f-1492r primerekkel szaporítottuk, majd a kapott PCR terméket két restrikciós enzimmal (*Bsu*RI és *Csp*6I) emésztettük. Az így kapott fragmentumokat agaróz gél-elektroforézis (ARDRA) segítségével szétválasztottuk (4.1. ábra), és a kapott mintázatok alapján a törzseket csoportosítottuk. Minden csoportból kiválasztottunk egy csoportreprezentánst, melynek bázissorrendjét meghatároztuk. A kapott szekvenciák alapján internetes adatbázis segítségével (RDP II.) meghatároztuk a törzseket, melyek minden esetben több, mint 99%-os hasonlóságot mutattak legalább egy, már tenyésztésbe vont szervezettel. A legközelebbi rokon szervezetek és az új törzsek szekvenciájából filogenetikai fát készítettünk (4.2. ábra).

4.1. A GÁZOLAJ BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE LABORATÓRIUMI KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT

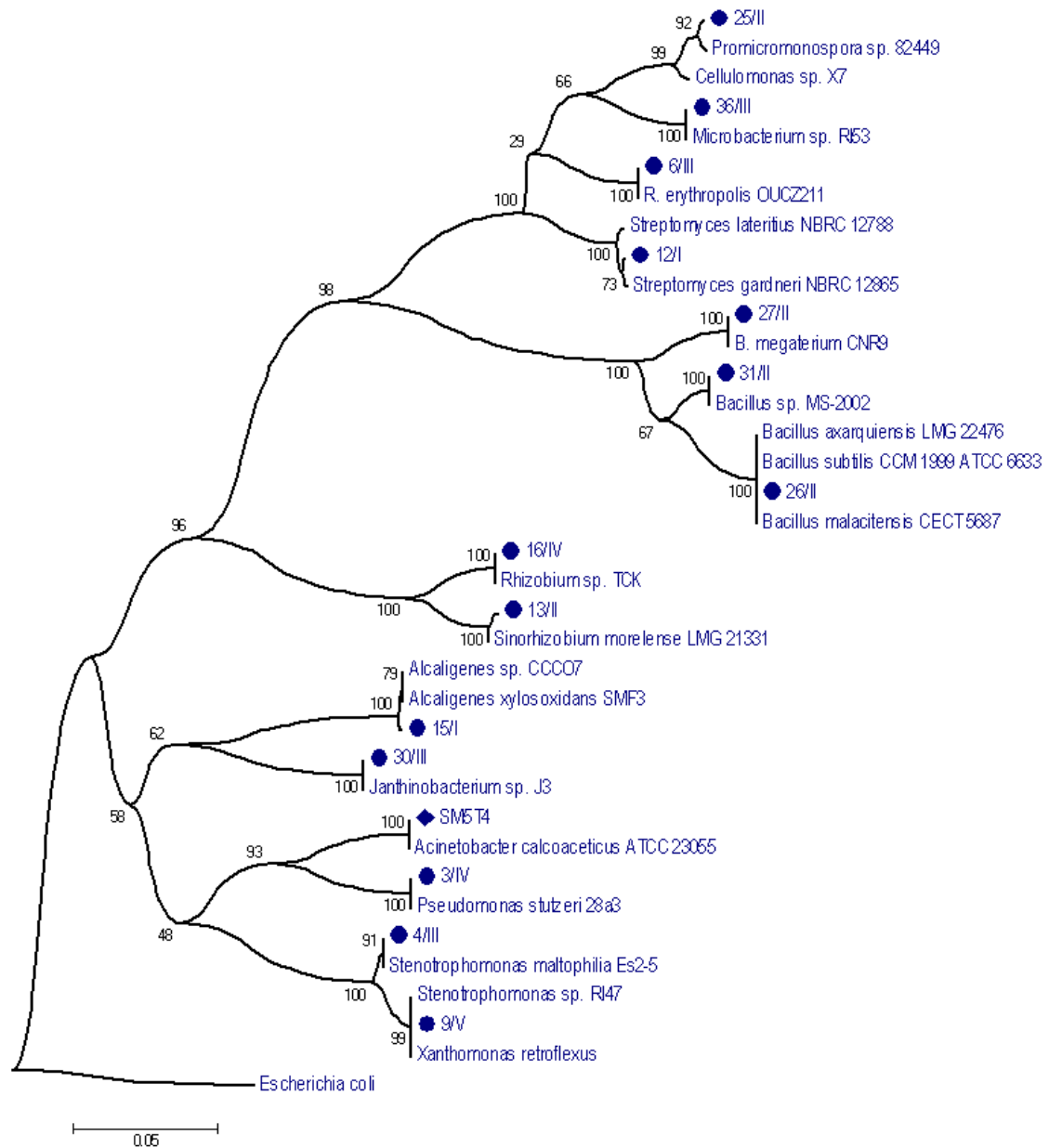


4.1. ábra. Az izolált és laboratóriumi körülmények között fenntartható 37 törzs 27f-1492r primerekkel felszaporított 16S rRNS génjének ARDRA mintázata. Az A és C ábrák a *Bsu*RI, a B és D ábrák a *Csp*6I restrikciós enzimekkel történt emésztéssel kapott mintázatot mutatják.

4.2. táblázat. A táblázatban a két enzimmel kapott mintázat alapján kialakított ARDRA csoportok találhatóak. A mindkét enzimmel azonos hasítási képet adó törzseket egy ARDRA csoportba soroltuk. A táblázatban vastagon szedve a később bázissorrend elemzéssel azonosított törzseket emeltük ki.

ARDRA csoportok	Az ARDRA csoportba tartozó törzsek
I.	3/IV , 8/V, 10/IV, 11/IV, 22/II, 29/V, 35/IV
II.	4/III , 9/V , 24/III, 32/III, 37/III
III.	6/III , 7/III, 18/III
IV.	55/III
V.	12/I
VI.	13/II
VII.	15/I , 28/IV
VIII.	16/IV , 20/IV, 21/IV
IX.	25/III
X.	26/II
XI.	27/II
XII.	30/III
XIII.	31/II
XIV.	33/IV
XV.	34/IV
XVI.	36/III

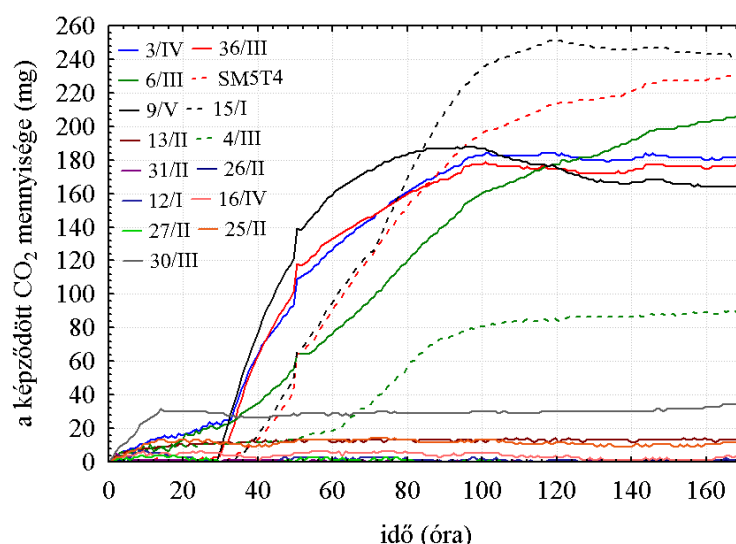
4.1. A GÁZOLAJ BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE LABORATÓRIUMI KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT



4.2. ábra. A izolált és azonosított törzsek elhelyezkedése a filogenetikai fán. A fa neighbor-joining módszerrel készült, részleges 16S rDNS szekvenciák alapján. Az egyes elágazásoknál a bootstrap értékeket (500 ismétlés) tüntettük fel.

4.1. A GÁZOLAJ BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE LABORATÓRIUMI KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT

4.1.3 A vizsgálatba bevont törzsek gázolajbontó képességének elemzése OxiTop rendszerben



4.3. ábra. A vizsgálatba vont 15 törzs gázolaj bontásából származó széndioxid termelése az idő függvényében

Az izolált és azonosított csoportrepresentáns törzsek esetében megvizsgáltuk a gázolajbontó képességüket is. Az OxiTop respirometrikus mérőrendszer segítségével zárt térben vizsgáltuk a mikrobák O_2 fogyasztását illetve a CO_2 -termelését. A mérés - a keletkezett CO_2 elnyelése folytán - az elfogyott O_2 miatt bekövetkezett nyomáscsökkenésre épül. A nyomáscsökkenésből a gáztörvények alapján következtethetünk a keletkezett CO_2 anyagmennyiségére, tömegére. A vizsgálatokat BHB táplevesben végeztük el 100 mg/l gázolajat adagolva szénforrásként.

A keletkezett CO_2 anyagmennyiségét a következő képlet alapján határoztuk meg:

$$m_{CO_2} = -(\Delta p \times V_g \times 10^{-4} / R \times T) \times 10^3 \times M$$

ahol:

m_{CO_2} a termelt széndioxid tömege (mg)

Δp a mért nyomáskülönbség (Pa)

V_g a gáztér térfogata (ml)

10^{-4} konverziós faktor Pa-ról hPa-ra, valamint m^3 -ről ml-re

10^3 konverziós faktor g-ról mg-ra

R egyetemes gázállandó; 8,314 J/(mol \times K)

T inkubálási hőmérséklet; 301 K

M a CO_2 molekulatömege 44,01 g/mol

Azt tapasztaltuk, hogy a 15/I (*Alcaligenes* sp.); az SM5T4 (*Acinetobacter calcoaceticus*); a 6/III (*Rhodococcus erythropolis*); a 3/IV (*Pseudomonas stutzeri*); a 36/III (*Microbacterium* sp.); a 9/V (*Xanthomonas* sp.) jól bontotta a gázolajat, míg a 4/III (*Stenotrophomonas maltophilia*) csak kis mértékben.

A különböző mikrobáknál eltérő hosszúságú lag fázist tapasztaltunk, azaz más és más időtartam kellett ahhoz, hogy alkalmazkodjanak az új környezethez és meginduljon a lebontás. Ez alapján három csoportot alakítottunk ki, az elsőbe tartozik a 3/IV (*Pseudomonas stutzeri*); a 36/III (*Microbacterium* sp.); a 9/V (*Xanthomonas* sp.); a következő csoportba tartoznak a 15/I (*Alcaligenes* sp.); az SM5T4 (*Acinetobacter calcoaceticus*) és a 6/III (*Rhodococcus erythropolis*), és a harmadik csoport egyetlen tagja a 4/III (*Stenotrophomonas maltophilia*).

A *Pseudomonas* jól ismert gázolaj bontásra képes nemzetség (Aislabie et al. 2000, Shim és Yang 1999, van Beilen et al. 1994, Van Hamme et al. 2003), de számos hivatkozást találni az *Acinetobacter* sp. (Song et al. 2000, Geissdorfer et al. 1999, Sakai et al. 1996) és a *Rhodococcus* sp. törzsek bontási képességéről is (Jung és Park 2004, Kim et al. 2002, Koike et al. 1999). Az *Alcaligenes* génuszba tartozó törzsek között szintén gyakoriak a gázolaj különböző komponenseit lebontani képes szervezetek (Greene et al. 2000, Johnson és Stanier 1971). Kimutatták már a *Microbacterium* génuszba tartozó törzsekről is, hogy képesek lehetnek a gázolaj egyes alkotórészeit szénforrásként hasznosítani (Jacques et al. 2007, Saul et al. 2005). A *Xanthomonas* génuszba tartozó törzsek nem a domináns gázolajbontó szervezetek közé tartoznak, de leírtak már dioxin illetve benzofurán hasznosító törzseket is (Ishiguro et al. 2000), az Antarktiszról pedig izoláltak szintén *Xanthomonas* törzset szennyezett területekről (Saul et al. 2005).

4.1.4 A vizsgálatba vont törzsek monoaromás vegyületek bontásának képessége

A gázolaj bontására képes törzsek az elemzett aromás vegyületek legalább egyikét szintén képesek voltak szénforrásként hasznosítani. A benzolt és a toluolt mindegyik hasznosította, a xilol izomerek keverékét a 15/I – *Alcaligenes* kivételével szintén képesek voltak bontani. Nagyobb eltéréseket tapasztaltunk a fenol, a ftálsav és a klórozott aromás vegyületek vizsgálatakor. A fenolt sem az előbb említett 15/I, sem a kevésbé általános aromás bontó 9/V – *Xanthomonas* és 4/III – *Stenotrophomonas* törzs nem volt képes hasznosítani. Hasonló eredmény kaptunk a ftálsav esetében is, azt csak a 15/I – *Alcaligenes* volt képes hasznosítani. Az összes klórozott aromás vegyületet csak a 6/III – *Rhodococcus*, az SM5T4 – *Acinetobacter* és a 36/III – *Microbacterium* volt képes hasznosítani (4.3. táblázat)

Szennyezett területekről sok esetben izoláltak már aromás törzseket bontó mikrobákat. *Alcaligenes* nemzetségbe tartozó törzs BTX bontó képességét mutatták ki Plaza és munkatársai (2007). A *Rhodococcus* nemzetség szintén közismert aromás vegyületeket bontani képes csoport, szinte minden szennyezett területen megtalálható (Jung és Park 2004, Táncsics et al. 2008). A széleskörű aromás gyűrű bontó aktivitással rendelkező *Acinetobacter* nemzetséget is gyakran írják le gázolajjal szennyezett mintákban (Margesin et al. 2003).

4.1.5 Az aromás gyűrűt hasító enzimek aktivitásának meghatározása

Az enzimaktivitás méréséhez két törzset, a *Rhodococcus erythropolis* 6/III-t és az *Acinetobacter calcoaceticus* SM5T4-t választottuk ki, amelyek megfelelő növekedést mutattak folyékony tápközegben. Referenciatörzsként a törzsgyűjteményből származó *Pseudomonas putida* DSM50202-t használtuk. Az enzimaktivitás mérések során elsősorban azt vizsgáltuk, hogy a benzol és a toluol hatására melyik anyagcsere útvonal aktiválódik, illetve, hogy melyik specifikus gyűrűhasító enzim expresszálódik és milyen mértékben. Mind a benzol, mind a toluol estében 168 órás inkubációs időt alkalmaztunk, majd ezt követően vizsgáltuk az enzimaktivitást (4.4. táblázat).

4.1. A GÁZOLAJ BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE LABORATÓRIUMI KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT

4.3. táblázat. Az izolált törzsek BTX bontásának eredményei (+: a törzs egyedüli szénforrásként képes volt hasznosítani az adott vegyületet; -: a törzs nem mutatott növekedést).

Törzs	benzol	toluol	xilolok	fenol	ftálsav	1,2-diklór benzol	1,3-diklór benzol	1,4-diklór benzol
6/III	+	+	+	+	+	+	+	+
SM5T4	+	+	+	+	+	+	+	+
16/IV	-	-	-	-	-	-	-	-
36/III	+	+	+	+	+	+	+	+
3/IV	+	+	+	+	+	-	-	-
26/II	-	-	-	-	-	-	-	-
27/II	-	-	-	-	-	-	-	-
31/II	-	-	-	-	-	-	-	-
4/III	+	+	+	-	-	+	+	+
25/II	-	-	-	-	-	-	-	-
12/I	-	-	-	-	-	-	-	-
9/V	+	+	+	-	-	-	-	-
13/II	-	-	-	-	-	-	+	-
15/I	+	+	-	-	+	+	-	-
30/III	-	+	-	-	-	-	-	-

4.4. táblázat. A C12O enzim aktivitása [nmol/(perc × mg)] a benzol illetve a toluol bontásakor

Törzs	benzol	toluol
<i>P. putida</i> DSM50202	430	108
<i>R. erythropolis</i> 6/III	225	87
<i>A. calcoaceticus</i> SM5T4	70	18

A benzollal történő indukció során, ahogy azt az irodalmi adatok alapján várni lehetett, csak az "orto" anyagcsere útvonal aktiválódott, tehát csak a C12O enzimek aktivitását lehetett detektálni. Az enzimaktivitásbeli sorrend a 168 órás inkubációs idejű vizsgálatoknál a következőnek adódott: *Pseudomonas putida* DSM50202 > *Rhodococcus erythropolis* 6/III > *Acinetobacter calcoaceticus* SM5T4. Ez az enzimaktivitásbeli sorrend jól megfeleltethető egy lebontási potenciál sorrendnek is, hiszen a benzol elsősorban C12O enzim segítségével juthat lebontásra, baktériumok esetében más anyagcsere útvonalak nem vesznek részt ebben a folyamatban.

Az irodalmi adatok alapján előzetesen arra lehetett számítani, hogy a toluollal történő inkubáció hatására a "meta" lebontási útvonal aktiválódik (Farhadian et al. 2007). Ezzel szemben mindhárom törzs esetében a C12O enzim aktivitását lehetett detektálni, tehát az "orto" lebontási útvonal

aktiválódott. Az enzimaktivitásbeli sorrend ugyanaz volt, mint amit a benzol lebontása során kaptunk, tehát: *Pseudomonas putida* DSM50202 > *Rhodococcus erythropolis* 6/III > *Acinetobacter calcoaceticus* SM5T4. Megfigyelhető azonban, hogy mindhárom törzsnél kisebb enzimaktivitást kaptunk a toluol lebontásakor, mint a benzolnál.

A kapott eredményeknek két fő oka lehet. Először is, a toluol lebontásában többféle enzim is szerepet játszhat. A toluol lebontásakor ugyanis olyan anyagszere utvonala aktiválódhatnak, amelyeknél nem dioxigenáz, hanem monooxygenáz enzimek játszanak főszerepet az aromás gyűrű hasításában. Ezen alternatív esetekben toluol-monooxygenáz enzimek, vagy alkán-hidroxiláz enzimek végzik a gyűrű lebontását (van Beilen et al. 1994). A második ok pedig az lehet, hogy a különböző aromás vegyületek eltérő mértékben oldódnak a vízben, ezért a mikrobákra kifejtett hatásuk is eltérő lehet. Minél jobban oldódik ugyanis egy aromás vegyület a vízben, annál könnyebben férnek hozzá a mikrobák. Ezért is próbálnak olyan anyagokat, például ciklodextrineket használni bioremediációs eljárások során, amelyek elősegítik ezen anyagok vízben való oldódását (Schwartz és Bar 1995).

4.1.6 A C12O enzim génjének kimutatása PCR segítségével

Kezdetben a Sei és munkatársai által tervezett, általuk univerzálisnak leírt primerpárral próbáltuk kimutatni a C12O gén jelenlétét azon törzseinkből, amelyeknél az enzimaktivitás vizsgálatok során a C12O enzim jelenlétét detektáltuk (1999). Ezen próbálkozásaink azonban sorra kudarcot vallottak, és csak a primer optimalizációhoz rendelt törzsgyűjteményből származó *Pseudomonas putida* DSM50202 törzsből tudtuk kimutatni a gént. Ugyanakkor a többi törzsből nem sikerült felszaporítani a kívánt génszakaszt.

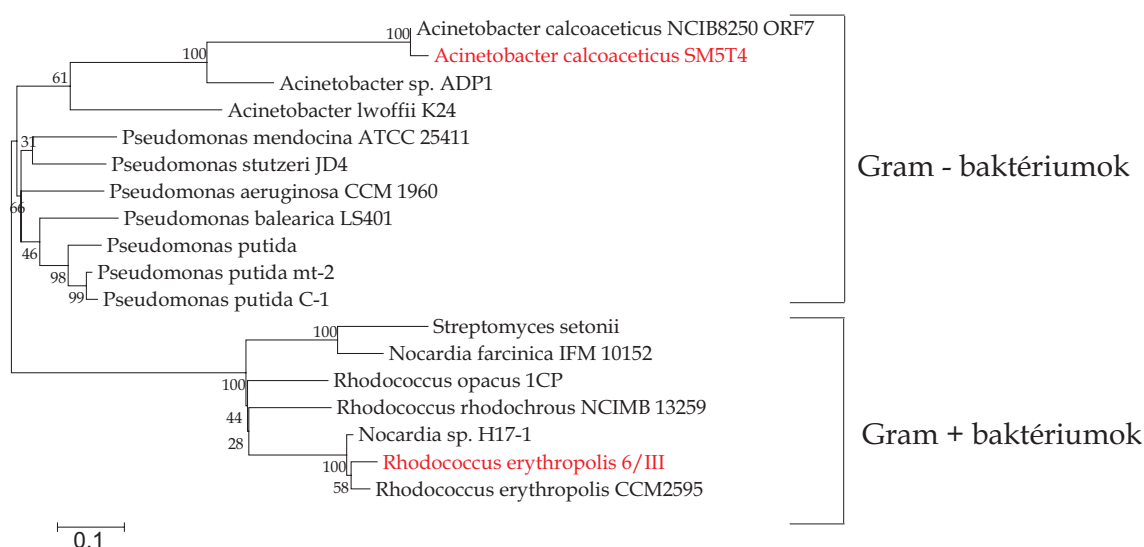
Felismerve a primer hiányosságait, az NCBI adatbázisából számos faj, ezen belül is elsősorban *Rhodococcus*, *Acinetobacter* és *Pseudomonas* törzsek C12O génjének szekvenciáját töltöttük le és hasonlítottuk össze. A szekvenciák illesztése után szembetűnő volt a gén nagyfokú diverzitása. Univerzális primer tervezésére alkalmas, minden faj C12O génjében meglévő, erősen konzervatív szekvencia szakaszt nem találtunk.

Ugyanakkor, a közeli rokon fajokat vizsgálva több olyan szekvencia szakaszt is találtunk, amelyek eléggé konzervatívnak bizonyultak ahhoz, hogy azokra primereket tervezzünk. A primertervezésnél elsősorban arra törekedtünk, hogy az általunk izolált törzsekből ki tudjuk mutatni a kívánt gént, ezért a csoportspecifikus primerek tervezésére helyeztük a hangsúlyt. Ennek megfelelően *Rhodococcus* és *Acinetobacter* fajokra specifikus primereket készítettünk. A *Rhodococcus* specifikus primerekhez a *R. erythropolis* CCM 2595 (AJ605581), a *R. rhodochrous* NCIMB 13259 (AF073741) és a *R. opacus* 1CP (X99622), míg az *Acinetobacter* specifikus primerekhez az *A. calcoaceticus* (Z36909), az *A. lwoffii* K24 (U77658.2) és az *Acinetobacter* sp ADP1 (CR543861) C12O szekvenciáit használtuk fel.

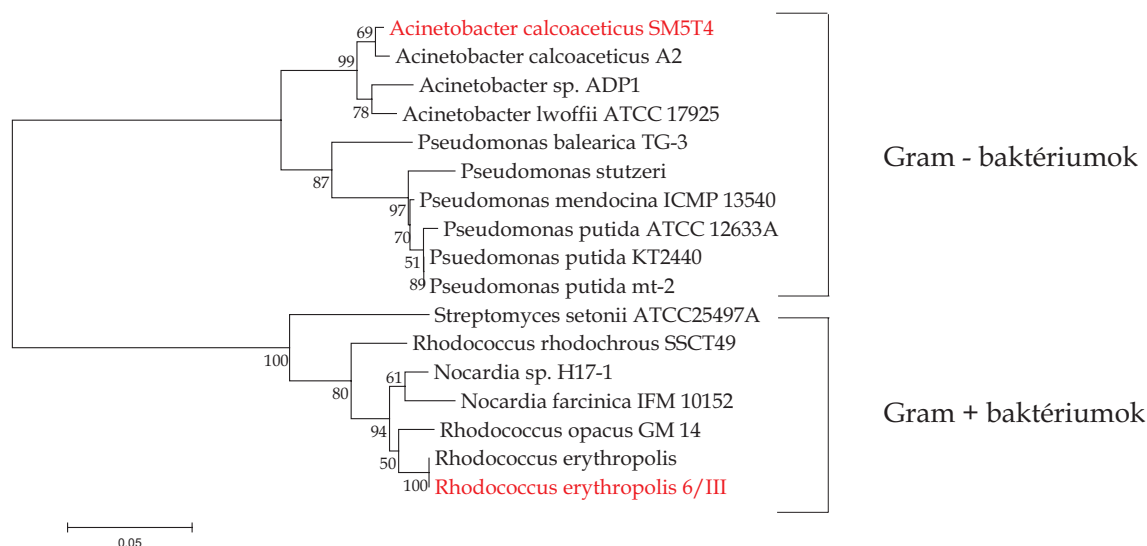
Mivel a *Rhodococcus*ok C12O szekvenciái több konzervatív szakaszt is tartalmaznak, lehetőségünk nyílt többféle primert tervezni és kipróbálni, így *Rhodococcus* specifikus reverse primerből kettő is készült, és ezek mindegyike kombinálható a forward primerrel. Az RHO_f az RHO_{rA} jelölésű reverse primerrel egy rövidebb, 220 bázispár hosszúságú szekvenciát ölel fel, míg az RHO_{rB}-vel egy hosszabb 550 bázispár hosszúságút. Sajnos az *Acinetobacter* fajok C12O szekvenciái már nem ilyen egységesek, ezért csak egy primerpárt terveztünk és próbáltunk ki.

Hogy a C12O enzim génjének diverzitását szemléltetni tudjuk, az általunk izolált törzsekből nyert, illetve a korábban GenBankból letöltött szekvenciák alapján törzsfát készítettünk.

4.1. A GÁZOLAJ BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE LABORATÓRIUMI KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT



4.4. ábra. Törzsfa a C12O katabolikus gén alapján. Piros színnel vannak kiemelve az általunk azonosított szekvenciák, míg a fekete színnel jelzett törzsek szekvenciái a GenBank adatbázisból származnak. A fa neighbor-joining módszerrel készült. Az egyes elágazásoknál a bootstrap értékeket (500 ismétlés) tüntettük fel.



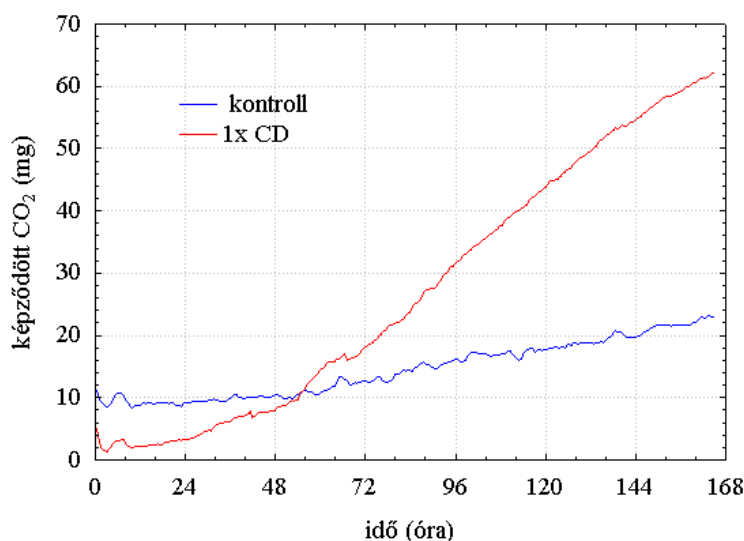
4.5. ábra. Törzsfa a 16S rRNS gén alapján. Piros színnel vannak kiemelve az általunk azonosított szekvenciák, míg a fekete színnel jelzett törzsek szekvenciái a GenBank adatbázisból származnak. A fa neighbor-joining módszerrel készült. Az egyes elágazásoknál a bootstrap értékeket (500 ismétlés) tüntettük fel.

A törzsfán (4.4. ábra) jól látszik, hogy a Gram pozitív és a Gram negatív mikrobák a katabolikus gén alapján élesen elkülönülnek egymástól. Ha ezt összevetjük ugyanezen fajok 16S rRNS génje alapján készült törzsfával (4.5. ábra), akkor megfigyelhetjük, hogy a Gram-festődés szerinti elkülönülés mellett a főbb csoportok elhelyezkedése is hasonló.

4.2 A szénhidrogének bontásának serkentése ciklodextrin adagolással

4.2.1 Az *Acinetobacter calcoaceticus* SM5T4 törzs gázolaj bontásának változása HPCD hatására

A vizsgálatok során azt elemeztük, hogy a tápveléshez adagolt HPCD milyen mértékben növeli a lebontott gázolaj mennyiségét. Ehhez első lépésként megvizsgáltuk milyen mértékben képes a HPCD szénforrásként hasznosulni, majd különböző arányok beállításával (1:1; 2:1; 3:1) meghatároztuk az ideális gázolaj-CD molarányt is.



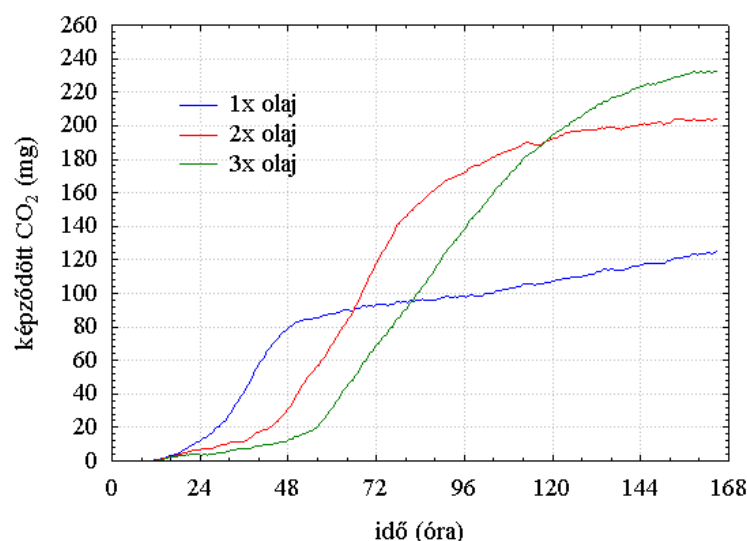
4.6. ábra. A HPCD szénforrásként történő hasznosulásának vizsgálata. A biotikus kontroll és a csak ciklodextrint tartalmazó mikrokozmoszokban tapasztalt CO₂ termelés az idő függvényében.

A HPCD szénforrásként történő hasznosulásának vizsgálatokor a BHB tápoldat más szénforrást nem tartalmazott. Biotikus negatív kontrollt is alkalmaztunk, ez esetben a tápvelésben semmilyen szénforrás nem volt. Az 4.6. ábrán megfigyelhető, hogy a szerves anyagot nem tartalmazó üvegekben is tapasztaltunk némi CO₂ termelést, illetve a HPCD, mint szénforrás lassan, kis mértékben hasznosult. A további elemzéseknél ezzel a "biotikus kontroll"-ként értelmezett eredménnyel korrigáltuk az összes további mérés eredményét.

Az adalékanyag hatásának vizsgálatát megelőzően meghatároztuk a törzs bontási képességeit mindhárom gázolaj koncentráció esetén. A háromszoros gázolaj mennyiséget (1200 mg/l) tartalmazó tápoldatban egy hét elteltével több CO₂ képződött (233 mg), mint az egyszeres, (400 mg/l) illetve a kétszeres (800 mg/l) gázolaj koncentráció esetén (125 illetve 204 mg). Ugyanakkor a számadatokból az is jól látható, hogy háromszoros gázolaj koncentráció nem eredményezett háromszoros CO₂-produkciót (4.7. ábra).

A görbe lefutásából következtetni lehet a bontás sebességére. Mind a három esetben 3 részre osztható a görbe, első szakaszként tapasztalható egy *lag* fázis, mely a különböző gázolaj koncentrációknál eltérő hosszúságú. A nagyobb koncentrációban adagolt gázolaj késleltette a lebontási folyamatok megindulását, azaz feltehetően gátló hatást váltott ki a mikroba számára. Az utána következő szakaszban a bontási sebesség nagyjából azonos, a görbék meredeksége ezen szaka-

4.2. A SZÉNHIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE CIKLODEXTRIN ADAGOLÁSSAL



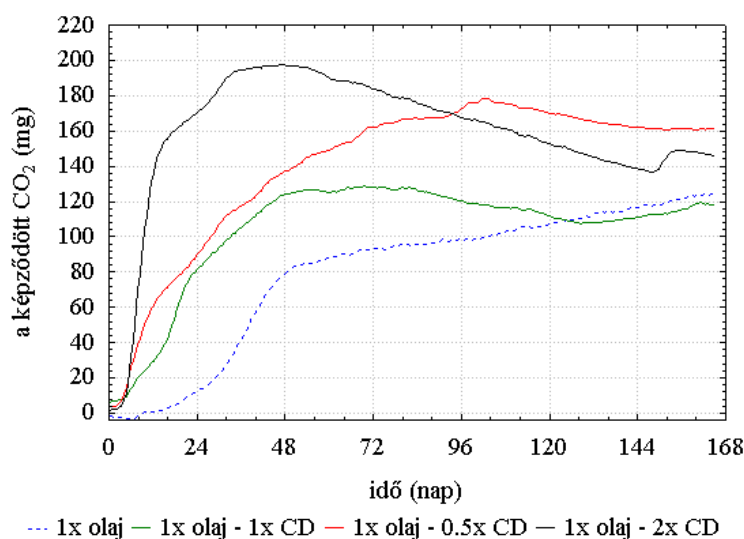
4.7. ábra. Az SM5T4 törzs gázolaj bontásából származó széndioxid mennyisége különböző koncentrációknál, az idő függvényében

szokban majdnem megegyezik. Ezután mind a három gázolaj koncentrációnál a bontási sebesség lassulását figyelhetjük meg. Az 1x-es és a 2x-es koncentrációknál ez a lassuló bontási sebesség a 48. illetve 96. órától figyelhető meg, de a 3x gázolaj koncentráció esetén is lassulás tapasztalható a 144. óránál. A kisebb bontási sebesség a mikroba számára hasznosítható és elérhető tápanyagok mennyiségének csökkenésére utal. A gázolaj különböző szénhidrogének keverékéből áll, melynek nem minden alkotórészét képes hasznosítani egy adott mikroba. A lag fázis hosszából viszont arra következtethetünk, hogy a gázolaj mérgező hatása a koncentráció mennyiségével nő, aminek oka lehet a toxikus hatású vegyületek mennyiségének a növekedése.

Ezt követően két kísérletsorozatot állítottunk fel. Az egyiknél állandó gázolaj koncentráció mellett vizsgáltunk különböző ciklodextrin koncentrációkat, míg a másik alkalommal az gázolaj-koncentrációt növeltük fokozatosan.

A 4.8. ábrán látható, hogy a ciklodextrin adagolás hatására minden esetben megnőtt a CO₂ produkció. Legkisebb mértékben az 1:1 molarány esetén, legnagyobb mértékben pedig a 1:2 molaránynál nőtt meg a szervesanyag hasznosítás. A grafikonon az is jól látható, hogy nemcsak a CO₂-produkció mennyisége változott meg, hanem a bontás sebességének az üteme is. Ahhoz, hogy meghatározhassuk, a CO₂-produkcióból mennyi származik az gázolaj komponenseinek bontásából, és mennyi a ciklodextrin bontásából, az eredeti adatsorokat a csak ciklodextrint tartalmazó mikrokozmosz kísérlet "biotikus kontroll" eredményével korrigáltuk.

Az 1:1 arányban alkalmazott ciklodextrin a lebontott gázolaj mennyiségére nem volt hatással, de megváltoztatta a bontás sebességét. A lag fázis jóval rövidebb ideig tartott, és utána egy nagyon intenzív bontási periódus következett. A 48. órára a lebontott gázolaj mennyisége elérte a maximumot, a továbbiakban nem változott. A korrigált adatokat ábrázoló görbén a 72. óra után tapasztalt csökkenés abból adódik, hogy ott már valószínűleg a ciklodextrin, mint szénforrás hasznosítása okozta a CO₂ produkciót. Az 1:0,5 illetve 1:2 arányban adagolt ciklodextrin mindkét esetben tovább növelte a kezdeti bontás sebességét, és a korrigált adatsorok alapján a lebontott gázolaj komponensek mennyiségét is. Ez a 1:0,5 arányban alkalmazott kezelés során a 96. órára



4.8. ábra. A különböző molarányban adagolt ciklodextrin hatása az SM5T4 törzs gázolaj bontására az idő függvényében (korrigált adatsor)

érte el a maximumot, és utána következett be a ciklodextrin szénforrásként történő hasznosítása, a 1:2 arány esetén ez a maximum már a 48. óránál tapasztalható volt, ami után nem történt jelentős CO₂-produkció.

Az adatsorban tapasztalható CO₂-produkció csökkenés (a biotikus kontroll figyelembe vétele mellett) a mérés elméleti hibájának következménye, a zárt rendszerben egyéb gázok termelése is történhetett, ami befolyásolta a nyomásváltozáson alapuló mérési eredményeket. Mivel a kísérletek sötétben, a nitrifikációs folyamatok gátlásával, aerob körülmények között történtek, ezért feltételezzük, hogy esetleg valamilyen volatilis anyagcseretermék halmozódott fel.

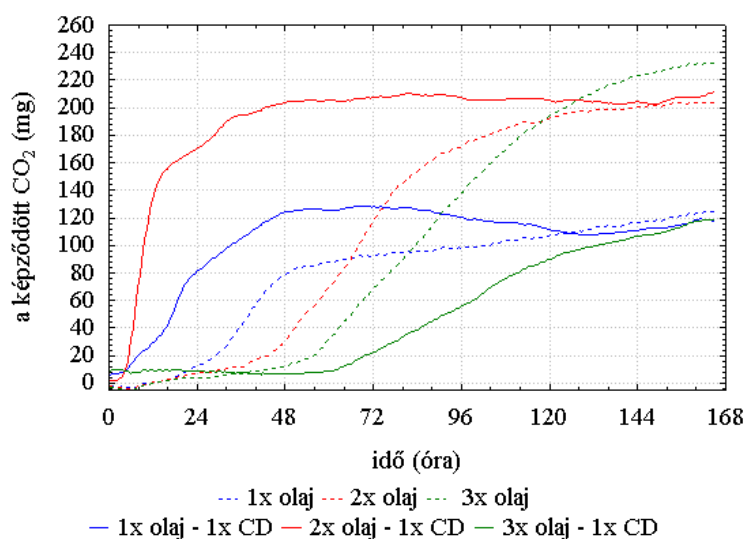
Az eredmények alapján a különböző ciklodextrin-koncentrációk alkalmazása esetén arra a következtetésre jutottunk, hogy 1:0,5 molarányban alkalmazott ciklodextrin serkentette a legjobban a lebontást.

Ezek után megvizsgáltuk a ciklodextrin hatását, de a különböző molarányok eléréséhez a gázolaj mennyiségét változtattuk (4.9. ábra). Az adott mennyiségű ciklodextrin más-más hatást váltott ki a különböző mennyiségű gázolaj bontására. A 3x gázolaj mennyiség esetén a *lag* fázis hosszabb lett, a CO₂-produkció pedig jelentősen csökkent. A másik két esetben a *lag* fázis megrövidült és egy intenzívebb bontási sebességet tapasztaltunk.

A korrigált adatsor alapján látható, a 3:1 arány alkalmazása esetén a gázolaj bontása minden szempontból csökkent. A *lag* periódus megnyúlt, a lebontott gázolaj mennyisége az 1x gázolaj – ciklodextrin nélküli bontás mennyiségére csökkent. Az 1:1 aránynál, mint már az előző kísérlet sorozatnál említettük, a *lag* fázis megrövidült, de a lebontott gázolaj mennyisége nem változott. Azonban ha megnézzük a 2:1 arányban alkalmazott ciklodextrin-kísérlet eredményét, jól látható, hogy mind a *lag* fázis rövidülése, mind a kezdeti bontási sebesség növekedése alapján jobb eredményeket értünk el, mint a ciklodextrin nélküli kísérleteinkben.

A 4.5. táblázatban összefoglaltuk, hogy a bemért gázolaj mennyiségének mekkora aránya alakult át CO₂-dá. A táblázatból egyértelműen kiderül, hogy a 3:1 arányban alkalmazott ciklodextrin gátolta a gázolaj lebontását, a 2:1 arányban történő alkalmazás a hatékonyságot nem növelte, vi-

4.2. A SZÉNHIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE CIKLODEXTRIN ADAGOLÁSSAL



4.9. ábra. Adott mennyiségű ciklodextrin hatása az SM5T4 szénhidrogén hasznosítására különböző gázolaj koncentrációknál az idő függvényében (korrigált adatsor)

4.5. táblázat. Az adagolt ciklodextrin hatékonysága (az ideális esetben – a bemért összes gázolaj teljes oxidációjakor – képződő széndioxid és a valóságban a képződött széndioxid mennyiségének aránya) a bemért gázolaj és az abból képződött széndioxid mennyisége alapján.

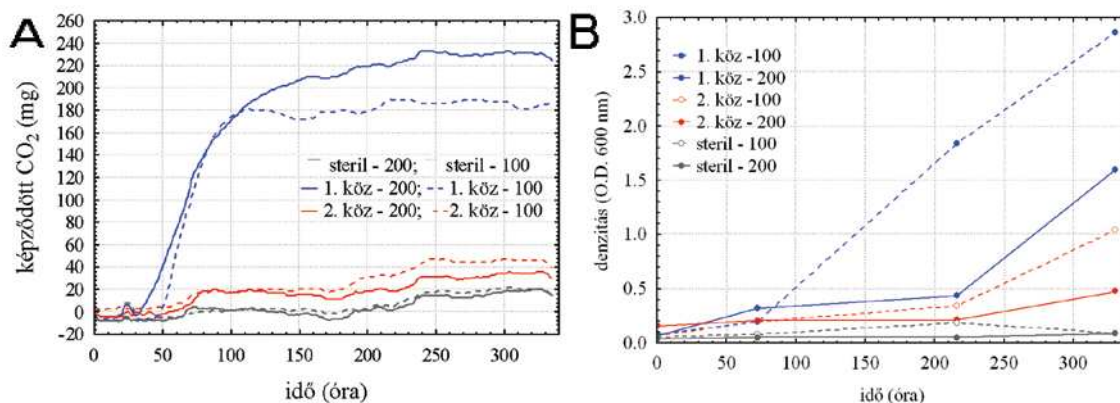
gázolaj: CD	képződött széndioxid	hatékonyság	sorrend
1:0	125,2	40%	5.
1:0,5	161,3	52%	3.
1:1	117,8	38%	4.
1:2	146,0	47%	2.
2:0	203,8	11%	6.
2:1	211,7	11%	1.
3:0	233,4	8%	7.
3:1	117,8	4%	8.

szont jelentősen megnövelte a bontás kezdeti sebességét. A legnagyobb hatékonyság-növelést az 1:0,5 illetve 1:2 arányú ciklodextrin alkalmazáskor érték el. Az 1x gázolaj koncentrációnál a sebesség növelésében is e két arány volt a legsikeresebb.

Összesítve a legnagyobb kezdeti bontási sebességet a 2:1; 1:2 illetve 1:0,5 arányoknál tapasztaltuk, igazán jelentős hatékonyság növelést pedig az 1x, azaz alacsony gázolaj koncentrációknál lehetett elérni.

4.2.2 Szennyezett területről származó közösség gázolaj bontásának serkentése HPCD-vel

4.2.2.1 A megfelelő közösség kiválasztása



4.10. ábra. A II. területről származó két közösség gázolaj bontó képességének vizsgálata. A: A közösségek CO₂ termelése a respiratorikus vizsgálatok alapján. B: A közösségek denzitásának változása az idő függvényében.

Két területről származó mikrobaközösség gázolaj bontó képességét vizsgáltuk. A respiratórikus vizsgálatokhoz szükséges csíraszám eléréséhez a területről hozott mintákat gázolajos táptalajban dúsítottuk. Elvégeztünk két kontrollmérést is, hogy a két általunk használt gázolaj koncentrációnál a gázolaj abiotikus bomlásából származó nyomásváltozást megismerjük. A kapott nyomásadatok alapján rajzolt grafikonon (4.10. ábra) jól elválnak az 1. számú közösség anyagcseréjét jellemző görbék mind az abiotikus kontrolltól, mind a 2. számú közösségtől. Ez azt jelenti, hogy míg a 2. számú közösség alig tudta hasznosítani a gázolajat egyedüli szénforrásként, addig az 1. számú közösség hatékonyan képes volt a gázolajat bontani. A grafikon tanúsága szerint a kezdeti lag fázis után a 1. számú közösség aktív anyagcserét folytatott. Az anyagcsere későbbi lassulása a szükséges tápanyagok (pl. oxigén, vagy gázolaj komponens) elfogyásával magyarázható.

A két minta közötti különbség a származási helyből adódhatott. Az 1. számú minta egy zárt, a környezeti hatásoknak kevésbé kitett térből származik. A 2. számú mintát egy jól átszellőzött helyről gyűjtöttük, amit ugyan a csapadéktól védett egy tető, de a benzinkút szétszerelése óta szabadon szellőzhetett – vagyis kisebb gázolaj koncentráció volt, de a terület rendszeresen kiszáradt.

További munkánkhoz a 1. számú közösséget választottuk ki.

4.2.2.2 Az 1. közösség jellemzése

A közösség szénforrás értékesítésének vizsgálata.

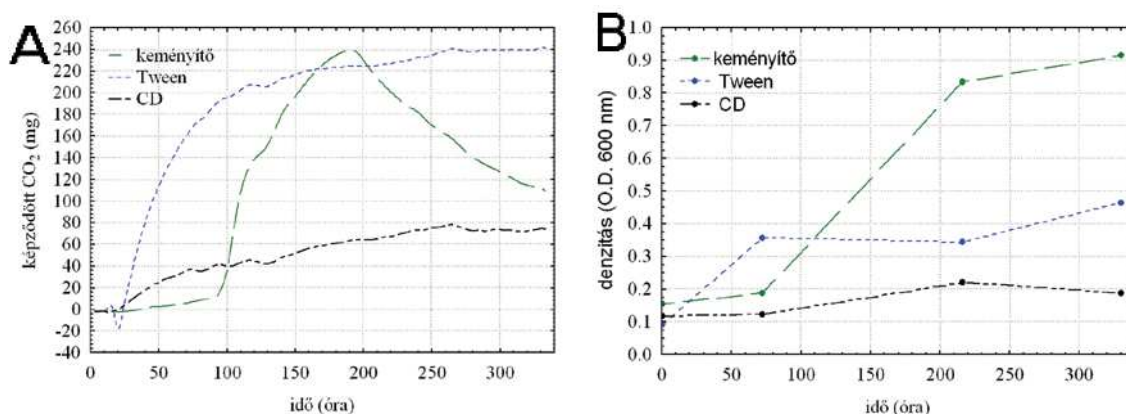
Megvizsgáltuk, hogy a közösség a BIOLOG GN2 95 különböző szénforrása közül hányat képes hasznosítani (4.11. ábra). A szénforrások közül 28 szénhidrát, 28 karbonsav, 20 aminosav, 5 polimer, 3 nukleozid, 3 alkohol, 3 cukorfoszfát, 5 pedig egyéb szénvegyület volt. A BIOLOG GN2 lemezeken vizsgált szénforrás hasznosítási eredményekből számunkra a legfontosabb az volt, hogy

4.2.2.3 A három adalékanyag hatásának összehasonlítása

A mérés célja az volt, hogy összevegyük a HPCD, a Tween 80 és a keményítő hatását a gázolaj biodegradációjára. A HPCD mellett a keményítő azért kapott helyet a kísérletekben, hogy megvizsgálhassuk, milyen hatással van a gázolaj biodegradációjára egy alternatív szénforrás jelenléte, főképpen mert a keményítő nagy molekulatömegű vegyület, ugyancsak glükóz alegységekkel, mint a β -ciklodextrin, de más térszerkezettel. A Tween 80 egy régóta alkalmazott felületaktív anyag, mely micellákat képezve növeli a szénhidrogének oldhatóságát.

A használt segédanyagok szénforrásként való hasznosulásának respirometrikus vizsgálata

Ezzel a méréssel arra kívántunk választ kapni, hogy az általunk az olaj degradációjának befolyásolására használni kívánt három anyag, a HPCD, a Tween 80 és a keményítő milyen mértékben hasznosulnak egyedüli szénforrásként az általunk létrehozott modellrendszerben.



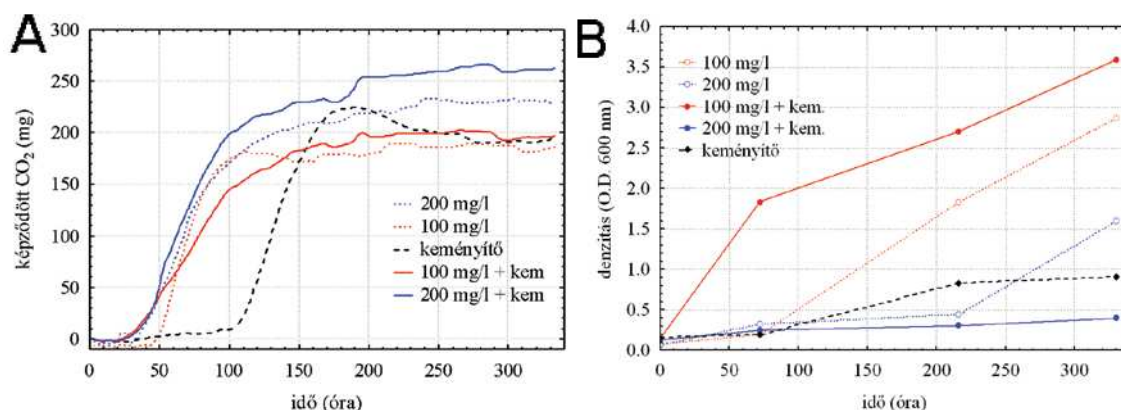
4.12. ábra. Az adalékanyagok bontása az 1. közösség esetén. A: a közösség CO₂ termelése a respirometrikus vizsgálatok alapján. B: a közösség denzitásváltozása.

A kapott adatok alapján rajzolt grafikonon (4.12. ábra) látható, hogy a keményítő emésztése csak hosszú *lag* fázis után indul meg, ám ekkor igen intenzíven. A mérés második felében (100. óra után) megfigyelhető nyomásnövekedést feltételezéseink szerint valamilyen volatilis anyagcse-retermék felhalmozódása okozta. A keményítő bontása jelentős biomassza-növekedést is eredményezett. A Tween 80 bontása rövid *lag* fázis után erőteljesen megindult majd fokozatosan lelassult, valószínűleg az elérhető oxigén csökkenése miatt. Ugyanakkor a 4.12/B. grafikonon látható, hogy a Tween kisebb biomassza-növekedést eredményezett, mint a keményítő. A HPCD a görbe tanúsága szerint a rendszerben lassan és csak kis mértékben hasznosult, sejtszám növekedést egyedüli szénforrásként nem eredményezett.

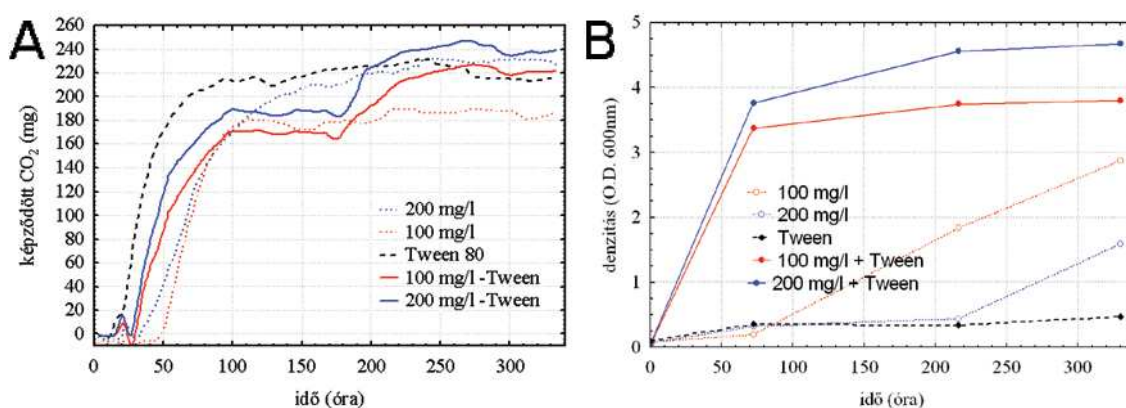
Kezelt gázolaj bontásának respirometrikus vizsgálata

Jelentős eltérés nem volt tapasztalható a kezeletlen és a kezelt adatok között, a kezelés hatására tapasztalt többlet széndioxid produkció a keményítő bontásából származhatott (4.13. ábra). Erre utalnak a denzitás adatok is, ahol a 100 mg/l-s koncentrációnál a keményítő hatására nagyobb mértékű sejtnövekedést tapasztaltunk, míg a 200 mg/l koncentrációnál az adagolt keményítő a biomassza produkció gátlását eredményezte.

4.2. A SZÉNHIIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE CIKLODEXTRIN ADAGOLÁSSAL



4.13. ábra. A keményítő hatása a gázolaj bontására. A: a közösség CO₂ termelése a respiratórikus vizsgálatok alapján. B: a közösség densitása.

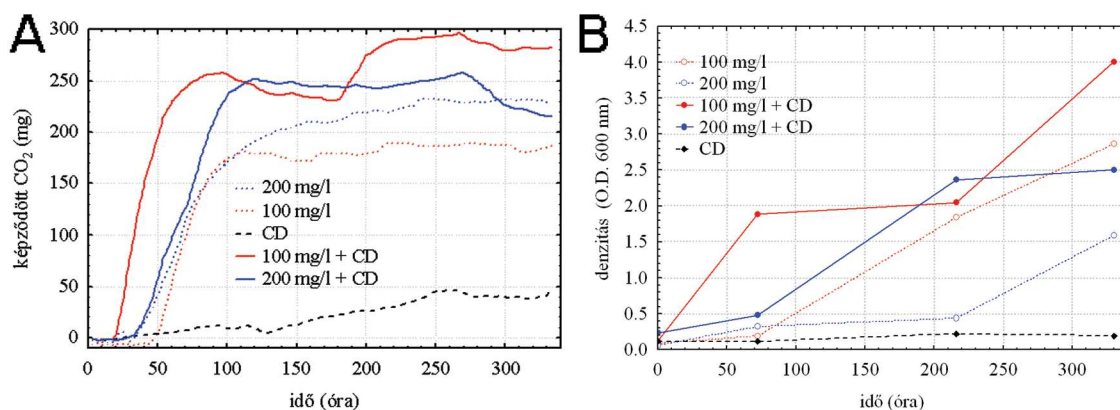


4.14. ábra. A Tween-80 hatása a gázolaj bontására. A: a közösség CO₂ termelése a respiratorikus vizsgálatok alapján. B: a közösség densitása.

A Tween 80 nagyon jó szénforrásnak bizonyult és nem képződött a kezelés hatására jelentős többlet széndioxid, ezért nem eldönthető, hogy milyen arányban bontotta az olajat, illetve a Tween 80-t a közösség (4.14. ábra). A biomassza densitás növekedéséből az látszik, hogy a gázolaj és a Tween 80 együttes keveréke kitűnő szénforrásnak bizonyult, és nagyon nagy biomassza produkciót eredményezett.

Az 4.15 grafikonon megfigyelhető, hogy a HPCD lerövidíti a lag fázist 100 mg/l koncentráció esetén és jóval nagyobb a széndioxid produkció is. Bár a nagyobb gázolaj koncentráció esetén is tapasztaltunk változást a kezeletlen mikrokozmoszokhoz képest, az nem olyan nagy mértékű, mint a 100 mg/l koncentráció esetén. Ennek oka lehet, hogy a bemért CD mennyiségét úgy állítottuk be, hogy ebben az esetben a gázolaj:CD arány 1:1 legyen.

A keményítő degradációjának respirometrikus mérése során megfigyelhető hosszú lag fázis magyarázata lehet, hogy valamelyik, a közösségben egyébként nem domináns törzs szaporodik el, ami képes a keményítőt hasznosítani. Másik lehetséges magyarázat, hogy az amilolitikus enzimek indukciójához szükséges a lag fázis, ennek azonban ellent mond, hogy a szakirodalmi adatok szerint a *Pseudomonas* törzsekre nem jellemző a nagy mennyiségű amilolitikus enzim termelése (Wang et al. 1998). A keményítővel kezelt gázolajos mintáknál ez a hosszú lag fázis nem jelenik



4.15. ábra. A CD hatása a gázolaj bontására. A: a közösség CO₂ termelése a respiratorikus vizsgálatok alapján. B: a közösség denzitása.

meg, ideje mindössze a tiszta gázolajos mintához hasonló hosszúságú. Feltételezhető ezért, hogy a keményítő, mint alternatív szénforrás nem hasznosul, mindössze a gázolaj degradációja folyik a rendszerben. A görbék lefutása nem utal arra sem, hogy a keményítő jelenléte egyéb módon befolyásolná a gázolaj lebontását.

A Tween 80-al kezelt gázolaj lebontásából kapott adatok alapján megrajzolt görbék lefutása megegyezik a tiszta Tween 80-at tartalmazó minta görbéjével. Ezt azzal magyarázzuk, hogy a Tween 80 elsődleges szénforrásként hasznosult, így a gázolaj lebontását nem segítette.

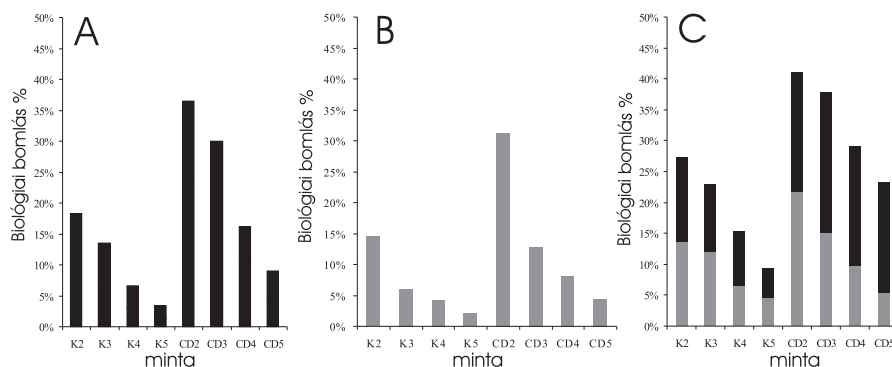
A HPCD-vel kezelt gázolajat tartalmazó mintáknál megfigyelhető, hogy a *lag* fázis lerövidült a csak gázolajat tartalmazó mintákhoz képest, a görbék lefutása meredekebb és nagyobb a széndioxid produkció a kezeletlen gázolajat tartalmazó mintákhoz viszonyítva. Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy a HPCD ténylegesen fokozza a gázolaj biodegradációját az általunk vizsgált modellrendszerben, miközben a csak HPCD-t tartalmazó minta azt mutatja, hogy a HPCD bontására szintén képes a kísérletben használt közösség. Ugyanakkor a HPCD degradációjának sebessége elegendően kicsi ahhoz, hogy ne szolgáljon elsődleges szénforrásként a gázolajjal szemben, és jelen legyen a rendszerben, amíg a gázolaj degradációja folyik.

Sok ciklodextrin típus képes a biodegradáció serkentésére, mind a PAH-k, mind a poliklórozott bifenilek (Fava et al. 2002, Wang et al. 1998) esetében is. A RAMEB-nél leírták, hogy a biológiai elérhetőségének növelésével serkentette a transzformátor olaj detoxifikációját és a PCB-k lebontását is (Molnár et al. 2005, Fava 2002). Brusseau és munkatársai szerint a HPCD 0,01 g/l-s koncentráció (μmol nagyságrend) felett már növeli a talajból történő kimosás hatékonyságát, elsősorban az alacsony vízdékonyságú vegyületeknél. Fenantrén transzport vizsgálatokkor, homokos talajban 2 g/l koncentrációban alkalmazott Triton, nem-ionos felületaktív anyag a retardációs faktort hasonló mértékben változtatta meg, mint a HPCD, de a Triton jelentős mértékben kitapadt a talajszemcsékhez, míg a HPCD nem (Brusseau et al. 1994).

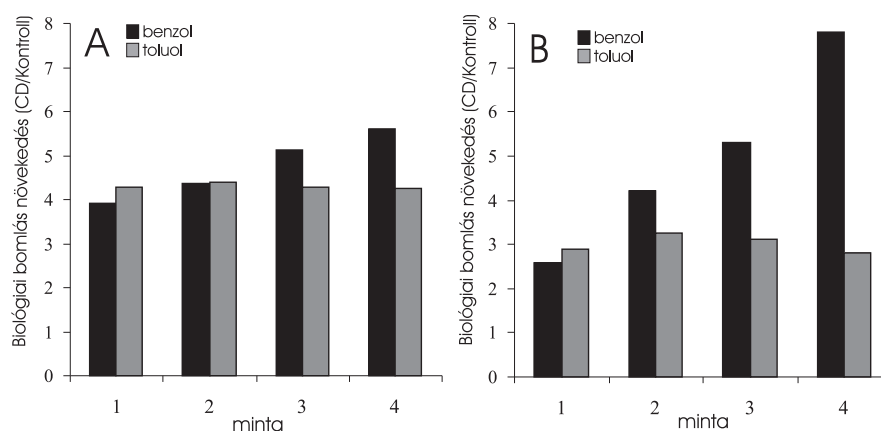
Vagyis, a HPCD képes a gázolaj-szennyezés biológiai bontásának serkentésére, vízdékonysága miatt nem tapad ki a talajszemcsékhez. Bár biológiailag bontható, annak sebessége jóval lassabb, mint az gázolaj könnyen bontható alkotóinál tapasztalható volt.

4.2. A SZÉNHIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE CIKLODEXTRIN ADAGOLÁSSAL

4.2.3 Az *Acinetobacter calcoaceticus* SM5T4 törzs BTX bontó képességének vizsgálata HPCD hatására



4.16. ábra. A CD hatása a benzol és a toluol bontására. **A:** a bemért benzol biológiailag lebomlott mennyisége százalékban kifejezve; **B:** a bemért toluol biológiailag lebomlott mennyisége százalékban kifejezve; **C:** a bemért benzol:toluol 1:1 arányú keverékének biológiailag lebomlott mennyisége százalékban kifejezve.



4.17. ábra. A CD hatása a benzol és a toluol 1:1 arányú keverékének bontására **A:** a CD bontás-növelő hatékonysága a benzol és a toluol esetében, egyedüli szénforrás esetén; **B:** a CD bontás-növelő hatékonysága a benzol és a toluol 1:1 arányú keverékének esetén.

A korábban, szénhidrogénnel szennyezett területről izolált *Acinetobacter calcoaceticus* SM5T4 törzsnél vizsgáltuk, milyen mértékben hat a HPCD a BTEX vegyületek lebontására. A vizsgálatokat szeptummal zárt üvegekben végeztük, megakadályozva a BTEX vegyületek elpárolgását. A kontroll (K) mikrokozmoszokhoz nem adagoltunk ciklodextrint, egyébként mindenben megegyeztek a kezelt mikrokozmoszokkal. Minden vizsgálat során mind a két (K, CD) mikrokozmosz típusnál felállítottunk abiotikus kontroll mikrokozmoszokat is, melyeket nem oltottunk be a mikrobával. A biodegradáció mértékére a BTEX vegyületek mennyiségének gázkromatográfiával történő rendszeres meghatározásából következtettünk. A biológiai lebomlás mértékét úgy határoztuk meg, hogy a mikrokozmoszokban tapasztalt aromás vegyület fogyását korrigáltuk az abiotikus kontroll mikrokozmoszokban tapasztalt koncentráció csökkenéssel.

A 4.16. grafikonokon jól látható, hogy a ciklodextrin adagolás hatására minden esetben nőtt a biológiailag lebomlott szénforrások mennyisége. A mikroorganizmusok csak a vizes fázisból tudják a benzolt felvenni (Prenafeta-Boldu et al. 2002), ezért az oldhatóság a bontást korlátozó tényező lehet. Amikor HPCD-t adtunk a tápoldathoz, akkor a benzol látszólagos oldhatósága megnőtt, mert zárványkomplex képződött a HPCD molekulákkal. A zárványkomplexbe zárt aromás vegyület nem alkot önálló nem-vizes fázist, és a fizikai-kémiai törvények alapján egyensúly alakul ki a vízben oldott és a zárványkomplexbe vitt aromás vegyületek mennyisége között. A benzol a vizes fázis, a gőztér és a vízben nem oldott fázis között a természet törvényei alapján adott mértékben oszlik meg (Szejtli 1988).

Ha növeljük a benzol mennyiségét, akkor a vízben oldott fázis nem arányosan növekszik. Adott mennyiségű ciklodextrin nem tud bizonyos mennyiség feletti benzollal zárványkomplexet képezni, ezért az egyre növekvő benzol koncentráció a HPCD-nel kezelt mikrokozmoszok esetében is csökkenő hatásfokot eredményezett.

Ugyanezt a tendenciát tapasztaltuk a toluol esetében is, azzal a különbséggel, hogy a toluolnak még a benzolnál is jóval kisebb a vízben való oldhatósága, ezért a ciklodextrin hatékonysága sem volt olyan jelentős.

Amikor a kétféle aromás vegyületnek a keverékét adagoltuk szénforrásként, akkor megfigyelhető volt, hogy ugyanolyan végkoncentrációnál a biológiailag lebomlott szennyezőanyagok aránya megnövekedett a csak toluolt vagy csak benzolt tartalmazó mikrokozmoszokhoz viszonyítva. A kezelés hatására a tendencia nem változott, a HPCD megnövelte a biológiailag lebomlott szénhidrogének arányát, de a nagy koncentrációk esetén ez a hatás nem volt olyan jelentős, mint kis koncentrációknál.

A 4.17. ábrán látható, hogy a CD-nel hogyan változott a hatékonyság az egyes szennyezőanyag koncentrációknál. A toluol, mint egyedüli szénforrás, a CD minden egyes koncentrációjánál azonos mértékben növelte meg a lebontást a kezeletlen mintákhoz képest. A mikroba a kontroll mintákkal összehasonlítva négyszer annyit toluolt volt képes lebontani a CD segítségével. Ezzel ellentétben a benzol, mint egyedüli szénforrásnál ez az arány lassan, de fokozatosan növekedett az aromás vegyület koncentrációjának növekedésével ($4x \rightarrow 5x$).

A kevert szubsztrátot tartalmazó mikrokozmoszokban a lebomlott benzol mennyiségének az aránya nagyobb mértékben növekedett, mint amikor csak benzol volt a szénforrás ($4x \rightarrow 8x$), ugyanakkor a lebomlott toluol aránya csökkent ($4x \rightarrow 3x$). A vegyület alacsony vízdékonysága miatt a növekvő indulási koncentráció csökkenő arányú biológiai lebomláshoz vezetett.

Wen-Lu és munkatársai (1999) hasonló eredményeket kaptak, mikor különböző szubsztituált benzolok *Photobacterium phosphoreum*-ra gyakorolt hatását vizsgálták. Megállapították, hogy a kis polaritású vegyületeknél a β -CD jobban kifejtette hatását, mint a polárosabb anyagoknál. A toxicitás mértéke arányos volt a vegyületek oktanol/víz koefficiensével.

A HPCD molekulák szelektíven választják el az aromás molekulákat más, lipofil szénhidrogének keverékéből is. Uemasu és munkatársai (2004). megállapították, hogy a 3-metilpentán, hexán, benzol és ciklohexán egyenlő arányú keverékéből a HPCD-t tartalmazó vizes fázisban dúsult a benzol (az összes szénhidrogén 58,9 n/n%-a) és a ciklohexán (34,2 n/n%). Ugyancsak megállapították, hogy HPCD-vel a reformált olajból szelektíven ($4,9\% \rightarrow 2,9\%$ -ra) csökkent az extrahálható benzol mennyisége, a toluol esetében a csökkenés nem volt ilyen mértékű.

4.3 A halogénezett szénhidrogének bontásának serkentése mikrokozmosz kísérletekben

A klórozott alifás szénhidrogének anaerob körülmények között, energiaszerző anyagcsereutakon történő hasznosításuk során elektronakzeptorként szerepelhetnek. Ehhez azonban megfelelő mennyiségű elektrondonorra van szükségük. A megfelelő elektrondonor pótlással serkenteni lehet a lebontás sebességét. A serkentett lebontás során az adalékanyagok azonban szénforrásként szolgálhatnak más mikrobák számára is, amelyek a területen fellelhető egyéb elektronakceptorokat hasznosítják. Az ideális adalékanyag a deklorináló szervezeteket a lehető legcélzottabban serkenti, speciálisan az ő populációjukat támogatja.

4.3.1 A dehalorespiráló szervezetek molekuláris módszerrel történő kimutatásának optimalizálása

A keresett szervezetek 16S rRNS génjének szekvenciáit letöltöttük az NCBI GeneBank adatbázisából (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), és az irodalmi adatok alapján választott primer szekvenciákat illesztettük rájuk. Ahol a specificitás az RDP II alapján nem volt megfelelő, ott a primer szekvenciáján módosítottunk, majd az eredményt ellenőriztük az adatbázis segítségével (4.6 és 4.7. táblázat).

4.6. táblázat. Az RDP II adatbázisban az 1200 bázispárnál hosszabb, "jó" minősítésű szekvenciák közül hány szekvencia illeszkedett a *Dehalobacter restrictus* specifikus (DR) és *Desulfuromonas chloroethenica* specifikus (DCE) primerekhez (0 és 3 hibás bázispárosodást engedve)

primer jele	DR-F	DR-R	DCE-F	DCE-R
tökéletes illeszkedés	14/151538	18/126415	6/151538	5/155445
3 hibás bázispárosodás	84/151538	46/126415	64/151538	104/155445

4.7. táblázat. Az RDP II adatbázisban az 1200 bázispárnál hosszabb, "jó" minősítésű szekvenciák közül hány szekvencia illeszkedett a *Dehalococcoides* sp. specifikus DHC1 és DHC2 primerekhez (0 és 3 hibás bázispárosodást engedve)

primer jele	DHC1	DHC1377	DHC774	DHC1212
tökéletes illeszkedés	55/58938	21/62924	162/15604	37/155445
3 hibás bázispárosodás	32214/58938	143/62924	985/15604	185/155445

A primerek tervezése után a típusörzsekből DNS-t izoláltunk, és a DNS-ből készített hígítási sor segítségével meghatároztuk a specifikus primerekkel végzett PCR során a kimutatási határértékeket (4.8. táblázat). Legbiztosabban a *Dehalococcoides* sp. szervezeteket tudtuk kimutatni nested PCR segítségével, és a *Dehalobacter restrictus* 16S rRNS génjének kópiáit is detektáltuk már 10^3 -os nagyságrendtől.

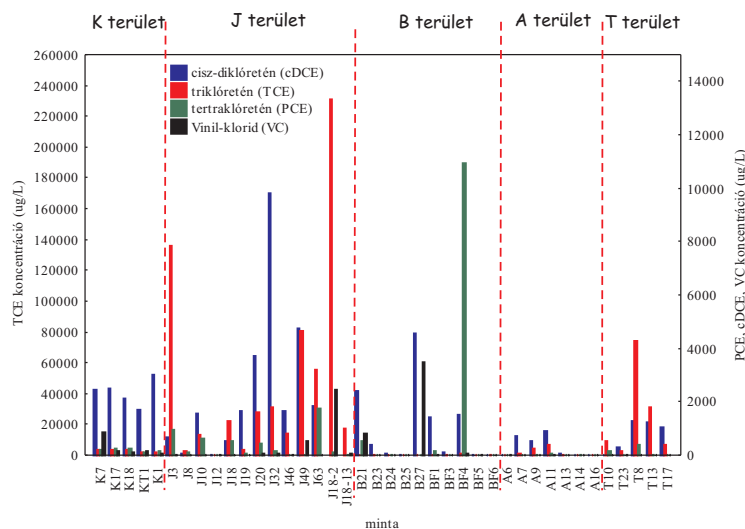
4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN

4.8. táblázat. Az egyes primerpárok kimutatási határértékei. DHC: *Dehalococcoides* sp.; DR: *Dehalobacter restrictus*; DCE: *Desulfuromonas chloroethenica*

DHC1 - DHC1377	$9,3 \times 10^5$
DHC774 - DHC1212	$7,4 \times 10^3$
DHC774 - DHC1212 nested PCR-ként	$9,3 \times 10^1$
DCE-F - DCE-R	$9,4 \times 10^5$
DR-F - DR-R	$1,6 \times 10^3$

4.3.2 A különböző területekről származó minták összehasonlítása

4.3.2.1 Kémiai paraméterek

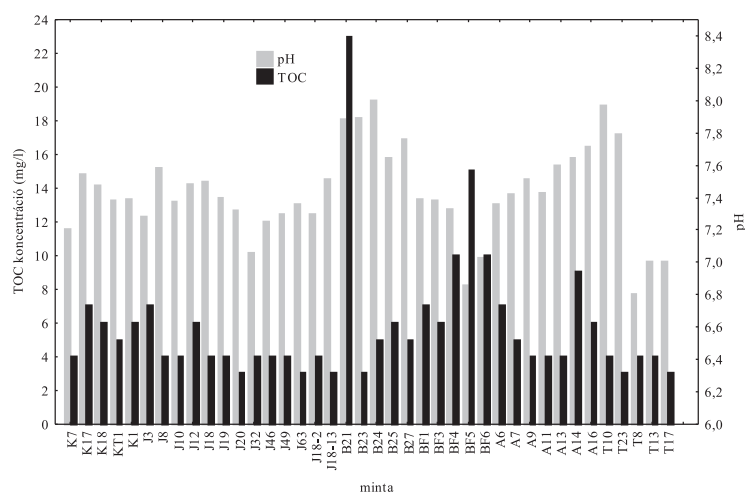


4.18. ábra. A különböző területekről származó talajvíz minták szennyezettségi adatai

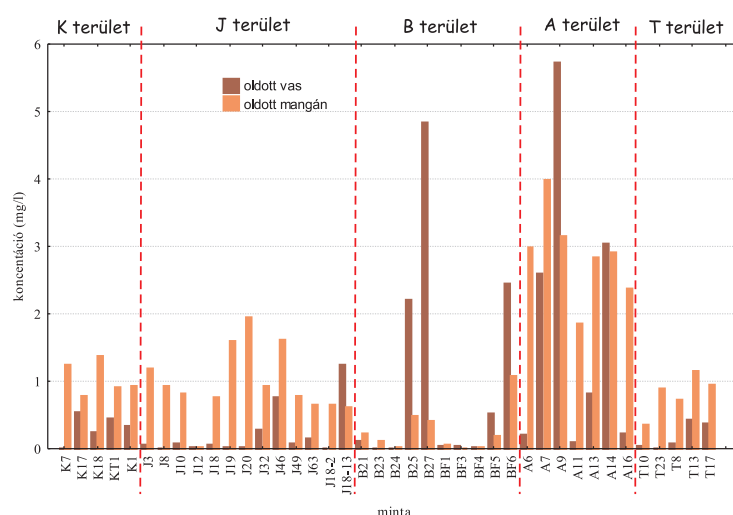
A vizsgálati területek helyszínét a terület tulajdonosára tekintettel nem áll módunkban nyilvánosságra hozni ezért csak a kémiai adatokat tudjuk a dolgozatban részletesen elemezni. A szennyezett területeken évek óta folyik fizikai kármentesítés, vagy a közelmúltban döntöttek a terület kármentesítésének megkezdéséről. Minden mintánk már kiépített kutakból származik, a szennyező csóva különböző pontjairól. A területeken semmilyen más biológiai, vagy kémiai beavatkozás nem történt.

Az általunk vizsgált öt terület szennyezettsége jelentősen eltért. Három terület (a *J*, a *B* és a *T* egyes kútjai) erősen szennyezett volt, míg a másik kettő (*K* és a *A*) kisebb koncentrációban tartalmazta a szennyező halogénezett szénhidrogéneket. Az egyes területeken más-más anyag a fő szennyező, a *K* területen a cDCE, a *J* és a *T* területeken a TCE, míg a *B* területen a PCE (4.18. ábra). A pH-ban és a TOC értékekben nem tapasztaltunk jelentős különbségeket, a talajvíz minták döntő többségének a kémhatása a semleges tartományban volt (4.19. ábra). A teljes oldható szerves anyag mennyisége mindenütt igen kicsi, a *B* területen kicsit nagyobb a többinél. Az oldott vas és oldott mangán tartalmában már jelentősebb különbségeket tapasztaltunk, nagy az oldott vas tartalma az *A* területnek, illetve a *B* terület egyes kútjainak (4.20. ábra). Jelentősebb nitrát- és

4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHIIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN



4.19. ábra. A különböző területekről származó talajvíz minták pH értéke és összes szerves anyag tartalma (TOC)

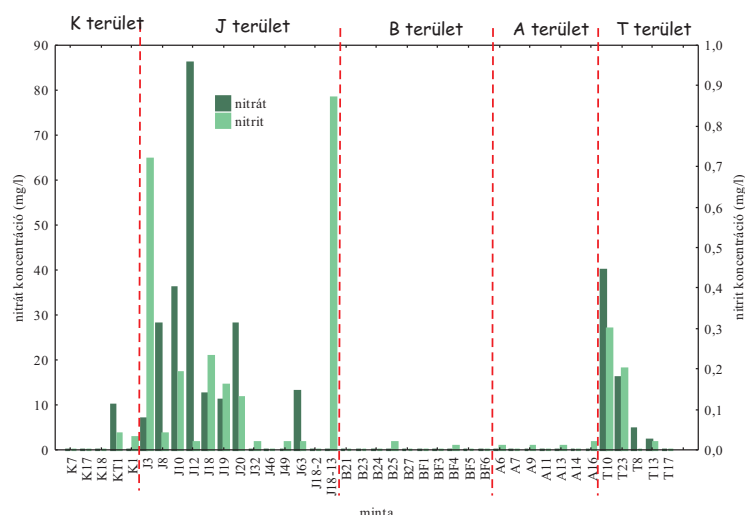


4.20. ábra. A különböző területekről származó talajvíz minták oldott vas és oldott mangán tartalma

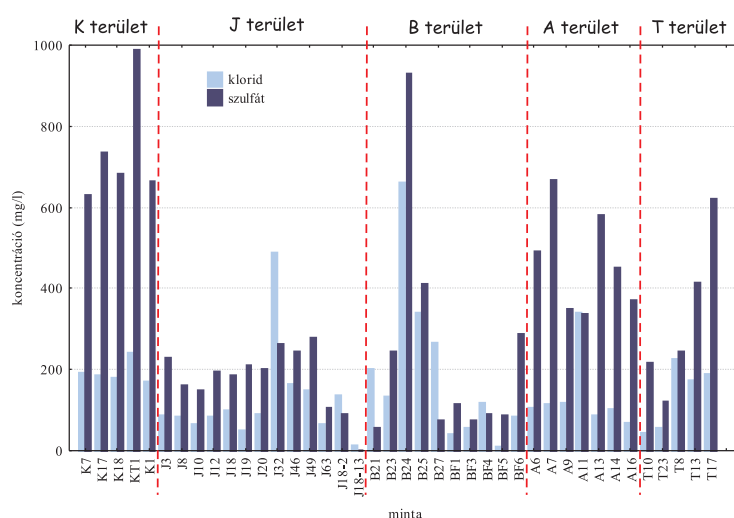
nitrit tartalom csak a *J* és a *T* területeken volt (4.21. ábra), viszont a szulfátionok mennyisége egy területen belül is jelentősen változó volt. A legnagyobb szulfátion tartalma a *K* területen lévő kutaknak volt, a legkisebb értéket a *J* terület kútjai esetén mértek (4.22. ábra).

A főkomponens elemzés alapján (4.23. ábra) az első komponens majdnem 20%-ban, a második komponens 18%-ban határozza meg a minták varianciáját. Egy kút nagyon elkülönül a többtől, a B27, ebből a kútból sikerült egyedül etánt és etént kimutatni. A többi kút jóval közelebb helyezkedik el egymáshoz, azaz a kémiai paraméterek alapján jóval hasonlóbbak. Az elemzésből az is látható, hogy a három nagyobb csoportban helyezkednek az egyes mért paraméterek. Egy jól elhatárolható csoportot határoz meg a VC, az etán és az etén, mely elsősorban az említett B27-s kút nagy koncentráció értékei miatt válhatott el. A másik két csoportban viszont érdekes összefüggések találhatók. A szennyezőanyagok magas koncentrációja együtt tapasztalható a nitrát és a nitrit viszonylag magasabb koncentrációival. Ezzel ellentétben, ahol a szennyezés nem volt jelentősen

4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHIIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN



4.21. ábra. A különböző területekről származó talajvíz minták nitrát és nitrit tartalma



4.22. ábra. A különböző területekről származó talajvíz minták klorid és szulfát tartalma

magas, ott a meghatározó kémiai paraméter a szulfát az oldható mangán és a klorid ionok voltak. A vas kicsit csoporton kívüli elhelyezkedése arra utal, hogy a nagy oldható vas koncentráció elsősorban a bomlástermékek megjelenésével együtt volt tapasztalható.

Az egyes minták elhelyezkedése a grafikonon arra utal, hogy az A és a K terület, viszonylag kis szennyeződésű és magas szulfát illetve oldható mangán koncentrációval rendelkezik, és a területekről származó kutak egy homogén mintasort alkotnak. Ugyanez a homogenitás mondható el a J területről is, csak pont az ellentétes oldalon, azaz nagy szennyezőanyag koncentráció és nitrát koncentráció mellett kis szulfát, mangán és vas koncentráció figyelhető meg. Ezzel ellentétben a B és a T terület kútjainak egyes mintái jelentősen eltérnek egymástól, vannak erősen és kevésbé szennyezett kutak.

4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN

4.9. táblázat. A minták dehalorespiráló szervezet tartalmának PCR alapú kimutatási eredménye (DHC: *Dehalococcoides* sp.; DR: *Dehalobacter restrictus*; DCE: *Desulfuromonas chloroethenica*; +: a PCR reakció pozitív; -: a PCR reakció negatív; 0: a PCR reakció eredménye nem eldönthető)

minta	DHC1	DHC2	DR	DCE	minta	DHC1	DHC2	DR	DCE
K7	+	+	-	-	B24	+	+	0	+
K17	-	-	-	+	B25	+	+	0	+
K18	-	-	-	-	B27	+	+	0	+
KT1	+	+	-	-	BF1	+	+	0	+
K1	+	+	-	+	BF3	+	+	0	-
J3	+	+	-	+	BF4	+	+	0	+
J8	+	+	-	+	BF5	+	+	0	+
J10	+	+	-	+	BF6	+	+	0	+
J12	-	+	-	-	A6	-	-	-	+
J18	-	+	-	-	A7	-	+	-	+
J19	+	+	-	+	A9	-	+	-	+
J20	+	+	-	+	A11	-	+	-	+
J32	+	+	-	+	A13	-	+	-	+
J46	+	+	-	-	A14	-	+	-	+
J49	-	+	-	-	A16	-	+	-	+
J63	-	-	-	-	T10	-	-	-	-
J18.2	+	+	+	+	T23	-	-	-	-
J18.13	-	-	-	+	T8	-	-	-	-
B21	+	+	0	+	T13	-	-	-	-
B23	+	+	0	-	T17	-	-	-	-

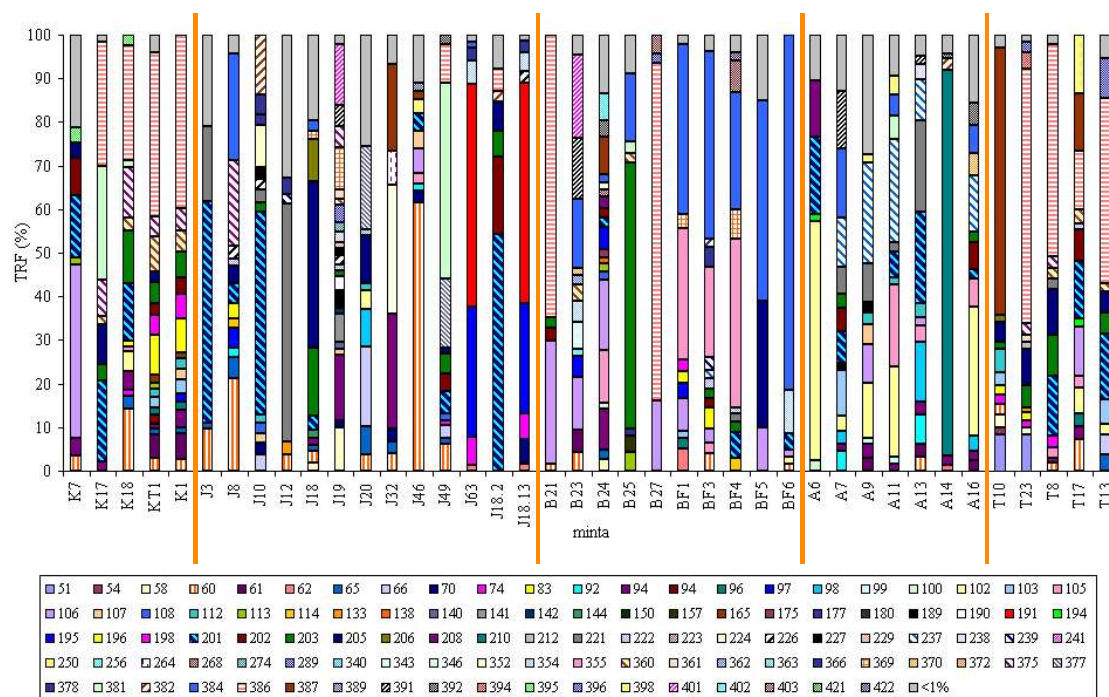
pozitív, de voltak olyan kutak is, melyekből nem tudtunk *Dehalococcoides* sp-t kimutatni. Hasonló heterogén eredményt kaptunk a *Desulfuromonas* sp. esetében is. A *J* kutak 60% volt pozitív, a *K* kutak esetén ez az arány 40% volt. A *K* területen egy kútból sem volt kimutatható a *Dehalobacter* sp., a *J* terület esetében csak a J18.2 kútból sikerült pozitív eredményt kapnunk.

A mikrobaközösségek vizsgálata

Az egyes minták baktérium közösségének összetételét gyors ujjlenyomat módszerrel, T-RFLP-vel vizsgáltuk. Az egyes elektroferogramok eredményeit oszlop diagramon ábráztuk. Minden területen található egy-két domináns szervezet, majd számos kisebb arányú csúccsal reprezentált mikroba is. A *T* terület jól láthatóan elkülönül a többi területtől, és a *B* terület "BF" jelű kútjai is eltérnek a többitől (4.24. ábra).

A főkomponens elemzés alapján rajzolt biplot ábrából (4.25. ábra) megállapíthatjuk melyek azok a TRF-k amelyek a legjelentősebb különbséget eredményezik az egyes T-RFLP mintázatok között. Jól látszik, hogy alapvetően három olyan csúcs van, melyek mentén megoszlanak a minták, ez a 384 bp, 386 bp és a 201 bp hosszú TRF-k. Ezen három csúcs alapján a területek három nagy csoportra oszlanak. A *T* terület és a *K* terület elsősorban a 386 bp-hoz tartozik, míg a *J* és az *A* terület a 201 bp-hoz. A 384 bp-hoz a *B* terület mintái tartoznak, egy két más területről kilógó

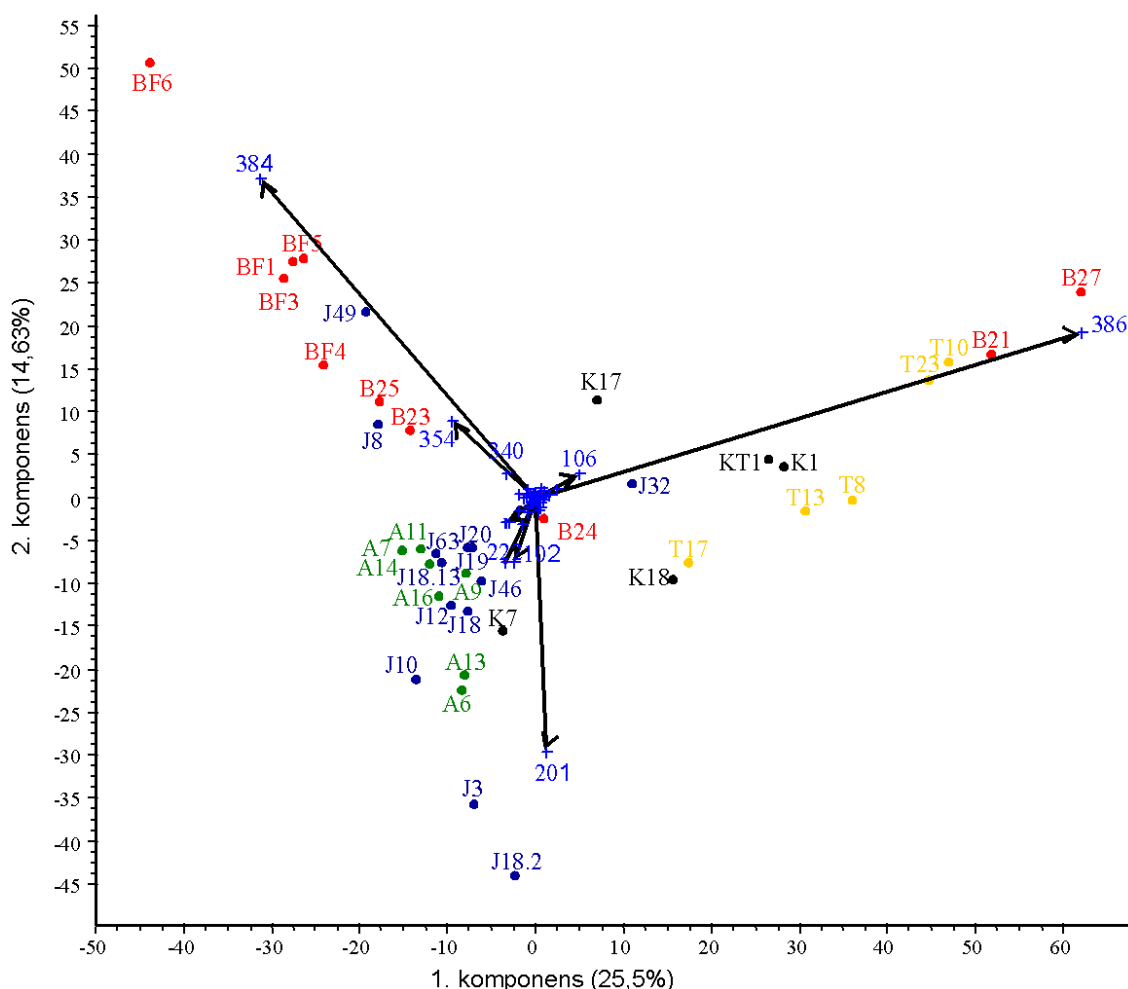
4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN



4.24. ábra. A vizsgált területek talajvíz mintáinak T-RFLP mintázata. Az egyes színek a különböző TRF-eket jelöli. Egy TRF jelenlétéből, vagy hiányából egy adott baktériumcsoport jelenlétére vagy hiányára következtethetünk.

mintával együtt.

4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHIIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN



4.25. ábra. A vizsgált területek talajvíz mintáiból származó T-RFLP mintázatok főkomponens elemzése. A színes teli körök az egyes mintákat jelölik, a kereszt jelek a számokkal az adott TRF-eket mutatják.

4.3.3 A megfelelő adalékanyag kiválasztása mikrokozmosz kísérletekben

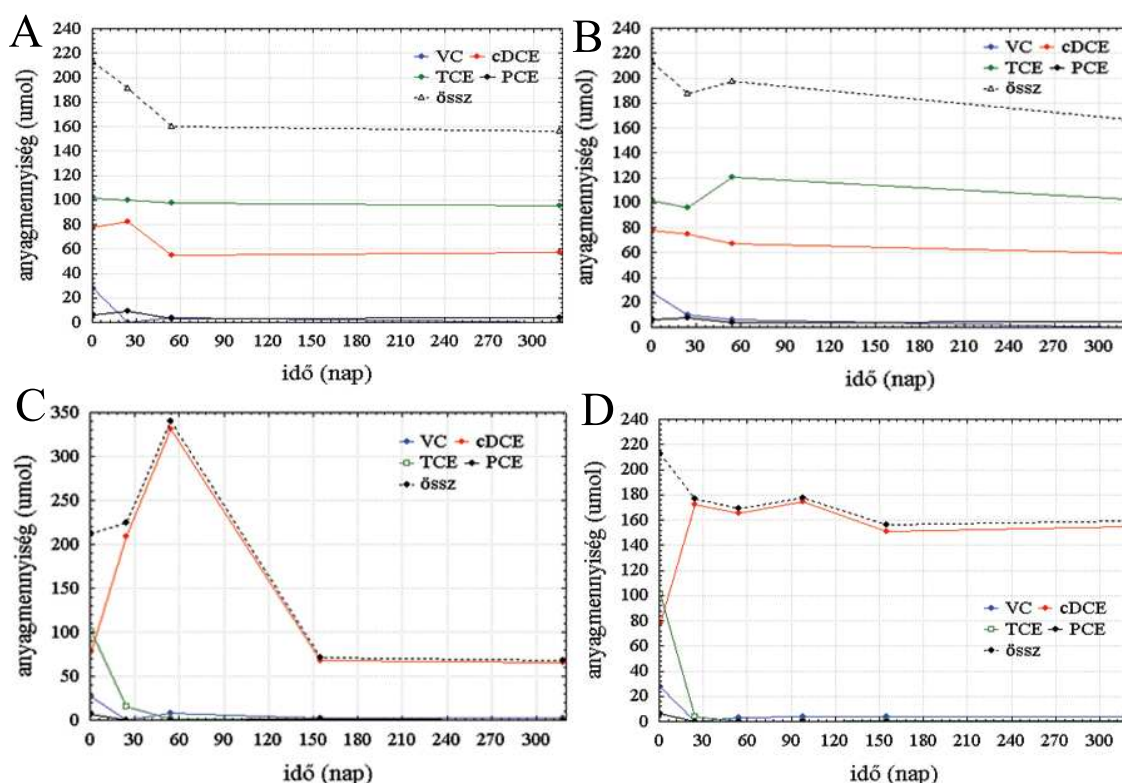
A mikrokozmosz kísérleteknek a célja olyan adalékanyag keresése volt, mellyel a biológiai lebontást serkenteni tudjuk. Két kútból vettünk talajvízmintát, a K7 és a J18.2-ből.

Minden mikrokozmosznál, minden mintavétel során vizsgáltuk a különböző kémiai paramétereket: a halogénezett szénhidrogének koncentrációját, pH-t; NO_3^- -t; NO_2^- -t; SO_4^{2-} -t; Fe^{3+} -t; Mn^{2+} -t, TOC-t illetve biológiai paramétereket, úgymint a redukzív deklorinációra képes szervezetek jelenlétét, a bakteriális közösség összetételének változását. A biotikus kontrollhoz (K) nem adagoltunk semmit, míg a másik három típus esetén 500-500 mg/l szárazanyag-koncentrációban adtuk az A, B és C adalékanyagot. A kísérletsorozat 318 napig tartott, mintavétel a 24., az 54., a 155. és a 318. napon történt.

4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHYDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN

4.3.3.1 Kémiai paraméterek

A két kútnak (J18.2; K7) igen eltérőek voltak a kémiai paramétereik, legnagyobb eltérést a szennyezőanyag koncentrációjában illetve a szulfátkoncentrációban tapasztaltunk.



4.26. ábra. A halogénezett szénhidrogén koncentrációja a K7 mikrokozmoszokban; A: biotikus kontroll; B: A adalékanyag; C: B adalékanyag; D: C adalékanyag

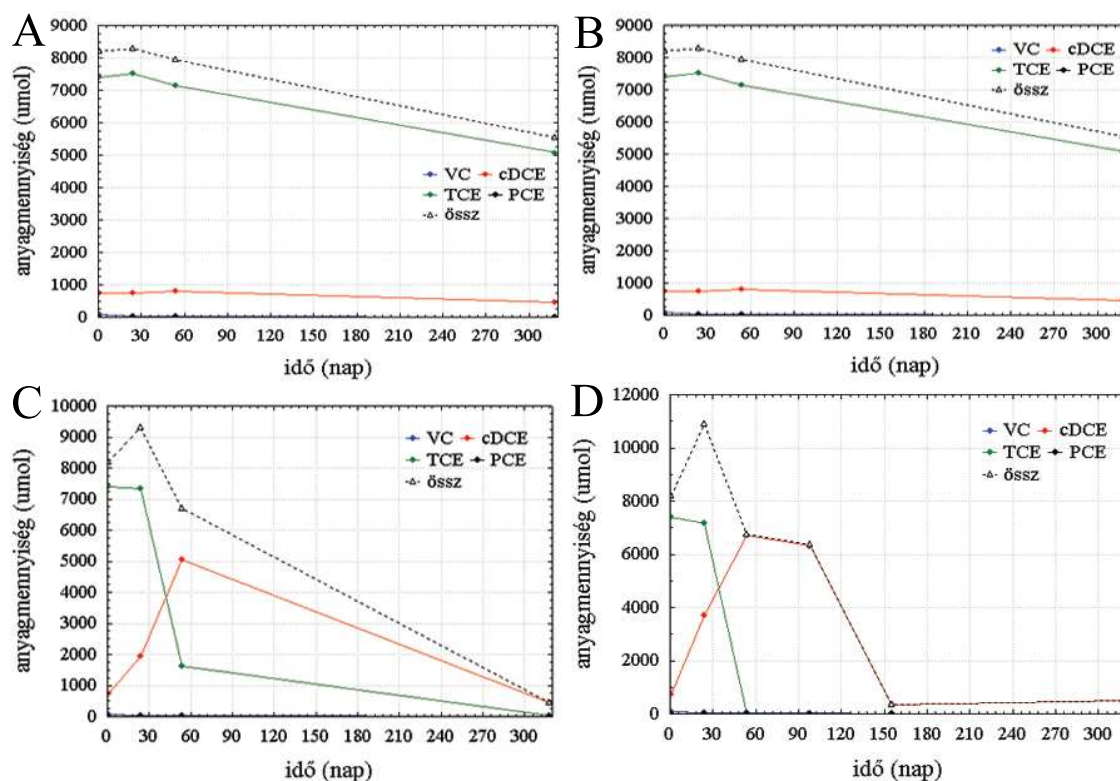
A J18.2-s kút nagy szennyezőanyag koncentrációjú, az összes halogénezett szénhidrogén mennyisége $8000 \mu\text{mol}$ volt a mikrokozmoszokban, de a szulfátkoncentráció igen kicsi (60 mg/l). A K7 kútból származó talajvíz szennyezettsége kisebb, de nagy szulfát tartalmú, az indulási koncentráció 650 mg/l volt. Nitrátot és nitritet a területen vett talajvízminta nem tartalmazott, az oldott vastartalomban jelentős különbségeket nem találtunk.

A pontos adalékanyagok összetételét sajnos a terület tulajdonosának és a helyszíni geológiai illetve technológiai vizsgálatokat folytató vállalat kérésére nem áll módunkban nyilvánosságra hozni, ezért a dolgozatban a lehető legpontosabb jellemzéssel szeretnénk rávilágítani a különböző adalékanyagok tulajdonságaira.

Az A adalékanyag egyszerű, egy szén-atomos szénforrás modell-adalékanyaga volt. A B adalékanyag összetett szénforrás, lebontásához bonyolult enzimszerek és összetett mikroba populációk szükségesek. A C adalékanyag elsősorban egy diszacharidot és annak egy karbonsavszármazékát tartalmazta. A vegyületek számos anaerob mikroba kiemelt elektrondonorainak számítanak, köztük nagyon sok deklorináló szervezet is képes hasznosítani azokat.

A halogénezett szénhidrogének koncentrációja a K kontroll mikrokozmoszokban is csökkent (4.26 és 4.27 ábrák). A minták származási területein is tapasztaltuk a szennyezőanyag koncentrációjának csökkenését bármilyen beavatkozás nélkül. A csökkenés okai lehetnek biotikusak és

4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHIIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN



4.27. ábra. A halogénezett szénhidrogének koncentrációja a J18-2 mikrokozmoszokban; A: biotikus kontroll; B: A adalékanyag; C: B adalékanyag; D: C adalékanyag. VC: vinil-klorid; cDCE: cisz-diklór etilén, TCE: triklóretilén, PCE: perklóretilén

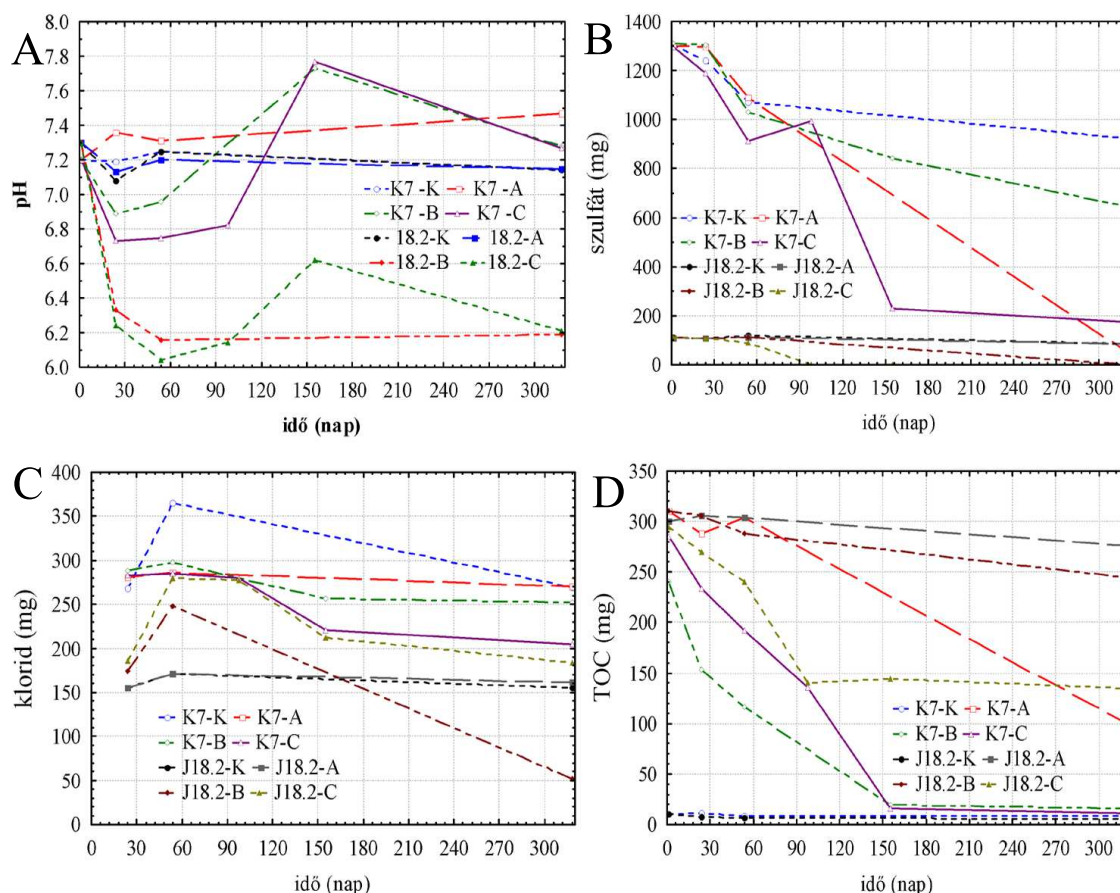
abiotikusak egyaránt. A kontroll üvegekben a szennyező vegyületek egymáshoz viszonyított aránya azonban nem változott meg, nem halmozódtak fel anyagcseretermékek. A két különböző kútból származó kontroll üvegekben eltérő a halogénezett szénhidrogének csökkenésének üteme, jól látszik, hogy míg a J18.2 mintánál a TCE koncentrációja fokozatosan csökken, addig a K7-nél az első 54 napban az alacsony klóratomszámú vegyületek – elsősorban a cDCE – csökkenését tapasztaltuk.

A K7 minta A adalékanyaggal kezelt mikrokozmoszaiban (K7/A) szintén nem tapasztaltunk semilyen változást a szennyezőanyag összetételében. A J18.2/A üvegekben a TCE koncentrációja a kontrollhoz képest nagyobb mértékben csökkent, de a dehalorespirációból származó anyagcseretermékek felhalmozódását nem tapasztaltuk. Ebből arra következtettünk, hogy a TCE lebomlása nem az energetikailag kedvező reduktív deklorináció anyagcsereúton történt, hanem egyéb, valószínűleg kometabolikus bontási folyamat során.

A K7/B mikrokozmoszokban drasztikusan csökkent a TCE és nőtt a cDCE koncentráció az 54. napra a kísérlet során. A TCE elfogyása után a cDCE koncentráció is csökkenni kezdett a 155. napig, majd ez a folyamat megállt. A J18.2/B mikrokozmoszok esetén a B adalékanyag serkentette a TCE lebontást, majd annak elfogyása után a cDCE mennyisége is jelentősen csökkenni kezdett. Mind a két esetben a cDCE nagyságrendileg a kiindulási mennyiségre tért vissza az egyéves kísérlet végére.

A K7/C mikrokozmoszoknál a C anyag serkentette a TCE lebomlását, de a cDCE lebomlást

4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHIIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN



4.28. ábra. A két mikrokozmosz fontosabb vízkémiai paramétereit. A: pH; B: szulfát mennyiség; C: klorid mennyiség; D: TOC. VC: vinil-klorid; cDCE: cisz-diklór etilén, TCE: triklór etilén, PCE: perklór etilén

nem segítette, míg a J18.2/C kút esetén mind a két vegyület lebomlását serkentette, és a cDCE is majdnem teljesen elfogyott már a 155. napra.

A vízkémiai paramétereket elemezve megállapítottuk (4.28. ábra), hogy az A anyag adagolásának hatására egyik mikrokozmoszban sem változott a pH a kontrollhoz viszonyítva, míg a B és a C anyagok mind a két mikrokozmosz típus esetén csökkentették a pH-t, ám eltérő mértékben. A kísérlet 155. napjára ez a jelentős csökkenés már nem volt tapasztalható, sőt a K7/B és K7/C mikrokozmoszokban a mért érték meghaladta a kiindulási értékeket. Ezek az értékek aztán a 318. napra visszaálltak az indulási értékek környékére. A J18.2 mikrokozmoszok esetén a pH csökkenés tartóssá vált.

A szulfát koncentráció változásának értékelésénél fontos megjegyezni az igen eltérő kiindulási értékeket. Az alacsony szulfáttartalmú J18.2 mikrokozmoszokban a kontroll üvegekben és a A üvegekben nem változott a szulfátionok koncentrációja, a B kezelés hatására lassan, az egyéves kísérlet alatt fokozatosan ürült ki a szulfát a mikrokozmoszokból, míg a C hatására, gyors szulfátredukció volt tapasztalható, melynek eredménye, hogy az 54. napra teljesen eltűnt a szulfát az üvegekből.

A K7-s talajvízben a szulfát koncentrációja igen nagy volt. Mind a négy típusú mikrokozmosz

4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHIIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN

esetén tapasztaltunk szulfátredukciót, csak eltérő mértékben. A kezeltetlen üvegekben volt a szulfátredukció sebessége a legkisebb, majd ezután következtek a *B* üvegek, majd az *A*, a leggyorsabb pedig a szulfátredukció a *C* kezelésű üvegekben volt.

A kloridion koncentráció adatait arra szeretnénk volna felhasználni, hogy a kloridion felszabadulásának mértékével a reduktív deklorinációt nyomon követhessük. Sajnos a kloridion koncentráció változása olyan kis mértékű volt, hogy a mérési eredményeket nem tekinthettük megbízhatóknak.

A TOC (Total Organic Carbon – teljes szerves eredetű szén) mérésével a hozzáadott adalékanyag mennyiségét követtük nyomon. A kontroll talajvízminták szervesanyag tartalma, hasonlóan a kiindulási mintákhoz, meglehetősen kicsi volt. A legkisebb szervesanyag felhasználást a *J18.2/A* és *J18.2/B* kezeléseknél tapasztaltuk, a *K7/A* mikrokozmoszokban a szervesanyag felhasználás az 54. nap után indult meg, akkor azonban nagy sebességgel. A *J18.2/C* kezelésnél a szervesanyag felhasználás az első 98 napon jelentős volt, utána ez a folyamat megállt. A legnagyobb szervesanyag felhasználást, amely a szerves anyag kiürüléséhez is vezetett, a *K7/B* és *K7/C* kezelésű mikrokozmoszaiban tapasztaltuk.

A mintavételek során vizsgáltuk a gőztér metán, etán és etilén koncentrációját is. A metán jelenléte indirekt bizonyítéka a metanogén szervezeteknek, az etilén, illetve etán pedig a TCE reduktív deklorinációjának halogénatomot nem tartalmazó végtermékei.

Metán termelést a *B* és *C* mikrokozmoszokban a 98. naptól kezdve tapasztaltunk, bár eltérő mennyiségben. A *K7*-s mikrokozmoszok kisebb mennyiségben tartalmaztak metánt, mint a *J18.2* üvegek. Míg metánt mindkét kút kezelt mikrokozmoszai esetén tapasztaltunk, addig az etilén illetve az etán képződés csak a *J18.2*-s kút *B* és *C* mikrokozmoszaiban volt. A *C* anyaggal kezelt minták egy nagyságrenddel nagyobb mennyiségben tartalmaztak etilént, illetve etánt, mint a *B* anyaggal kezelték. Az etilén és az etán aránya nagyságrendileg azonos volt a mikrokozmoszokban.

4.3.3.2 Biológiai paraméterek

A *B* és *C* mikrokozmoszokban, melyeknél jelentős bomlási folyamatokat tapasztaltunk, a kémiai paraméterek mellett vizsgáltuk a biológiai paraméterek változásait is. Specifikus kimutatásokkal nyomon követtük a dehalogénező szervezetek jelenlétét, ezen felül pedig elemeztük a mikroba közösség összetételét, illetve változását a különböző adalékanyagok hatására. A mikrokozmoszokból a kiindulási mintákon túl az 54. és a 318. napon vett mintákat is feldolgoztuk.

Dehalorespiráló szervezetek specifikus kimutatása

A *Dehalococcoides* sp.-t már a kiindulási mintákból is kimutattuk, a 318. napra a *K* és a *B* mikrokozmoszokból már csak a nested PCR segítségével mutattuk ki, mely azt jelenti, hogy ezeknek a szervezeteknek az aránya csökkent a közösségen belül (4.10. ábra). A másik két dehalorespiráló szervezet a *K7* kiindulási mintákban nem volt kimutatható, míg a *J18.2* mintákban igen. Az 54. napra mindegyik mikrokozmoszban visszaszorult az arányuk, nem voltak kimutathatóak, de a 318. napra a *Dehalobacter* sp. mindegyik mikrokozmoszban újra kimutathatóvá vált, és a *Desulfuromonas chloroethenica* is detektálható lett a *J18.2/K* és a *K7/B* és *K7/C* mikrokozmoszokban. Az 54. napos visszaszorulása ezeknek a szervezeteknek magyarázható a mikrokozmosz összeállításánál történő óhatatlan zavarással. A *Dehalococcoides* sp. folyamatos jelenléte arra utal, hogy kimutatása nem elégséges feltétele a PCE eténig történő redukciójának, ellentétben Hend-

4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN

Nap	Minta	J18.2 K	J18.2 B	J18.2 C	K7 K	K7 B	K7 C
0. nap	DHC1	+	+	+	+	+	+
	DHC2	+	+	+	+	+	+
	DR	+	+	+	-	-	-
	DCE	+	+	+	-	-	-
54. nap	DHC1	+	+	+	+	+	+
	DHC2	+	+	+	+	+	+
	DR	-	-	-	-	-	-
	DCE	-	-	-	+	-	-
318. nap	DHC1	-	-	+	-	-	+
	DHC2	+	+	+	+	+	+
	DR	+	+	+	+	+	+
	DCE	+	-	-	-	+	+

4.10. táblázat. A specifikus primerekkel végzett PCR-ek eredményei a mikrokozmoszokban (DHC: *Dehalococcoides ethenogenes*; DR: *Dehalobacter restrictus*; DCE: *Desulfuromonas chloroethenica*).

rickson és munkatársai (2002) megállapításával. Több dehalorespiráló szervezet együttes vizsgálata/kimutatása ezért megbízhatóbb eredménnyel szolgálhat.

A mikrobaközösség változásának vizsgálata

Ujjlenyomat módszerekkel követtük nyomon a mikrobaközösség változását. A 318. napon a rDNS alapú vizsgálatokat rRNS alapú vizsgálatokkal is kiegészítettük. A rRNS alapú vizsgálatok során csak azokat a mikrobákat mutatjuk ki, amelyek a mintavétel időpontjában aktív anyagcserét folytatnak és rRNS szintézis történik a sejtjeikben. A rDNS alapú vizsgálatok esetén olyan szervezeteket is kimutatunk, melyek esetleg nyugvó állapotban vannak az adott mintában, és nem aktívak a mintavétel idején.

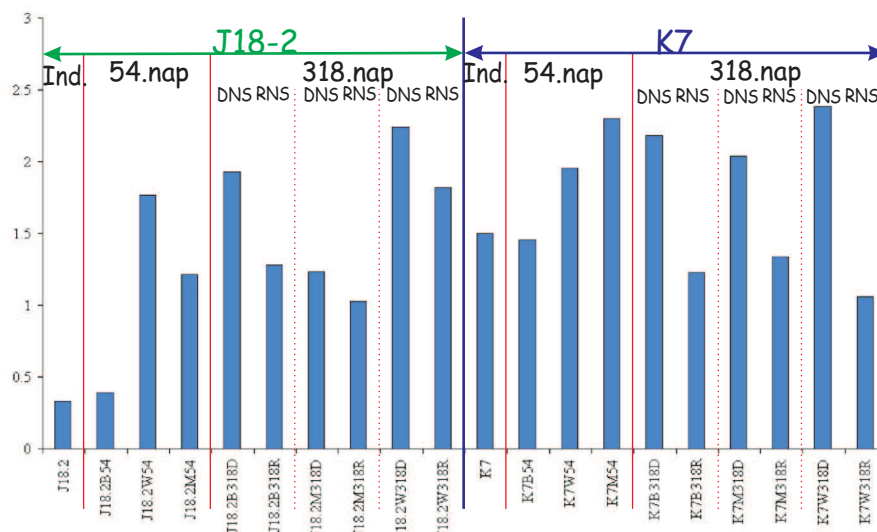
A Shannon féle diverzitásindexek alapján látható, hogy a kezelés hatására diverzitás növekedést tapasztaltunk, azaz a közösségben kimutatható mikrobák száma nőtt (4.29 ábra).

A J18.2 kiindulási mintájának alacsony értéke a kezelés hatására megnőtt, míg a kontroll mintában a 54. napra sem változott jelentősen. A két kezelés hatására a diverzitás nem azonos módon változott, a C adalékanyag hatására jobban megnőtt. Érdekes, hogy egy évvel az indítás után a kontroll mikrokozmoszoknak is megnőtt a diverzitása, feltételezzük, hogy eddigre a lassú növekedésű szervezetek is kimutathatóvá váltak.

Az adalékanyagok eltérő hatása abban is látszik, hogy míg a C mikrokozmoszban a diverzitás a 318. napig tovább nőtt, addig a B anyag hatására a diverzitás nem változott. Az is megállapítható, hogy a kezelt mikrokozmoszokban a diverzitás-index a rDNS-alapú és a rRNS-alapú vizsgálatok között – azaz a jelenlévő illetve az aktív mikrobacsoport diverzitása között – kisebb, mint a kontroll mintákban. Ebből arra következtettünk, hogy a kontroll mikrokozmoszban jóval több nyugvó mikrobacsoport volt a kezelt mintákhoz képest.

A K7 mintánál a kiindulási minta diverzitása már nagy. Ennek oka lehet, hogy a minta nem származik mélyről és a szennyezés mértéke is kisebb, mint a J18.2 esetében (kevésbé toxikus

4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHIIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN



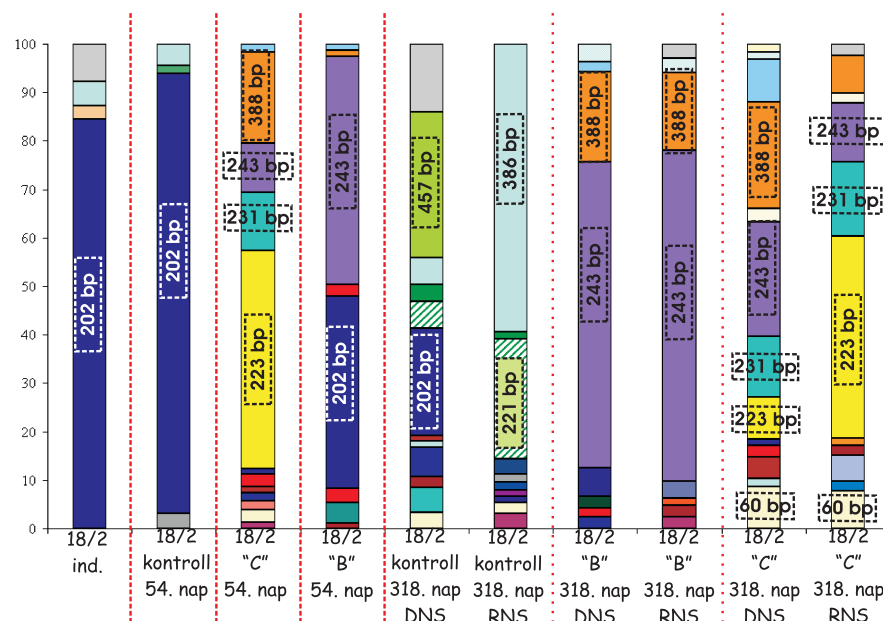
4.29. ábra. Az mikrokozmosz minták T-RFLP mintázata alapján számolt Shannon diverzitásindex értékei.

a környezet). A 54. napra a kezelt mikrokozmoszokban megnőtt a diverzitás, amely aztán nem nagyon változott a 318. napig. Viszont ha értelmezzük a rRNS-alapú vizsgálatok eredményeit, azt látjuk, hogy minden esetben jóval kisebb a diverzitásindex az rDNS alapú vizsgálatokhoz viszonyítva. Mindegyik mikrokozmosz esetében a jelenlévő mikrobáknak tehát csak egy kis csoportja végzett aktív anyagcserét.

A T-RFLP eredmények grafikus ábrázolása (4.30 és 4.31 ábrák) és a mintázatok főkomponens elemzése (4.32. ábra) alapján jól látszik, hogy a kiindulási minták közösség szerkezete jelentősen eltér a kezelt mikrokozmoszok közösségeitől. A domináns szervezet a kiindulási mintákban a 202 bp TRF-fel rendelkező mikroba, melyet a későbbi vizsgálatok segítségével azonosítani is tudtunk. Ennek helyét az 318. napi kezeletlen mikrokozmoszokban a 386 bp hosszú TRF-fel rendelkező mikroorganizmus vette át, melyet szintén meghatároztunk. Az is egyértelmű, hogy az egyes kezelések a két mintánál nem azonos mikrobapopulációt serkentettek. A *J18.2/C* mikrokozmoszokban, illetve a *K7/B* és *K7/C* mikrokozmoszokban néhány új szervezet jelent meg, melyek egyértelműen jellemzőek a közösségre. Ilyenek a 102 bp, 221 bp, 223 bp, 231 bp hosszú TRF-fel jellemzett mikrobák, amelyeket szintén igyekeztünk azonosítani. A főkomponens elemzés érdekessége, hogy a *J18.2/B* mikrokozmoszokra egyértelműen jellemző a 244 bp-ral jelölt szervezet. Ez a szervezet ugyan a többi mikrokozmoszban is megtalálható, de ebben a közösségben domináns szerepet játszik. A 388 bp-ral jellemzett klón elsősorban a *J18.2/C* mikrokozmoszok közösségének meghatározó tagja.

A sikeres *J18.2/C* mikrokozmosz 318. napi RNS-éből a T-RFLP mellett klónkönyvtárat is készítettünk, hogy meghatározzuk a közösség tagjait. A RNS-t hexamer primerekkel átírtuk cDNS-sé (transzkripció), majd a cDNS-ből PCR segítségével szaporítottuk a 16S rRNS egy szakaszát 27f és 519r primerekkel (lásd a 3.7. és 3.9. tábla a 3.5.5. fejezetben). A PCR termékből klónkönyvtárat készítettünk, amelynek során a közösségi DNS-ből származó PCR termékek a vektor-plazmid segítségével egy-egy *E. coli* kompetens sejtbe kerültek. Mintegy 150 klón került feldolgozásra, melynek során DNS-t izoláltunk a sejtekből, majd a vektorra specifikus M13 primerekkel felszapo-

4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHIIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN



4.30. ábra. A J18-2 mikrokozmoszok T-RFLP elemzésének eredménye

rítottuk azt a szakaszt, ahová a beépült szakasz illeszkedett. Ezután egy második PCR segítségével, 27f és 519r primerekkel felszaporítottuk a közösségi RNS-ből származó DNS szakaszt. Ezeket a PCR termékeket T-RFLP-vel csoportosítottuk, és meghatároztuk a csoportrepresentatív klónokat. Ezeknek a klónoknak a bázissorrendjét bázissorrend elemzéssel meghatároztuk, a szekvenciákat internetes adatbázis segítségével filogenetikailag meghatároztuk. A kapott szekvenciák az eredeti mintában található és aktívan működő szervezetek 16S rDNS gén egy-egy szakasza. Az azonosítás után meghatároztuk ezeknek a szervezeteknek a TRF-jeit, amelynek segítségével azonosítani tudtuk a közösségi T-RFLP mintázat fontosabb csúcsait is (4.32. ábra).

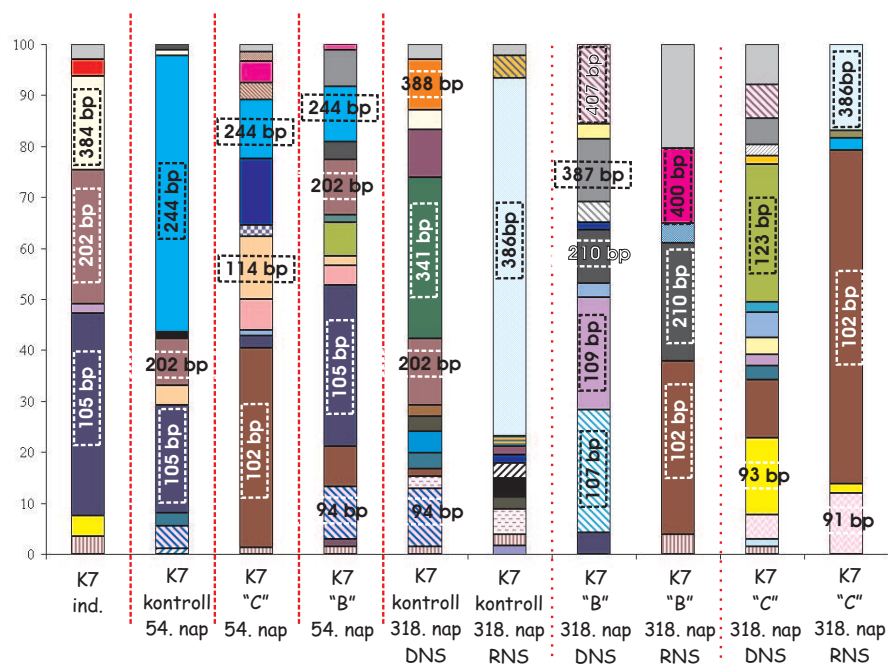
A fontosabb klónok filogenetikai besorolása és jellemzése:

A c1 csoportrepresentáns klón

A BshI/236I restrikciós enzim hasítóhelye 60 bp (4.33. és 4.32. ábrák). A szervezet a *Myxococcales* rendbe tartozik. Közelebbi besorolása nem lehetséges, mert nincs közeli rokona a tenyésztésbe vont mikrobák között.

A mixobaktériumok Gram negatív pálcika alakú vegetatív sejttel rendelkező szervezetek. Közös jellemzőjük a csúszó mozgásuk és a termőtest képzésük. Szélsőséges körülmények között ezekben a termőtestekben képződik a mixospóra, amely bár nem olyan ellenálló, mint az endospóra, de azért a szélsőséges környezeti paramétereket is tűri. Elsődleges élőhelyük a talaj, az élő és élettelen fák kérge, illetve különböző állatok trágyája, de írtak már le mixobaktériumot tengerből is. Hidrolitikus exoenzimjeikkel a nem oldékony makromolekulák széles skáláját bontják. Általában aerob organotróf szervezetek, ez alól eddig egyedül az *Anaeromyxobacter dehalogenans* kivétel, amely anaerob körülmények között képes az alifás halogénezett szénhidrogének bontására. Az általunk kapott szekvencia a *Sorangium* és *Chondromyces* nemzetségekkel áll legközelebbi rokonságban, melyek cellulózbontó szervezetek (Shimkets et al. 2006).

4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHIDROGÉN BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN



4.31. ábra. A K7 mikrokozmoszok T-RFLP elemzésének eredménye

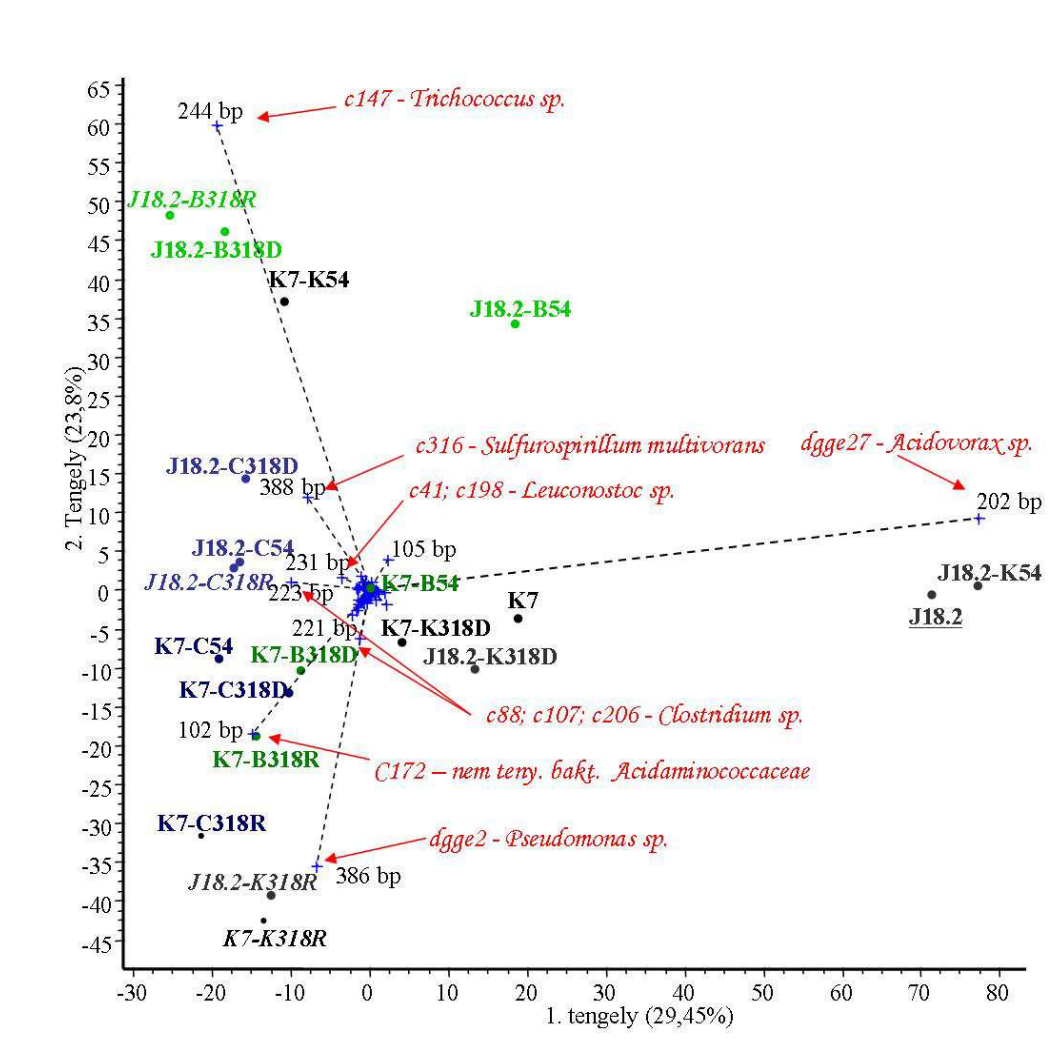
A c3 csoportreprezentáns klón

A BshI/236I restriktációs enzim hasítóhelye 60 bp (4.34. és 4.32. ábrák). Szintén nincsen közeli rokon szervezet, amelyet tenyésztésbe vontak volna, ezért csak a nagyobb taxon szerinti besorolása lehetséges. Legközelebbi rokonságot a *Victivallis vadensis* típus törzsszel mutat (94%), mely a csoport egyetlen tenyésztett törzse. Fekáliából izolálták, szigorúan anaerob szervezet. Szénforrásként számos cukrot hasznosít, de az összetettebb szénhidrátok bontására nem képes. Ugyancsak nem képes a nitrátot és a szulfátot terminális elektron akceptorként hasznosítani. Filogenetikai besorolása a csoportnak ma még nem egyértelmű. A The Prokaryotes a *Verrucomicrobia* phylum 7. szubdivíziójába sorolja (Schelsner et al. 2006). A RDP II. filogenetikai besorolása alapján a *Lentisphaerae* phylumba tartoznak (*Lentisphaerae*; *Victivallales*; *Victivallaceae*; *Victivallis*), melyek külön ágat képeznek a *Verrucomicrobia* csoporttól.

A c10 csoportreprezentáns klón

A BshI/236I restriktációs enzim hasítóhelye 60 bp (4.35. és 4.32. ábrák). Szintén nincsen közeli, tenyésztésbe vont rokon faj, sőt a TM7 csoportnak nincs egyetlen tenyésztésbe vont tagja sem. Az első szervezetet, amelyről a csoport a nevét is kapta egy savanyú tőzegláp mintából mutatták ki, 16S rRNS gén klónkönyvtár vizsgálat során (Rheims et al. 1996). Az internetes adatbázisokban elhelyezett szekvencia adatok arra utalnak, hogy ezek a szervezetek igen elterjedtek. Széles körben mutatták ki kémiai és geográfiai különböző környezetekből, mind szárazföldi (talaj, rizoszféra, tőzegláp), vízi (talajvíz, tenger, édesvizek, mélytengeri üledékek), mind klinikai (emberi szájjüreg, egér ürülék) mintákból. A molekuláris módszerek adta eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy gyakran vannak jelen eleveniszapban is. Hugenholtz és munkatársai (2001) egy

4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHYDROGÉN BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN

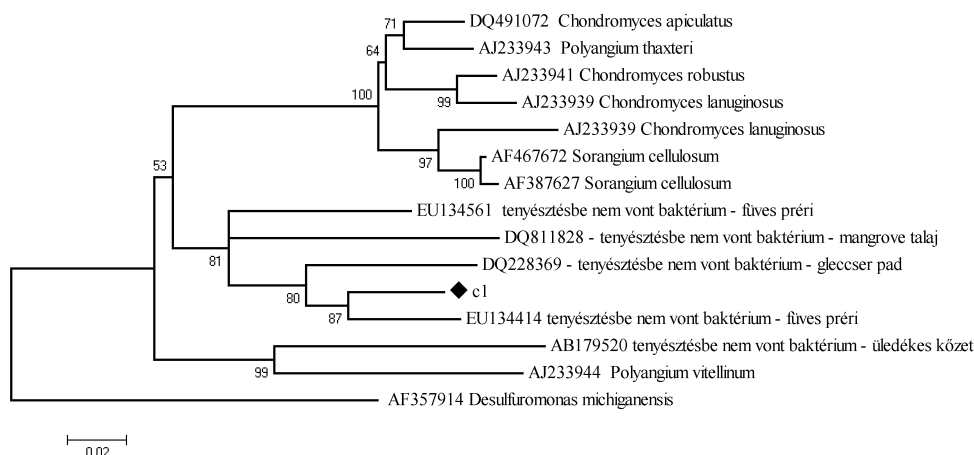


4.32. ábra. A mikrobiális minták T-RFLP mintázatának főkomponens elemzése

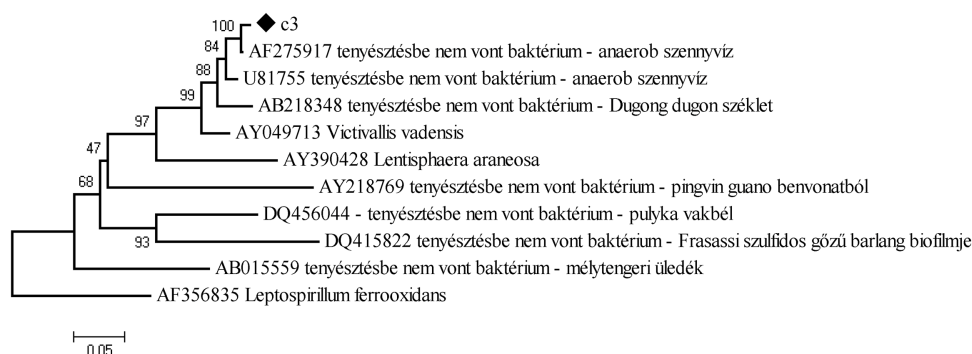
laboratóriumi szennyvíztisztító modellrendszerben vizsgálták részletesen a csoportot. Kimutatták filamentjeiket, tipikus Gram-pozitív sejt-falukat. A filamentáris szerkezet és a Gram pozitív sejt-fal alapján ezek a szervezetek lehetnek a harmadik nagy ága a Gram pozitív szervezeteknek (az Aktinobaktériumokkal és a kis G+C Gram pozitív csoportokkal) a *Bacteria* doménban. A TM7 filamentek nem akkumuláltak polifoszfátot vagy poli-3-hidroxibutirátot laboratóriumi körülmények között.

Másik érdekességük, hogy a 16S rRNS gén szekvenciában szoros hasonlóságot mutatnak az *Archaea* csoporttal. A *Bacteria* domén tagjainak a 911. pozícióban uracil (U), a 912.-ben pedig citozin (C) van. Az *Archaeák*nak a 911. pozícióban szintén uracil (U) van, de a 912. helyen is uracil (U), mely közös tulajdonság a TM7 csoporttal. Ez a második bázis felelős az *Archaeák* aminoglikozid antibiotikum – streptomycin – elleni rezisztenciájáért. Bár a TM7 csoport esetén a rezisztencia nem bizonyított, de az adatok alapján valószínűsíthető (Hugenholtz et al. 2001).

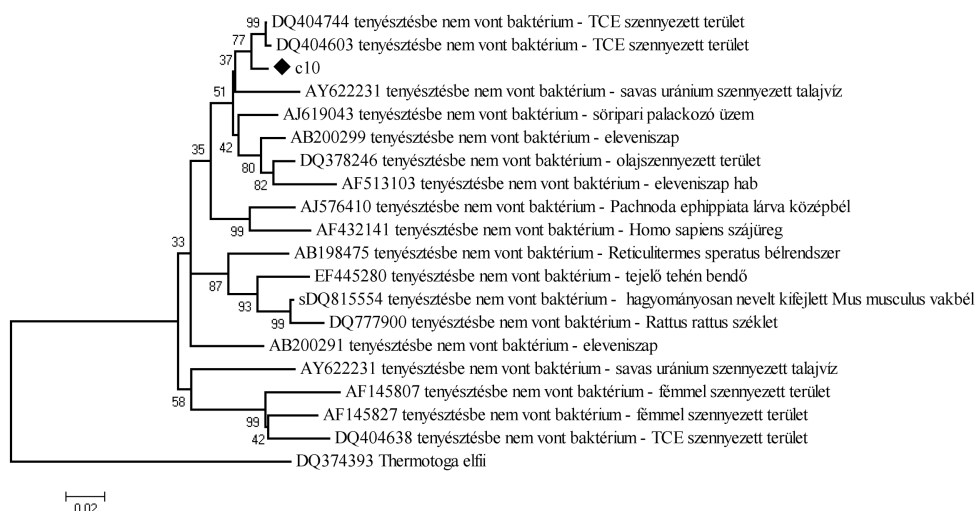
4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN



4.33. ábra. A c1, Myxococcales rendbe tartozó klón filogenetikai fán történő ábrázolása



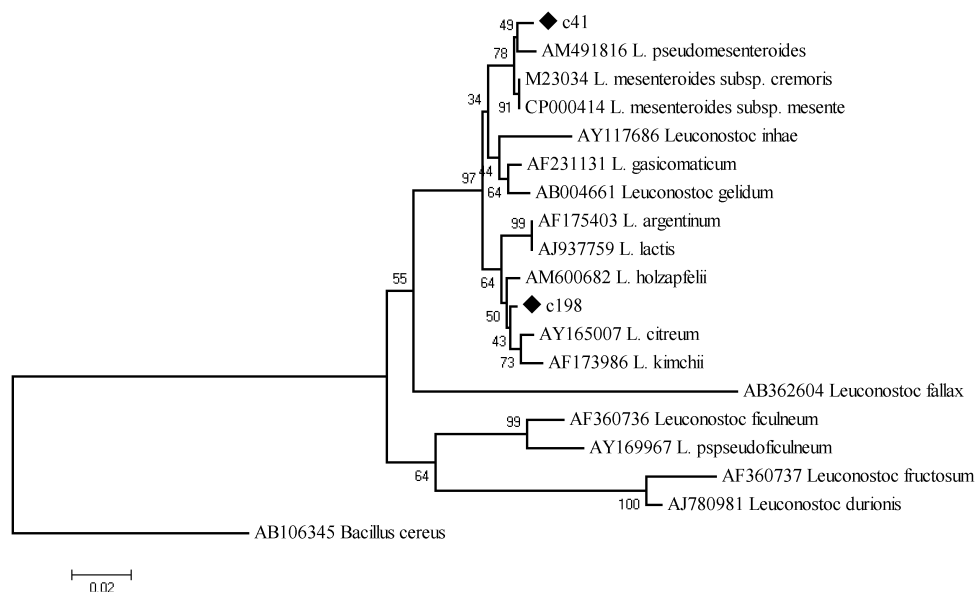
4.34. ábra. A c3, Lentisphaerae családba tartozó klón filogenetikai fán történő ábrázolása



4.35. ábra. A c10, TM7 csoportban tartozó klónok filogenetikai fán történő ábrázolása

A c41, c198 csoportrepresentáns klónok

4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN



4.36. ábra. A c41, c198, *Leuconostoc* nemzetségbe tartozó klónok filogenetikai fán történő ábrázolása

A BshI236I restrikciós enzim hasítóhelye 231 bp (4.36. és 4.32. ábrák). A szekvencia hasonlósági adatok alapján a c41 klón a *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* ATCC 8293 törzzsel mutat 99%-os hasonlóságot, míg a c198 klón pedig *Leuconostoc holzapfelii* BFE 7000^(T) törzzsel (szintén 99%).

A *Leuconostoc* nemzetségbe tartozó szervezetek nem motilisak és spórákat sem képeznek. Fakultatív anaerob baktériumok, melyek kemoorganotróf, obligát fermentálók. Általánosan elterjedtek talajokban, élelmiszerekben. Rendszerint a savasabb pH-t kedvelik (Hemme és Foucaud-Scheunemann 2004).

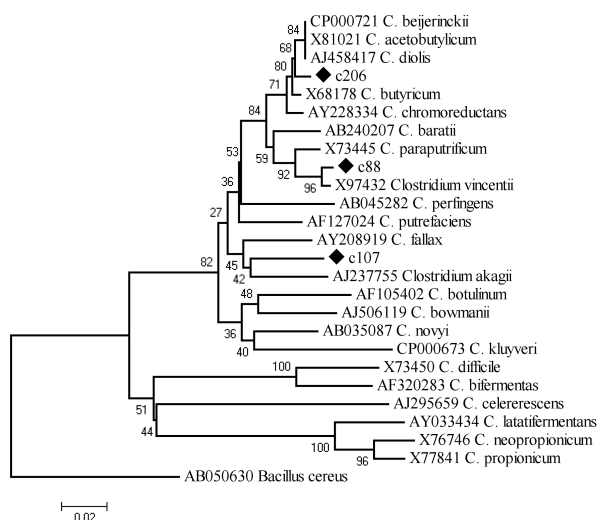
A c88, c107, c206 csoportrepresentáns klónok

A BshI236I restrikciós enzim hasítóhelyei 221 és 223 bp (4.37. és 4.32. ábrák). A szekvencia hasonlósági adatok alapján a c88 klón a *Clostridium vincentii* DSM10228 törzzsel mutat 98%-os hasonlóságot, a c206 *Clostridium diolis* DSM5431 törzzsel (szintén 98%). A c107 klónt csak nemzetség szintjén tudtuk a *Clostridium*ok közé sorolni, lehet, hogy eddig le nem írt faj egy tagját képviseli.

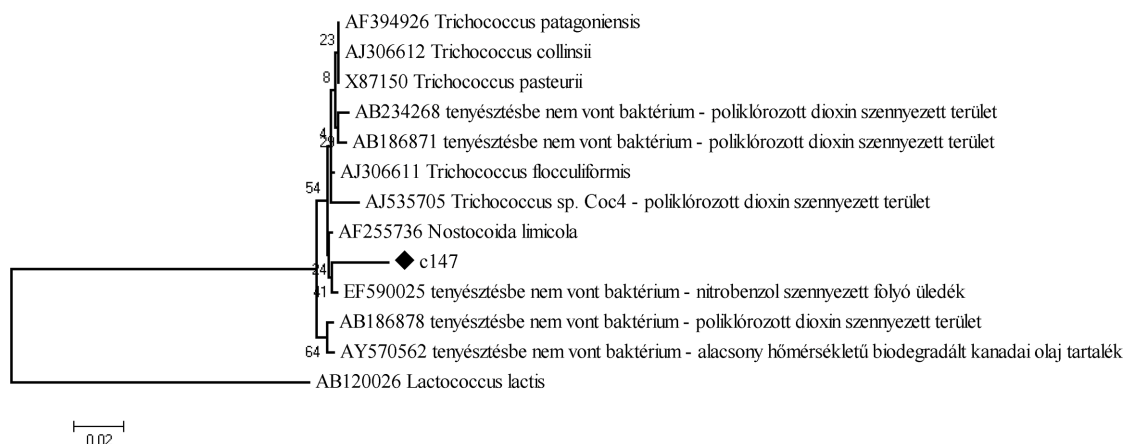
A *Clostridium* nemzetség a *Firmicutes*, *Clostridiales* rendbe tartozik. Motilis, endospóra képző, obligát anaerob szervezeteket takar, amelyek fermentációs anyagcserét folytatnak. Leggyakrabban szénhidrátok felhasználásával szerves savakat, alkoholokat termelnek. Disszimilatorikus szulfát redukciót nem végeznek. Mivel nincs elektrontranszportláncuk, ezért csak szubsztrát szintű foszforilációra képesek (Davis et al. 2002, Dennis et al. 2003, Macbeth et al. 2004, Richardson et al. 2002). A *Clostridium vincentii* egy pszichrofil, obligát anaerob, szaharofil szervezet, melyet az Antraktiszról izoláltak először.

A c147 csoportrepresentáns klón

4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN



4.37. ábra. A c88, c107 és c206, *Clostridium* nemzetségbe tartozó klónok filogenetikai fán történő ábrázolása



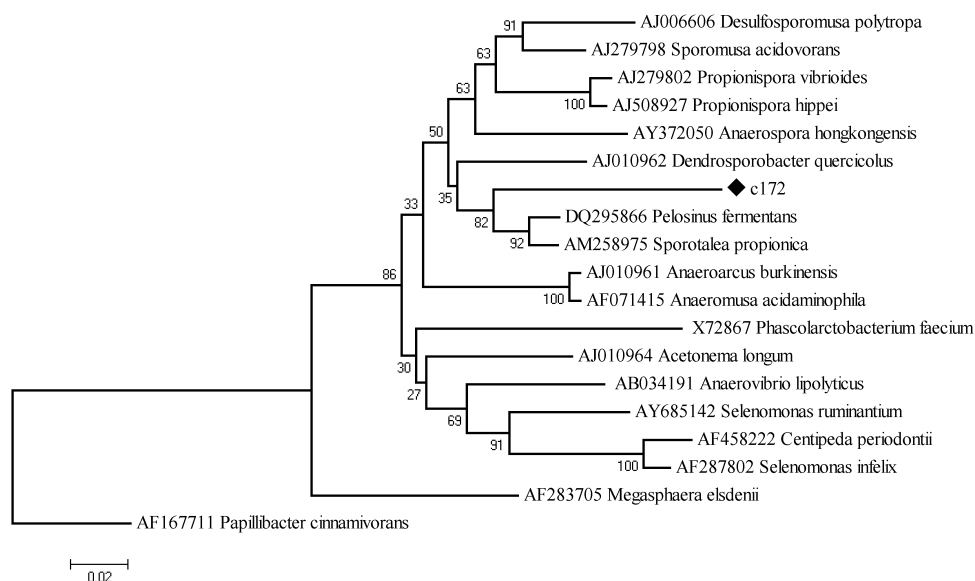
4.38. ábra. A c147, *Trichococcus* nemzetségbe tartozó klón filogenetikai fán történő ábrázolása

A BshI/236I restriktációs enzim hasítóhelye 244bp (4.38. és 4.32. ábrák). A c147 klón 95%-s hasonlóságot mutat a *Trichococcus pasteurii* KoTa2 törzsszel, így faji szintű meghatározása nem lehetséges. A *Trichococcus* nemzetség tagjai nem motilisak és spórákat sem képeznek. Fakultatív anaerob, kemoorganotróf szervezetek, amelyek szintén képesek fermentációs anyagcserére. Rend szerint szénhidrátokat hasznosítanak és szerves savakat termelnek. Nitrát redukcióra nem képesek (Liu et al. 2002).

A c172 csoportrepresentáns klón

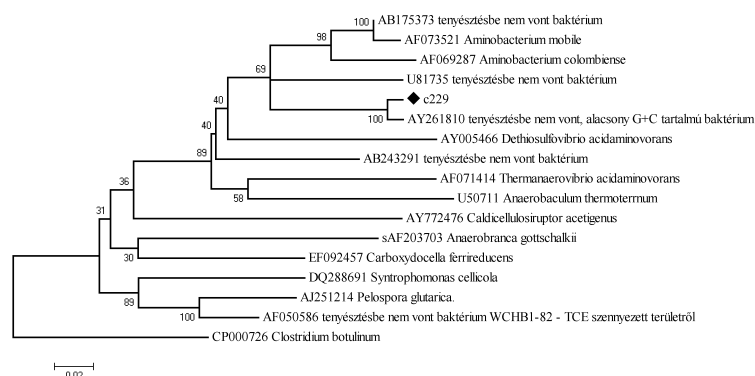
A BshI/236I restriktációs enzim hasítóhelye 102bp (4.39. és 4.32. ábrák). A klón 92%-s bázis-sorrend egyezést mutat a *Pelosinus fermentans* R7 törzsszel, így itt sem sikerült faji szinten meghatározni a klónt.

4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN



4.39. ábra. A c172, Acidaminococcaceae családba tartozó klón filogenetikai fán történő ábrázolása

Az Acidaminococcaceae család tagjai szigorúan anaerob, gyakran endospórát képző baktériumok. A *Sporotalea propionica* fajt 2007-ben írták le, a *Thoracotermes macrothorax* természetből izolálták. Motilis Gram-pozitív festődésű, hosszú pálcák. Terminális endospórát képeznek. Különböző cukrokat acetáttá és propionáttá fermentálnak. Képesek az oxigént redukálni laktát, glükóz, glicerín és hidrogén elektron donor mellett (Shelobolina et al. 2007). A *Pelosinus fermentans* fajt szintén 2007-ben írták le, a sejtek motilisak, 6 peritrich flagellummal rendelkeznek, spórát képeznek. A Fe(III)-t képesek fermentálható szubsztrát jelenlétében redukálni (Helander et al. 2004). A *Clostridium querciculus*-t 2000-ben reklaszifikálták, mint *Dendrosporobacter querciculus* (Strompl et al. 2000). *Sporomusa* genusba tartozó törzset kimutattak klórozott szénhidrogénnel szennyezett vizek mikrobiológiai vizsgálataiból is (Davis et al. 2002).

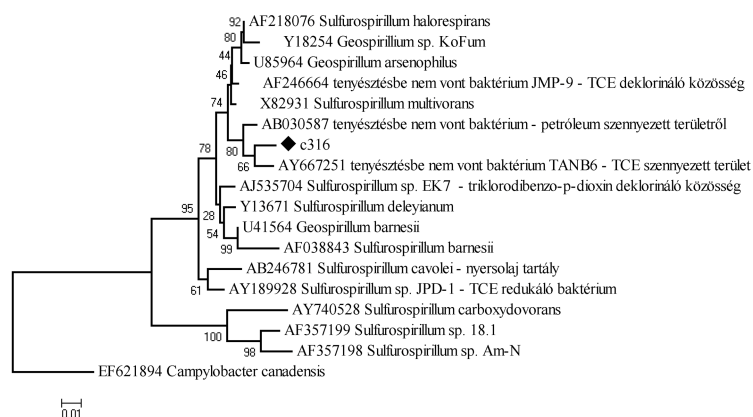


4.40. ábra. A c229, Acidaminococcaceae családba tartozó klón filogenetikai fán történő ábrázolása

A c229 csoportreprezentáns klón

4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN

A BshI236I restrikciós enzim hasítóhelye 381 bp (4.40. és 4.32. ábrák). A c229 klón szintén az Acidaminococcaceae családba tartozik, de azon belül az *Aminobacterium* nemzetséggel mutat közelebbi rokonságot. Az *Aminobacterium mobile* ILE-3 törzzsel a szekvenciahasonlóság 91%-os, mely egy Gram-negatív, nem sporuláló, mezofil baktérium. Anaerob szennyvíz tisztító üzemből izolálták. Szerint, glicint, threonint és piruvátot, mint energia forrást hasznosít, de fenntartásához élesztő kivonat is szükséges. Gyenge növekedést mutatott többek között cisztein, kazamínosav, pepton tartalmú táptalajokon. A *Methanobacterium formicicum* törzs jelenléte mellett képes volt az alanint, glutamátot, leucint, izoleucint, valint és aszparátot oxidálni (Baena et al. 2000). Az *Acidobacterium* nemzetségbe tartozó törzset írták le már poliklórozott bifenilt bontó dúsító közösségből is (Watts et al. 2001).



4.41. ábra. A *Sulfurospirillum* nemzetségbe tartozó c316 klón filogenetikai fán történő ábrázolása

A c316 csoportrepresentáns klón

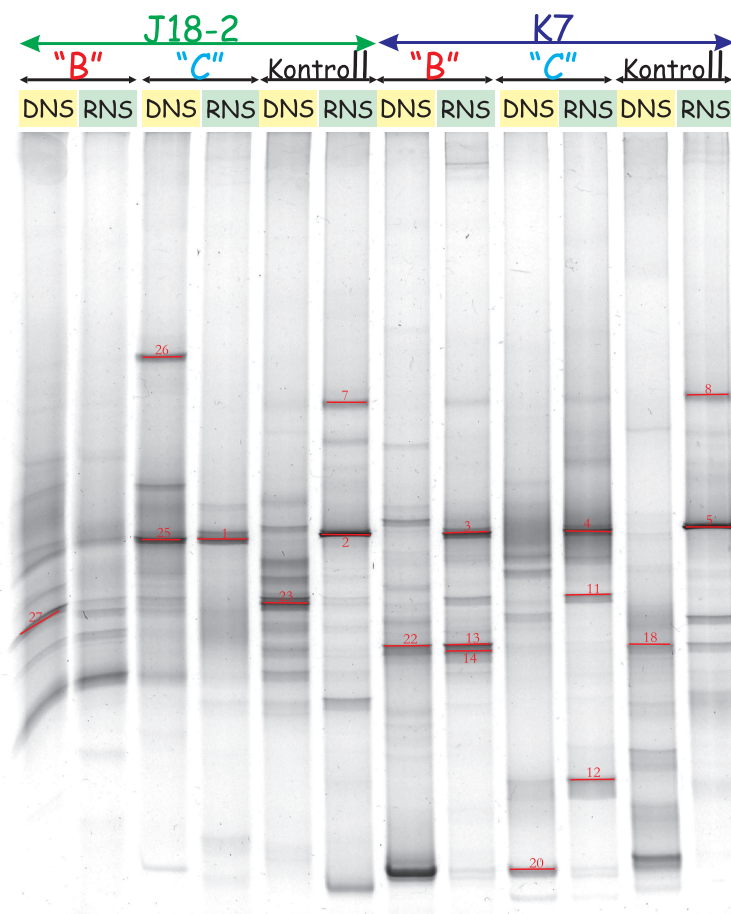
A BshI236I restrikciós enzim hasítóhelye 388 bp (4.41 és 4.32 ábrák). A c316 klón 97,3%-s hasonlóságot mutat a *Sulfurospirillum arsenophilum* MIT-13 törzzsel és 96,5%-os ill. 96,2%-os hasonlóságot a *Sulfurospirillum halorespirans* PCE-M2 és a *Sulfurospirillum multivorans* törzsekkel. A *Sulfurospirillum multivorans* szervezet az ϵ -proteobaktériumokhoz tartozik (régábbi neve *Dehalospirillum multivorans*), TCE-dehalogenáz enzimmel rendelkezik, H_2 elektrondonor felhasználásával PCE illetve TCE bontására is képes (Holliger et al. 1998, Macbeth et al. 2004). Nagy TCE-tartalmú talajvizekből illetve TCE-bontó közösségekből (Lowe et al. 2002, Macbeth et al. 2004) és triklorodibenzo-p-dioxin deklorináló közösségekből is (Ballerstedt et al. 2004) többször kimutatták. A *Sulfurospirillum arsenophilum* MIT-13 törzs esetében nem vizsgálták a PCE redukáló képességét (Stolz et al. 1999).

A mikrobiális közösségének DGGE elemzése

A klónkönyvtárat a J18.2/C 318. napos mintavételből származó közösségi RNS-ből hoztuk létre, ezért annak érdekében, hogy a többi mikrobiális közösségének domináns tagjait is meghatározzuk a DGGE módszert választottuk, hogy gyorsan szekvencia-információkhoz jussunk. A

4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN

DGGE elemzés a mikrokozmoszok 318. napján vett mintákból RNS és DNS alapon egyaránt készült. A DGGE segítségével poliakrilamid gélen tudjuk elválasztani a közösségi DNS-ből az egyes taxonokhoz tartozó DNS molekulákat. Az egyes csíkok a gélből kivághatók, majd a sikeres kinyerés után a szekvenciák bázissorrendje meghatározható. Ennek segítségével gyorsan képet kaphatunk, milyen szervezetek voltak jelen az egyes mikrokozmoszokban.



4.42. ábra. A *J18.2* és a *K7* mikrokozmoszok 318. napi mintájának RNS és DNS alapú vizsgálata DGGE-vel.

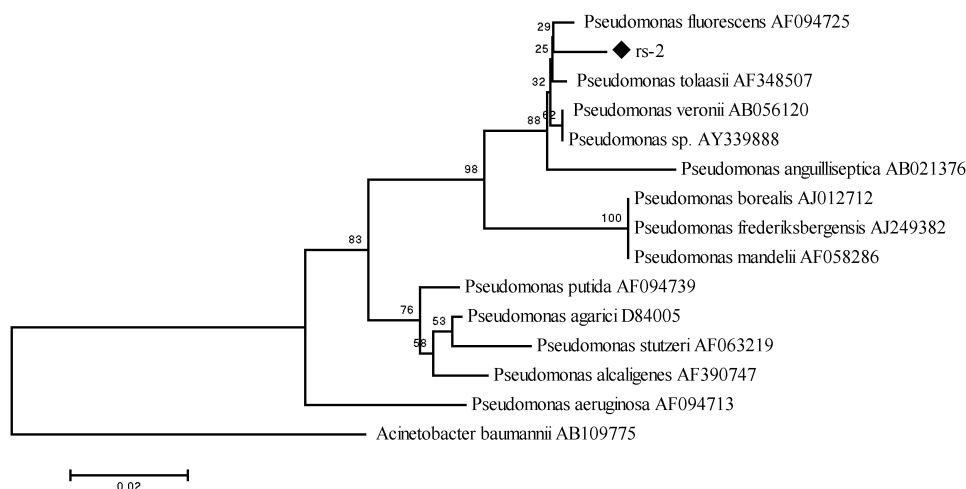
A DGGE mintázat alapján is látszik az egyes mikrokozmoszok közötti különbség, azonban mi elsősorban a kivágott csíkok segítségével meghatározott szervezetekre fektettük a hangsúlyt. A piros vonallal jelölt csíkokból (4.42. ábra) meghatározott szervezetek a következők:

1. és 25. csíkok

A bázissorrend megegyezett a klónkönyvtár c10-s klónjával (4.35. ábra). A DGGE mintázat alapján a szervezet megtalálható *J18.2/B* mikrokozmoszokban. Mind DNS, mind RNS alapon kimutatható volt, ami arra utal, hogy a biomasszája jelentős volt és aktív anyagcserét is folytatott.

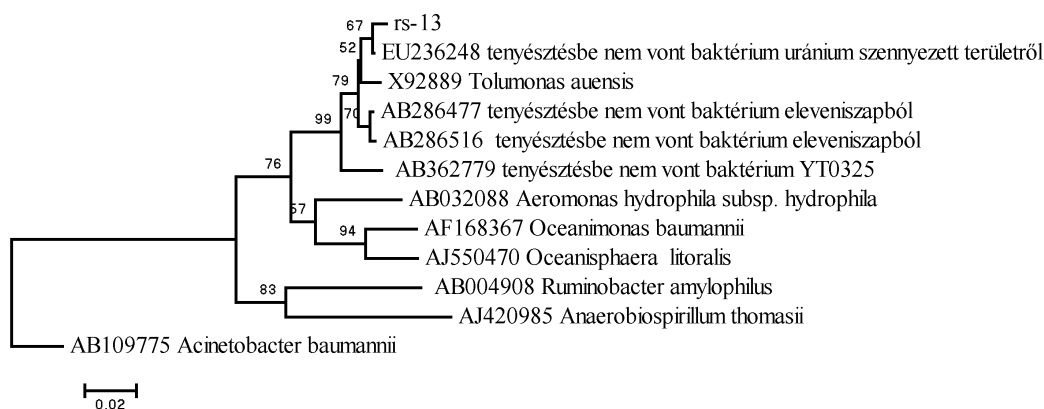
2.,3.,4.,5.,7. és 8. csíkok (4.43. ábra)

4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHIIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN



4.43. ábra. A *Pseudomonas* génuszba tartozó szekvencia filogenetikai fán történő ábrázolása

A szekvenciák 100%-s hasonlóságot mutatnak a *Pseudomonas veronii* CIP 104663 törzsszel. Legközelebbi rokonai a szekvencia alapján készített filogenetikai fán találhatóak, a részleges bá-zissorrend alapján nem meghatározható faj szinten. Számos *Pseudomonas* törzsről leírták hogy képes a TCE-t oxidatív kometabolikus anyagcserével bontani. A DGGE elemzés során kimutattuk az összes K7 mikrokozmosz és a *J18.2/K* RNS alapú mintáiból, mely arra utal, hogy bár nem voltak jelen nagy arányban ezekben a közösségekben, de aktív anyagcserét folytattak.



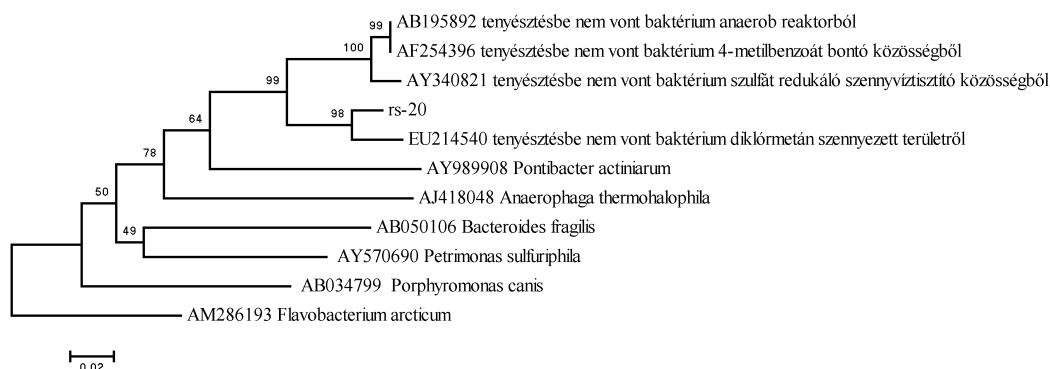
4.44. ábra. A *Tolumonas* taxonba tartozó rs13 szekvencia filogenetikai fán történő ábrázolása

13., 14., és 22. csíkok (4.44. ábra)

A *Tolumonas ausensis*-szel 98%-s hasonlóságot mutató mikroba. A *T. ausensis* toluol termelő szervezet, anoxikus környezetből izolálták. Gram-negatív, önálló mozgásra nem képes törzs, melynek optimális növekedési hőmérséklete 22°C, az optimális pH 7,2. Toluolt termel fenilalaninból, fenilpiruváttól, fenilacetáttól. Fenolt képes előállítani tirozinból. Mind szénforrás, mind toluol prekursor szükséges a toluol termelés megkezdéséhez. Oxikus és anoxikus körülmények között

4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN

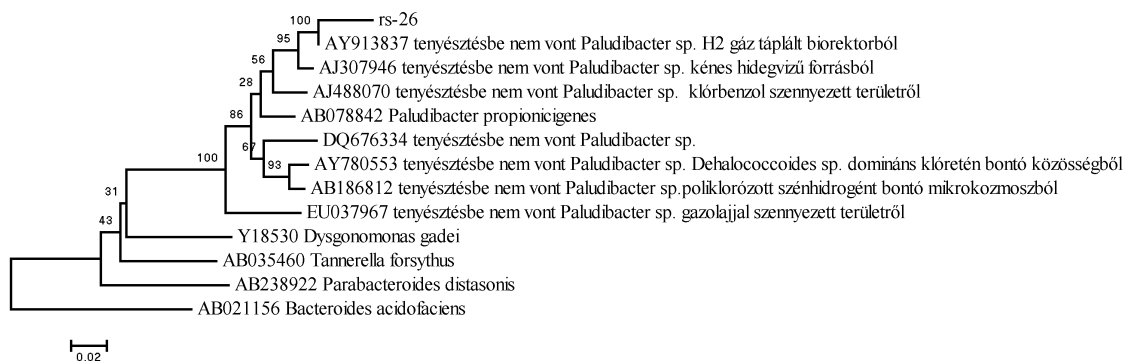
is növekszik. Ha glükóz a szénforrás acetát, etanol és formiát a fő fermentációs végtermékek. A 16S rRNS gén bázissorrendje alapján a γ -Proteobaktériumok közé tartozik (Fischer-Romero et al. 1996). Ezt a szervezetet sikerült kimutatni a *K7/B* és *K7/K* közösségekből.



4.45. ábra. A *Bacterioidetes* taxonba tartozó rs20 szekvencia filogenetikai fán történő ábrázolása

20. csík (4.45. ábra)

A *Pedobacter heparinus* DSM2366 törzzsel 91%-s hasonlóságot mutató szervezet. A *K7 B* és *C* mikrobiális DNS alapú mintájában is benne van, de nem aktív szervezet. A *Pedobacter heparinus* pszichrofil szervezet, amely különböző cukrokat képes szénforrásként hasznosítani, és bontja a heparint is.



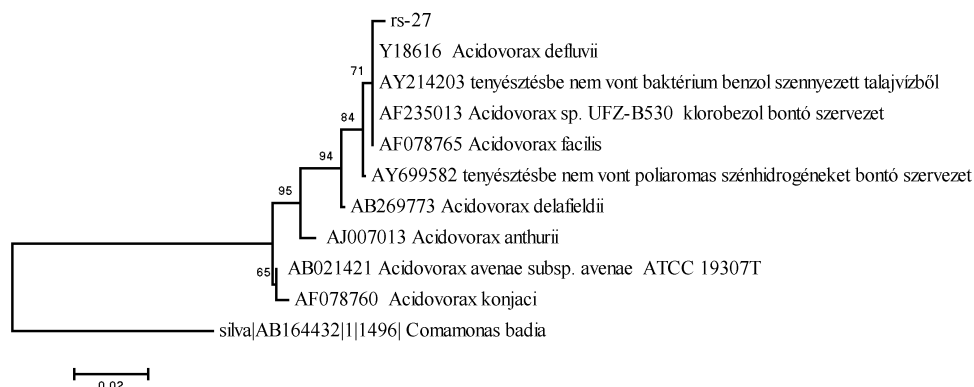
4.46. ábra. A *Bacterioidetes* taxonba tartozó rs26 szekvencia filogenetikai fán történő ábrázolása

26. csík (4.46. ábra)

A gélek alapján csak a *C* mikrobiális közösségekben van jelen, de ott sem mutat aktivitást (nincs csík ugyanazon a magasságon az RNS alapú mintában). A legközelebbi tenyésztésbe vont rokon szervezet a *Paludibacter propionigenes* (96%). A *P. propionigenes* szigorúan anaerob, propionát termelő baktérium, melyet rizs ültetvényről izoláltak. Gram negatív rövid pálca, nincsen csillója, nem képez spórát, oxidáz, kataláz negatív, nitrátot nem képes redukálni. Számos cukrot hasznosít,

4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN

és propionátot és acetátot termel fő fermentációs végtermékként, kevés szukcináttal. Az optimális növekedési hőmérséklete 30°C. A 16S rRNS gén szekvenciáján alapuló vizsgálat a Bacteroidetes phylumba sorolta (Ueki et al. 2006).



4.47. ábra. A *Acidovorax* taxonba tartozó szekvencia filogenetikai fán történő ábrázolása

27. csík (4.47. ábra)

99%-s hasonlóságot mutat a *Acidovorax defluvii* BSB411 törzs 16S rRNS génjével. Megtalálható a J18.2/K és J18.2/B DNS alapú mintáiban, illetve a K7/C RNS alapú mintájában. Fries és munkatársai izoláltak *Acidovorax* törzseket, amelyek képesek voltak a TCE bontására, kometabolikusan. Egyes törzsek esetén kimutatták a toluol monooxygenáz gént is (1997). Ugyancsak mutattak ki TCE szennyezés forrásához közel *Acidovorax*-ot és *Methylocystis*-t (Miller et al. 2007).

A kapott eredmények összegzése

A J18.2/K mikrokozmoszban a kiindulási mintához hasonlóan az *Acidovorax* sp. volt a egyetlen és domináns, az ujjenyomat módszerekkel kimutatható törzs. Egy év múlva, a kísérlet végén jelen voltak az *Acidovorax*, a *Clostridium*, a *Pseudomonas* és a *Trichococcus* genuszba tartozó szervezetek. Egy év alatt a mikrokozmoszokban feldúsultak a mikrobák, biomassza növekedés volt tapasztalható, ennek eredményeképpen olyan szervezeteket is ki tudtunk mutatni, amelyek előtte csak nyomokban voltak jelen. Ugyanakkor fontos eredmény, hogy a közösség összetétele jelentősen nem változott, a domináns szervezetek ugyanazok maradtak.

A K7/K mikrokozmoszban az első 54 napon tapasztaltunk jelentős szulfátredukciót és azzal párhuzamosan a VC és a cDCE mennyiségének csökkenését. Az irodalmi adatok alapján valószínűsíthető, hogy a szulfátredukáló szervezetek jelenléte a szulfát redukálása mellett kometabolikus folyamatként a cDCE és a VC redukálását is eredményezi (Smidt és de Vos 2004). A szulfátredukció sebességének növekedése lehet az anaerobitás kialakulásának az eredménye, mely a területen nem valósulhatott meg olyan mértékben, mint a laboratóriumi körülmények között. Az 54. nap után a folyamatok leállnak.

A K7/A és J18.2/A mikrokozmoszokban a folyamatok a biotikus kontrollhoz hasonlóak, a reduktív deklorináció folyamatát nem gyorsította az adalékanyag.

4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN

Az adalékanyagok hatására a biotikus kontrolltól igen eltérő közösség alakult ki, a fő különbség a fermentáló szervezetek aktivitásában mutatkozik meg. A *B* anyaggal kezelt mikrokozmoszban a 318. napon a *Trichococcus* sp. fermentáló anyagcserét folytató és a *Sulfurospirillum multivorans* dehalogénező szervezet is jelen volt.

A *K7/B* kezelés során a reduktív deklorináció folyamatát észleltük, a tipikus anyagcseretermék, a cDCE mennyisége megnövekedett az 54. napra, majd a TCE kiürülése után a 155. napra a vegyület koncentrációja is lecsökkent. A vízkémiai paraméterek alapján látható, hogy a *B* adalékanyag adagolása 0,3-del csökkentette a pH-t, a *B* adalékanyag lassan bontható, fermentatív anyagcseretermékei rövid szénláncú zsírsavak, melyek befolyásolják a pH-t. A *B* anyag fermentációjára utal a TOC fogyás is, mely az elején gyorsabban, majd egyre lassulva történik, majd a 155. napra ki is ürül a mikrokozmoszokból. A TOC csökkenését enyhe késéssel követi a szulfát csökkenése, mely arra utal, hogy a szulfátredukáló szervezetek a *B* összetett vegyületeit nem, de a fermentáció során keletkezett egyszerűbb zsírsavakat már képesek hasznosítani elektrondonorként és szénforrásként. Fontos megjegyezni, hogy ebben az összeállításban a szulfátredukció és a deklorináció párhuzamosan zajlik. A 155. napra elfogy a rendszerből az adalékanyag, mely az összes biológiai folyamat leállításához vezet.

J18.2/B kezelés esetében a deklorináció folyamata a *K7* mikrokozmoszhoz hasonlóan történt, csak sokkal nagyobb mértékben. A pH változása jóval is jelentősebb, mint az előző esetben, 6,2-re csökken az 54. napra. A szulfátredukció folyamata ebben a kísérletben lassú, és csak a TCE kiürülése, az 54. nap után indul meg. A legfontosabb azonban a minimális szervesanyag hasznosítás a mikrokozmoszokban. Az összes paramétert összevetve, a pH csökkenéséből valószínűsíthetően egy nagyon gyors fermentációs folyamat történt a 24-54 nap között, melynek termékei a rövid szénláncú szerves savak. Ezek módosították a pH-t is. Ugyanakkor ezeknek a savaknak a hasznosítása nem történt nagy mennyiségben, valószínűleg a legjelentősebb elektrondonor a molekuláris hidrogén lehetett, mind a deklorináló, mind a szulfátredukáló mikrobák esetében, de még a metanogén szervezetek számára is.

A *K7/C* kezelésnél a TCE ugyancsak redukálódott cDCE-vé, ám a cDCE mennyisége nem csökkent a továbbiakban, tehát a vegyület redukálása megállt. A *C* anyag hatására a pH ugyancsak csökkent, melynek oka lehet a *C* eleve savas kémhatása és a fermentáció együttes hatása. A *C* szerves anyag a 155. napra szintén kiürült, mely a folyamatok leállításához vezetett, de addig is elsősorban a szulfátredukció volt domináns folyamat, és nem a reduktív deklorináció. A szulfátredukció ennél a kezelésnél gyorsabb volt, mint a *B* adalék esetén, melynek elsősorban az lehet az oka, hogy a *C* adalék kitűnő elektrondonor és szénforrás a szulfátredukáló szervezetek számára is.

J18.2/C mikrokozmoszoknál a reduktív deklorináció folyamatának minden fázisa tapasztalható, még etán és etilén képződést is detektáltunk, és szerencsére a VC nem halmozódott fel. A szennyezőanyag kevesebb, mint 10%-a maradt vissza a 155. nap után. Az alacsony szulfát mennyiség a szulfátredukció hatására gyorsan, a 98. napra kiürült. A *C* szervesanyag mennyisége is csak a 98. napig csökkent, utána a folyamat leállt. Feltételezzük, hogy a szervesanyagokat elsősorban a fermentatív és a szulfátredukáló szervezetek hasznosították. A szulfát kiürülése, a pH és feltehetően a redoxpotenciál eltolódása ezeket a folyamatokat lassította, és a deklorináló folyamat maradt csak, mely elsősorban molekuláris hidrogént használ elektrondonornak.

A *C* anyaggal kezelt mikrokozmoszban több fermentációra képes szervezet is jelen volt. A *Clostridium* genusz több törzse is megjelent, a *Leuconostoc* fajok szintén kimutathatóak volt, és a *Trichococcus* sp. sem tűnt el a kezelés hatására. Csak ebben a mikrokozmoszban volt jelen a c10 klón. Szerepéről nem sokat tudunk, ugyanis eddig még nem vonták tenyésztésbe, de a csoportot

4.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN

mostanában kezdik mélyebben leírni. Ezen kívül szintén megjelent a *Sulfurospirillum multivorans* is.

Mindezek a biológiai változások alátámasztják a kémiai eredményeket. Feltételezzük, hogy a nagy mennyiségű szerves adalékanyagot gyorsan elkezdték bontani a jelenlévő aerob mikroorganizmusok, amely következtében elfogyott az oxigén és lecsökkent a redoxpotenciál. Mivel a rendszer zárt, ezért nincs oxigén utánpótlás. Ezt követően anaerob folyamatok indultak be. Első lépésként az adagolt szervesanyag fermentálása történt meg, mely következtében molekuláris hidrogén, valamint szerves savak termelődtek. Utóbbiak okozhatták a pH csökkenését már az 54. napon a kezelt mikrokozmoszokban.

A *B* és a *C* adalékanyag-kezelés hatására más mikrobaközösség alakult ki, bizonyos szervezetek csak egyik illetve másik típusú mikrokozmoszban voltak jelen. A mikrokozmoszok hatékonysága is különbözött, a *C* kezelt kísérletben gyorsabban bomlott le eténig illetve etánig a szennyezés. Ez magyarázható azzal, hogy a két adalékanyagot a mikrobák másképpen hasznosítják, illetve más mikrobák hasznosítják és emiatt eltérő anyagcsere-termékek keletkezhetnek.

4.4 Új tudományos eredmények

1. Tizenöt baktériumtörzset azonosítottunk, majd meghatároztuk, hogy milyen aromás szénhidrogéneket képesek egyedüli szénforrásként hasznosítani. Ugyancsak vizsgáltuk gázolajbontó képességüket a széndioxid termelés mérésével.
2. Kimutattuk, hogy a hidroxipropil- β -ciklodextrin egyaránt gyorsítja és serkenti a gázolaj bontását az *Acinetobacter calcoaceticus* SM5T4-nél és a szennyezett területről származó mikrobaközösségnél. Megállapítottuk, hogy a hidroxipropil- β -ciklodextrin adagolása növeli a benzol és toluol bonthatóságát is az *Acinetobacter calcoaceticus* SM5T4 törzsnél.
3. A C adalékanyag serkentette a legjobban a triklóretilén lebontását a laboratóriumi mikrokozmosz kísérletek során, így a TCE az 54. napra kiürült; az anyag tehát alkalmas lehet terepi viszonyok között történő felhasználásra is.
4. Klórozott alifás szénhidrogénnel szennyezett területek mikrobaközösségének diverzitásvizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a mikrobaközösség összetétele a területre jellemző kémiai paraméterekkel szoros összefüggést mutat.
5. Megállapítottuk, hogy – a katekol 1,2 dioxigenáz enzim diverz jellege miatt – nem lehet általános, minden baktérium enzimjének kimutatására alkalmas primert tervezni, ezért célzottan a *Pseudomonas*, az *Acinetobacter* és a *Rhodococcus* nemzetség enzimjének kimutatására alkalmas primereket terveztünk.
6. A dehalorespiráló szervezetek mellett a fermentáló szervezetek is fontos szerepet játszanak a halogénezett szénhidrogének lebontásában, mert az összetett szerves anyagokat azok alakítják át a dehalorespiráló szervezetek számára felvehető formájú vegyületekké.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Számos mikrobacsoport képes xenobiotikumok bontására. A közösségek melyek megfelelő támogatása és tápanyaggal történő ellátása hozzájárulhat a szennyezőanyagok koncentrációjának jeles csökkenéséhez.

A szénhidrogén-szennyezett területekről származó minták csíraszám becslései arra engednek következtetni, hogy bizonyos koncentráció alatt a gázolaj akár serkentőleg is hat a mikrobaközösségek növekedésére. Adott koncentráció feletti értéknél a csíraszám csökkenését tapasztaltuk, melynek oka lehet többek között a gázolaj alkotók toxikus hatása, vagy az oldott oxigén mennyiségének csökkenése is. Hasonló eredményeket már többször leírtak a szakirodalomban is (Singh és Ward 2004).

A különböző izolált és azonosított törzsek tulajdonságai arra utalnak, hogy a terület bennszülött mikrobiótája képes a szennyező anyag eltávolítására. Ezt támasztják alá azok a laboratóriumi kísérleti eredmények is, melyekkel a szénhidrogén-bontó törzseket tovább jellemeztük. Az OxiTop respirometrikus mérőrendszerrel végzett vizsgálatok során a csoportrepresentáns törzsek kétharmada képes volt növekedni, és aktív anyagcserét folytatott, ha szénforrásként gázolajat adagoltunk. Ilyen törzsek voltak a 15/I (*Alcaligenes* sp.); az SM5T4 (*Acinetobacter calcoaceticus*); a 6/III (*Rhodococcus erythropolis*); a 3/IV (*Pseudomonas stutzeri*); a 36/III (*Microbacterium* sp.), a 9/V (*Xanthomonas* sp.), és a 4/III (*Stenotrophomonas maltophilia*).

A gázolajat bontani képes törzsek közül a benzolt és a toluolt mindegyik mikroba szénforrásként tudta hasznosítani. A xilolokat szintén minden törzs képes volt lebontani a 15/I (*Alcaligenes* sp.) kivételével. A fenolnál és a klórozott aromás vegyületeknél már nem volt ennyire egyöntetű az eredmény, de pl. a 6/III (*Rhodococcus erythropolis*) az összes klórozott aromás vegyületet képes volt bontani.

Ahhoz azonban, hogy bármely terület bennszülött mikrobiótájának lebontóképességét is felmérhessük, olyan diagnosztikai módszerekre van szükség, melyekkel a mikrobák aktivitása könnyen és megbízhatóan megvizsgálható. Az aromás vegyületeket bontani képes mikrobacsoportok vizsgálatára kidolgoztunk egy olyan módszert, amellyel enzimaktivitás vizsgálat során meghatározható az aktivált anyagcsere útvonal, és az, hogy a vizsgált izolátum hogyan bontja a szennyező anyagot adott referencia törzsekhez képest. A tenyésztéses módszer alternatívájaként pedig molekuláris biológiai technikára (PCR) alapozva sikerült olyan vizsgálatokat tervezni, amellyel a fő nemzetségek közül (*Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*) tenyésztés nélkül is könnyen megállapítható, hogy melyik van jelen a területen. A kimutatott gének bázissorrendjének megállapításával pedig arra a következtetésre jutottunk, hogy ezek a gének elsősorban kromoszómálisan lehetnek kódolva. Ha a horizontális géntranszfer játszana döntő szerepet a gének terjedésében, a 16S rDNS és a katabolikus gének szekvencia-adatai alapján kapott filogenetikai fák felépítése nem lenne ennyire hasonló. A kimutatott gén kromoszómális elhelyezkedése eltér azoktól a génektől, melyek számos xenobiotikum lebontását katalizáló enzimért felelősek. E gének ugyanis plazmidon kódoltak és horizontális géntranszferrel terjednek (Sørensen et al. 2005). A vizsgált gének kromoszómális elhelyezkedésének oka az lehet, hogy a baktériumok anyagcseréjében természetes körülmények között előforduló aromás vegyületek is – pl. membránalkotó szteroidok, vagy a humusz különböző bontási stádiumában felszabaduló anyagok – szénforrásként hasznosulnak (Lovley et al. 1996, Coates et al. 2002).

Az izolátumok jellemzése után részletes vizsgálatokba kezdtünk, hogy a HPCD mint felületaktív tulajdonságokkal rendelkező anyag, képes-e a szénhidrogén bontásának serkentésére, és vajon csak gyorsítja-e a folyamatot, vagy növelni tudja a lebontott mennyiséget is.

A 3:1 mólarányban alkalmazott ciklodextrin gátolta az olaj lebontását. A 2:1 arányban történő

alkalmazás a hatékonyságot nem, viszont a bontás kezdeti sebességét jelentősen megnövelte. A legnagyobb hatékonyság-növekedést a ciklodextrin 1:2 és 1:0,5 arányú alkalmazásakor értük el. A különböző arányok alkalmazásának egyidejű sikeressége feltehetően azzal magyarázható, hogy a két esetben a CD más típusú molekulákkal is zárványkomplexeket képzett. A HPCD máshogy képes zárványkomplexet képezni például a monoaromás és a poliaromás vegyületekkel (Szejtli 1988), azonban e feltételezést számos további vizsgálattal kell még alátámasztani.

A dúsító kultúrák csak egy vagy nagyon kevés mikrobátípust eredményeznek, és általában a gyorsan növekvőket szelektálják. A nagy szubsztrát koncentráció hatására – mely gyakori a dúsító tenyészetekben – a nagyobb növekedési rátával rendelkező szervezetek a lassan növekvőket elnyomják (Dunbar et al. 1997). Erre világít rá az általunk a gázolaj bontási vizsgálatok során kapott eredmény is, mely szerint a gázolaj-tartalmú dúsító tápoldatban fenntartott közösségben egy, a gázolaj bontására képes mikroba (*Pseudomonas aeruginosa*) erősen elszaporodott.

A gázolaj bontásának serkentése kétféleképpen is elérhető: (i) felületaktív anyagok segítik a gázolaj vizes fázisba jutását, így a sejtek által történő felvételét, (ii) vagy nagyobb mennyiségű biomassa elérésével, mely fajlagosan nagyobb lebontó kapacitással rendelkezik. A fentieket tekintetbe véve a mikrokozmosz vizsgálatokat háromféle adalékanyaggal állítottuk be: (i) A HPCD előzetes vizsgálataink és irodalmi adatok alapján felületaktív anyagként szerepelhet, (ii) a Tween 80 felületaktív hatása ismert, bontásának képessége számos mikrobacsoport esetében ismert, a fajmeghatározás során is rendszeresen használt fenotipikai bélyeg (Brenner et al. 2005), (iii) a keményítő a HPCD-hez hasonlóan glükóz polimer, ezért szénforrásként hasznosulhat, de felületaktív hatása nincs.

A közösségi vizsgálatoknál tehát a HPCD hatékonyságát összevetettük más, általánosan elterjedt felületaktív anyag, a Tween 80 hatékonyságával is. Megállapítottuk, hogy a Tween 80 elsődleges szénforrásként hasznosult, mivel a gázolaj bontásának lassulását eredményezte. Feltételezhető, hogy a közösség a Tween 80-t részesítette előnyben szénforrásként. A keményítő azonban alternatív szénforrásként sem hasznosult, mert keményítővel beállított mikrokozmoszokban a gázolaj bontásának aránya nem tért el a kontrolltól.

A klórozott szénhidrogének okozta szennyeződések biológiai kármentesítése többek között azért jelent komoly kihívást a szakemberek számára, mert az ilyen típusú szennyezéseket hatékonyan bontani képes mikrobák közül számos anaerob anyagcserét folytat, és tenyésztése, valamint vizsgálata is igen nehézkes és időigényes. Ezért elsőként egy olyan molekuláris módszert dolgoztunk ki, amellyel a szennyezett területekről származó mintákból rutinszerűen lehet kimutatni a reduktív deklorinálásra jellemző szervezeteket, mint amilyen a *Dehalococcoides sp.*, a *Dehalobacter restrictus* és a *Desulfuromonas chloroethenica*. Ennek a vizsgálati módszernek a segítségével megállapítottuk, hogy azokon a területeken, ahol bomlástermékeket már a kiindulási mintában nagyobb mennyiségben tudtunk detektálni, ott több típusú és több kútból származó dehalorespiráló szervezetet tudtunk kimutatni, mint az aktív bontásra nem utaló minták esetében.

Az általunk is vizsgált mikrobákról mára már tudott (Smidt és de Vos 2004), hogy csak egyszerű szerves vegyületeket, és/vagy molekuláris hidrogént fogadnak el elektrondonorként. Ezért feltételeztük, hogy a területen található mikrobaközösség más tagjai – melyek ezeket az egyszerű vegyületeket anyagcseréjük során előállítják – is befolyásolhatják a bontási folyamatok hatékonyságát. Ennek vizsgálatára különböző adalékanyagokkal mikrokozmosz kísérleteket állítottunk be.

A mikrokozmosz kísérletek legfontosabb eredménye, hogy bizonyította a helyszíni beavatkozások létjogosultságát. A három választott adalékanyagból kettő, melyek összetettebb szervesanyag keverékkel rendelkeztek, mindkét mintánál képesek voltak a bomlási folyamatok megindítására. A

két minta között a legfontosabb különbség a szulfátkoncentráció nagysága volt. Ennek következtében a két mintánál a bomlási folyamatok eltértek egymástól. A nagy szulfátkoncentráció elektronakceptort nyújtott a szulfátredukáló szervezeteknek, melyek az adagolt elektrondonor segítségével még aktívabbak lettek, elnyomva a deklorináló baktériumokat. Ugyanakkor a szulfát hiánya esetén a deklorináló szervezetek el tudtak szaporodni, mert az elektrondonorokként szolgáló szerves anyagokat más nem hasznosította (Révész et al. 2006). A deklorináló szervezetek másik kompetitív csoportja, a metanogének, elsősorban molekuláris hidrogént használnak elektrondonorként (Zinder 1993), a metán képződése azonban csak a bontási folyamatok megindulása után volt tapasztalható, ezért valószínűsíthető, hogy az adagolt szerves anyagból molekuláris hidrogén csak később keletkezett megfelelő mennyiségben.

A működő mikrokozmoszoknál részletes közösségi elemzést is végeztünk. Általánosságban elmondható, hogy a beavatkozás hatására a közösség szerkezete minden esetben jelentősen átalakult. Az adalékanyagok hatására a fermentatív anyagcserét folytató, az összetett szénforrásokat lebontó mikrobacsoportok kerültek előtérbe (pl. *Leuconostoc*, *Trichococcus*, *Clostridium*, *Acidaminococcaceae*). A két különböző helyről származó mintákból összeállított, azonos anyaggal kezelt mikrokozmoszok baktériumközössége azonban nem azonos módon változott. Sőt, kifejezetten kevés olyan adatot kaptunk a különböző közösségi vizsgálatokból, mely arra utalna, hogy ugyanazok a fajok lennének jelen a mintákban. A kapott eredmények a következőképpen értelmezhetők: a deklorinációs folyamatok megindulásához, a dehalorespiráló szervezetek aktiválásához egyszerű szerves savakra és molekuláris hidrogénre van szükség. Ezeket az összetett szerves vegyületekből a fermentációra képes szervezetek különböző anyagcsere útvonalakon állítják elő. A fermentációt végző mikrobacsoportok azonban egymással helyettesíthetők, rendszertani besorolásuk a folyamat szempontjából irreleváns. Az eredeti, bennszülött mikrobióta meghatározza ugyan, hogy mely fermentáló baktériumok képesek az adalékanyag hatására elszaporodni, de ez a biodegradáció folyamatának sikerét nem befolyásolja. Kérdés, hogy a fermentáció végterméke, mely a környezetben feldúsul, hogyan befolyásolja a lebontási folyamatokat. Feltehetően ennek nagyobb szerepe van a TCE sikeres lebontásában, hiszen a dehalorespiráló szervezetek a lehetséges elektrondonorok csak szűk spektrumát képesek hasznosítani, azonban ennek bizonyítása további vizsgálatokat igényel.

A munka további fontos eredményként rávilágított arra, hogy a szennyezett területeken számos olyan mikrobatorzs, illetve faj él, amelynek még közeli rokonát sem vonták tenyésztésbe. Ez két dologra hívja fel a figyelmet: egyrészt a mikroorganizmusoknak még mindig csak nagyon kis hányadát vontuk tenyésztésbe, a részletes vizsgálatok (pl. anyagcsere-folyamatok) viszont ezeken alapulnak; másrészt, az olyan, toxikusnak tekintett élettereknek is lehet aktív anyagcserét folytató mikrobiótája, mint pl. a triklóretilén szennyezett talaj.

A továbblépés lehetőségei

- Érdemes megvizsgálni, hogy a ciklodextrinek, mint felületaktív anyagok serkenteni tudják-e a TCE bontását, hiszen a klórozott alifás szénhidrogének vízzoldékonysága gyakran limitáló tényező a remediációs folyamatokban;
- A ciklodextrin hatékonyságának további vizsgálata szükséges akár oszlopkísérletek, akár helyszíni kísérletek keretében. Ugyancsak nagyon hasznos lenne a biológiai folyamatok pontosabb analitikai nyomonkövetése, melyre e dolgozat keretein belül nem nyílt lehetőség;
- A reduktív deklorinációra irányuló vizsgálatok következő lépése két irányban is történhet,
 - egyrészt *in situ* kísérletek beállítása lenne igen hasznos;

-
- másrészt a különböző fermentációs végtermékek pontos hatását mikrobiológiai kísérletek keretében érdemes lehet a későbbi technológiai kérdések megválaszolásához vizsgálni.
 - A redukatív deklorinációban részt vevő enzimek expressziójának részletes vizsgálata választ adhat számos olyan kérdésre, melyre a 16S rRNS alapú vizsgálatokkal nem lehet felelni.
 - Az eddig tenyésztésbe nem volt baktériumok tenyésztése új fajok leírását tenné lehetővé, illetve ennek révén részletesebben lehetne vizsgálni azon anyagcsere folyamatokat, melyek a szennyező anyagok lebontásában részt vesznek.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során rámutattunk, hogy a biostimuláció (adalékanyag adagolása a biológiai bontás serkentése érdekében) hatásos lehet úgy szénhidrogén szennyezések, mind klórozott alifás szénhidrogén szennyezések esetén. Azonban a megfelelő adalékanyag kiválasztásához ismernünk kell azokat a mikrobiológiai folyamatokat, melyek során az adott területen a szennyező anyag lebomlik. Egy gázolajjal szennyezett talajból 36 olyan mikrobát izoláltunk, melyek képesek tolerálni a gázolajat alkotó vegyületek jelenlétét, potenciálisan részt vesznek azok lebontásában, egyszersmind kizárólagos szénforrásként is képesek hasznosítani azokat. Az izolátumokat molekuláris biológiai módszerekkel csoportosítottuk, és egy-egy reprezentáns törzset 16S rDNS génje alapján azonosítottunk. A kiválasztott törzsek gázolajbontó képességét OxiTop respirometrikus rendszerben is megvizsgáltuk, melynek eredménye alapján a törzseket gázolajbontó képességük szerint három nagy csoportba osztottuk. Ezek után megvizsgáltuk, hogy az izolált törzsek közül melyek képesek az aromás vegyületek minél szélesebb körét szénforrásként hasznosítani. A vizsgálat eredménye nagyban megegyezett az irodalomban leírtakkal; sok helyről izoláltak már aromás vegyületeket bontani képes, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, vagy *Alcaligenes* törzseket.

A fontosabb nemzetségek kimutatására kidolgoztunk egy olyan vizsgálati módszert, melynek segítségével el tudjuk dönteni, melyik anyagcsere-útvonal aktiválódik az aromás szennyező molekula hatására. Ez első lépésben enzimaktivitáson alapuló mérést tartalmaz, majd ennek eredményeire alapozva egy molekuláris genetikai módszereken alapuló technikát is kidolgoztunk az aromás vegyületek bontásában döntő szerepet játszó, *Rhodococcus*, *Acinetobacter* és *Pseudomonas* nemzetségek kimutatására.

A szénhidrogének sok esetben azért nem bomlanak le gyorsan, mert a mikrobák nem tudják felvenni őket a nem-vizes fázisból. Ezért olyan vizsgálatokat végeztünk, ahol a tápleveshöz adagolt felületaktív anyaggal (HPCD) serkentettük a gázolaj lebontását. Ehhez első lépésként megvizsgáltuk, hogy az *Acinetobacter calcoaceticus* SM5T4 törzs milyen mértékben képes szénforrásként hasznosítani a HPCD-t, majd különböző arányok beállításával meghatároztuk az ideális (2:1) olaj-CD mólarányt is. A sikeres eredmények alapján mikrobiális közösségi vizsgálatokat is végeztünk, ahol a HPCD hatását összehasonlítottuk a Tween 80 felületaktív anyag és a keményítő hatásával. A Tween 80 elsődleges szénforrásként hasznosult, így az olaj lebontását nem segítette. A keményítő jelenléte nem befolyásolta az olaj lebontását. A HPCD valóban számottevő hatást gyakorolt az *Acinetobacter calcoaceticus* SM5T4 törzs BTX-bontó képességére. Ennek részletes vizsgálata során megállapítottuk, hogy a ciklodextrin-adagolás hatására a kontrollhoz képest minden esetben több szénforrás bomlott le, ugyanakkor az egyre növekvő benzol-koncentráció a HPCD-nel kezelt mikrokozmoszokban is csökkenő hatásfokot eredményezett. Ugyanezt a tendenciát tapasztaltuk a toluol vonatkozásában is. A kevert szubsztrátot (benzolt és toluolt együtt) tartalmazó mikrokozmoszokban több benzol bomlott le mint a csak benzolt tartalmazókban, ugyanakkor a lebomlott toluol aránya csökkent.

A halogénezett szénhidrogének biológiai bontásának nyomon követése érdekében olyan módszerre volt szükségünk, mely megbízhatóan felderíti a bontásban résztvevő szervezeteket. Ezért első lépésként a dehalorespiráló szervezetek (*Dehalobacter restrictus*, *Desulfuromonas chloroethenica* és *Dehalococcoides ethenogenes*) molekuláris biológiai módszerekkel történő kimutatását optimalizáltuk. Ezek után megvizsgáltunk öt különböző területet, melyek kémiai paramétereik jelentősen eltértek. Részletes mikrobiológiai vizsgálatok után arra a következtetésre jutottunk, hogy a területek mikrobiológiai összetételét nem elsősorban a szennyezés határozza meg, hanem a terület eredeti geológiai-kémiai tulajdonságai.

A mikrokozmosz-kísérletek célja olyan adalékanyag keresése volt, mellyel a biológiai lebom-

tást serkenteni tudjuk. Az "A" adalékanyaggal kezelt mikrokozmoszokban a folyamatok a biotikus kontrollhoz hasonlóak, a reduktív deklorináció folyamatát ez nem gyorsította. A "B" és a "C" adalékanyag-kezelés hatására más mikrobaközösség alakult ki, bizonyos szervezetek csak egyik illetve másik típusú mikrokozmoszban voltak jelen. A mikrokozmoszok hatékonysága is különbözött, a "C" anyaggal kezelt kísérletben gyorsabban bomlott le eténig illetve etánig a szennyezés. Ez magyarázható azzal, hogy a két adalékanyagot a mikrobák másképpen, illetve egyiket vagy másikat különböző fajok hasznosítják, és emiatt más anyagcseretermékek keletkezhetnek.

A közösségi ujjlenyomat vizsgálatok segítségével megállapítottuk, hogy a mikrobiális közösség jelentősen megváltozik a kezelés hatására, és a közösség új szerkezetét az adalékanyag típusa is befolyásolja. A dehalorespiráló szervezetek közül a mikrokozmoszokban a különböző időpontokban vett mintákból a *Dehalobacter restrictus*, a *Desulfuromonas chloroethenica* és a *Dehalococcoides ethenogenes* fajokat sikerült kimutatni, hol egyszerre, hol a fentiek némelyikét. Sőt, a J18.2/C mikrokozmoszban a *Sulfurospirillum* nemzetséghez tartozó, deklorinációra képes törzset is sikerült kimutatni a közösségi vizsgálatok során. A kémiai és biológiai vizsgálatok alapján azonban a dehalorespiráló szervezetek mellett jelentős szerepük van a fermentáló szervezeteknek is, hiszen ezek azok, melyek az összetett elektrondonorokat egyszerűbb, a dehalorespirálók számára felvehető formájú molekulákká alakítják. A mikrokozmoszokban számos, valószínűsíthetően fermentációs anyagcserét folytató, eddig tenyésztésbe nem vont szervezetet mutattunk ki.

SUMMARY

It has been emphasized in this study that biostimulation (supply of additives enhancing biological decomposition) can be an effective way of eliminating both hydrocarbon and chlorinated aliphatic hydrocarbon contaminations. However, when choosing the applicable additive, microbiological processes involved in the decomposition of contaminants on a given site have to be known.

Thirty-six microbial strains were isolated from a gasoline-contaminated soil, being tolerant to gasoline compounds (such as benzene and toluene) and potentially taking part in their decomposition, as well as being able to use them as sole carbon source. Isolates were grouped by molecular biological methods and a representative from each group was identified on the basis of its 16S rDNA gene.

Gasoline degrading ability of the selected strains was investigated also in OxiTop respirometric system, based on which result the strains were separated into three main groups.

Thereafter, isolated strains were investigated based on their capacity of utilizing the wider range of aromatic compounds as sole carbon source. Results corresponded well to the literature cited; inasmuch as *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas* and *Alcaligenes* strains isolated from many sites were able to degrade aromatic compounds.

For detection of the genera of major importance, a new method was developed that allows the identification of the metabolic pathway activated in response to the aromatic contaminant molecule; comprising (i) a measurement of enzymatic activity, and upon those result a (ii) technique based on molecular genetic methods, detecting those *Rhodococcus*, *Acinetobacter* and *Pseudomonas* genera which play a key role in the degradation of aromatic compounds. Using this latter technique, the range of aromatic compound degrading strains can be determined.

In many cases hydrocarbons break down slowly, because the microbes can not take them up from the non-aqueous phase, therefore a surfactant (HPCD) was added to the broth (growth medium) in order to improve gasoline degradation. As a first step of achieving this, (i) *Acinetobacter calcoaceticus* SM5T4 strain was tested for capacity of utilizing HPCD as a sole carbon source, and then (ii) through setting up different proportions, the applicable (2:1) oil-cyclodextrin molar ratio was determined.

Based on the results, microbial community analyses were also performed, where the effects of HPCD and Tween 80 surfactants, as well as those of starch were compared, respectively. Tween 80 was utilized as primary carbon source, thus it did not help the degradation of oil, while the presence of starch had not any influence on the degradation.

HPCD indeed took a notable effect on the benzene- and toluene-degrading capacity of *Acinetobacter calcoaceticus* SM5T4 strain. Detailed investigation affirmed that cyclodextrin addition caused increased degradation of carbon sources in each case compared to the control, although increasing benzene concentration resulted decreased efficiency of decomposition even in case of HPCD-treated microcosms. The same tendency was experienced also with toluene. In the microcosms comprising mixed substrate (benzene and toluene together), there was more benzene degraded than in those comprising benzene only, at the same time the proportion of degraded toluene decreased.

Monitoring of biological degradation of halogenated hydrocarbons required a reliable method for the exploration of micro-organisms taking part in the decomposition. Thus, in the first step molecular biological methods detecting dehalorespiring organisms, such as *Dehalobacter restrictus*, *Desulfuromonas chloroethenica* and *Dehalococcoides ethenogenes* were optimized.

Thereafter, five contaminated sites dealing with significantly different chemical parameters were investigated. Detailed microbiological tests led to the conclusion that microbiological com-

position of these sites is primarily characterized by their original geological and chemical nature rather than by the contamination.

The aim of microcosm experiments was to search an additive, which can improve the biological degradation process. In microcosms treated with the "A" additive microbial processes were similar to the biotic control, so dechlorination was not accelerated in this case. There were however different microbial communities grown in response to treatments "B" and "C"; where certain micro-organisms occurred solely in the one or the other type of microcosm, respectively. Degrading efficiency of the microcosms also differentiated; i.e. in case of "C" treatment, a higher rate of contaminant was degraded to ethene and ethane within the same timeframe, respectively. It can be interpreted that microbes utilize the two additives on different ways or the one and the other is consumed by diverse species respectively, therefore different metabolites can be evolved.

Based on the community fingerprint analyses it was established that microbial community had been significantly altered by the treatments and the new structure of the community was influenced also by the type of additive. Among dehalorespiring organisms in the microcosms, *Dehalobacter restrictus*, *Desulfuromonas chloroethenica* and *Dehalococcoides ethenogenes* species were detected in the samples during the study; being taken either all or some of them at the same time. Moreover, in the microcosm J18.2/C, a strain belonging to the genus *Sulfurospirillum* was also identified, which was earlier described in the literature as taking part in dechlorination processes.

However, based on the chemical and biological investigations, beside the dehalorespiring micro-organisms, there are fermentative ones also playing an important role, since these latter transform the complex electron donors into simpler molecule forms, which can be taken up by dehalorespiring microbes. In the microcosms, a number of those microorganisms were detected, which presumably deal with fermentative metabolism and have not been cultured before.

IRODALOMJEGYZÉK

- Aeckersberg, F., Bak, F. és Widdel, F.: 1991, Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium, *Archives of Microbiology* **156**(1), 5–14.
- Aeckersberg, F., Rainey, F. és Widdel, F.: 1998, Growth, natural relationships, cellular fatty acids and metabolic adaptation of sulfate-reducing bacteria that utilize long-chain alkanes under anoxic conditions, *Archives of Microbiology* **170**(5), 361–369.
- Aislabie, J., Foght, J. és Saul, D.: 2000, Aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from soil near Scott Base, Antarctica, *Polar Biology* **23**(3), 183–188.
- Alexander, M.: 1965, Biodegradation: problems of molecular recalcitrance and microbial fallibility., *Advances in Applied Microbiology* **7**, 35–80.
- Alexander, M.: 1999, *Biodegradation and bioremediation.*, Academic Press.
- Alvarez-Cohen, L. és McCarty, P.: 1991, Effects of toxicity, aeration, and reductant supply on trichloroethylene transformation by a mixed methanotrophic culture., *Applied and Environmental Microbiology* **57**(1), 228–235.
- Alvarez, P. és Vogel, T.: 1991, Substrate interactions of benzene, toluene, and para-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries., *Applied and Environmental Microbiology* **57**(10), 2981–2985.
- Amann, R., Ludwig, W. és Schleifer, K.: 1995, Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **59**(1), 143–169.
- Anderson, J. és McCarty, P.: 1997, Transformation yields of chlorinated ethenes by a methanotrophic mixed culture expressing particulate methane monooxygenase, *Applied and Environmental Microbiology* **63**(2), 687–693.
- Atlas, R.: 1981, Bioremediation of petroleum hydrocarbons, *Microbiology Reviews* **45**, 180–209.
- Atlas, R. és Philp, J.: 2005, *Bioremediation. Applied microbial solutions for real-world environmental cleanup*, ASM Press Washington.
- Baedecker, M., Cozzarelli, I., Eganhouse, R., Siegel, D. és Bennett, P.: 1993, Crude oil in a shallow sand gravel aquifer. III. Biogeochemical reactions and mass balance modeling in anoxic groundwater, *Applied Geochemistry* **8**(6), 569–586.
- Baena, S., Fardeau, M., Labat, M., Ollivier, B., Garcia, J. és Patel, B.: 2000, *Aminobacterium mobile* sp. nov., a new anaerobic amino-acid-degrading bacterium, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**(1), 259–264.
- Baker, R., Baehr, A. és Lahvis, M.: 2000, Estimation of hydrocarbon biodegradation rates in gasoline-contaminated sediment from measured respiration rates, *Journal of Contaminant Hydrology* **41**(1-2), 175–192.
- Ballerstedt, H., Hantke, J., Bunge, M., Werner, B., Gerritse, J., Andreesen, J. és Lechner, U.: 2004, Properties of a trichlorodibenzo-p-dioxin-dechlorinating mixed culture with a *Dehalococcoides* as putative dechlorinating species, *FEMS Microbiology Ecology* **47**(2), 223–234.
- Balogh, K., Szaniszló, N., H-Otta, K. és Fenyvesi, É.: 2007, Can cyclodextrins really improve the selectivity of extraction of BTEX compounds?, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **57**(1), 457–462.

- Bar, R.: 1990, A new cyclodextrin-agar medium for surface cultivation of microbes on lipophilic substrates, *Applied Microbiology and Biotechnology* **32**(4), 470–472.
- Bej, A., Saul, D. és Aislabie, J.: 2000, Cold-tolerant alkane-degrading *Rhodococcus* species from Antarctica, *Polar Biology* **23**(2), 100–105.
- Bender, H.: 1993, Purification and characterization of a cyclodextrin-degrading enzyme from *Flavobacterium* sp., *Applied Microbiology and Biotechnology* **39**(6), 714–719.
- Borden, R. és Rodriguez, B.: 2006, Evaluation of slow release substrates for anaerobic bioremediation, *Bioremediation Journal* **10**(1), 59–69.
- Bouwer, E.: 1994, *Bioremediation of chlorinated solvents using alternate electron acceptors*, CRC Press.
- Boyd, C., Larkin, M., Reid, K., Sharma, N. és Wilson, K.: 1997, Metabolism of naphthalene, 1-naphthol, indene, and indole by *Rhodococcus* sp. strain NCIMB 12038, *Applied and Environmental Microbiology* **63**(1), 151–155.
- Bradford, M. et al.: 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* **72**(1), 248–254.
- Bradley, P.: 2003, History and ecology of chloroethene biodegradation: A review, *Bioremediation Journal* **7**(2), 81–109.
- Bradley, P., Chapelle, F. és Lovley, D.: 1998, Humic acids as electron acceptors for anaerobic microbial oxidation of vinyl chloride and dichloroethene, *Applied and Environmental Microbiology* **64**(8), 3102–3105.
- Brenner, D., Krieg, N., Staley, J. et al.: 2005, *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Springer.
- Breuil, C. és Kushner, D.: 1980, Effects of lipids, fatty acids, and other detergents on bacterial utilization of hexadecane., *Canadian Journal of Microbiology* **26**(2), 223–31.
- Briones, A. és Raskin, L.: 2003, Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability, *Current Opinion in Biotechnology* **14**(3), 270–276.
- Brosius, J., Palmer, M., Kennedy, P. és Noller, H.: 1978, Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 75, National Acad Sciences, pp. 4801–4805.
- Brusseau, M., Wang, X. és Hu, Q.: 1994, Enhanced transport of low-polarity organic compounds through soil by cyclodextrin, *Environmental Science & Technology* **28**(5), 952–956.
- Bury, S. és Miller, C.: 1993, Effect of micellar solubilization on biodegradation rates of hydrocarbons, *Environmental Science & Technology* **27**(1), 104–110.
- Cerniglia, C.: 1992, Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Biodegradation* **3**(2), 351–368.
- Chapelle, F. és Bradley, P.: 1996, Microbial acetogenesis as a source of organic acids in ancient Atlantic Coastal Plain sediments, *Geology* **24**(10), 925–928.
- Chauhan, S., Barbieri, P. és Wood, T.: 1998, Oxidation of trichloroethylene, 1, 1-dichloroethylene, and chloroform by toluene/o-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1, *Applied*

- and *Environmental Microbiology* **64**(8), 3023–3024.
- Coates, J., Cole, K., Chakraborty, R., O'Connor, S. és Achenbach, L.: 2002, Diversity and ubiquity of bacteria capable of utilizing humic substances as electron donors for anaerobic respiration, *Applied and Environmental Microbiology* **68**(5), 2445–2452.
- Cole, J., Fathepure, B. és Tiedje, J.: 1995, Tetrachloroethene and 3-chlorobenzoate dechlorination activities are co-induced in *Desulfomonile tiedjei* DCB-1, *Biodegradation* **6**(2), 167–172.
- Cupples, A., Spormann, A. és McCarty, P.: 2003, Growth of a *Dehalococcoides*-like microorganism on vinyl chloride and cis-dichloroethene as electron acceptors as determined by competitive PCR, *Applied and Environmental Microbiology* **69**(2), 953–959.
- Davis, J., Odom, J., DeWeerd, K., Stahl, D., Fishbain, S., West, R., Klecka, G. és DeCarolis, J.: 2002, Natural attenuation of chlorinated solvents at Area 6, Dover Air Force Base: characterization of microbial community structure, *Journal of Contaminant Hydrology* **57**(1-2), 41–59.
- de Jong, R. és Dijkstra, B.: 2003, Structure and mechanism of bacterial dehalogenases: different ways to cleave a carbon–halogen bond, *Current Opinion in Structural Biology* **13**(6), 722–730.
- Deeb, R. és Alvarez-Cohen, L.: 1999, Temperature effects and substrate interactions during the aerobic biotransformation of BTEX mixtures by toluene-enriched consortia and *Rhodococcus rhodochrous*., *Biotechnology and Bioengineering* **62**(5), 526–536.
- Dennis, P., Sleep, B., Fulthorpe, R. és Liss, S.: 2003, Phylogenetic analysis of bacterial populations in an anaerobic microbial consortium capable of degrading saturation concentrations of tetrachloroethylene, *Canadian Journal of Microbiology* **49**(1), 15–27.
- DeWeerd, K., Mandelco, L., Tanner, R., Woese, C. és Suflita, J.: 1990, *Desulfomonile tiedjei* gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate-reducing bacterium, *Archives of Microbiology* **154**(1), 23–30.
- Díaz, E.: 2004, Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility, *International Microbiology* **7**(3), 173–180.
- Dibble, J. és Bartha, R.: 1979, Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge, *Applied and Environmental Microbiology* **37**(4), 729–739.
- Duetz, W., Marques, S., de Jong, C., Ramos, J. és van Andel, J.: 1994, Inducibility of the TOL catabolic pathway in *Pseudomonas putida* (pWW0) growing on succinate in continuous culture: evidence of carbon catabolite repression control., *Journal of Bacteriology* **176**(8), 2354–2361.
- Dunbar, J., White, S. és Forney, L.: 1997, Genetic diversity through the looking glass: effect of enrichment bias, *Applied and Environmental Microbiology* **63**(4), 1326–1331.
- Dutta, T. és Harayama, S.: 2001, biodegradation of n-alkylcycloalkanes and n-alkylbenzenes via new pathways in *Alcanivorax* sp. strain MBIC 4326, *Applied and Environmental Microbiology* **67**(4), 1970–1974.
- Efroymsen, R. és Alexander, M.: 1994, Role of partitioning in biodegradation of phenanthrene dissolved in nonaqueous-phase liquids, *Environmental Science & Technology* **28**(6), 1172–1179.
- Einsele, A., Schneider, H. és Fiechter, A.: 1975, Characterization of microemulsions in a hydrocarbon fermentation by electron microscopy, *Journal of Fermentation Technology* **53**, 241–243.
- EPA: 1998, Technical protocol for evaluating natural attenuation of chlorinated solvents in ground

- water. important processes affecting the rate and transport of organic compounds in the subsurface; epa/600/r-98/128.
- EUSTAT: 2006.
url: <http://epp.eurostat.ec.europa.eu>
- Evans, W.: 1947, Oxidation of phenol and benzoic acid by some soil bacteria, *Biochemistry Journal* **41**, 373–382.
- Farhadian, M., Vachelard, C., Duchez, D. és Larroche, C.: 2007, In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: A review, *Bioresource Technology* **99**(13), 5296–5308.
- Fathepure, B. és Boyd, S.: 1988, Dependence of tetrachloroethylene dechlorination on methanogenic substrate consumption by *Methanosarcina* sp. strain DCM., *Applied and Environmental Microbiology* **54**(12), 2976–2980.
- Fava, F.: 2002, Effects of randomly methylated- β -cyclodextrins (RAMEB) on the bioavailability and aerobic biodegradation of polychlorinated biphenyls in three pristine soils spiked with a transformer oil, *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**(3), 393–399.
- Fava, F. és Grassi, F.: 1996, Cyclodextrins enhance the aerobic degradation and dechlorination of low-chlorinated biphenyls, *Biotechnology Techniques* **10**(4), 291–296.
- Fava, S., Di Gioia, D., Marchetti, L. és Fenyvesi, E.: 2002, Randomly methylated β -cyclodextrins (RAMEB) enhance the aerobic biodegradation of polychlorinated biphenyl in aged-contaminated soils, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **44**(1), 417–421.
- Fedorak, P. és Westlake, D.: 1981a, Degradation of aromatics and saturates in crude oil by soil enrichments, *Water, Air, & Soil Pollution* **16**(3), 367–375.
- Fedorak, P. és Westlake, D.: 1981b, Microbial degradation of aromatics and saturates in prudhoe bay crude oil as determined by glass capillary gas chromatography, *Canadian Journal of Microbiology* **27**(4), 432–443.
- Feist, C. és Hegeman, G.: 1969, Phenol and benzoate metabolism by *Pseudomonas putida*: Regulation of tangential pathways, *Journal of Bacteriology* **100**(2), 869–877.
- Fennell, D., Gossett, J. és Zinder, S.: 1997, Comparison of butyric acid, ethanol, lactic acid, and propionic acid as hydrogen donors for the reductive dechlorination of tetrachloroethene, *Environmental Science & Technology* **31**, 918–926.
- Fenyvesi, E., Gruiz, K., Verstichel, S., De Wilde, B., Leitgib, L., Csabai, K. és Szaniszló, N.: 2005, Biodegradation of cyclodextrins in soil, *Chemosphere* **60**(8), 1001–1008.
- Fetzner, S.: 1998, Bacterial dehalogenation, *Applied Microbiology and Biotechnology* **50**(6), 633–657.
- Fischer-Romero, C., Tindall, B. és Jüttner, F.: 1996, *Tolomonas auensis* gen. nov., sp. nov., a toluene-producing bacterium from anoxic sediments of a freshwater lake, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **46**(1), 183–188.
- Francois, A., Mathis, H., Godefroy, D., Piveteau, P., Fayolle, F. és Monot, F.: 2002, Biodegradation of methyl tert-butyl ether and other fuel oxygenates by a new strain, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012, *Applied and Environmental Microbiology* **68**(6), 2754–2762.
- Freeborn, R., West, K., Bhupathiraju, V., Chauhan, S., Rahm, B., Richardson, R. és Alvarez-Cohen,

- L.: 2005, Phylogenetic analysis of TCE-dechlorinating consortia enriched on a variety of electron donors, *Environmental Science & Technology* **39**(21), 8358–8368.
- Fries, M., Forney, L. és Tiedje, J.: 1997, Phenol-and toluene-degrading microbial populations from an aquifer in which successful trichloroethene cometabolism occurred, *Applied and Environmental Microbiology* **63**(4), 1523–1530.
- Galushko, A., Minz, D., Schink, B. és Widdel, F.: 1999, Anaerobic degradation of naphthalene by a pure culture of a novel type of marine sulphate-reducing bacterium, *Environmental Microbiology* **1**(5), 415–420.
- Garnier, P., Auria, R., Augur, C. és Revah, S.: 1999, Cometabolic biodegradation of methyl t-butyl ether by *Pseudomonas aeruginosa* grown on pentane, *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**(4), 498–503.
- Geissdorfer, W., Kok, R., Ratajczak, A., Hellingwerf, K. és Hillen, W.: 1999, The Genes rubA and rubB for alkane degradation in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 are in an operon with *estB*, encoding an esterase, and *oxyR*, *Journal of Bacteriology* **181**(14), 4292–4298.
- Gevers, D., Cohan, F., Lawrence, J., Spratt, B., Coenye, T., Feil, E., Stackebrandt, E., Van de Peer, Y., Vandamme, P. és Thompson, F.: 2005, Opinion: Re-evaluating prokaryotic species, *Nature Reviews Microbiology* **3**, 733–739.
- Gibson, D. és Parales, R.: 2000, Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology* **11**(3), 236–243.
- Gill, C. és Ratledge, C.: 1972, Effect of n-alkanes on the transport of glucose in *Candida* sp. strain 107., *Biochemistry Journal* **127**, 59P–60P.
- Goodall, D.: 1978, *Numerical classification*, Dr W. Junk Publisher.
- Goswami, P. és Singh, H.: 1991, Different modes of hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* species., *Biotechnology and Bioengineering* **37**(1), 1–11.
- Goyal, A. és Zylstra, G.: 1996, Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39, *Applied and Environmental Microbiology* **62**(1), 230–236.
- Greene, E., Kay, J., Jaber, K., Stehmeier, L. és Voordouw, G.: 2000, Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons, *Applied and Environmental Microbiology* **66**(12), 5282–5289.
- Gribble, G.: 1994, The natural production of chlorinated compounds, *Environmental Science & Technology* **28**(7), 310–310.
- Habe, H. és Omori, T.: 2003, Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **67**(2), 225–243.
- Hamamura, N., Yeager, C. és Arp, D.: 2001, Two distinct monooxygenases for alkane oxidation in *Nocardioides* sp. strain CF8, *Applied and Environmental Microbiology* **67**(11), 4992–4998.
- Hammer, Ø., Harper, D. és Ryan, P.: 2001, PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis, *Palaeontologia Electronica* **4**(1), 1–9.
- Hardison, L., Curry, S., Ciuffetti, L. és Hyman, M.: 1997, Metabolism of diethyl ether and cometabolism of methyl tert-butyl ether by a filamentous fungus, a *Graphium* sp., *Applied and*

- Environmental Microbiology* **63**(8), 3059–3067.
- Hartmans, S. és De Bont, J.: 1992, Aerobic vinyl chloride metabolism in *Mycobacterium aurum* L1., *Applied and Environmental Microbiology* **58**(4), 1220–1226.
- He, J., Ritalahti, K., Aiello, M. és Löffler, F.: 2003, Complete detoxification of vinyl chloride by an anaerobic enrichment culture and identification of the reductively dechlorinating population as a *Dehalococcoides* species, *Applied and Environmental Microbiology* **69**(2), 996–1003.
- Hegeman, G.: 1966, Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida* I. Synthesis of enzymes by the wild type, *Journal of Bacteriology* **91**(3), 1140–1154.
- Heinaru, E., Truu, J., Stottmeister, U. és Heinaru, A.: 2000, Three types of phenol and p-cresol catabolism in phenol-and p-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds, *FEMS Microbiology Ecology* **31**, 195–205.
- Heipieper, H., Diefenbach, R. és Keweloh, H.: 1992, Conversion of cis unsaturated fatty acids to trans, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity., *Applied and Environmental Microbiology* **58**(6), 1847–1852.
- Heitkamp, M., Freeman, J., Miller, D. és Cerniglia, C.: 1988, Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp.: identification of ring oxidation and ring fission products., *Applied and Environmental Microbiology* **54**(10), 2556–2565.
- Helander, I. M., Haikara, A., Sadovskaya, I., Vinogradov, E. és Salkinoja-Salonen, M. S.: 2004, Lipopolysaccharides of anaerobic beer spoilage bacteria of the genus *pectinatus* - lipopolysaccharides of a gram-positive genus, *FEMS Microbiology Reviews* **28**(5), 543–552.
- Hemme, D. és Foucaud-Scheunemann, C.: 2004, *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods, *International Dairy Journal* **14**(6), 467–494.
- Hendrickson, E., Payne, J., Young, R., Starr, M., Perry, M., Fahnestock, S., Ellis, D. és Ebersole, R.: 2002, Molecular analysis of *Dehalococcoides* 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout North America and Europe, *Applied and Environmental Microbiology* **68**(2), 485–495.
- Holliger, C., Gaspard, S., Glod, G., Heijman, C., Schumacher, W., Schwarzenbach, R. és Vazquez, F.: 1997, Contaminated environments in the subsurface and bioremediation: organic contaminants, *FEMS Microbiology Reviews* **20**(3-4), 517–523.
- Holliger, C., Schraa, G., Stams, A. J. és Zehnder, A. J.: 1992, Enrichment and properties of an anaerobic mixed culture reductively dechlorinating 1,2,3-trichlorobenzene to 1,3-dichlorobenzene., *Applied and Environmental Microbiology* **58**(5), 1636–1644.
- Holliger, C., Wohlfarth, G. és Diekert, G.: 1998, Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria, *FEMS Microbiology Reviews* **22**(5), 383–398.
- Holmes, A., Costello, A., Lidstrom, M. és Murrell, J.: 1995, Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related, *FEMS Microbiology Letters* **132**(3), 203–208.
- Holt, M., Mitchell, G. és Watkinson, R.: 1992, *The environmental chemistry, fate and effects of nonionic surfactants*, Vol. 3, Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH.
- Hopkins, G., Semprini, L. és McCarty, P.: 1993, Microcosm and in situ field studies of enhanced

- biotransformation of trichloroethylene by phenol-utilizing microorganisms., *Applied and Environmental Microbiology* **59**(7), 2277–2285.
- Horváth, S.: 1980, *Mikrobiológiai praktikum*, Tankönyvkiadó.
- Hotelling, H.: 1933, Analysis of a complex of statistical variables into principal components, *Journal of Educational Psychology* **24**(6), 417–441.
- Hugenholtz, P., Tyson, G., Webb, R., Wagner, A. és Blackall, L.: 2001, Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain Bacteria with no known pure-culture representatives, *Applied and Environmental Microbiology* **67**(1), 411–419.
- Hughes, J., Duston, K., Ward, C. C. H., University, R., of Civil, D., Engineering, E. és water Remediation Technologies Analysis Center (US, G.: 2002, *Engineered bioremediation*, Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center.
- Hunter-Cevera, J.: 1998, The value of microbial diversity., *Current Opinion in Microbiology* **1**(3), 278–285.
- IEA, I. E. A.: 2007.
url: <http://www.iea.org>
- Ishiguro, T., Ohtake, Y., Nakayama, S., Inamori, Y., Amagai, T., Soma, M. és Matsusita, H.: 2000, Biodegradation of dibenzofuran and dioxins by *Pseudomonas aeruginosa* and *Xanthomonas maltophilia*, *Environmental Technology* **21**(11), 1309–1316.
- Jacques, R., Okeke, B., Bento, F., Peralba, M. és Camargo, F.: 2007, Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial consortium from a petrochemical sludge land-farming site, *Bioremediation Journal* **11**(1), 1–11.
- Jadoun, J. és Bar, R.: 1993, Microbial transformations in a cyclodextrin medium. Part 3. Cholesterol oxidation by *Rhodococcus erythropolis*, *Applied Microbiology and Biotechnology* **40**(2), 230–240.
- Janssen, D., Oppentocht, J. és Poelarends, G.: 2001, Microbial dehalogenation, *Current Opinion in Biotechnology* **12**(3), 254–258.
- Johnson, B. és Stanier, R.: 1971, Dissimilation of aromatic compounds by *Alcaligenes eutrophus*, *Journal of Bacteriology* **107**(2), 468–475.
- Johnson, E., Smith, C., O'Reilly, K. és Hyman, M.: 2004, induction of methyl tertiary butyl ether (MTBE)-oxidizing activity in *Mycobacterium vaccae* JOB 5 by MTBE, *Applied and Environmental Microbiology* **70**(2), 1023–1030.
- Jordan, A., Harnisch, J., Borchers, R., Le Guern, F. és Shinohara, H.: 2000, Volcanogenic halocarbons, *Environmental Science & Technology* **34**(6), 1122–1124.
- Jung, I. és Park, C.: 2004, Characteristics of *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1 for the biodegradation of benzene, toluene, m-xylene (BTX), and their mixtures, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **97**(6), 429–431.
- Kanally, R. és Harayama, S.: 2000, Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria, *Journal of Bacteriology* **182**(8), 2059–2067.
- Kao, C. és Borden, R.: 1997, Site-specific variability in BTEX biodegradation under denitrifying conditions, *Ground Water* **35**(2), 305–311.

- Kao, C., Chen, S., Wang, J., Chen, Y. és Lee, S.: 2003, Remediation of PCE-contaminated aquifer by an in situ two-layer biobarrier: laboratory batch and column studies, *Water Research* **37**(1), 27–38.
- Kengen, S., Breidenbach, C., Felske, A., Stams, A., Schraa, G. és De Vos, W.: 1999, Reductive dechlorination of tetrachloroethene to cis-1, 2-dichloroethene by a thermophilic anaerobic enrichment culture, *Applied and Environmental Microbiology* **65**(6), 2312–2316.
- Kim, D., Kim, Y., Kim, S., Kim, S., Zylstra, G., Kim, Y. és Kim, E.: 2002, Monocyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by *Rhodococcus* sp. Strain DK17, *Applied and Environmental Microbiology* **68**(7), 3270–3278.
- Kim, S., Song, S., Kim, K., Ho, E. és Oh, K.: 2003, Proteomic analysis of the benzoate degradation pathway in *Acinetobacter* sp. KS-1, *Research in Microbiology* **154**(10), 697–703.
- Klug, M. és Markovetz, A.: 1967, Thermophilic bacterium isolated on n-tetradecane, *Nature* **215**(5105), 1082–1083.
- Kluyver, A. és van Niel, C.: 1956, *The microbe's contribution to biology*, Harvard University Press.
- Koike, K., Ara, K., Adachi, S., Takigawa, H., Mori, H., Inoue, S., Kimura, Y. és Ito, S.: 1999, Regio-specific internal desaturation of aliphatic compounds by a mutant *Rhodococcus* strain, *Applied and Environmental Microbiology* **65**(12), 5636–5638.
- Kostal, J., Suchanek, M., Klierova, H., Demnerova, K., Kralova, B. és McBeth, D.: 1998, *Pseudomonas* C12B, an SDS degrading strain, harbours a plasmid coding for degradation of medium chain length n-alkanes, *International Biodeterioration and Biodegradation* **42**(4), 221–228.
- Kumar, S., Tamura, K. és Nei, M.: 2004, MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment, *Briefings in Bioinformatics* **5**(2), 150–163.
- Lane, D.: 1991, 16S/23S sequencing, *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* pp. 115–175.
- Laurie, A. és Lloyd-Jones, G.: 1999, The *phn* genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism, *Journal of Bacteriology* **181**(2), 531–540.
- Lederberg, J.: 2000, *Encyclopedia of microbiology*, Academic Press, San Diego.
- Lee, M., Gregory, G. és White, D.: 1995, *Surfactant-enhanced anaerobic bioremediation of a carbon tetrachloride DNAPL*, Battelle Press, Columbus.
- Lee, N., Hwang, M., Jung, G., Kim, Y. és Min, K.: 1996, Physical structure and expression of *alkBA* encoding alkane hydroxylase and rubredoxin reductase from *Pseudomonas maltophilia*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **218**(1), 17–21.
- Liu, J. R., Tanner, R. S., Schumann, P., Weiss, N., McKenzie, C. A., Janssen, P. H., Seviour, E. M., Lawson, P. A., Allen, T. D. és Seviour, R. J.: 2002, Emended description of the genus *Trichococcus*, description of *Trichococcus collinsii* sp. nov., and reclassification of *Lactosphaera pasteurii* as *Trichococcus pasteurii* comb. nov. and of *Ruminococcus palustris* as *Trichococcus palustris* comb. nov. in the low-G+C Gram-positive bacteria, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(4), 1113–1126.
- Löffler, F. és Sanford, R.: 2005, Analysis of trace hydrogen metabolism., *Methods in Enzymology*

397, 222–237.

- Löffler, F., Sanford, R. és Tiedje, J.: 1996, Initial characterization of a reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium chlororespirans* Co23, *Applied and Environmental Microbiology* **62**(10), 3809–3813.
- Löffler, F., Sun, Q., Li, J. és Tiedje, J.: 2000, 16S rRNA gene-based detection of tetrachloroethene-dechlorinating *Desulfuromonas* and *Dehalococcoides* species, *Applied and Environmental Microbiology* **66**(4), 1369–1374.
- Löffler, F., Tiedje, J. és Sanford, R.: 1999, Fraction of electrons consumed in electron acceptor reduction and hydrogen thresholds as indicators of halo-respiratory physiology, *Applied and Environmental Microbiology* **65**(9), 4049–4056.
- Loftsson, T., Jarho, P., Másson, M. és Järvinen, T.: 2005, Cyclodextrins in drug delivery, *Expert Opinion on Drug Delivery* **2**(2), 335–351.
- Lovley, D.: 2003, Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation, *Nature Reviews Microbiology* **1**(1), 35–44.
- Lovley, D., Coates, J., Blunt-Harris, E., Phillips, E. és Woodward, J.: 1996, Humic substances as electron acceptors for microbial respiration, *Nature* **382**(6590), 445–448.
- Lowe, M., Madsen, E., Schindler, K., Smith, C., Emrich, S., Robb, F. és Halden, R.: 2002, Geochemistry and microbial diversity of a trichloroethene-contaminated Superfund site undergoing intrinsic in situ reductive dechlorination, *FEMS Microbiology Ecology* **40**(2), 123–134.
- Macbeth, T., Cummings, D., Spring, S., Petzke, L. és Sorenson Jr, K.: 2004, Molecular characterization of a dechlorinating community resulting from in situ biostimulation in a trichloroethene-contaminated deep, fractured basalt aquifer and comparison to a derivative laboratory culture, *Applied and Environmental Microbiology* **70**(12), 7329–7341.
- Maeng, J., Sakai, Y., Tani, Y. és Kato, N.: 1996, Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of n-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp. strain M-1, *Journal of Bacteriology* **178**(13), 3695–3700.
- Mägli, A., Wendt, M. és Leisinger, T.: 1996, Isolation and characterization of *Dehalobacterium formicoaceticum* gen. nov. sp. nov., a strictly anaerobic bacterium utilizing dichloromethane as source of carbon and energy, *Archives of Microbiology* **166**(2), 101–108.
- Maidak, B., Cole, J., Lilburn, T., Parker Jr, C., Saxman, P., Farris, R., Garrity, G., Olsen, G., Schmidt, T. és Tiedje, J.: 2001, The RDP-II (Ribosomal database project), *Nucleic Acids Research* **29**(1), 173–174.
- Manly, B.: 1997, *The bootstrap*, Chapman and Hall, London.
- Männistö, M., Tirola, M., Salkinoja-Salonen, M., Kulomaa, M. és Puhakka, J.: 1999, Diversity of chlorophenol-degrading bacteria isolated from contaminated boreal groundwater, *Archives of Microbiology* **171**(3), 189–197.
- Marchesi, J., Sato, T., Weightman, A., Martin, T., Fry, J., Hiom, S. és Wade, W.: 1998, Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology* **64**(2), 795–799.
- Margesin, R., Labbé, D., Schinner, F., Greer, C. és Whyte, L.: 2003, Characterization of

- hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils, *Applied and Environmental Microbiology* **69**(6), 3085.
- Margesin, R., Zimmerbauer, A. és Schinner, F.: 2000, Monitoring of bioremediation by soil biological activities, *Chemosphere* **40**(4), 339–346.
- Marin, M., Smits, T., van Beilen, J. és Rojo, F.: 2001, The alkane hydroxylase gene of *Burkholderia cepacia* RR10 is under catabolite repression control, *Journal of Bacteriology* **183**(14), 4202–4209.
- Mashreghi, M. és Márialigeti, K.: 2005, Characterization of bacteria degrading petroleum derivatives isolated from contaminated soil and water, *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran* **16**(4), 317–320.
- Massol-Deya, A., Odelson, D., Hickey, R. és Tiedje, J.: 1995, *Bacterial community fingerprinting of amplified 16 S and 16-23 S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA)*, Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, Netherlands.
- Mateles, R., Baruah, J. és Tannenbaum, S.: 1967, Growth of a thermophilic bacterium on hydrocarbons: A new source of single-cell protein, *Science* **157**(3794), 1322.
- Maymo-Gatell, X., Anguish, T. és Zinder, S.: 1999, Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1, 2-dichloroethane by "*Dehalococcoides ethenogenes*" 195, *Applied and Environmental Microbiology* **65**(7), 3108–3113.
- McMahon, P. és Bruce, B.: 1997, Distribution of terminal electron-accepting processes in an aquifer having multiple contaminant sources, *Applied Geochemistry* **12**(4), 507–516.
- Meyer, S. és Steinhart, H.: 2000, Effects of heterocyclic PAHs (N, S, O) on the biodegradation of typical tar oil PAHs in a soil/compost mixture., *Chemosphere* **40**(4), 359–367.
- Mikesell, M., Kukor, J. és Olsen, R.: 1993, Metabolic diversity of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from a petroleum-contaminated aquifer, *Biodegradation* **4**(4), 249–259.
- Miller, T., Franklin, M. és Halden, R.: 2007, Bacterial community analysis of shallow groundwater undergoing sequential anaerobic and aerobic chloroethene biotransformation, *FEMS Microbiology Ecology* **60**(2), 299–311.
- Mo, K., Lora, C., Wanken, A., Javanmardian, M., Yang, X. és Kulpa, C.: 1997, Biodegradation of methyl t-butyl ether by pure bacterial cultures, *Applied Microbiology and Biotechnology* **47**(1), 69–72.
- Mohn, W., Westerberg, K., Cullen, W. és Reimer, K.: 1997, Aerobic biodegradation of biphenyl and polychlorinated biphenyls by Arctic soil microorganisms, *Applied and Environmental Microbiology* **63**(9), 3378–3384.
- Molnár, M., Leitgib, L., Gruiz, K., Fenyvesi, É., Szaniszló, N., Szejtli, J. és Fava, F.: 2005, Enhanced biodegradation of transformer oil in soils with cyclodextrin—from the laboratory to the field, *Biodegradation* **16**(2), 159–168.
- Monna, L., Omori, T. és Kodama, T.: 1993, Microbial degradation of dibenzofuran, fluorene, and dibenzo-p-dioxin by *Staphylococcus auriculans* DBF63., *Applied and Environmental Microbiology* **59**(1), 285–289.
- Muyzer, G. és Smalla, K.: 1998, Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

- and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology, *Antonie van Leeuwenhoek* **73**(1), 127–141.
- Ni, S., Fredrickson, J. és Xun, L.: 1995, Purification and characterization of a novel 3-chlorobenzoate-reductive dehalogenase from the cytoplasmic membrane of *desulfomonile tiedjei* dcb-1., *Journal of Bacteriology* **177**(17), 5135–5139.
- Nielsen, R. és Keasling, J.: 1999, Reductive dechlorination of chlorinated ethene DNAPLs by a culture enriched from contaminated groundwater, *Biotechnology and Bioengineering* **62**(2), 160–165.
- Nijenhuis, I. és Zinder, S.: 2005, Characterization of hydrogenase and reductive dehalogenase activities of *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195, *Applied and Environmental Microbiology* **71**(3), 1664–1667.
- Nubel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R., Ludwig, W. és Backhaus, H.: 1996, Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis., *Journal of Bacteriology* **178**(19), 5636–5643.
- Oh, Y., Shareefdeen, Z., Baltzis, B. és Bartha, R.: 1994, Interactions between benzene, toluene, and p-xylene (BTX) during their biodegradation, *Biotechnology and Bioengineering* **44**(4), 533–538.
- Oláh, J., Cserhádi, T. és Szejtli, J.: 1988, β -cyclodextrin enhanced biological detoxification of industrial wastewaters, *Water Research* **22**(11), 1345–1352.
- Oldenhuis, R., Oedzes, J., van der Waarde, J. és Janssen, D.: 1991a, Kinetics of chlorinated hydrocarbon degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b and toxicity of trichloroethylene., *Applied and Environmental Microbiology* **57**(1), 7–14.
- Oldenhuis, R., Oedzes, J., van der Waarde, J. és Janssen, D.: 1991b, Kinetics of chlorinated hydrocarbon degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b and toxicity of trichloroethylene., *Applied and Environmental Microbiology* **57**(1), 7–14.
- Oros, G., Cserhádi, T., Fenyvesi, E. és Szejtli, J.: 1990, Microbial decomposition of some cyclodextrin derivatives by bacteria associated with plants., *International Biodeterioration* **26**(1), 33–42.
- Pearson, K.: 1901, On lines and planes of closest fit to systems of points in space, *Philosophical Magazine* **2**(6), 559–572.
- Płaza, G., Wypych, J., Berry, C. és Brigmon, R.: 2007, Utilization of monocyclic aromatic hydrocarbons individually and in mixture by bacteria isolated from petroleum-contaminated soil, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**(4), 533–542.
- Pócsi, I.: 1999, Physiological and ecological evaluation of bacterial cyclodextrin glycosyltransferases (CGTases), *Biologia (Slovak Republic); Section Cellular and Molecular Biology*.
- Podani, J.: 1997, *Bevezetés a többváltozós biológiai adatfeltárás rejtelmeibe*, Scientia Kiadó, Budapest.
- Prenafeta-Boldu, F., Vervoort, J., Grotenhuis, J. és van Groenestijn, J.: 2002, Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) hydrocarbons by the fungus *Cladophialophora* sp. Strain T1, *Applied and Environmental Microbiology*

68(6), 2660–2665.

- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B., Ludwig, W., Peplies, J. és FO, G.: 2007, SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB, *Environmental Science & Technology* **35**(21), 7188–7196.
- Puzder, T., Csáki, F., Gruiz, K., Horváth, Z., Márton, T. és Sajgó, Z.: 2001, *Kármentesítési kézikönyv 4. Kármentesítési technológiák*, Környezetvédelemi és Vízügyi Minisztérium.
- Ranjard, L., Poly, F. és Nazaret, S.: 2000, Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment., *Research in Microbiology* **151**(3), 167–177.
- Ratajczak, A., Geissdorfer, W. és Hillen, W.: 1998, Alkane hydroxylase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1 Is encoded by alkM and belongs to a new family of bacterial integral-membrane hydrocarbon hydroxylases, *Applied and Environmental Microbiology* **64**(4), 1175–1179.
- Révész, S., Sipos, R., Kende, A., Rikker, T., Romsics, C., Mészáros, É., Mohr, A., Tánicsics, A. és Márialigeti, K.: 2006, Bacterial community changes in TCE biodegradation detected in microcosm experiments, *International Biodeterioration & Biodegradation* **58**(3-4), 239–247.
- Rheims, H., Rainey, F. és Stackebrandt, E.: 1996, A molecular approach to search for diversity among bacteria in the environment, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **17**(3), 159–169.
- Richardson, R., Bhupathiraju, V., Song, D., Goulet, T. és Alvarez-Cohen, L.: 2002, Phylogenetic characterization of microbial communities that reductively dechlorinate TCE based upon a combination of molecular techniques, *Environmental science & technology* **36**(12), 2652–2662.
- Ritalahti, K. és Löffler, F.: 2003, Populations implicated in anaerobic reductive dechlorination of 1, 2-dichloropropane in highly enriched bacterial communities, *Applied and Environmental Microbiology* **70**(7), 4088–4095.
- Robertson, B. és Alexander, M.: 1996, Mitigating toxicity to permit bioremediation of constituents of nonaqueous-phase liquids, *Environmental Science & Technology* **30**(6), 2066–2070.
- Rockne, K., Chee-Sanford, J., Sanford, R., Hedlund, B., Staley, J. és Strand, S.: 2000, Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions, *Applied and Environmental Microbiology* **66**(4), 1595–1601.
- Rosenberg, E.: 1986, Microbial surfactants, *Critical Review of Biotechnology* **3**(2), 109–132.
- Rueter, P., Rabus, R., Wilkes, H., Aeckersberg, F., Rainey, F., Jannash, H. és Widdel, F.: 1994, Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria, *Nature* **372**(6505), 455–458.
- Saito, N. és Nei, M.: 1987, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406–425.
- Sakai, Y., Maeng, J., Kubota, S., Tani, A., Tani, Y. és Kato, N.: 1996, A non-conventional dissimilation pathway for long chain n-alkanes in *Acinetobacter* sp. M-1 that starts with a dioxygenase reaction, *Journal of Fermentation and Bioengineering* **81**(4), 286–291.
- Saul, D., Aislabie, J., Brown, C., Harris, L. és Foght, J.: 2005, Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica, *FEMS Microbiology Ecology*

53(1), 141–155.

Schelsner, H., Jenkins, C. és Staley, J.: 2006, *The phylum Verrucomicrobia: a phylogenetically heterogeneous bacterial group*, Vol. 7, Springer.

Schwartz, A. és Bar, R.: 1995, Cyclodextrin-enhanced degradation of toluene and p-toluic acid by *Pseudomonas putida*, *Applied and Environmental Microbiology* **61**(7), 2727–2731.

Sei, K., Asano, K., Tateishi, N., Mori, K., Ike, M. és Fujita, M.: 1999, Design of PCR primers and gene probes for the general detection of bacterial populations capable of degrading aromatic compounds via catechol cleavage pathways, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **88**(5), 542–550.

Semple, K., Doick, K., Jones, K., Burauel, P., Craven, A. és Harms, H.: 2004, Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated., *Environmental Science & Technology* **38**(12), 228A–231A.

Sharma, P. és McCarty, P.: 1996, Isolation and characterization of a facultatively aerobic bacterium that reductively dehalogenates tetrachloroethene to cis-dichloroethene, *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 761–765.

Shelobolina, E. S., Nevin, K. P., Blakeney-Hayward, J. D., Johnsen, C. V., Plaia, T. W., Krader, P., Woodard, T., Holmes, D. E., VanPraagh, C. G. és Lovley, D. R.: 2007, *Geobacter pickeringii* sp. nov., *Geobacter argillaceus* sp. nov. and *Pelosinus fermentans* gen. nov., sp. nov., isolated from subsurface kaolin lenses, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**(1), 126–135.

Shim, H., Ryoo, D., Barbieri, P. és Wood, T.: 2001, Aerobic degradation of mixtures of tetrachloroethylene, trichloroethylene, dichloroethylenes, and vinyl chloride by toluene-o-xylene monooxygenase of *Pseudomonas stutzeri* OX1, *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**(1), 265–269.

Shim, H. és Yang, S.: 1999, Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* immobilized in a fibrous-bed bioreactor., *Journal of Biotechnology* **67**(2-3), 99–112.

Shimkets, L., Dworkin, M. és Reichenbach, H.: 2006, *The Myxobacteria*, Vol. 7, Springer.

Sikkema, J., de Bont, J. és Poolman, B.: 1994, Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes, *Journal of Biological Chemistry* **269**(11), 8022–8028.

Sikkema, J., de Bont, J. és Poolman, B.: 1995, Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **59**(2), 201–222.

Singh, A. és Ward, O.: 2004, *Biodegradation and bioremediation*, Springer.

Sipos, R.: 2004, *Molekuláris ujjenyomat módszerek összehasonlító elemzése széleslevelű gyékény (typha latifolia) rizoszféra baktérium-közösség faji diverzitásának megismerésében*, Master's thesis, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Mikrobiológiai Tanszék, Budapest.

Skubal, K., Barcelona, M. és Adriaens, P.: 2001, An assessment of natural biotransformation of petroleum hydrocarbons and chlorinated solvents at an aquifer plume transect, *Journal of Contaminant Hydrology* **49**(1-2), 151–169.

Smidt, H. és de Vos, W.: 2004, Anaerobic microbial dehalogenation, *Annual Review of Microbiology* **58**(1), 43–73.

- Smith, C., Danilowicz, B., Clear, A., Costello, F., Wilson, B. és Meijer, W.: 2005, T-Align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment length polymorphism profiles, *FEMS Microbiology Ecology* **54**(3), 375–380.
- Smits, T., Devenoges, C., Szynalski, K., Maillard, J. és Holliger, C.: 2004, Development of a real-time PCR method for quantification of the three genera *Dehalobacter*, *Dehalococcoides*, and *Desulfitobacterium* in microbial communities, *Journal of Microbiological Methods* **57**(3), 369–378.
- Song, S., Hein, S. és Steinbüchel, A.: 2000, Cloning, nucleotide sequence and primary biochemical characterization of esterase *EstA* from *Ralstonia eutropha* CH34, *Biotechnology Letters* **22**(6), 443–449.
- Sørensen, S., Bailey, M., Hansen, L., Kroer, N. és Wuertz, S.: 2005, Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review, *Nature Reviews Microbiology* **3**(9), 700–710.
- Stackebrandt, E. és Ebers, J.: 2006, Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards, *Microbiol Today* **33**, 152–155.
- Stackebrandt, E. és Goebel, B.: 1994, Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **44**(4), 846–849.
- Stackebrandt, E. és Liesack, W.: 1993, *Nucleic acids and classification*, Academic Press.
- Stanier, R., Palleroni, N. és Doudoroff, M.: 1966, The aerobic pseudomonads: a taxonomic study., *Journal of General Microbiology* **43**(2), 159–271.
- Steffan, R., McClay, K., Vainberg, S., Condee, C. és Zhang, D.: 1997, Biodegradation of the gasoline oxygenates methyl tert-butyl ether, ethyl tert-butyl ether, and tert-amyl methyl ether by propane-oxidizing bacteria, *Applied and Environmental Microbiology* **63**(11), 4216–4222.
- Stokes, J., Paton, G. és Semple, K.: 2005, Behaviour and assessment of bioavailability of organic contaminants in soil: relevance for risk assessment and remediation, *Soil Use and Management* **21**, 475–486.
- Stolz, J., Ellis, D., Switzer Blum, J., Ahmann, D., Lovley, D. és Oremland, R.: 1999, *Sulfurospirillum barnesii* sp. nov. and *Sulfurospirillum arsenophilum* sp. nov., new members of the *Sulfurospirillum* clade of the epsilon Proteobacteria, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **49**(3), 1177–1180.
- Strompl, C., Tindall, B., Lunsdorf, H., Wong, T., Moore, E. és Hippe, H.: 2000, Reclassification of *Clostridium quercicolum* as *Dendrosporobacter quercicolus* gen. nov., comb. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**(1), 101–106.
- Sung, Y., Ritalahti, K., Sanford, R., Urbance, J., Flynn, S., Tiedje, J. és Löffler, F.: 2003, Characterization of two tetrachloroethene-reducing, acetate-oxidizing anaerobic bacteria and their description as *Desulfuromonas michiganensis* sp. nov., *Applied and Environmental Microbiology* **69**(5), 2964–2974.
- Suthersan, S.: 2005, *In situ remediation engineering*, CRC Press.
- Szejtli, J.: 1988, *Cyclodextrin technology*, Springer.
- Takizawa, N., Iida, T., Sawada, T., Yamauchi, K., Wang, Y., Fukuda, M. és Kiyohara, H.: 1999,

- Nucleotide sequences and characterization of genes encoding naphthalene upper pathway of *Pseudomonas aeruginosa* PaK1 and *Pseudomonas putida* OUS82., *Journal of Bioscience and Bioengineering* **87**(6), 721–731.
- Tanada, S., Nakamura, T., Kawasaki, N., Torii, Y. és Kitayama, S.: 1999, Removal of aromatic hydrocarbon compounds by hydroxypropyl-cyclodextrin, *Journal of Colloid and Interface Science* **217**(2), 417–419.
- Tani, A., Ishige, T., Sakai, Y. és Kato, N.: 2001, Gene structures and regulation of the alkane hydroxylase complex in *Acinetobacter* sp. strain M-1, *Journal of Bacteriology* **183**(5), 1819–1823.
- Terzenbach, D. és Blaut, M.: 1994, Transformation of tetrachloroethylene to trichloroethylene by homoacetogenic bacteria, *FEMS Microbiology Letters* **123**, 213–218.
- Thauer, R., Jungermann, K. és Decker, K.: 1977, Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria, *Bacteriology Review* **41**(1), 100–180.
- Tiehm, A.: 1994, Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants, *Applied and Environmental Microbiology* **60**(1), 258–263.
- Táncsics, A., Szoboszlay, S., Kriszt, B., Kukolya, J., Baka, E., Márialigeti, K. és Révész, S.: 2008, Applicability of the functional gene catechol 1,2-dioxygenase as a biomarker in the detection of BTEX-degrading *Rhodococcus* species, *Journal of Applied Microbiology*.
- Townsend, G. és Suflita, J.: 1997, Influence of sulfur oxyanions on reductive dehalogenation activities in *Desulfomonile tiedjei*, *Applied and Environmental Microbiology* **63**(9), 3594–3599.
- Traunecker, J., Preuß, A. és Diekert, G.: 1991, Isolation and characterization of a methyl chloride utilizing, strictly anaerobic bacterium, *Archives of Microbiology* **156**(5), 416–421.
- Tsao, C., Song, H. és Bartha, R.: 1998, Metabolism of benzene, toluene, and xylene hydrocarbons in soil, *Applied and Environmental Microbiology* **64**(12), 4924–4929.
- Ueki, A., Akasaka, H., Suzuki, D. és Ueki, K.: 2006, *Paludibacter propionigenes* gen. nov., sp. nov., a novel strictly anaerobic, Gram-negative, propionate-producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil in Japan, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**(1), 39–44.
- Uemasu, I. és Kushiya, S.: 2004, Selective separation of benzene from hydrocarbon mixtures via liquid–liquid extraction method using aqueous solutions of substituted cyclodextrins, *Fuel Processing Technology* **85**(13), 1519–1526.
- Usanov, N., Loginov, O. és Melentév, A.: 1990, Synthesis of cyclodextrin glucanotransferases by microorganisms utilizing cyclodextrins as sole carbon source, *Doklady. Biological sciences*, Vol. 310, Consultants Bureau, pp. 87–89.
- Vähäoja, P., Kuokkanen, T., Välimäki, I., Vuoti, S. és Perämäki, P.: 2005, Biodegradabilities of some chain oils in groundwater as determined by the respirometric BOD OxiTop method, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **381**(2), 445–450.
- van Beilen, J., Panke, S., Lucchini, S., Franchini, A., Röthlisberger, M. és Witholt, B.: 2001, Evolution and regulation of the *Pseudomonas putida* GPo1 and P1 *alk*-gene clusters, *Microbiology* **147**, 1621–1630.

- van Beilen, J., Wubbolts, M. és Witholt, B.: 1994, Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*., *Biodegradation* **5**(3-4), 161–174.
- van der Meer, R.: 1994, Genetic adaptation of bacteria to chlorinated aromatic compounds, *FEMS Microbiology Reviews* **15**(2), 239–249.
- Van Hamme, J., Singh, A. és Ward, O.: 2003, Recent advances in petroleum microbiology, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**(4), 503–549.
- van Pée, K.: 1996, Biosynthesis of halogenated metabolites by bacteria, *Annual Review of Microbiology* **50**(1), 375–399.
- van Pée, K.: 2001, Microbial biosynthesis of halometabolites, *Archives of Microbiology* **175**(4), 250–258.
- Verce, M., Ulrich, R. és Freedman, D.: 2000, Characterization of an isolate that uses vinyl chloride as a growth substrate under aerobic conditions, *Applied and Environmental Microbiology* **66**(8), 3535–3542.
- Vermue, M., Tramper, J., De Jong, J. és Oostrom, W.: 1992, Enzymic transesterification in near-critical carbon dioxide: effect of pressure, hildebrand solubility parameter and water content, *Enzyme Microbiology Technology* **14**(8), 649–655.
- Volkerling, F., Breure, A. és Rulkens, W.: 1997, Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation, *Biodegradation* **8**(6), 401–417.
- Volkerling, F., Breure, A., van Andel, J. és Rulkens, W.: 1995, Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Applied and Environmental Microbiology* **61**(5), 1699–1705.
- Wackett, L. és Householder, S.: 1989, Toxicity of trichloroethylene to *Pseudomonas putida* F1 is mediated by toluene dioxygenase, *Applied and Environmental Microbiology* **55**(10), 2723–2725.
- Walker, J.: 1975, Petroleum in the marine environment, *Bioscience* **25**(10), 674–674.
- Walter, U., Beyer, M., Klein, J. és Rehm, H.: 1991, Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1, *Applied Microbiology and Biotechnology* **34**(5), 671–676.
- Wang, J., Marlowe, E., Miller-Maier, R. és Brusseau, M.: 1998, Cyclodextrin-enhanced biodegradation of phenanthrene, *Environmental Science & Technology* **32**(13), 1907–1912.
- Ward, D.: 2006, A microbiological perspective on microbial species, *Microbe* **1**, 269–278.
- Watanabe, K. és Hamamura, N.: 2003, Molecular and physiological approaches to understanding the ecology of pollutant degradation, *Current Opinion in Biotechnology* **14**(3), 289–295.
- Watts, J., Wu, Q., Schreier, S., May, H. és Sowers, K.: 2001, Comparative analysis of polychlorinated biphenyl-dechlorinating communities in enrichment cultures using three different molecular screening techniques, *Environmental Microbiology* **3**(11), 710–719.
- Wen-lu, S., Qing-guo, H. és Lian-sheng, W.: 1999, β -cyclodextrin (β -CD) influence on the biotoxicities of substituted benzene compounds and pesticide intermediates, *Chemosphere* **38**(4), 693–698.
- Whyte, L., Hawari, J., Zhou, E., Bourbonniere, L., Inniss, W. és Greer, C.: 1998, Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp., *Applied*

- and Environmental Microbiology* **64**(7), 2578–2584.
- Widdel, F. és Rabus, R.: 2001, Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons, *Current Opinion in Biotechnology* **12**(3), 259–276.
- Wodzinski, R. és Larocca, D.: 1977, Bacterial growth kinetics on diphenylmethane and naphthalene-heptamethylnonane mixtures, *Applied and Environmental Microbiology* **33**(3), 660–665.
- Wu, Q., Bedard, D. és Wiegel, J.: 1997, Temperature determines the pattern of anaerobic microbial dechlorination of Aroclor 1260 primed by 2,3,4,6-tetrachlorobiphenyl in Woods Pond sediment, *Applied and Environmental Microbiology* **63**(12), 4818–4825.
- Yamahara, R., Ogo, S., Masuda, H. és Watanabe, Y.: 2002, Catecholato)-iron(III) complexes: structural and functional models for the catechol-bound iron(III) form of catechol-dioxygenases., *Journal of Inorganic Biochemistry* **88**(3–4), 284–294.
- Yang, Y. és McCarty, P.: 2000, biomass, oleate, and other possible substrates for chloroethene reductive dehalogenation, *Bioremediation Journal* **4**(2), 125–133.
- Yeh, C. és Novak, J.: 1994, Anaerobic biodegradation of gasoline oxygenates in soils, *Water Environment Research* **66**(5), 744–752.
- Yen, K. és Serdar, C.: 1988, Genetics of naphthalene catabolism in pseudomonads., *Critical Review of Microbiology* **15**(3), 247–68.
- Yuste, L. és Rojo, F.: 2001, Role of the *crc* gene in catabolic repression of the *Pseudomonas putida* GPo1 alkane degradation pathway, *Journal of Bacteriology* **183**(21), 6197–6206.
- Zhang, Y., Maier, W. és Miller, R.: 1997, Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability, and biodegradation of phenanthrene, *Environmental Science & Technology* **31**(8), 2211–2217.
- Zinder, S.: 1993, Physiological ecology of methanogens, *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics* pp. 128–206.

IRODALOMJEGYZÉK

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

E doktori értekezés elkészültéhez szükséges vizsgálatok a Szent István Egyetem, Környezet-tudományi Doktori Iskola, Mezőgazdasági-, Környezeti Mikrobiológia és Talaj-biotechnológia c. tudományági részterülete keretében, az Eötvös Loránd Tudományegyetem (ELTE) Mikrobiológiai Tanszéken valósulhattak meg, melyért hálás köszönetem fejezem ki.

Köszönetet mondok témavezetőmnek, Dr. Márialigeti Károlynak a téma és a laboratóriumi háttér biztosításáért, a sokoldalú szakmai támogatásáért és türelméért.

Köszönetet mondok Prof. em. Dr. Dr. h.c. Kecskés Mihálynak (DSc, biol.) és Dr. Hosam E.A.F. Bayoumi Hamuda Ph.D.-nek, a sok gyakorlati tapasztalat átadásáért a környezeti mikrobiológia vizsgálmódszereinek területéről, valamint a doktori iskolában nyújtott szakmai és szervezői tevékenységükért;

Külön köszönetem fejezem ki szakdolgozóimnak, név szerint: Mészáros Évának, Mohr Anitának, Pór Tamásnak, Táncsics Andrásnak, Tóth Ákosnak és Varga Karolinának, akiknek lankadatlan lelkesedése és mérhetetlen áldozatkészsége elengedhetetlen volt a dolgozat alapjául szolgáló kísérletek elvégzéséhez;

Romsics Csabának, Sipos Ritának és Székely Annának, akik mindig rendelkezésemre álltak, bármilyen kérdéssel fordultam is hozzájuk, és a legnehezebb pillanatokban is támaszul szolgáltak;

És nem utolsó sorban fejezem ki hálámat Simka Ágnesnek és Balogh Lajosné Anikónak, akikre munkám során mindig támaszkodhattam;

Köszönetet mondok a Kutatás-fejlesztési Pályázati és Kutatáshasznosítási Iroda GVOP-3.1.1.-2004-05-0407/3.0 számú pályázati támogatásáért;

Végül köszönöm férjem, családom, barátaim, és mindazok megértését, támogatását, valamint türelmét, akik a doktori cselekmény sikeréhez valamilyen módon hozzájárultak.