

**SZENT ISTVÁN EGYETEM**

**ADALÉKANYAGOK HATÁSA KÜLÖNBÖZŐ SZENNYEZŐANYAGOK  
LEBONTÁSÁRA**

Doktori értekezés tézisei

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

# 1. A munka előzményei, a kitűzött célok

## 1.1 A téma aktualitása, jelentősége

Az elmúlt évszázadban környezetünk szennyeződése óriási mértékben megnövekedett. 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. 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 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 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).

## 1.2 Célkitűzések

A nagy mennyiségben a talajba jutott gázolaj mérgező hatású a talaj élővilágára, ezért szükséges olyan eljárások kidolgozása, amelyekkel könnyen, gyorsan és megfelelő hatékonysággal tudjuk a szennyezést megszüntetni. Az egyik kínáló 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 célja volt, hogy 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 vevő törzsek közül elsősorban azokra koncentráljunk, amelyek az aromás vegyületek széles spektrumát képesek hasznosítani, és azok nagy koncentrációit tolerálni. 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 célul tűztük ki, hogy bebizonyítsuk, hogy a hidroxipropil- $\beta$ -ciklodextrin (HPCD) segítségével gyorsítható a gázolaj mikroorganizmusok általi lebontása, illetve hogy összehasonlítsuk a HPCD, a Tween 80 és a keményítő hatását a gázolaj biodegradációjára.

Az üzemanyagként alkalmazott szénhidrogén szennyezések – mint pl. a gázolaj – mellett egy másik jelentős szennyező forrása a talajvíznek a klórozott alifás szénhidrogének nem megfelelő kezelése.

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 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. Anyag és módszer

Mintáink eltérő földrajzi helyzetű, szennyezett területekről származnak. A szennyezett talajból a törzsek izolálása gázolajos dúsító táptalajon történt, így eleve azokat a törzseket szelektáltuk, amelyek képesek a gázolaj különböző komponenseit szénforrásként hasznosítani. A vizsgálatokhoz a frissen izolált szervezeteken túl törzsgyűjteményekből származó mikrobákat is felhasználtunk. A Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ - Német Mikroorganizmus- és Sejttenyésztés Gyűjtemény)-ből származnak a *Pseudomonas putida* DSM50202 és az *Acinetobacter* genospecies 11 DSM590 törzsek. Az ELTE Mikrobiológiai Tanszék törzsgyűjteményéből származik az SM5T4 jelű törzs.

A helyszíni és laboratóriumi kémiai méréseket akkreditált laboratórium végezte, a BTX vegyületek mérése a laboratóriumban kidolgozott gázkromatográfiás módszerrel történt.

A mikrokozmosz kísérletek során a széndioxid-termelését zárt rendszerben, OxiTop OC110 (WTW) segítségével mértük. Az adalékanyag adagolásának (HPCD) hatását a benzol és a toluol bontására teflon-dugóval záródó üvegekben vizsgáltuk. A triklóretilén bontásának vizsgálatához a mikrokozmoszokat 2 literes üvegedényekben állítottuk össze, és légmentesen lezártuk, hogy a levegővel ne érintkezzen, a mintavételezés nitrogén gáz ellenáramoltatás mellett történt.

A csíraszám becslés a klasszikus szélesztéses technikával, tízes alapú hígítási sor segítségével történt, a biomassza növekedést pedig optikai denzitás meghatározással követtük nyomon. A közösségi szénforrás vizsgálatához BIOLOG GN2 (Hayward, California, USA) lemezeket használtunk. Az enzimaktivitás mérést Feist és munkatársai által kidolgozott protokoll szerint végeztük el, de azt helyenként módosítottuk (Feist és Hegeman 1969).

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. A DNS izolálást UltraClean Soil DNA Kittel (MoBio), sz RNS izolálást RNeasy Mini Kittel (Qiagen) végeztük, a gyártó utasításai szerint. Az RNS reverz transzkripcióját random hexamer primerekkel végeztük. 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.

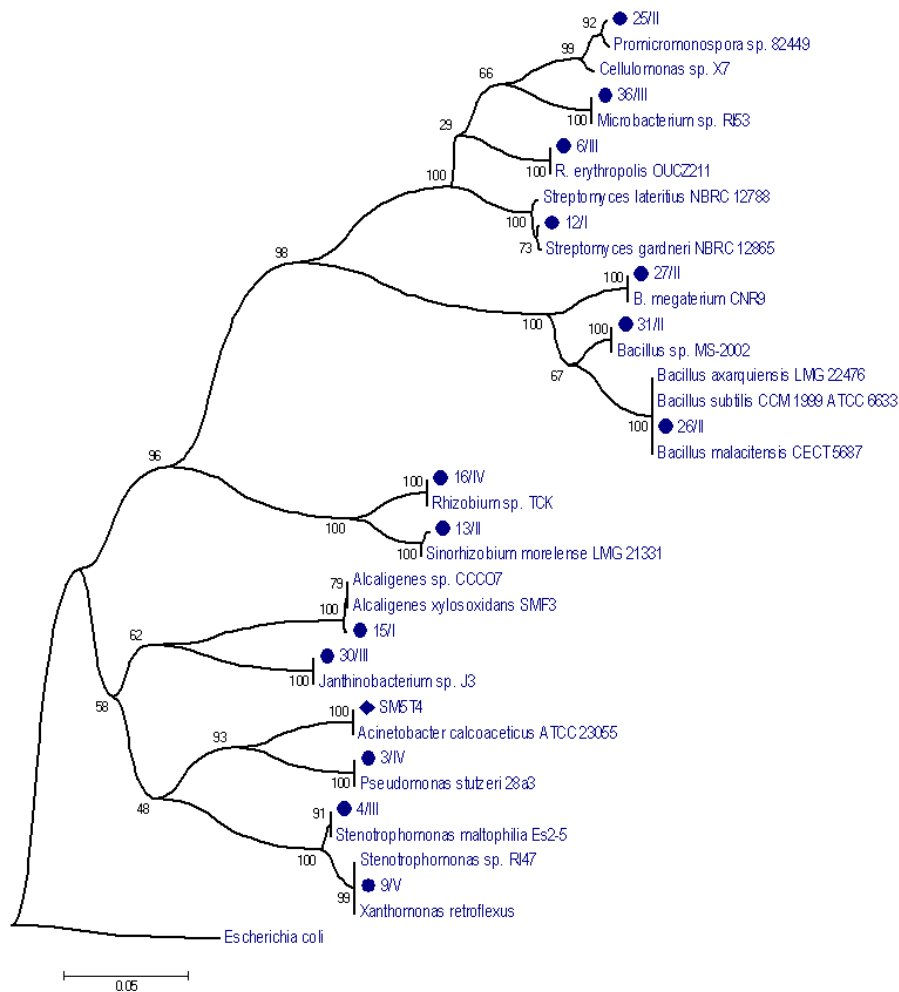
A közösségi DNS-t vagy RNS-t tartalmazó minták feldolgozására több, alternatív módszert is alkalmaztunk. Az egyik ilyen volt a klónkönyvtár készítése, mely segítségével a közösséget alkotó mikrobák 16S rRNS génjét szétválaszthattuk egymástól és bázissorrendjüket meghatározhattuk. Emellett több ujjlenyomat módszert is alkalmaztunk, mint a denaturáló grádiens gél elektroforézis (DGGE) és a terminális restrikciós fragment hossz polimorfizmus (T-RFLP). A DGGE-t INGENYphorU (Ingeny) gélelektroforézis rendszerben végeztük, a T-RFLP elemzéseket ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) berendezésben GeneMapper program segítségével végeztük.

A filogenetikai fák készítéséhez az ARB-SILVA (?) internetes adatbázis segítségével, a MEGA3 programcsomagot (?) használtuk. Az eredmények kiértékeléséhez (főkomponens analízis) statisztikai módszereket alkalmaztunk (SYNTAX 2000 programcsomag).

### 3. Eredmények

#### 3.1 A gázolaj bontásának serkentése laboratóriumi körülmények között

A gázolajos dúsító lemezekon kapott csíraszám alapján a szennyezés egy adott TPH koncentráció felett szintén egy nagyságrenddel csökkentette a gázolajat bontani képes mikroorganizmusok mennyiségét. A gázolajos táptalajokról, telepmorfológiai különbségek alapján, összesen 45 darab különböző törzset izoláltunk.



3.1. 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.

ARDRA analízis alapján 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 (3.1. ábra).

Az izolált és azonosított csoportreprezentáns törzsek esetében megvizsgáltuk a gázolajbontó képességüket is. Azt tapasztaltuk, hogy a 15/I (*Alcaligenes* sp.); az SM5T4 (*Acinetobacter cal-*

### 3.1. A GÁZOLAJ BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE LABORATÓRIUMI KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT

*coaceticus*); 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 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.

#### 3.1.1 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.

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.

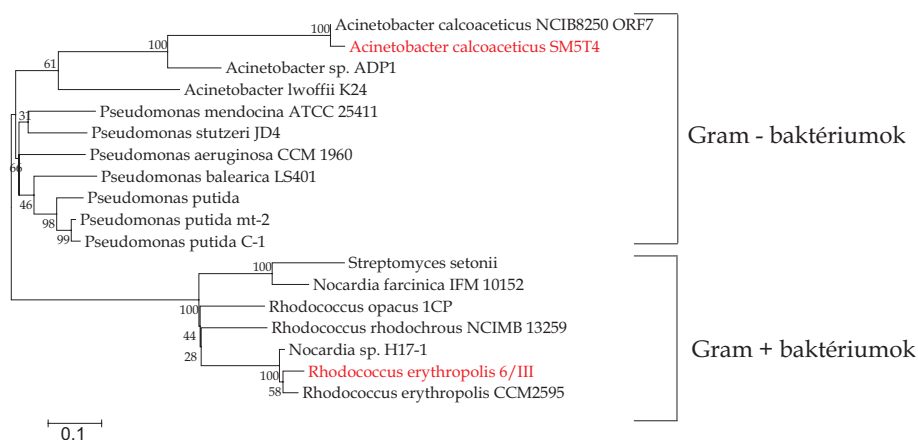
Az irodalmi adatok alapján előzetesen arra lehetett számítani, hogy a toluollal történő inkubáció hatására a "meta" lebontási útvonal aktiválódik (Farhadian et al. 2007). Ezzel szemben mindhárom törzs esetében a C12O enzim aktivitását lehetett detektálni, tehát az "orto" lebontási útvonal aktiválódott.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

#### 3.1.2 A C12O enzim génjének kimutatása PCR segítségével

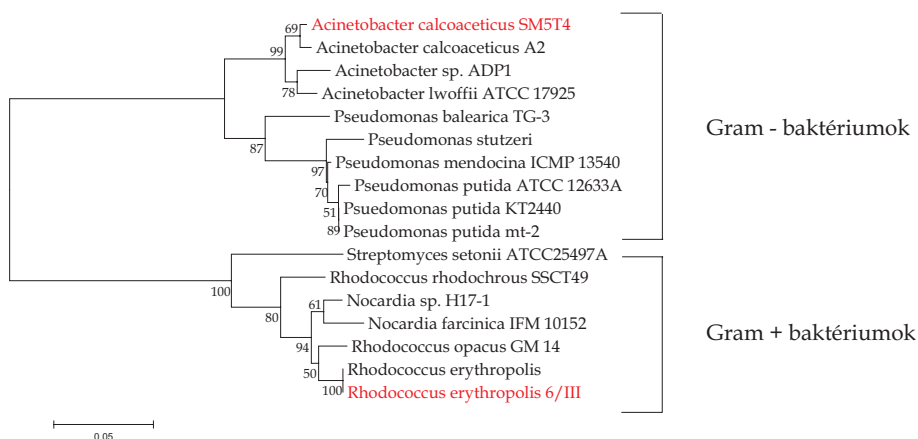
A primertervezésnél elsősorban arra törekedtünk, hogy az általunk izolált törzsekből ki tudjuk mutatni a kívánt gént, ezért a csoportspecifikus primerek tervezésére helyeztük a hangsúlyt. Ennek megfelelően *Rhodococcus* és *Acinetobacter* fajokra specifikus primereket készítettünk.

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

### 3.2. A SZÉNHIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE CIKLODEXTRIN ADAGOLÁSSAL



**3.2. ábra. Törzsfá a C120 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.**



**3.3. ábra. Törzsfá 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 (3.2. ábra) jól látszik, hogy a Gram pozitív és a Gram negatív mikroba a katabolikus gén alapján élesen elkülönülnek egymástól. Ha ezt összevetjük ugyanezen fajok 16S rRNS génje alapján készült törzsfával (3.3. ábra), akkor megfigyelhetjük, hogy a Gram-festődés szerinti elkülönülés mellett a főbb csoportok elhelyezkedése is hasonló.

### 3.2 A szénhidrogének bontásának serkentése ciklodextrin adagolással

A vizsgálatok során azt elemeztük, hogy a tápveléshez adagolt HPCD milyen mértékben növeli a lebontott gázolaj mennyiségét.

A háromszoros gázolaj mennyiséget (1200 mg/l) tartalmazó tápoldatban egy hét elteltével több CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub>-produkciót.

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. 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 ciklodextrin adagolás hatására minden esetben megnőtt a CO<sub>2</sub> produkció. Legkisebb mértékben az 1:1 mólarány esetén, legnagyobb mértékben pedig a 1:2 mólarányánál nőtt meg a szervesanyag hasznosítás. Nemcsak a CO<sub>2</sub>-produkció mennyisége változott meg, hanem a bontás sebességének az üteme is. Az 1:0,5 illetve 1:2 arányban adagolt ciklodextrin mindkét esetben tovább növelte a kezdeti bontás sebességét, és a lebontott gázolaj komponensek mennyiségét is. Ez a 1:0,5 arányban alkalmazott kezelés során a 96. órára 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 CO<sub>2</sub>-produkció.

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 CO<sub>2</sub>-produkció pedig jelentősen csökkent. A másik két esetben (1x, 2x gázolaj mennyiség) a *lag* fázis megrövidült és egy intenzívebb bontási sebességet tapasztaltunk.

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.

Amikor mikrobaközösség gázolajbontó képességét igyekeztünk HPCD-vel serkentetni, a ciklodextrin 100 mg/l gázolajkoncentráció esetén lerövidítette a *lag* fázist és növelte a széndioxid termelést. 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 közösségi vizsgálatoknál 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.

Az *Acinetobacter calcoaceticus* SM5T4 törzsnél a ciklodextrin adagolás hatására minden esetben nőtt a biológiailag lebomlott benzol ill. toluol 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.

Adott mennyiségű ciklodextrin nem tud bizonyos mennyiség feletti benzollal zárványkompleket képezni, ezért az egyre növekvő benzol koncentráció a HPCD-nel kezelt mikrokozmoszok esetében is csökkenő határfokot 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.

### 3.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHIDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN

---

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.

#### 3.3 A halogénezett szénhidrogének bontásának serkentése mikrokozmosz kísérletekben

##### 3.3.1 A különböző területekről származó minták összehasonlítása

A klórozott alifás szénhidrogének anaerob körülmények között, energiaszerző anyagcsereutakon történő hasznosításuk során elektronakceptoroként szerepelhetnek. Ehhez azonban megfelelő mennyiségű elektrondonorra van szükségük. Az ideális adalékanyag a deklorináló szervezeteket a lehető legcéltobbabban serkenti, speciálisan az ő populációjukat támogatja.

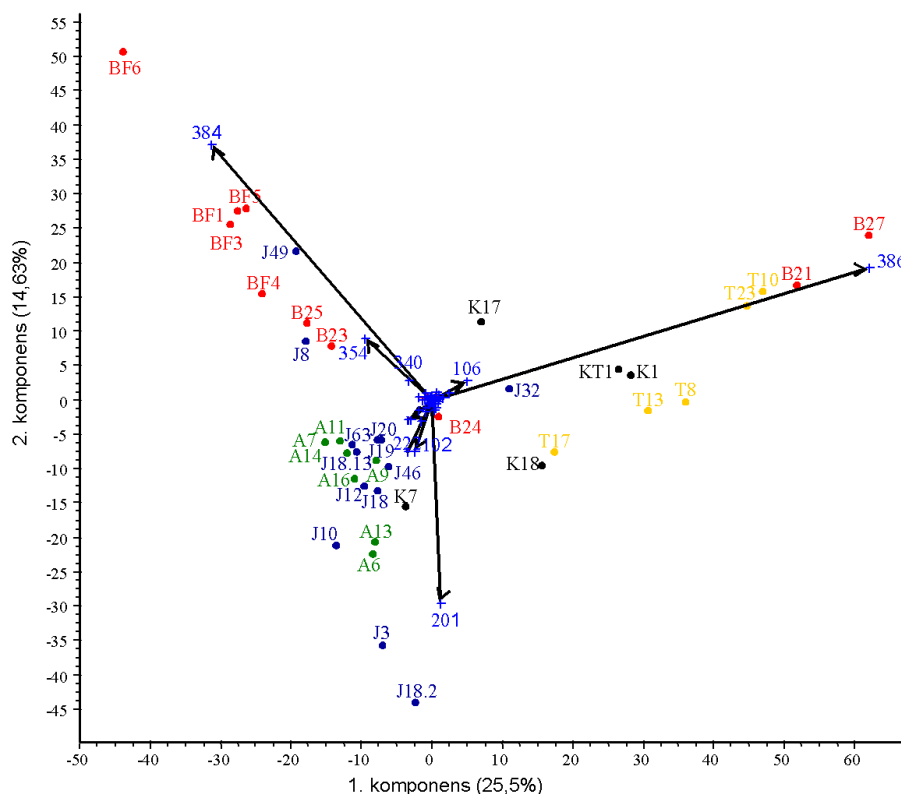
Legbiztosabban a *Dehalococcoides* sp. szervezeteket tudtuk kimutatni nested PCR segítségével, és a *Dehalobacter restrictus* 16S rRNS génjének kópiáit is detektáltuk már  $10^3$ -os nagyságrendtől.

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. Nagy az oldott vas tartalma az *A* területnek, illetve a *B* terület egyes kútjainak. Jelentősebb nitrát- és nitrit tartalom csak a *J* és a *T* területeken volt, a legnagyobb szulfátion tartalma a *K* területen lévő kutaknak volt, a legkisebb értéket a *J* terület kútjai esetén mérték.

Génusz-specifikus PCR-ek segítségével minden mintánál megvizsgáltuk, hogy mely dehalorespiráló szervezetek voltak jelen a területen. A *T* területről egyetlen, általunk vizsgált dehalorespirációra képes szervezetet sem mutattunk ki. Ezzel ellentétben a *B* terület minden kútjából képesek voltunk a *Dehalococcoides* sp-t már  $10^5$  nagyságrendben kimutatni és a *Desulfuromonas* sp. teszt is minden esetben pozitív volt. A *Dehalobacter* sp. jelenlétére utaló tesztek eredménye nem volt egyértelmű, de feltételezzük, hogy minimális mennyiségben, a kimutathatósági határ környékén ezek a szervezetek is jelen voltak. Az *A* területről származó kutak mintái esetében a *Dehalococcoides* sp.-t csak nested PCR segítségével tudtuk detektálni, ami azt jelenti, hogy a mintában ezeknek a szervezeteknek a mennyisége nagyságrendileg  $10^5$  és  $10^2$  sejt/l között volt. Ezen kívül még a *Desulfuromonas* sp. kimutatására szolgáló tesztek eredményei voltak pozitívak. A *J* és a *K* területekről származó minták jóval heterogénebb képet mutattak. Voltak olyan kutak, amelyek már a DHC1 teszt során is pozitívak voltak, voltak olyanok, ahol csak a DHC2 teszt lett pozitív, de voltak olyan kutak is, melyekből nem tudtuk *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.

Az egyes minták baktérium közösségének összetételét gyors ujjenyomat módszerrel, T-RFLP-vel vizsgáltuk. A főkomponens elemzés alapján rajzolt biplot ábrából (3.4. 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

### 3.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHYDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN



3.4. 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.

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 mintával együtt.

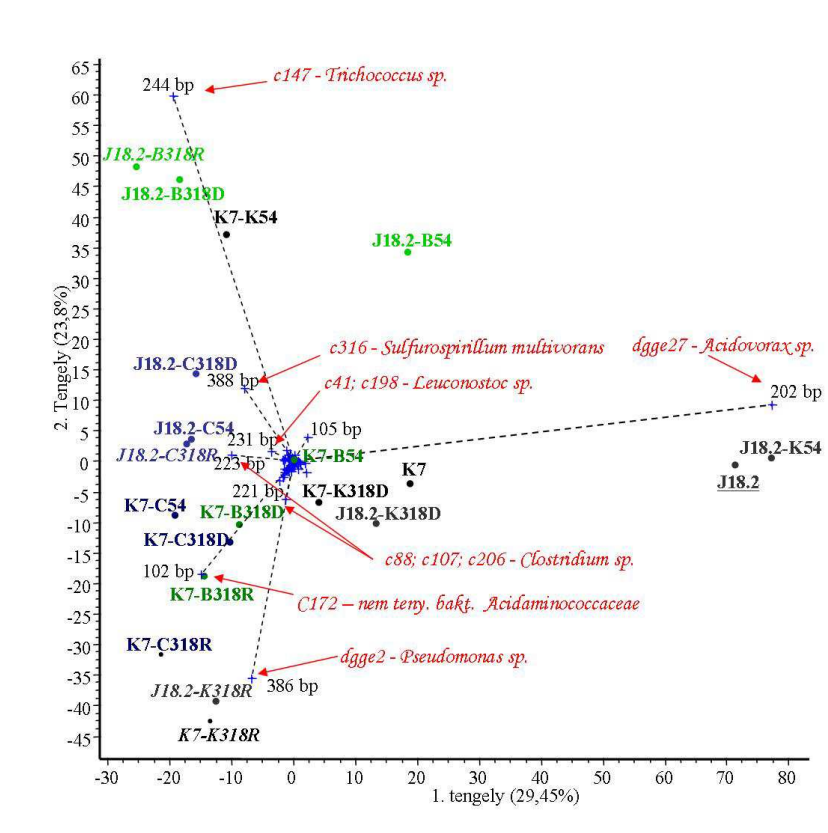
#### 3.3.2 A megfelelő adalékanyag kiválasztása mikrokozmosz kísérletekben

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. 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.

A *B* és *C* mikrokozmoszokban, melyeknél jelentős bomlási folyamatokat tapasztaltunk, a kémiai paraméterek mellett vizsgáltuk a biológiai paraméterek változásait is.

A *Dehalococcoides* sp.-t már a kiindulási mintákból is kimutattuk, a 318. npra 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. A másik két dehalorespiráló szervezet a *K7* kiindulási mintákban nem volt kimutatható, míg a *J18.2* mintákban igen. Az 54. npra mindegyik mikrokozmoszban visszaszorult az arányuk, nem voltak kimutathatóak, de a 318. npra a *Dehalobacter* sp. mindegyik mikrokozmoszban újra kimutathatóvá vált, és a *Desulfuromonas chloro-*

### 3.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHYDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN



3.5. ábra. A mikrokozmoszok T-RFLP mintázatának főkomponens elemzése

*ethenica* is detektálható lett a *J18.2/K* és a *K7/B* és *K7/C* mikrokozmoszokban. Az 54. napos visszاسzorulása ezeknek a szervezeteknek magyarázható a mikrokozmosz összeállítása során történő óhatatlan zavarással. A *Dehalococcoides* sp. folyamatos jelenléte arra utal, hogy kimutatása nem elégséges feltétele a PCE eténig történő redukciójának, ellentétben Hendrickson és munkatársai (2002) megállapításával. Több dehalorespiráló szervezet együttes vizsgálata/kimutatása ezért megbízhatóbb eredménnyel szolgálhat.

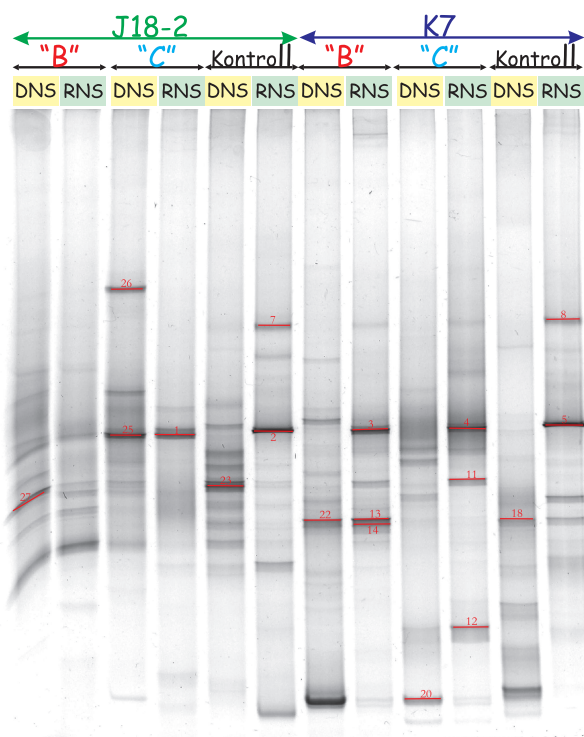
A Shannon féle diverzitásindexek alapján a kezelés hatására diverzitás növekedést tapasztaltunk, azaz a közösségben kimutatható mikrobák száma nőtt.

Ujjlenyomat módszerekkel követtük nyomon a mikrobaközösség változását. A 318. napon a rDNS alapú vizsgálatokat rRNS alapú vizsgálatokkal is kiegészítettük. A sikeres *J18.2/C* mikrokozmosz 318. napi RNS-éből a T-RFLP mellett klónkönyvtárat is készítettünk, hogy meghatározzuk a közösség tagjait. Az azonosítás után meghatároztuk ezeknek a szervezeteknek a TRF-jeit, amelynek segítségével azonosítani tudtuk a közösségi T-RFLP mintázat fontosabb csúcsait is (3.5. ábra).

Annak érdekében, hogy a többi mikrokozmosz közösségének domináns tagjait is meghatározzuk a DGGE módszert választottuk, hogy gyorsan szekvencia-információkhoz jussunk. A DGGE elemzés a mikrokozmoszok 318. napján vett mintákból RNS és DNS alapon egyaránt készült.

A T-RFLP mintázatok főkomponens elemzése (3.5. 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 vizsgál-

### 3.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHYDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN



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

latok segítségével azonosítani is tudtunk (*Acidovorax* sp., DGGE 27. csík). Ennek helyét az 318. napi kezelt mikrokozmoszokban a 386 bp hosszú TRF-fel rendelkező mikroorganizmus vette át, melyet szintén meghatároztunk (*Pseudomonas* sp., DGGE 2.,3.,4.,5.,7. és 8. csíkok). 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 szerkezet jelent meg, melyek egyértelműen jellemzőek a közösségre. Ilyenek a 102 bp, 221 bp, 223 bp (*Clostridium* spp., c88; c206; c107 klónok), 231 bp (*Leuconostoc* spp.) hosszú TRF-fel jellemzett mikrobák. A főkomponens elemzés érdekessége, hogy a *J18.2/B* mikrokozmoszokra egyértelműen jellemző a 244 bp-ral jelölt szerkezet (*Trichococcus* sp., c147 klón). Ez a szerkezet ugyan a többi mikrokozmoszban is megtalálható, de ebben a közösségben domináns szerepet játszik. A 388 bp-ral jellemzett klón (*Sulfurospirillum multivorans*, c316 klón) elsősorban a *J18.2/C* mikrokozmoszok közösségének meghatározó tagja.

A *J18.2/K* mikrokozmoszban a kiindulási mintához hasonlóan az *Acidovorax* sp. volt a egyetlen és domináns, az ujjlenyomat módszerekkel kimutatható törzs. Egy év múlva, a kísérlet végén jelen voltak az *Acidovorax*, a *Clostridium*, a *Pseudomonas* és a *Trichococcus* génuszba tartozó szervezetek. 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. 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 *Tolomonas ausensis*-szel 98%-s hasonlóságot mutató szerkezetet (DGGE 13;14; és 22

### 3.3. A HALOGÉNEZETT SZÉNHYDROGÉNEK BONTÁSÁNAK SERKENTÉSE MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEKBEN

---

csíkok) sikerült kimutatni. A *T. ausensis* toluol termelő szervezet, anoxikus környezetből izolálták.

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

A többi 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* (c316 klón) 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. 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. Ebben a mikrokozmoszban is megtaláltuk a *A Tolumonas ausensis*-szel hasonlóságot mutató szervezetet.

*J18.2/B* kezelés esetében a deklorináció folyamata a *K7* mikrokozmoszhoz hasonlóan történt, csak sokkal nagyobb mértékben. Valószínűleg a legjelentősebb elektrondonor a molekuláris hidrogén lehetett, mind a deklorináló, mind a szulfátredukáló mikrobák esetében, de még a metanogén szervezetek számára is. Az 1. és 25. csíkokból származó DNS bázissorrend megegyezett a klónkönyvtár c10-s klónjával. Mind DNS, mind RNS alapon kimutatható volt, ami arra utal, hogy a biomasszája jelentős volt és aktív anyagcserét is folytatott.

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* 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 DGGE 20. csíkjából származó DNS szekvencia alapján kimutattunk egy *Pedobacter heparinus* DSM2366 törzsszel 91%-s hasonlóságot mutató szervezetet. A *Pedobacter heparinus* pszichrofil szervezet, amely különböző cukrokat képes szénforrásként hasznosítani, és bontja a heparint 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. 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 mikrokozmoszban több fermentációra képes szervezet is jelen volt. A *Clostridium* génusz több törzse is megjelent, a *Leuconostoc* (c41; c198 klónok) fajok szintén kimutathatóak voltak, 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 mostanában kezdik mélyebben leírni. Ezen kívül szintén megjelent a *Sulfurospirillum multivorans* is. A DGGE 26. csík takarta szervezet csak ebben a mikrokozmoszokban van jelen, de ott sem mutat aktivitást (nincs csík ugyanazon a magasságon az RNS alapú mintában). A legközelebbi tenyésztésbe vont rokon szervezet a *Paludibacter propionicigenes* (96%). A klónkönyvtár c10-s klónja mind DNS, mind RNS alapon kimutatható volt. A c1 klón a *Myxococcales* rendbe tartozik. Közelebbi besorolása nem lehetséges, mert nincs közeli rokona a tenyésztésbe vont mikrobák között. A c3 klón esetén 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. A c172 klón 92%-s bázissorrend egyezést mutat a *Pelosinus fermentans* R7 törzsszel, így itt sem sikerült faji szinten meghatározni a klónt.

A c229 klón szintén az Acidaminococcaceae családba tartozik, de azon belül az *Aminobacterium* nemzetséggel mutat közelebbi rokonságot.

Mindezek a biológiai változások alátámasztják a kémiai eredményeket. Feltételezzük, hogy a nagy mennyiségű szerves adalékanyagot gyorsan elkezdtek 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.

#### 3.4 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- $\beta$ -ciklodextrin egyaránt gyorsítja és serkenti a gázolaj bontását az *Acinetobacter calcoaceticus* SM5T4-nél és a szennyezett területről származó mikrobaközösségnél. Megállapítottuk, hogy a hidroxipropil- $\beta$ -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.

## 4. Következtetések és javaslatok

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).

Az OxiTop respirometrikus mérőrendszerrel végzett vizsgálatok során a csoportreprezentáns 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.

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.

A 3:1 molarányban 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 képezett. 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 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. 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 hatékony-



---

ságát. 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 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 mikrotörzs, 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.

## 5. A dolgozat témaköréhez kapcsolódó fontosabb publikációk

- Idegen nyelvű könyv, könyvrészlet
  1. Sipos, R., Székely, A., **Révész, S.**, Márialigeti K., Addressing PCR Biases in Environmental Microbiology Studies. Chapter 3. *Bioremediation Methods and Protocols, in series: Methods in Molecular Biology* (Vol. 599) editor: S. P. Cummings, Humana Press, ISBN: 978-1-60761-438-8 (*in press*)
- Lektorált, referált, IF-ral rendelkező folyóiratban megjelent publikációk
  1. Tánicsics, A, Szoboszlay, S., Kriszt, B., Kukolya, J., Baka, E., Márialigeti, K., **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* 105 ( 4) 1026-1033 (IF 2.501)
  2. Sipos, R., Székely, A. J., Palatinszky, M., **Révész, S.**, Márialigeti, K., Nikolausz M. (2007) Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle numbers on 16S rRNA gene targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiology Ecology* Vol. Issue 2: 341-350. (IF: 2.787)
  3. **Révész, S.**, Sipos, R., Kende, A., Rikker, T., Romsics, Cs., Mészáros, É., Mohr, A., Tánicsics, A., Márialigeti, K. (2006) Bacterial community changes at TCE biodegradation detected in microcosm experiments. *International Biodeterioration and Biodegradation* 58: 239-247 (IF: 1.209)
  4. Nikolausz, M.; Sipos, R.; **Révész, S.**; Székely, A. J.; Márialigeti, K. (2005) Observation of bias associated with re-amplification of DNA isolated from denaturing gradient gels. *FEMS Microbiology Letters*, 244 (2):385-390 (IF:2.057)
- Lektorált, referált folyóiratban megjelent angol nyelvű publikációk
  1. **Révész, S.**, Sipos, R., Romsics, Cs., Kende, A., Rikker, T., Mészáros, É., Tánicsics, A., Márialigeti K. (2005) Bacteria and Archea community changes at TCE biodegradation as revealed in microcosm experiments. *3rd European Bioremediation Conference, Chania, Crete, 4-7. July.*
- Lektorált, referált folyóiratban megjelent magyar nyelvű publikációk
  1. **Révész Sára**, Romsics Csaba, Pór Tamás, Mansour Mashregi, A. A. Khalif, Márialigeti Károly (2002): Enhance diesel-oil degradation using hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin *Az MTA Szabolcs-Szatmár-Bereg megyei Tudományos Testületének X. - Közgyűléssel egybekötött - Jubileumi Tudományos Ülése; Közleménykötet.* Nyíregyháza, 28-29 September 2002.
  2. Pór Tamás, **Révész Sára**, Márialigeti Károly (2003): Effect of the dihydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on gasoline degradation ability of bacterial community isolated from contaminated soil. *MTA Szabolcs-Szatmár-Bereg Megyei Testületének XI. - Közgyűléssel egybekötött -Tudományos Ülése; Közleménykötet.* Nyíregyháza, 26-27 September 2003.
- Nemzetközi konferencián tartott angol nyelvű előadások
  1. **Révész, S.**, Romsics, Cs., Mészáros, É., Mohr, A., Rikker, T., Kende, A., Márialigeti K. (2006) Microbial community analysis of TCE contaminated sites and technology improvement for enhanced bioremediation. *ISEB-ESEB-JSEB 2006 International Conference on Environmental Biotechnology, Leipzig, Germany, 9-13 Júl. 2006.*

---

- Nemzetközi konferencián bemutatott poszterek

1. **Révész, S.**, Pór, T., Masreghi, M., Romsics, Cs., Márialigeti K. (2002): The influence of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on hydrocarbon degradation of isolated hydrocarbon-degrading microorganisms. *International Conference on "Power of Microbes in Industry and Environment" Opatija, 7-9 Jún. 2002, Croatia.*
2. **Révész, S.**, Romsics, Cs., Pór, T., Sipos, R., Palatinszky, M., Márialigeti K. (2003): Stimulation of microbial degradation with cyclodextrins at BTX compounds. FEMS 2003 - 1st Congress of European Microbiologists. Ljubljana, Cankarjev Dom, 29 Jún. - 3 Júl., 2003, Slovenia.
3. Pór, T., **Révész, S.**, Romsics, Cs., Márialigeti, K. (2003): Comparison of the effect of three supplementary compounds on the ability of a microbial community isolated from contaminated soil to biodegrade diesel oil. *FEMS 2003 - 1st Congress of European Microbiologists. Ljubljana, Cankarjev Dom, 29 Jún. - 3 Júl., 2003, Slovenia.*
4. **Révész, S.**, Sipos, R., Kende, A., Rikker, T., Mészáros, É., Márialigeti, K. (2005) Bacterial community changes at TCE biodegradation in microcosms experiments. *IBBS-13; 13th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium. 4-9 Sept., 2005 - Madrid, Spain.*
5. **Révész, S.**, Romsics, Cs., Mohr, A., Kende, A., Rikker, T., Márialigeti, K. (2006) Bacterial community changes at TCE biodegradation in microcosms experiments. *11th International Symposium in Microbial Ecology - ISME-11, Vienna, Austria, 20-25 Aug. 2006.*
6. Táncsics, A., **Révész, S.**, Pór, T., Márialigeti K. (2006) Investigation of aromatic hydrocarbon degradation by bacteria with molecular and enzyme kinetical methods. *ISEB-ESEB-JSEB 2006 International Conference on Environmental Biotechnology, Leipzig, Germany, 9-13 July 2006.*
7. Romsics, Cs., **Révész, S.**, Mészáros, É., Mohr, A., Rikker, T., Kende, A., Márialigeti, K. (2006) Prokaryote diversity of TCE contaminated sites in Hungary. *ISEB-ESEB-JSEB 2006 International Conference on Environmental Biotechnology, Leipzig, Germany, 9-13 July 2006.*
8. Mohr, A., Mészáros, É., Rikker, T., Márialigeti, K., **Révész, S.** (2007) Monitoring the chemical and biological features of a TCE contaminated site in Hungary during in situ biostimulation process *BioMicroWorld 2007 - II. International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology Seville, Spain, 28. Nov. - 1. Dec. 2007.*
9. Varga, K., Mészáros, É., Mohr, A., Romsics, Cs., Rikker, T., Márialigeti, K., **Révész, S.** (2007) Prokaryote diversity of TCE contaminated sites in Hungary *15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology Budapest, July 18-20, 2007.*
10. Tóth, Á., Mohr, A., Mészáros, É., Romsics, Cs., Rikker, T., Márialigeti, K., **Révész, S.** (2007) Microbial community analysis of TCE contaminated sites and technology improvement for enhanced bioremediation *15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology Budapest, July 18-20, 2007.*
11. Varga, K., Mészáros, É., Mohr, A., Romsics, Cs., Tóth, Á., Rikker, T., Márialigeti, K., **Révész, S.**, (2008) Cultivation-based approaches to characterization of TCE contaminated sites *Congress Year 2008 of the Hungarian Society for Microbiology Budapest, Oct. 15-17, 2008.*

## IRODALOMJEGYZÉK

- Alexander, M.: 1965, Biodegradation: problems of molecular recalcitrance and microbial fallibility., *Advances in Applied Microbiology* **7**, 35–80.
- 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.
- 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.
- Feist, C. és Hegeman, G.: 1969, Phenol and benzoate metabolism by *Pseudomonas putida*: Regulation of tangential pathways, *Journal of Bacteriology* **100**(2), 869–877.
- 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.
- 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.
- Kluyver, A. és van Niel, C.: 1956, *The microbe's contribution to biology*, Harvard University Press.
- 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.
- 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.
- Révész, S., Sipos, R., Kende, A., Rikker, T., Romsics, C., Mészáros, É., Mohr, A., Táncsics, A. és Márialigeti, K.: 2006, Bacterial community changes in TCE biodegradation detected in microcosm experiments, *International Biodeterioration & Biodegradation* **58**(3-4), 239–247.
- Singh, A. és Ward, O.: 2004, *Biodegradation and bioremediation*, Springer.
- Smidt, H. és de Vos, W.: 2004, Anaerobic microbial dehalogenation, *Annual Review of Microbiology* **58**(1), 43–73.
- Szejtli, J.: 1988, *Cyclodextrin technology*, Springer.
- Zinder, S.: 1993, Physiological ecology of methanogens, *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics* pp. 128–206.