SZENT ISTVÁN EGYETEM
KÖRNYEZETTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS

Szénhidrogénekkel szennyezett területek mikroba populációjának jellemzése

Szabó István

Gödöllő

2011

A doktori iskola

megnevezése:	**Környezettudományi Doktori Iskola**
tudományága:	**Környezettudomány**
vezetője:	Dr. Heltai György, DSc *egyetemi tanár, tanszékvezető* Szent István Egyetem, Gödöllő Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Környezettudományi Intézet Kémia és Biokémiai Tanszék
Témavezető:	Dr. Szoboszlay Sándor, PhD *egyetemi docens* Szent István Egyetem, Gödöllő Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék

.....	.....
Az iskolavezető jóváhagyása	**A témavezető jóváhagyása**

TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék ... 3
1. Bevezetés ... 5
2. Irodalmi áttekintés ... 9
2.1. Szénhidrogének, mint kockázatos anyagok ... 9
2.1.1. Összes alifás szénhidrogének (TPH) ... 12
2.1.2. Aromás szénhidrogének ... 12
2.1.2.1. BTEX vegyületek - Benzol és alkilbenzolok ... 12
2.1.2.2. PAH vegyületek - Policiklikus aromás szénhidrogének ... 13
2.2. Szénhidrogén vegyületek biológiai lebontása ... 13
2.2.1. Kármentesítési technológiák ... 15
2.2.2. A biodegradációs eljárások és azok csoportosítása ... 15
2.2.2.1. Természetes szennyezőanyag csökkenés (Natural attenuatation) ... 16
2.2.2.2. Természetes biodegradáció fokozása (Biostimulation) ... 16
2.2.2.3. „Ösztönös” talajoltás ... 17
2.2.2.4. Faji szinten identifikált mikrobák alkalmazása (Bioaugmentation) ... 18
2.3. Mikroszervezetek faji szintű meghatározása, identifikációja ... 19
2.3.1. Új mikrobafajok leírása ... 19
2.4. Mikrobiológiai monitoring ... 20
2.4.1. Ökotoxikológiai vizsgálatok ... 21
2.4.2. Molekuláris biológiai vizsgálatok ... 22
2.4.2.1. PCR reakció ... 22
2.4.2.2. Terminális restrikciós fragment hossz polimorfizmus (T-RFLP) elemzés ... 23
2.4.2.3. Klónkönyvtár készítése ... 24
3. Anyag és módszer ... 27
3.1. Biológiai- és geokémiai monitoring rendszer ... 28
3.1.1. A monitoring mintavételi helyszínek bemutatása ... 28
3.1.2. Környezeti mintavételezés szennyezett területekről ... 29
3.1.3. Helyszíni vizsgálatok ... 29
3.1.4. Akkreditált kémiai analitika ... 29
3.1.5. Mikrobiológiai vizsgálatok ... 30
3.1.6. Toxikológiai vizsgálatok Aliivibrio fischeri tesztszervezettel ... 30
3.1.7. Közösségi DNS minta feldolgozás a T-RFLP-hez ... 30
3.1.7.1. 16S rDNS PCR a T-RFLP-hez ... 31
3.1.7.2. Agaróz gélelektroforézis ... 32
3.1.7.3. A PCR termék emésztése T-RFLP-hez ... 33
3.1.7.4. Az emésztett PCR termék tisztítása etanol-precipitációval ... 33
3.1.7.5. T-RFLP analízis ... 34
3.1.8. Klónkönyvtárak létrehozása ... 34
3.1.8.1. Klónkönyvtárak feldolgozása T-RFLP segítségével ... 35
3.1.8.2. Szekvenáló reakció ... 36
3.1.8.3. Kapilláris gélelektroforézis ... 36
3.1.8.4. Szekvencia hasonlóság elemzés ... 36
3.1.9. Statisztikai módszerek ... 37
3.1.9.1. Spearman-féle rang korreláció ... 37
3.1.9.2. Shannon-féle diverzitás elemzés ... 37
3.1.9.3. T-próba, Mann-Whitney U ... 38
3.1.9.4. Klaszter-analízis ... 38
3.1.9.5. Biomarker keresés ... 38
3.2. Szénhidrogén bontó mikroszervezetek izolálása ... 40

3.2.1. Szénhidrogén bontó mikrobák izolálása szennyezett környezeti mintákból 40
3.2.2. Gravimetriás bontási kísérlet 41
3.2.3. Mikroszervezetek faji szintű identifikációja 42
3.2.3.1. DNS tisztítás 42
3.2.3.2. PCR reakció 42
3.2.3.3. Agaróz gélelektroforézis 43
3.2.3.4. PCR termék tisztítása 43
3.2.3.5. Szekvenáló reakció és kapilláris gélelektroforézis, szekvencia elemzés 44
3.2.4. Részletes biodegradációs vizsgálatok (bontási kísérlet) 44
3.3. Új baktériumfaj leírásához szükséges vizsgálatok 45
3.3.1. Molekuláris biológiai vizsgálatok 46
3.3.1.1. Filogenetikai vizsgálatok 46
3.3.1.2. Guanin és citozin arány analízis 46
3.3.1.3. DNS-DNS hibridizáció 46
3.3.2. Fenotípusos vizsgálatok 46
3.3.2.1. Morfológiai leírás 46
3.3.2.2. Sejtmembrán zsírsav anaílzis 47
3.3.2.3. Respiratórikus kinon analízis 48
3.3.2.4. Poláros lipidek meghatározása 48
3.3.3. Elektronmikroszkópos felvétel készítése 48
4. Eredmények 49
4.1. Szénhidrogénekkel szennyezett területek biológiai és geokémiai vizsgálata 49
4.1.1. Biomarkerek keresése a szennyezés előfordulásának megállapítására 55
4.1.2. A bakteriális közösség elemzése klónkönyvtárakkal 57
4.2. Szénhidrogén bontó mikroszervezetek keresése 61
4.2.1. A szénhidrogén bontó törzsek taxonómiai besorolása 62
4.2.2. Bontási kísérlet 66
4.3. A TBF2/20.2 jelű törzs rendszertani besorolása 69
4.3.1. Filogenetikai jellemzés 69
4.3.2. Fenotípusos vizsgálatok 72
4.3.2.1. Morfológiai vizsgálatok 72
4.3.2.2. Fiziológiai fenotípusos és enzimatikus jellemzés 72
4.3.2.3. Kemotaxonómiai jellemzés 74
4.3.3. Az Olivibacter nemzetség bemutatása 75
4.3.4. Az új baktériumfaj (*Olivibacter oleidegradans*) bemutatása 76
5. Következtetések, javaslatok 79
6. Összefoglalás 83
7. English summary 85
8. Irodalomjegyzék 87
9. Köszönetnyílvánítás 101

1. BEVEZETÉS

„A világ erőforrásai elegendőek ahhoz, hogy kielégítsék mindenki szükségleteit, de nem elegendőek ahhoz, hogy kielégítsék mindenki mohóságát.”
Mahatma Gandhi

Elég csak a közelmúlt eseményeit áttekinteni ahhoz, hogy megértsük, milyen környezeti veszélyeket rejtenek magukban az emberiség egyre fokozódó energiaszükségletének kielégítésére használt fosszilis energiahordozók, ezen belül is a szénhidrogének, vagyis a kőolaj származékok. A teljesség igénye nélkül az *Exxon Waldez* (1989), vagy a *Deepwater Horizon* (2010) mind-mind közismert nevek a súlyos környezeti kárt okozó olajszennyezések között. E két havária esemény által okozott környezeti kár mértéke is jól példázza a természetes forrásból származó, kitermelések során felszínre hozott, az olajipari technológia során adalékolt ásványolaj környezetkárosító hatását. Érdekes, hogy míg előbbivel kapcsolatosan a kutatási eredmények arról számolnak be, hogy a szárazföldi szennyezések nyomai még ma is (húsz év elteltével) megtalálhatóak az egykor érintett partszakaszon (Li & Boufadel, 2010), a másik esetben az egész világot bejárta a hír, miszerint a tengeri olajszennyezés tulajdonképpen megszűnt a szennyezés helyszínén található olajbontásra képes mikroszervezeteknek köszönhetően (Hazen et al., 2010).

A XXI. században az emberiség által teremtett civilizált környezet szinte minden előállítási, működési folyamata energiaigényes, melynek alapját a fosszilis energiahordozók jelentik, így az olajipari termékek elégetése útján nyerhető energia. A világ jelenlegi fejlődési irányával, vagyis a civilizáció globális méretű terjedésével párhuzamosan nő az azt ellátó energia felhasználása. A jelenlegi tendenciák mellett ma már jól látható, hogy ez a fokozódó fosszilis energia igény egyre problémásabb módon kielégíthető a véges természetes olajkészletekből. Az kőolaj iránti növekvő kereslet és az eddigi kitermelő helyek kimerülése olyan, eddig fel nem tárt, vagy nehezen elérhető készletek irányába hajtják a feltárásokat végző vállalatokat, amelyeket ez idáig gazdasági, vagy más okból nem tekintettek kitermelendő területeknek. Ebből következik, hogy olyan olajmezők ipari feltárása is megkezdődött, illetve megkezdődik, ahol eddig, például a környezeti, természeti szempontok szabtak gátat a kitermelésnek (pl. olajkitermelés természetvédelmi területeken). Ezek a folyamatok sajnálatos módon a jövőre nézve előrevetítik azt is, hogy a továbbiakban is számítanunk kell a fent említett havária szintű szennyezésekre nem csak a világ távol eső részeiben, de Európában és hazánkban is (Juhász, 2010).

A legtöbb környezeti szennyezést, akárcsak a világon, hazánkban is az olajszármazékok okozzák (Barótfi, 2000). Így a hazai környezetvédelmi gyakorlat egyik leggyakoribb kihívása a felszín alatti vizek és a földtani közeg szénhidrogén szennyezettségének felszámolása (Atzél, 2008). Magyarországon a szennyezéseket ugyan legfőképpen nem a kitermelés során keletkező problémák okozzák, de a szállításból (pl. vezetéksérülések), tárolásból (pl. egykori üzemanyag tartályok) és az

olajtermékek kiszolgálásából (pl. töltőállomások) származó szennyezések az egész ország területére jellemzőek. A világon lejátszódó tendenciákhoz hasonló folyamatok nálunk is érezhetőek pl. a feltárások, vagy az újonnan fektetett szállító vezetékek nálunk is megjelennek természetvédelmi- (pl. olajfúrás a vétyemi ősbükkösben), illetve a felszín alatti víz szempontjából érzékeny, illetve fokozottan érzékeny területeken.

Az olajipari származékokból adódó környezeti szennyezések szempontjából, s ez más, környezetre veszélyes tevékenységek esetében is igaz, a megelőzés kell, hogy jelentse a környezetvédelmi munka elsődleges feladatát. A szennyezés bekövetkezése után a környezeti elemek, valamint a természeti értékek ugyanis is olyan mértékben károsodhatnak, hogy azok helyreállítása jelentős mennyiségű gazdasági eszköz, illetve energia befektetést igényel, ha az egyáltalán lehetséges. A szennyezés bekövetkezése után, a hazai jogi szabályozásnak megfelelően, általában a szennyezéssel kapcsolatos információk összegyűjtése és környezetvédelmi célú értékelése (tényfeltárás) után a tervezési és kivitelezési szakaszban a helyi adottságoknak megfelelően úgy kell eljárnunk, hogy a szennyezés felszámolása minél hatékonyabban menjen végbe. Az ilyen, ún. csővégi szennyezések felszámolására ma már számos módszer áll rendelkezésünkre. A módszerek lehetnek például fizikai, kémiai, termikus, vagy szigeteléses eljárások, valamint az ezek közül leginkább természet közelinek számító biológiai módszerek. Az ilyen módszerek lényege a természetes erőforrások, például prokarióta szervezetek (baktériumok) xenobiotikumbontó képességének alkalmazása a kármentesítés érdekében. Az Amerikai Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala (US EPA) minden olyan esetben, amelyben csak lehetséges, a biológiai módszerek alkalmazását részesíti előnyben az egyéb eljárásokkal (termikus, fizikai-kémiai stb.) szemben. A biológiai módszerek lényege a természetes erőforrások, például prokarióta szervezetek (baktériumok) xenobiotikumbontó képességének alkalmazása a kármentesítés érdekében. Ennek egyik legegyszerűbb módszere a természetes öntisztuló képesség kiaknázása, vagyis a szennyezett területen bontó képességgel rendelkező mikrobák bontási kapacitásának felmérése és alkalmazása. Ezért a szénhidrogén szennyezés hatására kialakuló mikrobiota összetétele a kárhely öntisztuló képességének megismerése szempontjából meghatározó jelentőségű. Másik lehetséges módszer a bioaugmentáció, mely során igazoltan szénhidrogén bontási kapacitással rendelkező baktériumok felhasználása történik. Az ilyen lebontó mikroszervezetek alkalmazásának gátat szabhatnak a szennyezett terület környezeti tényezői, mint pl. a szennyező anyagok mennyisége, összetétele, valamint az adott közegben élő mikrobaközösségek. A bioaugmentáció segítségével tehát természetes körülmények között a szénhidrogén szennyezések felszámolhatók, amennyiben a szennyezett kárhely környezetvédelmi, valamint biológiai és geokémiai tulajdonságai azt lehetővé teszik.

A szénhidrogének lebontásának kulcs szervezetei a baktériumok mellett a mikrobiális gombák (Leahy, 1990). Jelen dolgozatban a szennyezett területek mikroba popoulációjának jellemzését, E. Díaz 2008-as munkájához hasonlóan, csak a szerves szennyező anyagok mikrobiológiai biodegradációban részt vevő bakteriális közösség elemzésén keresztül mutatjuk be.

Dolgozatom elsődleges **célkitűzése annak megállapítása volt, hogy a szennyezés mennyiben változtatja meg a bakteriális közösség diverzitását, faji összetételét, valamint megjelölhetők-e olyan közösség alkotók, amelyek csak a szennyezett vagy az ugyanazon területről származó nem szennyezett (a továbbiakban „háttér") mintákra jellemzőek, vagyis a környezetvédelmi gyakorlat számára a jövőben ún. biomarkerként alkalmazhatók**. Ennek érdekében biológiai és geokémiai monitoring rendszert működtettünk, amely során három hazai olajszármazékokkal szennyezett helyszín többcélú vizsgálatát valósítottuk meg. A célkitűzés megvalósítása érdekében összefüggéseket kerestünk a háttér és szennyezett minták kémiai analitikai, valamint toxikológiai eredményei között statisztikai módszerekkel. Ezen felül a mikroba populációk részletesebb megismerése érdekében a szennyezett helyszínekről származó talajvíz minták analitikai és mikrobiológiai vizsgálatán túl molekuláris biológiai módszereket is alkalmaztunk: elvégeztük a mintákból származó közösségi 16S rDNS terminális restrikciós fragment hossz polimorfizmus (T-RFLP) alapú elemzését, valamint klónkönyvtárak segítségével meghatároztuk a közösség alkotó baktériumokat. A biomarkerek keresése érdekében szintén a T-RFLP adatok felhasználásával statisztikai elemzéseket végeztünk, mind a szennyezett, mind a háttér minták esetében. A hasonló kutatásoktól eltérően tehát az azonos területről származó szennyezett mintákon felül azonos területről származó háttér minták analitikai, toxikológiai és mikrobiológiai tulajdonságait is vizsgáltuk.

Mint fent említettem a szennyezések felszámolásának környezetvédelmi szempontból leginkább elfogadható módja a bioaugmentáció, vagyis a szennyezett közeg oltása (inokulálása) igazoltan bontó mikrobákkal. Dolgozatom második részében célunk olyan szénhidrogén bontó baktériumok izolálása volt, amelyek szintén szennyezett területekről származnak, de tulajdonságaik alapján okszerűen felhasználhatók lehetnek az említett szénhidrogénekkel szennyezett monitoring helyszíneken. Ehhez a monitoring helyszínektől független szennyezett területekről **olyan mikrobákat kerestünk, amelyek *in vitro* igazolhatóan képesek szénhidrogén szennyezések lebontására**. Ezeket a mikroszervezeteket olyan hazai területekről származó környezeti mintákban kerestük, amelyek mikrobiális közösségét érintette szénhidrogén szennyezés, azt feltételezve, hogy a szennyezés hatására nagyobb számban szelektálódnak az adott közegben degradációs képességgel rendelkező baktériumok. Ahhoz, hogy ezeket a mikrobákat később oltóanyagként is fel tudjuk használni, ismerni kellett azok degradációs, patogenitási tulajdonságait, ezért az újonnan izolált

törzseket szintén 16S rDNS alapú vizsgálatokkal Tindall et al, 2010 előírásait követve faji szinten identifikáltuk.

Tudományos munkánk nem várt eredménye volt, hogy ez utóbbi munkaszakasz során olyan mikroba törzset izoláltunk, amely a molekuláris biológiai és egyéb vizsgálatok eredménye alapján egy **eddig ismeretlen, új baktérium faj leírásá**hoz vezetett.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A szennyező anyagokra vonatkozó, jelenleg hatályos 6/2009. (IV. 14.) „A földtani közeg és a felszín alatti víz szennyezéssel szembeni védelméhez szükséges határértékekről és a szennyezések méréséről” című KvVM-EüM-FVM együttes rendelet tartalmazza azon kémiai elemek és vegyületek listáját, amelyeket környezetvédelmi szempontból kockázatosnak tekintünk. A rendelet a 219/2004. (VII. 21.) „a felszín alatti vizek védelméről” című Kormányrendelet alapján meghatározza az ezen anyagokra vonatkozó „B” szennyezettségi határértékeket. A szennyezettségi határérték az a szennyezőanyag-koncentráció a felszín alatti vízben, illetve a földtani közegben, amelynek bekövetkeztekor a földtani közeg, a felszín alatti víz szennyezettnek minősül. Munkánk során - a hatályos jogszabályok alapján meghatározott - szénhidrogén származékokkal szennyezett területekről származó baktériumok többcélú vizsgálatát végeztük el.

2.1. Szénhidrogének, mint kockázatos anyagok

Szénhidrogén szennyezéseket a földtani közegbe, illetve a felszín alatti vízbe mesterséges úton jutó kőolaj származékai és termékei okozzák. Az ásványolaj többnyire sötét színű, sűrűn folyó anyag, számos (esetenként több ezer) vegyület keveréke, amelynek összetétele az előfordulási helytől függően változik. Kémiailag a nyersolaj különböző vegyületek bonyolult elegye, ezernél több telített (egyszeres-), illetve telítetlen (többszörös kovalens kötéseket tartalmazó) szénhidrogén komponenst tartalmaz, amelyek a legveszélyesebb mikroszennyezők közé sorolhatók. A nyersolajokban, a szénhidrogéneken túl kis mennyiségben oxigén, kén- és nitrogén tartalmú vegyületek, valamint fémkomponensek is lehetnek. A különböző kőolajok átlagos elemi összetétele viszonylag tág határok között mozog: 81-87 % szén, 10-14 % hidrogén, 0-7 % oxigén, 0-6 % kén, 0-1 % nitrogén. A szénhidrogének összetételét tekintve a kőolaj (nyersolaj) különböző szerkezetű és molekulatömegű, nyílt szénláncú (alifás), ezen belül egyenes szénláncú, normál (n-) paraffinok, elágazó szénláncú, izo (i-) paraffinok, gyűrűs szénláncú (aliciklikus), ciklo (c-) paraffinok és aromás gyűrűt tartalmazó, valamint a több aromás gyűrűt magába foglaló poliaromás szénhidrogének (PAH) elegye. Az összetétel alapján megkülönböztetünk paraffinbázisú, átmeneti és nafténbázisú kőolajokat (ez utóbbi főleg aromás, illetve poliaromás szénhidrogéneket tartalmaz). A tiszta normál paraffinok szagukról alig ismerhetők fel, az illékonyabb homológok (pl. n-heptán, n-oktán és n-nonán) inkább kellemes, jellegzetes gyümölcsszerű szaggal rendelkeznek, a magasabb forrpontúak pedig szintén szagtalanok. Az olajtermékek tipikus „benzinszagát” túlnyomóan az izoparaffinok, az aromás és poliaromás komponensek adják (Hancsók, 2004; Markó, 2005).

A világ energiatermelésében és fogyasztásában a fosszilis energiahordozók (kőolaj, földgáz, kőszén) közel 80%-os szerepet játszanak. Ennek több mint fele a kőolaj égetéséből származó energia. A British Petrol adatai alapján a világ évi kőolaj termelése 2009-ben kb. 3800 milliárd

tonna volt. Magyarországon az energiaellátás 1/3-a származik kőolajból (7-8 millió tonna), amelynek 2/3-át importáljuk. A nyers kőolajat, előtisztítást követően (propán és a bután leválasztása), frakcionált desztillálással választják szét nyers benzinre, petróleumra, gázolajra, kenő és paraffinolajra, valamint aszfaltra (desztillálási maradék). Ezeket a főbb párlatokat további tisztítási és desztillációs technológiákkal finomítják és a felhasználásnak megfelelően adalékolják (Nádor, 1982; Szabó, 1989; Nagy, 2000; Barótfi, 2000, Rácz et al., 2002; WHO, 2008; Biritish Petrol, 2010).

A kőolajtermékek közül a keverékanyagok, mint a gazolin, a benzin, a középpárlatok, a kenőolajok és a különböző ipari célvegyületek, mint pl. a metil-terc-butiléter (MTBE) okozhatnak nagyobb mértékű talaj- és talajvíz-szennyezést. Az olajipari termékekben lévő folyékony gőzök, gázok ugyanis a beszivárgás előtt jórészt elpárolognak, a nehéz olajok és a bitumen pedig csak igen kis mértékben tudnak beszívódni a talajba, sok esetben impregnálják azt. Esetükben nagyobb kockázatot az okoz, ha a szennyezett területeken ezek a nehéz olajok valamilyen szerves oldószerrel egy időben és térben jelennek meg (hazánkban pl. vasúti javító állomások területén, vagy szomszédos ipari technológiák esetén). Mivel a kitermelt szénhidrogén elegy, vagyis az ásványolaj is a környezetre, az ökoszisztéma egyes elemeire és az egészségre veszélyes anyag, s ezen tulajdonságát általában csak fokozza a felhasználási célnak megfelelő mesterséges adalékolása, az olajipari termékek kockázatos anyagnak, a velük szennyeződött fel nem felhasznált ipari melléktermékek pedig veszélyes hulladéknak minősülnek. Éppen ezért minden olyan tevékenység, amely során a környezeti elemekbe kőolaj, vagy származékai kerülhetnek kockázatosnak tekintendők és potenciális szennyezőforrások. A talaj és talajvíz szennyeződése ezek alapján előfordulhat a kőolaj kitermelése, feldolgozása, az egyes termékek szállítása, szakszerűtlen tárolása, kiszolgálása másodlagos szennyezése (pl. légszennyezés) folyamán. Káros hatása, hasonlóan más környezeti szennyezőkhöz, függ a környezetbe jutott szennyezőanyag mennyiségétől, tulajdonságaitól és a lokális környezet adottságaitól (talajadottságok, talajvíz mélysége, csapadék mennyisége, éghajlati, időjárási tényezők, természetes és épített környezet). Az ásványolaj és származékainak vizeink minőségére gyakorolt káros hatása sokirányú. A szénhidrogének általában mérgezőek a vízi életközösségekre. A toxikus hatás különböző lehet, nagymértékben függ a vegyület vízben való oldhatóságtól (Barótfi, 2000). A szénhidrogének környezetkárosító hatásai között leggyakrabban az alábbiak szerepelnek:

a.) A szénhidrogének egyes vegyületei íz- és szagrontók is lehetnek. Így az ivó-, illetve felszíni vízbe kerülve már igen kis mennyiségben is fogyasztásra alkalmatlanná teszik vizeinket.

b.) Az illékony komponensek a levegő oxigénjével tűz- ill. robbanásveszélyes elegyet alkothatnak.

c.) Egyes aromás és poliaromás vegyületek bizonyítottan rákkeltő hatással bírnak, valamint toxikusak, mutagének lehetnek. Ezek közül néhány akár bőrön át felszívódva is karcinogén hatású lehet (pl. benzol).

d.) Gőzeiket belélegezve a véráramba kerülnek, mely által akut toxikus reakciót, májkárosodást vagy teratogén hatást válthatnak ki.

e.) A talajba, talajvízbe beszivárgó szénhidrogének hosszabb-rövidebb ideig perzisztálnak és terjednek a talajban, a közeg hidraulikus vezetőképessége, szerves anyag és agyagásvány tartalma, valamint mikrobiológiai aktivitása függvényében.

f.) A szénhidrogén szennyezők apoláros jellegük miatt a kapillárisokból a vizet, levegőt kiszorítják, anaerob talajállapotot okoznak.

g.) Hatásukra gátlódhatnak a biológiai anyagkörforgalmi rendszerek.

h.) Az olajszármazékok élő- és/vagy talajvízbe, illetve rétegvizekbe kerülve, azzal szétterjedve (migrálva) a szennyezőforrástól jelentős távolságban is kifejthetik környezetkárosító hatásukat (Walker et al., 1975; Nyer, 1993; Wilson & Jones, 1993; Barótfi, 2000; Szoboszlay et al., 2002; WHO, 2008, Táncsics et al. 2010).

A szénhidrogének humán egészségügyi hatásai közvetlen expozíció esetén majd minden emberi szerv esetében jelentkezhetnek. Az általuk okozott tüneteket és szervi elváltozásokat az 1. sz. táblázat tartalmazza.

1. számú táblázat Szénhidrogének által okozott tünetek és elváltozások (Bordás, 2005 nyomán)

Érintett szervek	**Tünetek**
Légzőszervek	Nehézlégzés, cianózis, vérköpés, tüdőödéma, tüdőgyulladás, lipid pneumonia
Központi idegrendszer és perifériás idegek	Depresszió, excitáció (belégzés és lenyelés után, zavartság, nisztagmus, egyensúlyvesztés, hányinger, hányás, fáradtság, kimerültség, alvászavar, tudatvesztés, érző- és motorosidegek károsodása (paralízis), Parkinson tünetek
Gyomor és bélrendszer	Hányinger, hányás, hasmenés, hasfájdalom
Máj	Májenzimértékek emelkedése, gyulladás, fibrózis
Vese	Akut turbuláris nekrózis, fehérjevizelés, vérvizelés
Vér és vérképző szervek	Véralvadászavar, hemolítikos anémia, csontvelő károsodás, akut leukémia, methemoglobinémia
Bőr	Kiütések, erithémák, allergiás elváltozások

A fejezet bevezetőjében említett 6/2009. együttes rendelet a kőolaj komponenseket három fő szennyező anyag kategóriába sorolja: alifás szénhidrogének (TPH), benzolok és alkilbenzolok (BTEX vegyületek) valamint a policiklikus aromás szénhidrogének (PAH). Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) ivóvíz minőségre vonatkozó ajánlása - hasonlóan a magyar 201/2001 (X. 25) kormányrendelethez - általánosságban olajipari termékekre külön-külön nem állapít meg határértéket, de jónéhány szénhidrogén (pl. benzol, etil-benzol, toluol, xilolok, benz(a)pirén) esetében meghatározza azt (WHO, 2008).

2.1.1. Összes alifás szénhidrogének (TPH)

A nemzetközi környezetvédelmi gyakorlat „Total Petrol Hydrocarbon (TPH)” elnevezéssel illet minden kőolaj eredetű, C_5-C_{40}-ig terjedő szénatomszámú szénhidrogént. Ezzel szemben a hazai jogszabályokban a TPH csoportba csak az alifás, C_5-C_{40} vegyületeket sorolják (továbbiakban ez alapján értelmezendő). A TPH vegyületek kémiailag lehetnek telítettek és telítetlenek, valamint ezen belül egyenes, elágazó és gyűrűs láncúak. A TPH-n belül elkülönítjük a VALPH (Volatile Aliphatic Petroleum Hydrocarbon) vegyületeket, amelyek illékonyak és 5-10 szénatomot tartalmaznak fő komponensként (megtalálhatóak gazolinban, benzinben és kerozinban), illetve az EPH vegyületeket (Extractable Petroleum Hydrocarbon), amelyek kevésbé, vagy egyátalán nem illékony vegyületek (gázolaj, kenőolajok fő alkotórészei) (Szoboszlay & Kriszt, 2010).

2.1.2. Aromás szénhidrogének

Telítetlen gyűrűs, konjugált kettős kötést tartalmazó, jellegzetes szagú, szerves vegyületek. Lehetnek mono-, illetve poliaromás szerkezetűek, utóbbi esetben az aromás gyűrűk közös szénatomokon keresztül építik fel szerkezetüket. Legegyszerűbb képviselőjük a hat szénatomot és hat hidrogént tartalmazó benzol, amelynek gyűrűjét a kötésben részt vevő szénatomok elektronjai stabilizálnak (Markó, 2005). A 6/2009 (IV. 14) együttes rendelet monoaromás, BTEX és poliaromás, PAH vegyületeket különít el.

2.1.2.1. BTEX vegyületek - Benzol és alkilbenzolok

Illékony, monoaromás vegyületek, melyek közül a legjelentősebbek a csoport névadói: a *b*enzol, *t*oluol, *e*til-benzol és a *x*ilolok. A csoport vegyületei már igen kis koncentrációban toxikusak, sőt a benzol emberben bizonyítottan humán karcinogén hatású (WHO, 1982), belélegezve mérgező vegyület.

Erősen kormozó lánggal ég és gőzei a levegővel robbanó elegyet alkotnak. A kémiai iparban mutatott számos előnyös tulajdonsága ellenére a felhasználását korlátozni kell, mivel erős méreg. Károsítja a csontvelőt, károsítja a hajszálerek falát és véralvadási zavarokat is okozhat. Jól oldódik lipidekben, ezért az olyan lipidgazdag szövetekben halmozódhat fel, mint a csontvelő, mellékvese, idegrendszer. Ez utóbbi magyarázza, hogy fejfájást, hányingert, eszméletlenséget is okoz (Breuer, 1995). A benzol által okozott halál általában légzésbénulás miatt következik be. (Dési, 2001). Az expozíció megszűnése után akár évek múlva is kialakulhatnak rosszindulatú nyirokszervi daganatok, fehérvérűség (Láng, 2002).

A toluol (metil-benzol) színtelen, benzolra emlékeztető szagú, gyúlékony, mérgező folyadék. A benzolhoz hasonlóan ipari oldószerként használják, sokféle ipari termék kiindulási anyaga. A toluol az idegrendszerre és a bőrre izgató hatást fejt ki, de a benzollal ellentétben nem vérméreg (Breuer, 1995).

Az etil-benzol esetében a benzol gyűrűhöz egy etil csoport ($-CH_2-CH_3$) kapcsolódik. Jellegzetes szagú, víztiszta, mozgékony, éghető folyadék. Kémiai reakciói a benzol és az etán reakcióihoz hasonlítanak.

A xilol (dimetil-benzol) aromás szagú, víztiszta, éghető folyadék. Kémiai szerkezete a toluolhoz hasonló, de a xilol esetében a benzol gyűrűhöz két metil csoport ($-CH_3$) kapcsolódik. A két metl csoport egymáshoz képest három különböző gyűrűalkotó szénatomon helyezkedhet el, így három térbeli izomerje ismeretes az orto-, meta-, és para-xilol. Az izomerek tulajdonságai kissé különböznek egymástól (Breuer, 1995). Az izomerek közül főleg a p-xilol fejt ki izgató hatást az idegrendszerre és a bőrre (Dési, 2001).

2.1.2.2. PAH vegyületek - Policiklikus aromás szénhidrogének

Tökéletlen égés, valamint növényi, állati szervezetek bomlása során keletkező vegyületek, de a nyers kőolajban is megtalálhatók. A rendelet alapján a csoportba 19, több (2-7) aromás gyűrűt tartalmazó szénhidrogén tartozik, melyek a naftalin kivételével nem illékonyak. Közülük a benz(a)antracén, krizén, benz(b)fluorantén, benz(k)fluorantén, benz(a)pirén, indenol(1,2,3-c,d)pirén valamint a dibenz(a,h)antracén emberben bizonyítottan rákkeltő hatású PAH vegyületek (WHO, 2010).

PAH vegyületekkel dolgozatomban nem foglalkoztam. A TPH és BTEX vegyületek esetében a földtani közegre, valamint a felszín alatti vízre vonatkozó B szennyezettségi határértékeket a 2. számú táblázat tartalmazza.

2. számú táblázat A dolgozatban vizsgált szerves szennyezőkre vonatkozó B szennyezettségi határértékek [6/2009 (IV.14) KvVM-EüM-FVM együttes rendelet alapján] *EAB: egyéb alkil-benzlok

Szennyezettségi határérték (B)	**Mérték-egység**	**A vizsgált szénhidrogén vegyületek**					
		TPH	*Benzol*	*Toluol*	*Etil-benzol*	*Xilolok*	*EAB**
Felszín alatti víz	*µg/l (mg/l)*	100	1	20	20	20	20
Földtani közeg	*mg/kg*	100	0,5	0,2	0,2	0,2	0,2

2.2. Szénhidrogén vegyületek biológiai lebontása

A mikroorganizmusokban anyagcsere folyamataik során állandó kémiai átalakulások zajlanak, biomolekulák szintetizálódnak, lebomlanak a tápanyagok és a már szükségtelenné vált molekulák (Boross & Sajgó, 1993). Különösen igaz ez a talajban élő lebontó mikrobákra, amelyek a szerves anyag bontásában (mineralizáció), átalakításában (transzformáció) vesznek részt. A talajok biológiai közösségei igen rugalmas adaptációs rendszert képeznek az idegen és az új kémiai szerkezetek lebontására, hatástalanítására (Szabó, 2008). A bontást megalapozó anyagcsere enzimekkel katalizált reakciók összessége. Az enzimek olyan fehérjék, amelyek aktív centrummal rendelkeznek, amely a meghatározott szubsztrát kapcsolódását teszi lehetővé, így katalizálják a kémiai reakciókat. Térszerkezetükből fakadóan specifikusan meghatározzák a reakció kiindulási és

végtermékét (Szeberényi, 2004). A mikroorganizmusok által végzett katabolikus, illetve transzformációs folyamatok összességét biodegradációnak nevezzük. A mikroorganizmusok ezen képességét kihasználva, lehetőség nyílik arra, hogy a mesterséges úton a környezetbe kerülő szennyezőanyagokat környezetkímélő módon eliminájuk (Szoboszlay & Kriszt, 2010).

A biodegradáció lehet teljes, vagy részleges. Előbbi esetén a szerves vegyületekből a mineralizációs folyamatok során, széndioxid és víz keletkezik, míg az utóbbiban rendkívül sok és változatos vegyület alakul ki. A részleges biodegradáció következhet az átalakítást végző enzimrendszer valamely tagjának hiányából, vagy abból, hogy a körülmények nem optimálisak a lebontó szervezetek számára, így részlegesen oxidált közti termékek keletkeznek. Más esetekben a sejt bioszintetikus folyamatai révén a kiindulási vegyületeknél komplexebb és sok esetben toxikusabb anyagok jöhetnek létre. Ezek a környezetbe, vagy az emberi szervezetbe kerülve akár kockázatosabbak is lehetnek, mint a degradálni kívánt szennyezőanyagok (Maier, 2000). A kőolaj - ahogy azt korábban bemutattam - egy komplex keverék, a legkülönbözőbb szénatomszámú, illékonyságú, oldhatóságú és polaritású szénhidrogének széles skáláját tartalmazza, valamint kis mennyiségben oxigén-, kén-, és nitrogéntartalmú vegyületeket és fémkomponenseket. Egyes prokarióták rendelkeznek olyan enzimekkel, melyek lehetővé teszik, hogy ezeket az összetett, szerves vegyületeket szénforrásként hasznosítani tudják (Pesti et al., 2001). Az egyszerű szénhidrogének egy része biológiailag könnyen elbomlik és kevésbé toxikus anyagok jönnek létre. Náluk jóval kockázatosabbak az aromás és a poliaromás vegyületek (Németh, 2001). A kárhelyek mikroba közösségének jónéhány tagja részt vehet a xenobiotikumok lebontásában, például úgy, hogy az egyik mikroba által végzett degradáció végtermékét egy másik mikroszervezet tápanyagként hasznosítja (Szabó, 2008).

A szénhidrogén bontási képesség széles körben elterjedt a mikroszervezetek között. Több különböző baktérium és gombacsoport is rendelkezik ezzel a tulajdonsággal. Atlas (1981) 22 baktérium, egy alga és 14 gomba nemzetséget említ, melyek mind vízi környezetből lettek izolálva. Az általuk említett legjelentősebb szénhidrogén bontó taxonok: *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Candida*, *Rhodotorula* és *Sporobolomyces*. Számos jól ismert szénhidrogén bontó mikroba tartozik a Proteobaktériumok csoportjába, például a *Sphingomonas* (α-*Proteobaktériumok*), a *Comamonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Delftia*, *Acidovorax*, illetve a *Hydrogenophaga* (β-*Proteobaktériumok*), valamint a *Pseudomonas* (γ-*Proteobaktériumok*) nemzetség tagjai. A Proteobaktériumok bontási mechanizmusa és ezen belül a szubsztrát specifitásuk, illetve a lebontás folyamata jól ismert folyamatokon alapul (Arai et al, 1998; Zhang, 1999; Khang et al, 2000; O'Sullivan et al, 2005; Ryan et al, 2007; Fahy et al., 2008). Ennek megfelelően, ahogy azt a

„Bevezetés” fejezetben is említettük jelen dolgozatban a bakteriális bioremediációval foglalkozunk részletesen.

Az optimális bontáshoz kedvező környezeti feltételek megteremtésére van szükség. Olyan környezeti változókat kell figyelembe venni, mint az oldott oxigén mennyisége, a pH, a hőmérséklet, a nedvességtartalom, az elektron akceptorok megléte [pl. a szervetlen tápanyagok megléte (főként nitrogén és foszfor)], a talaj pórustérfogata, kötöttsége, a leiszapolható rész aránya, illetve a gátló tényezők (extrém toxikus elem tartalom, növényvédő szer maradvány, szabad fázisú szennyezés stb.). A lebontás kezdeti lépéseiben kulcsszerepet játszó oxigenázok molekuláris oxigénigényét ki kell elégíteni, így a bioremediáció során fontos az aerob feltételek megteremtése (Tóth & Táncsics, 2009).

2.2.1. Kármentesítési technológiák

A szénhidrogének és egyéb szennyezők közegből való eltávolítására napjainkban számos technológia ismert. Ezek a kármentesítési módszerek lehetnek fizikai-kémiai, termikus, izolációs, illetve biológiai eljáráson alapulók. A kármentesítést (beavatkozás) végezhetjük *in situ*, vagy *ex situ* módszerekkel. *In situ* technológiákról akkor beszélünk, amikor az elszennyezett közeget olyan módszerekkel tisztítják meg, mely során a szennyezett közeget nem termelik ki, valamint a tisztított felszín alatti vizet visszanyeletik, szikkasztják a területen belül. Az *ex situ* technológiák esetében a szennyezett közeget, illetve felszín alatti vizet kitermelik, és csak kitermelés után általában jól kontrollálható körülmények között mentesítik a szennyezőanyag(ok)tól (Barótfi, 2000; Németh, 2001; Szoboszlay & Kriszt, 2010).

2.2.2. A biodegradációs eljárások és azok csoportosítása

Mint ahogy a bevezetésben említettük az US EPA a fenti beavatkozási módszerek közül a biológiai módszerek alkalmazását részesíti előnyben minden olyan esetben, ahol ez lehetséges (Szoboszlay et al., 2002). A bakteriális alapon végezhető biodegradációs eljárások előnyei, hogy a felszín minimális bolygatásával járnak (csekély a veszélye más közegek elszennyezésének), nagy kiterjedésű területekre is alkalmazhatóak, költségük rövid távon viszonylag alacsony (nincs kitermelés, szállítás, sőt a technológiai megoldások is lehetnek költségkímélőek), a talaj élővilágával kíméletesek. A legtermészetesebb kármentesítési módszernek a biológiai eljárások tekinthetők (Szoboszlay & Kriszt, 2010).

Míg a szennyezett talajok fizikai-, illetve kémiai tisztítása köbméterenként 7-800 dollárba is kerülhet, ugyanilyen mennyiségű talaj mikrobákkal történő rekultiválása 2-300 dollár körül mozog (Tóth & Táncsics, 2009). Emellett a biológiai eljárások általában kisebb energiaigénnyel bírnak, így az energiaegységre vonatkozó kármentesítési haszon nagyobb lehet. Szerves szennyezőanyagok mikroszervezetek által történő lebontása, átalakítása során, ideális esetben, különböző oxidáltsági

fokú vegyületeken keresztül döntő hányadban szén-dioxid és víz keletkezik. Az *in situ* remediáció hátránya, hogy a maradék szennyezettség és a köztitermékek miatt a munkálatok során fokozott kockázattal kell számolni, hiszen a szennyezett környezeti elem/fázis nincs izolálva a nem szennyezett környezettől.

A biodegradációs eljárások alkalmazásánál figyelembe kell venni:

1. Alacsony hőmérsékleten a lebontás lényegesen csökken, vagy akár le is állhat.
2. A mikroszervezetek szennyezés tűrő és bontó képessége változó.
3. Az eljárás kezdete előtt a szabad fázisban lévő szennyezőanyagokat el kell távolítani (az anaerob körülmények elkerülése miatt).
4. Patogén vagy fakultatív patogén mikrobák felszaporítása és alkalmazása jelentős egészségügyi kockázattal jár (Szoboszlay & Kriszt, 2010).
5. A szennyezés monitoring rendszerének kiépítése szükséges lehet attól függetlenül, hogy a területen minimális beavatkozás történik, így a biológiai kármentesítés hosszútávon jelentős költségekkel járhat.

Az alábbi alfejezetekben biológiai kármentesítés típusait mutatjuk be.

2.2.2.1. Természetes szennyezőanyag csökkenés (Natural attenuatation)

Mesterséges beavatkozástól mentes „spontán degradáció”, melynek során a szennyezett közegben megjelenő szénforráshoz alkalmazkodva (adaptálódva) a kárhelyen lévő mikroszervezetek közül azok szaporodnak fel, amelyek képesek a szénhidrogén vegyületek hasznosítására. A természetes úton megvalósuló spontán biodegradációt öntisztulásnak is nevezik. A módszer kivitelezhetőségét a terület nagyban befolyásolhatja, mert a bontó mikrobák növekedéséhez és szaporodásához a szénforráson kívül egyéb tápanyagokra és elektron akceptorokra is szükség lehet. A degradációs folyamatok összehasonlítva egyéb módszerekkel általában igen lassan mennek végbe. Különösen igaz ez a spontán biodegradáció esetében, hiszen a bennszülött bakteriális mikrobaközösség tagjai nem biztos, hogy rendelkeznek olyan enzimrendszerrel, amely a jelenlevő szénhidrogén vegyületek teljes spektrumát bontani képes. Emiatt a kármentesítési módszert általában szennyezés monitorozással egészítik ki, amely során folyamatos ellenőrző analitikai mérések mellett ellenőrzik a koncentráció változást a kárhelyen (*monitored natural attenuatation*). (Leahy & Colwell, 1990; Chaineau et al., 1996; Korda et al., 1997; Margesin & Schinner, 2001; Németh, 2001; Szabó, 2008; Atzél, 2008).

2.2.2.2. Természetes biodegradáció fokozása (Biostimulation)

A szénhidrogén vegyületek lebontásához, illetve a mikrobák enzimrendszereinek megfelelő működéséhez makro- mikro- és nyomelemekre is szükség van. A legfontosabb limitáló tényezők ezekből a nitrogén, foszfor és kálium, valamint a környezeti körülmények közül a nedvesség, illetve

az oxigén tartalom a mentesíteni kívánt közegben. Egyes makroelemek arányának helyes megválasztásával (pl.: C:N=10:1, C:P=100:1) illetve a szennyezett közegbe történő keverésével a mikrobiális bontás sebessége fokozható („támogatott spontán biodegradáció”). Az adalékok lehetnek tápanyag-kiegészítők, amelyek a biodegradációt segítik, és lehetnek felületaktív anyagok, pl. tenzidek, kelátképzők, stb., amelyek a szennyezőanyag biológiai hozzáférhetőségét biztosítják. Noha a szénhidrogének lebontása megvalósulhat anaerob körülmények között is, az aerob degradáció sebessége jóval meghaladja azt. Ebben az esetben az olajszármazékok bontását végző enzimek működéséhez molekuláris oxigénre van szükség. Az oxigén mennyisége a szennyezett közeg aktív vagy passzív levegőztetésen túl hidrogén-peroxid (H_2O_2), vagy egyéb oxigénfejlesztő anyag közegbe keverésével is pótolható, így azonban a biológiai beavatkozás már kevéssé tekinthető természetes eljárásnak. A mesterséges anyag-adagolás lehetséges kockázata ezen felül, hogy az esetenként feleslegben adagolt H_2O_2 a közegben kémiailag nem reagál az ott lévő szennyező anyagokkal, vagy - mivel nem specifikus oxidálószerről van szó - nem az ártalmatlani kívánt vegyülettel lép reakcióba. Toxikus lehet továbbá (egyéb talajlakók mellett) a szénhidrogén bontó mikrobákra is. Komplex szennyezések esetén a H_2O_2 hatására részlegesen oxidált szerves vegyületek keletkezhetnek, amelyek a talaj anyagokkal, illetve egymással reagálva toxikológiailag kockázatos miliőt hozhatnak létre a kárhelyen. A vízben oldható tápanyagok bejuttatását vízrecirkuláltatással, vagy talajvízbe injektálással végzik. Ha a biodegradációhoz szükséges oxigénmennyiség biztosítását a talajlevegő gyakori cseréjével oldjuk meg, akkor talajszellőztetésről (bioventilláció) beszélünk (Dibblef & Bartha, 1979; Maier, 2000; Németh, 2001; Bedard, 2003; Anton et al., 2006, Atzél, 2008; Szabó, 2008; Szoboszlay & Kriszt, 2010).

2.2.2.3. „Ösztönös” talajoltás

A módszer során a mentesítendő közegből (földtani közeg, felszín alatti víz) izolálják a degradációs tulajdonsággal rendelkező mikroszervezeteket és az - általában szelektív táptalajokon kiválogatott - törzseket lombikokban, tartályokban (fermentorokban) szaporítják fel (10^5 - 10^{10} CFU/ml), majd nagy mennyiségben visszajuttatják (inokulálják) a szennyezett közegbe. Az (ösztönös) talajoltás során az inokulálás mellett tápanyag, nedvesség és oxigén kiegészítést is rendszeresen alkalmaznak. A módszer kivitelezésénél a mikrobákat csak bontási kapacitás szempontjából vizsgálják anélkül, hogy egyéb tulajdonságaikat ténylegesen ismernék, vagyis a talajoltás anélkül történik, hogy ismernék a törzsek patogenitását, bontási spektrumát vagy más tulajdonságait. A faji szinten azonosítatlan mikrobatörzsekkel történő kármentesítés rendkívül veszélyes lehet, hiszen a talajvíz áramlással mikrobák nagy távolságokat tehetnek meg, így humán egészségügyi szempontból veszélyt jelentő biológiai ágensek szennyezhetik a talajvizet (Maier, 2000, Szoboszlay et al, 2002, Atzél, 2008).

2.2.2.4. Faji szinten identifikált mikrobák alkalmazása (Bioaugmentation)

A faji szinten identifikált, ismert degradációs, patogenitási és érzékenységi (környezeti hatásokkal szemben) stb. tulajdonságokkal rendelkező, mikroszervezeteket alkalmazó módszerek összefoglaló neve. A szakirodalomban tudatos talajoltásnak, vagy bioaugmentációnak is nevezik. A mentesítési eljárásban használhatnak a kárhelyről izolált, vagy laboratóriumi törzsgyűjteményből kiválasztott mikrobákat. A módszer szempontjából elvárás, hogy ismerjük a használni kívánt szervezet minden fontos tulajdonságát [patogenitás, olajbontási spektrum, hőmérséklet-, pH optimum, toxikus anyagok (pl. nehézfémekkel] szembeni tolerancia (Weber et al., 1994; Korda et al., 1997).

Egyes mikroba taxonok az alifás, míg mások az aromás szerkezetű szénhidrogéneket degradálják nagyobb mértékben, sőt az eltérés akár a törzsek szintjén is jelentkezhet. Kármentesítés esetén fontos a szennyezés összetételének ismerete, hiszen a legjobb hatásfokot akkor érhetjük el, ha az alkalmazott mikroszervezetek bontási spektruma lefedi az eliminálni kívánt szennyezőanyagok összetételét (Anton et al., 2006). A mikrobák széles hőmérsékleti tartományban (-5°C - +80°C) képesek szaporodásra, ám a környezeti elemekben jellemző hőmérséklettartomány szempontjából az in situ bioaugmentációban elsősorban a mezofil, illetve pszichrofil mikroszervezeteknek lehet jelentőségük. A szennyező szénhidrogének biodegradációja széles hőmérsékleti tartományban valósulhat meg. A kutatások eredménye azt igazolja, hogy magasabb hőmérsékleti értékek esetén a lebontás felgyorsul, optimálisnak a 20-30 ^{o}C közötti értékek tekinthetőek (Atlas, 1981; Leahy, 1990).

A környezeti kárhelyeken a szénhidrogén szennyezések kísérőjeként - ipari tevékenységek következtében - gyakran nagy koncentrációban fordulnak toxikus fémek. Ezért fontos lehet a talajoltásra használt törzsek ezekkel szembeni érzékenységének megállapítása, különösen, ha a kárhelyen számíthatunk ilyen komplex szennyezésekre. (Korda et al., 1997). Bioaugmentáció esetében megvan az esélye annak, hogy a szennyezett közegbe juttatott, ismert tulajdonságú, nagy számban felszaporított (10^6-10^8 CFU/ml) mikroszervezet viszonylag gyorsan és hatékonyan elvégezze a kárhelyen a kívánt eredményű szennyező anyag bontást. Ennek első feltétele a törzsek túlélése és tartós megmaradása a szennyezett közegben. Az eljárások tervezésénél figyelembe kell venni, hogy a kiválasztott mikrobák szaporodási rátája alacsonyabb lehet, mint mesterséges körülmények között, a természetes mikrobaközösség bennszülött tagjaival kompetíció alakulhat ki, illetve a természetes közegben jó néhány predátor szervezet táplálékául is szolgálhatnak (Goldstein et al., 1985; Watanabe at al., 1998, Atzél, 2008). Dolgozatom második részében, célkitűzésünknek megfelelően bioaugmentációban alkalmazható bontó mikrobákat kerestünk.

2.3. Mikroszervezetek faji szintű meghatározása, identifikációja

A vizsgálatainkban környezeti mintákból biodegradációs céllal izolált baktériumok prokarióta szervezetek, amelyek nem rendelkeznek membránnal körülhatárolt sejtmaggal. Ezen élőlények esetében a DNS a sejtben szabadon helyezkedik el (Fischer, 1997), dupla szálú és általában cirkuláris szerkezetű, de ismertek lineáris genomot tartalmazó taxonok is (*Streptomyces sp.*, *Borellia burgdorferi*). Ezeken a mikroszervezeteken belül további, önálló replikációra képes genetikai elemek a plazmidok, melyek rövid, cirkuláris DNS molekulák. A plazmidok a baktériumsejtnek környezetváltozás esetén gyorsabb adaptációs, ill. védelmi képességet biztosítanak (pl.: antibiotikum rezisztencia, toxinok, enzimek termelése) (Pesti et al., 2001), sőt sok esetben a baktériumok degradációs képessége is plazmidon kódolt (Latha & Lalithakumari, 2001).

A faji szintű identifikációhoz a prokarióták esetében általában a riboszómák felépítését és azok tulajdonságait határozzák meg. A riboszómák felületén zajlik a fehérjeszintézis (valamint prokarióta sejtek esetében a szekretált enzimek szintézise is), így mind az eukarióta, mind a prokarióta szervezetek számára alapvető fontosságú sejtelemek. Prokariótáknál a riboszómák megtalálhatóak a sejthártya belső felszínéhez kapcsolódva, a citoplazmában, mint szabad riboszómák, valamint poliszóma formájában az mRNS-re fűződve. A riboszómák a citoszolból centrifugálással könnyen elkülöníthetők, ugyanis meghatározott ülepedési sebességgel (szedimentációs koeficiens) rendelkeznek, melynek mértékegysége a Svedberg egység (S). Prokarióta szervezetek esetében az ülepedési állandó 70S, az eukarióták esetében ez 80S. A prokariota szervezetek riboszómái egy 30S és 50S alegységre disszociálnak (Fischer, 1997; Szeberényi 2004). A 30S alegység 21 különböző fehérjét és egy 16S riboszómális RNS-t (rRNS) tartalmaz. Az rRNS-ek kevéssé változékonyak és könnyen izolálhatók, ahogy az őket kódoló rDNS szakaszok is. A prokarióta baktériumok esetében a 16S rDNS körülbelül 1500 bázispár hosszúságú. Ez az 1500 bázispár ún. szemi-konzervatív elemeket tartalmaz, ugyanis a bázispárok első 27, illetve az utolsó 21 nukleotidpárt tartalmazó szakasza a baktériumokban megegyező, vagyis konzervált. Hasonló konzervált terület található a 16S rDNS 519-es régiójában. Jelen molekuláris biológiai alapon végzett taxonómiai vizsgálatok az ilyen konzervált szakaszok között található változó szakaszok összehasonlítása által becsülik az egyes fajok genetikai rokoni kapcsolatát, valamint ezek alapján történik a rokonsági törzsfa megalkotása is (Szabó, 1989).

2.3.1. Új mikrobafajok leírása

J. B. Tindall és munkatársai (2010) előírásait követve ahhoz, hogy ezt egyértelműen igazolhassuk, hogy új mikrobafajt izoláltunk az ismertetett 16S rDNS gén szekvencia elemzés mellett számos más vizsgálat elvégzése is szükséges. A további vizsgálatokat két csoportba sorolhatjuk: lehetnek molekuláris biológiai és fenotípusos vizsgálatok. A molekuláris biológiai

vizsgálatok alapját az említett 16S rDNS gén szekvencia jelenti. A szekvenciával szemben elvárás, hogy jó minőségű (zajtól mentes, egyértelműen értékelhető) és amennyiben lehetséges teljes szekvencia legyen az elemzés alapja. Abban az esetben, ha az on-line adatbázisok alapján végzett szekvencia azonosítás kisebb mint 97%-os egyezőséget mutat más fajokkal, akkor a mikrobát új faj jelöltnek tekintjük. Ennél magasabb egyezőség esetén teljes DNS-DNS hibridizációt kell végezni az új faj jelölttel és a legközelebbi ismert mikrobával. Ennek 70% alatti egyezősége esetén beszélhetünk új faj jelöltről. A fenotípusos vizsgálatokat abban az esetben végezzük, ha a molekuláris biológiai módszerek a fenti egyértelmű különbséget mutatják az izolált, illetve a referencia törzsek genetikai állománya között. A fenotípusos vizsgálatok első lépése a klasszikus morfológiai leírás, valamint a biokémiai karakter megállapítása. Előbbibe tartozik a sejt színének, alakjának, motilitásának, táptalaj preferenciájának, érzékenységének (hőmérséklet, NaCl) leírása, valamint az enzimatikus és szubsztrát reakciók elvégzése. Utóbbiba tartozik a respiratórikus lipokininek, poláros lipidek, valamint a zsírsavak meghatározása. Az elemzéssel kapcsolatban elvárás, hogy az összehasonlítani kívánt baktériumokat azonos tenyésztési körülmények között (inkubációs idő és hőmérséklet, táptalaj) szaporítsuk fel a vizsgálatok előtt. Nem kötelező, de amennyiben lehetséges elektronmikroszkópos felvételek készítése is szükséges lehet a könnyebb azonosíthatóság miatt (pl. a típus törzs és az új faj jelölt vizuális elkülönítésére sejt elemek alapján). A fenti vizsgálatokhoz szükséges módszereket a 3.3. fejezetben mutatom be.

2.4. Mikrobiológiai monitoring

A felszín alatti közegek védelmének érdekében a szennyezettség megállapítása mellett fontos az ökológiai minőség vizsgálata, értékelése, vagyis a szennyező anyagok hatásának vizsgálata a közegben élő szervezetekre (Chapman et al. 1996; van Kraats 1996). A felszín alatti közeg szennyezettségét ma sok esetben csak a kémiai analitika eszközeivel értékelik annak ellenére, hogy az egyes kockázatos anyagokra, vegyületekre vonatkozó koncentrációk ismerete nem elégséges ahhoz, hogy összegzett biológiai hatásukat értékelni tudjuk. A földtani közegek biológiai összetétele és működése határozza meg azok természetes funkcióit (pl. termékenység, szerves anyag produkció és lebontás, illetve ezek természetes körfolyamatai), amelyek fizikai természetüket és vízföldtani adottságaikat alakítják (Alexander, 1997). Az olyan biológiai paraméterek vizsgálata, mint a talajlégzés, a biomassza összetétele, a mikrobiológiai jellemzők és az enzim aktivitások sikeresen alkalmazhatók a minőségi tulajdonságok változásának, valamint a szennyező anyagok hatásának indikátoraként (Brookes 1995; Margesin et al. 2000; Brohon et al. 2001; Castaldi et al. 2004; Kizilkaya et al. 2004; Yuangen et al. 2006). Az előbb felsorolt módszerekhez hasonlóan használhatók az ökotoxikológiai vizsgálatok, amelyek jól alkalmazhatók a szennyező anyagok összegzett biológiai hatásának, illetve azok biodegradációjának monitorozásához. A kockázatos

anyagok lebontásának nyomon követése az egyes szennyezett területeken a biodegradációs tevékenység kivitelezését és működtetését is megalapozhatja vagy befolyásolhatja (Renoux et al. 1995; Salanitro et al. 1997; Saterbak et al. 1999; Płaza et al. 2005; Leitgib et al. 2007). Ennek érdekében a szennyezett közegek kármentesítésének teljeskörű kockázatértékeléséhez a toxikológiai, kémiai analitikai és biológiai módszerek kombinációira van szükség. A minőségi jellemzők megállapításához a fizikai, kémiai és biológiai indikátorok együttesen értékelendők (Rombke et al. 2005). Mikrobiológiai monitoring vizsgálataink során ökotoxikológiai és molekuláris biológiai módszereket alkalmaztunk (PCR, T-RFLP, klónkönyvtár). Az alábbiakban a módszereket megalapozó irodalmi ismereteket foglaljuk össze.

2.4.1. Ökotoxikológiai vizsgálatok

Az ökotoxikológia a szennyező anyagok környezetre, a környezet élőlényeire gyakorolt hatásának vizsgálata szupraindividuális biológiai szerveződési szinten, az adott környezeti elem ökológiai szempontból fontos és jelentős, érzékeny és jellemző egyedeit, populációit felhasználó, tesztszervezeteket és -rendszereket alkalmazó bioindikációs módszer (Callow, 1993). Az ökotoxikológiai vizsgálatok irányulhatnak a környezet egyes elemeinek élőlényeire, az ökológiai rendszerek működésére gyakorolt hatások megismerésére. Így végső soron az ökológiai folyamatok védelmét szolgálják, biztosítva minden élőlény, és ezen belül az ember létfeltételeit is (Dura, 2005). Az ökotoxikológiai vizsgálatok célja, hogy az ökoszisztéma egészére vonatkoztatható eredményt kapjunk biológiai tesztek segítségével. Ez alapján vizsgálni tudjuk az egyes vegyi anyagok és/vagy szennyezett környezeti minták élő szervezetekre gyakorolt hatását. Ökotoxikológiai tesztmódszerekkel különböző szerveződési szinteken végezhetünk vizsgálatokat: egyed szinten az egyed élettani viselkedése (pusztulás, növekedés, energiaháztartás, biokémiai folyamatok, mutáció) vizsgálható, a populáció szintjén pedig a szaporodás, egyedsűrűség és eloszlás tanulmányozható (Dura & Gruiz, 2001).

Ha a vegyi anyagok a környezetbe kerülnek, akkor az ökoszisztémában nehezen becsülhető változásokat hoznak létre, amelyek egyensúlyok eltolódását, a fajeloszlás megváltozását, gyakran egyes fajok teljes kipusztulását eredményezhetik. Ahhoz, hogy a környezetet szennyező vegyi anyagok káros hatását felmérjük, mennyiségi és minőségi információt kell szereznünk a szennyezőanyagról, az érintett környezeti elemekről, az ökoszisztémáról, valamint a szennyezés időbeni lefolyásáról. Az ilyen vizsgálatokhoz ökotoxikológiai tesztek azért bizonyulnak kézenfekvő megoldásnak, mivel viszonylag egyszerű tesztekkel mérik a hatást, majd ezekből az eredményekből végeznek extrapolációt a teljes ökoszisztémára (Gruiz et al., 2001). Az ökotoxikológiai tesztek alkalmasak arra, hogy közvetlenül mutassák a környezet, vagy a környezeti minták aktuális toxicitását és egyéb káros hatásait. A szennyezett területről származó környezeti minták

vizsgálatával biztosítható, hogy a helyi adottságokon kialakult szennyezést és hatásait konkrét esetben, az ökotoxikológiai tesztszervezetre gyakorolt hatásán keresztül, a területre vonatkoztatva vizsgáljuk. A tesztek eredményeként meggyőződhetünk a környezeti mintákban található, különféle módokon és erősséggel kötődő szennyezőanyagok hozzáférhetőségéről. Vegyes szennyeződés esetében a hatások eredőjét mutatja, melyben az egymást erősítő, összeadódó és kioltó hatások egyaránt megjelennek. Segítségükkel a területen jelenlévő tényleges környezeti hatás becsülhető (Dura & Gruiz, 2001).

A szennyezőanyagok ökotoxikus hatását többféle módon vizsgálhatjuk. Így használhatunk egy fajt alkalmazó laboratóriumi teszteket. Az egy fajt alkalmazó tesztek egyik előnye, hogy laboratóriumi körülmények között könnyen elvégezhető, különleges műszerezettség sem kell hozzá. Az egy fajt használó teszteken belül a mikrobiális módszerek különösen alkalmasak lehetnek az ökoszisztéma jellemzésére, mivel majdnem minden ökoszisztémában megtalálhatóak (pl. *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacer agile*, *Aliivibrio fischeri*). Az egy fajt alkalmazó tesztek végpontja széles skálán mozoghat. A leggyakrabban használt végpont a tesztorganizmus túlélése. A krónikus hatások jellemzésére a NOAEL – (No-Observable-Adverse-Effect-Level – nincs megfigyelhető káros hatás szintje), míg az akut hatások jelzőszámául az LC_{50} –et (Lethal Concentration 50, ami a vizsgált faj egyedeinek 50%-os pusztulását eredményező koncentráció), vagy az EC_{50} értéket (Effect Concentration 50, az a koncentráció, amely a vizsgált faj egyedeinek bármilyen aktivitását a felére változtatja) használják. Végpontként igen gyakran használják különböző enzimek (pl. ATPáz, dehidrogenáz) aktivitásának megváltozását (Dura & Gruiz, 2001).

Szénhidrogén szennyezések vizsgálatára számos esetben alkalmazták az általunk is használt *Aliivibrio fischeri* (Henryk et al., 2007) (korábban *Photobacterium phosphoreum*, illetve *Vibrio fischeri*) vizsgálatot szénhidrogénekkel szennyezett felszíni vizek és talajok vizsgálatára, valamint a biodegradáció ökotoxikológiai hatásának mérésére (Blaise et al, 2003; Shahid et al, 2006; Hubálek et al, 2007; Al-Mutairi et al, 2008; Płaza et al, 2008, 2009).

2.4.2. Molekuláris biológiai vizsgálatok

2.4.2.1. PCR reakció

A Kary Banks Mullis által 1985-ben kidolgozott PCR (polimerase chain reaction) során a megcélzott DNS templátból (a megsokszorozni kívánt DNS szakasz) nagyszámú másolatot készíthetünk 2 iniciáló primer (oligonukleotid) és DNS-polimeráz enzim segítségével (Saiki et al, 1985). A folyamat 3 lépcsőből épül fel. Első lépésben a mintából (pl. baktérium szuszpenzió) származó kettősszálú DNS-t magas hőmérsékleten denaturáljuk, mely során a purin és pirimidin bázisok közti hidrogénhidak felbomlanak, vagyis a templát DNS egyszálúvá válik. Ezután a hőmérséklet csökkentésével a választott primerek a DNS templáthoz kapcsolódnak. Harmadik

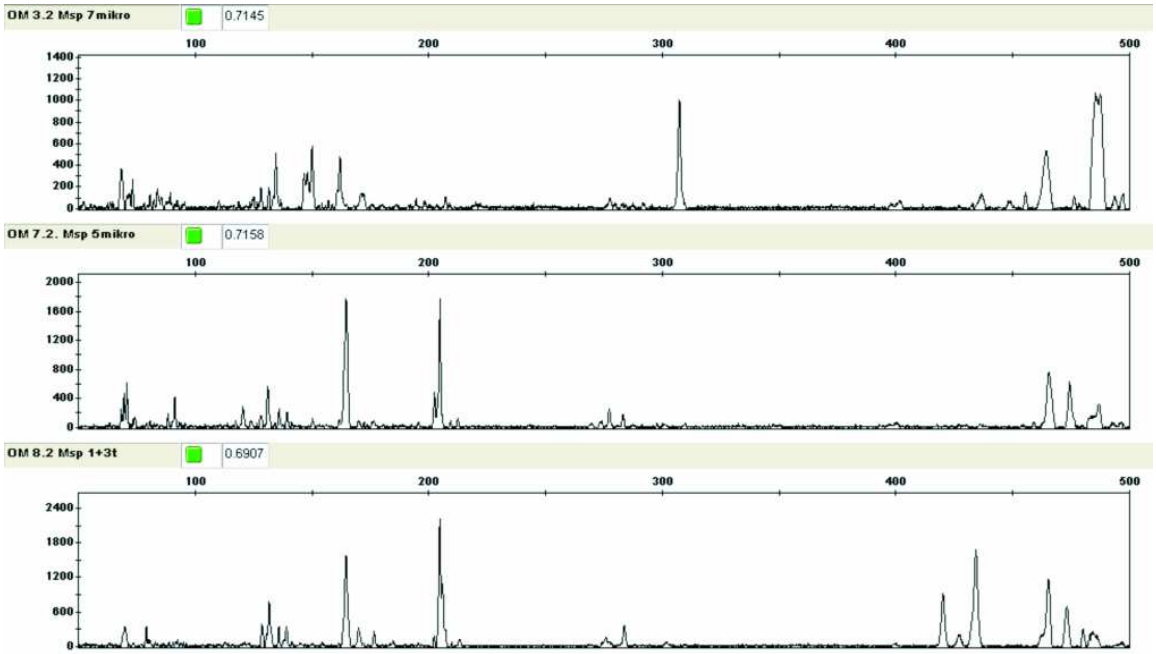
lépésben a hőmérséklet emelésével a polimeráz enzim a kapcsolódó primerek végeit 5‘-3‘ irányban elongálja, vagyis elkészíti az egyszálú templát DNS kiegészítő (komplementer) szálát, azaz megtörténik a mintában a primerekkel határolt DNS szálak másolása (Szeberényi, 2004; Klug et al., 2009; Turner et al., 2000; Madigen et al., 2009; Klug et al., 2009). A PCR reakcióhoz szükséges alapanyagok:

- Tisztított templát DNS
- Primerek: az amplifikálandó szakasz két végét határozzák meg.
- Taq-polimeráz: hőstabil enzim, mely az új DNS-szál felépítéséért felelős (*Thermus aquaticus* termofil baktérumból származik)
- Taq-puffer: biztosítja az íráshoz a megfelelő kémiai közeget
- dNTP (dezoxiribonukleotid-trifoszfátok): a polimeráz enzim ezekből építi fel az új DNS-szálakat. (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- $MgCl_2$: befolyásolja a primer-dimerek keletkezését, elősegíti a primerek kapcsolódását, a másolás pontosságát, valamint a Taq polimeráz enzim aktivitását
- Tween 20: segíti a nem vízoldékony anyagok diszpergálását
- MQ-víz: a végtérfogat beállításához szükséges nagy tisztaságú víz (fizikai közeg).

2.4.2.2. Terminális restrikciós fragment hossz polimorfizmus (T-RFLP) elemzés

A T-RFLP igen érzékeny közösségi DNS mintázatot vizsgáló módszer, mely lehetővé teszi akár több minta egyidejű gyors vizsgálatát, egy adott közösség összetételének a hosszabb időintervallumban való nyomon követését, változásának elemzését. A közösségalkotó mikroszervezetek diverzitását, összetételét a nukleinsavak a nukleinsav minták bázissorrendjében meglévő különbségek alapján mutatják ki, akár szennyezett közegek esetében is (Liu et al, 1997; Katsivela, 2003; Malik et al, 2008; Schütte et al, 2008, Paisse et al, 2008). Az eljárás első lépésében a mintában előforduló mikroorganizmusok teljes DNS-ét kinyerjük, amit a fent bemutatott 16S rDNS alapú PCR elvégzését követően restrikciós endonukleázokkal emésztünk. A PCR-hez használt primer pár egyik tagja, a módszer érzékenységének növelése céljából, fluoreszcensen jelölt, így a 5’-terminális végükön jelölt PCR termékek jönnek létre. A restrikciós enzimekkel végzett hasítás után a terminális fragment hosszának detektálását végezzük kapilláris gélelektroforézis segítségével (Madigen et al., 2009). A T-RFLP más molekuláris biológiai módszerekkel összevetve egyszerűen kivitelezhető, jobban reprodukálható és nagyobb felbontóképességű az ún. ujjlenyomat módszer (DNA fingerprinting) (Moeseneder et al, 1999; Nunan et al, 2005). A T-RFLP módszerrel ugyanis az amplifikált, majd hasított fragment nukleotid sorrendje nem, csak a hosszúsága kerül meghatározásra.

A hasítási helyek, illetve az ezek alapján létrejövő fluoreszcens terminális restrikciós fragmentek (T-RF-ek) ún. OTU-kat (*Operational Taxonomic Unit*) határoznak meg, amelyek jellemzőek lehetnek egyes nemzetségekre, esetenként fajokra. Ezeket már meghatározott hasítási hellyel rendelkező fajokhoz, illetve nemzetségekhez hasonlítva képet kaphatunk egy környezeti minta mikroba összetételéről, valamint hosszabb időintervallumban nyomon követhetjük a diverzitás változását (Marsh, 1999; Sipos et al., 2007, Paisse, 2008). A kapilláris gélelektroforézis eredménye tehát egy olyan kromatogramszerű ábra, amelyen a csúcsok helyei a restrikciós enzimmel emésztett terminális fragmentek hosszúságát, míg azok nagysága (görbe alatti terület) az azonos fragmenthez tartozó elemek kvantitatív elemzését teszi lehetővé (1. ábra). A T-RFLP során kapott képen nem minden esetben lehet kvalitatív elemzést végezni. Ahhoz, hogy a mintában talált fragment csúcsokat identifikáljuk klónkönyvtár létrehozására van szükség (Paisse, 2008).



1. ábra Az ópusztaszeri mintavételi terület 2006. 08. 15-én vett szennyezett (OM7.2, OM8.2) és háttér (OM3.2) talajvízmintáinak terminális restrikciós fragment hossz polimorfizmus (T-RFLP) elemzésének kromatogramja. Az egyes csúcsok az 5'-terminális fragmenteket jelölik: a csúcsok elhelyezkedése a vízszintes tengelyhez viszonyítva a fragmentek (nukleotidszám szerinti) hosszúságával, míg a görbe alatti terület a fragment mennyiségével arányos

2.4.2.3. Klónkönyvtár készítése

A klónozás alapja a rekombináns DNS-technológia. Elvében hasonlít a PCR-re, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben a kijelölt DNS-fragmentumot megfelelő gazdasejtben amplifikálják. A klónozás legtöbbször bakteriális rendszerben történik. A laboratóriumokban erre a leggyakrabban az *Escherichia coli*-t használják, mert egyszerű felépítésű, rutinszerűen fenntartható és génjeinek száma mindösszesen háromezer körül van (Weaver & Hedrick, 1997).

A klónozás kivitelezéséhez az amplifikálni kívánt DNS szakaszt ún. vektorba kell építeni, amely képes a bakteriális gazdasejtben replikálódni. A vektor általában önálló replikációra képes plazmid, amely olyan rezisztenciagéneket hordoz, melyek előnyösek a baktériumok számára és

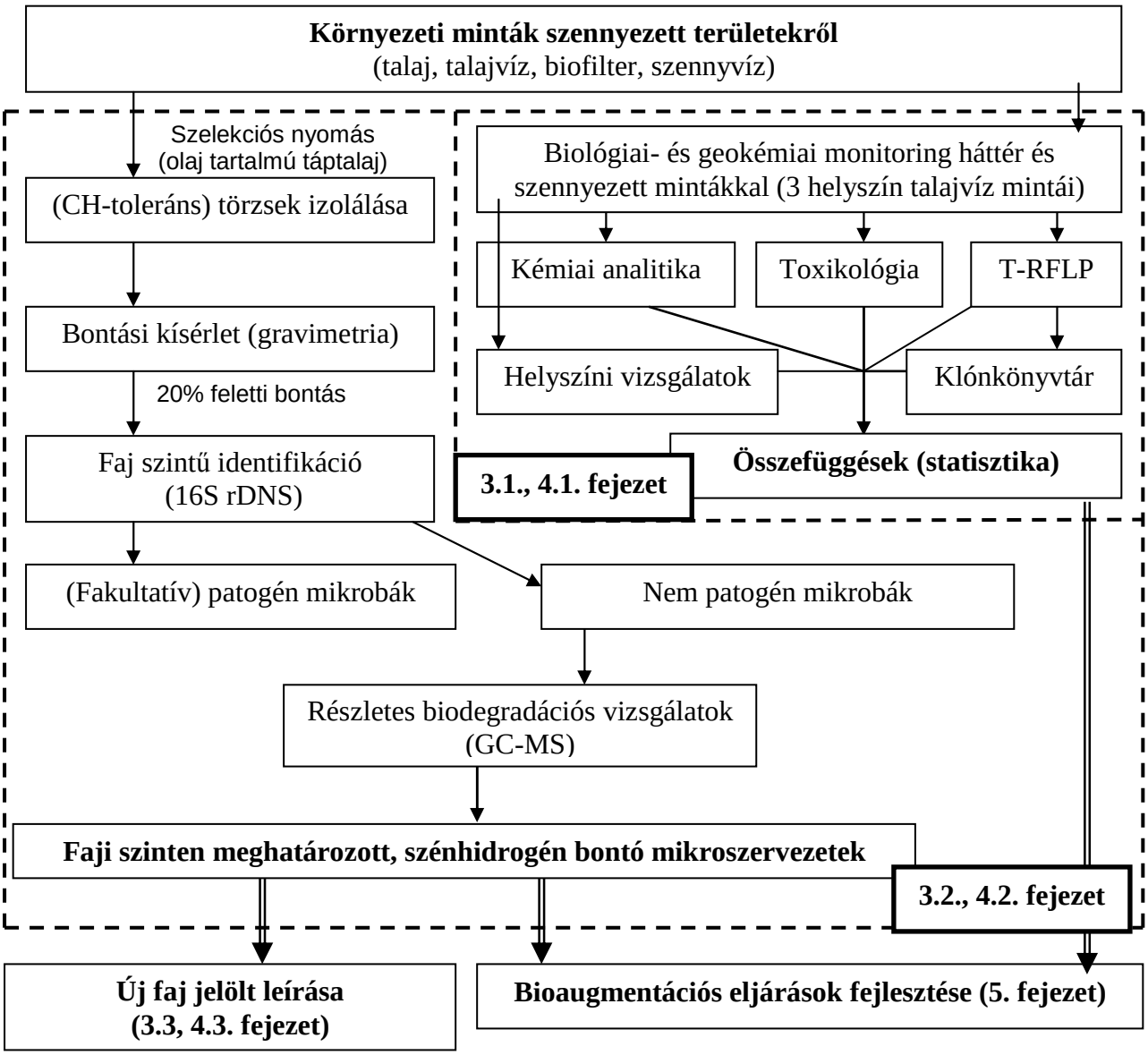
szelekciós elemként is használhatóak (Heszky et al., 2005). A baktérium plazmidjába beépített, vizsgálandó DNS szakaszt tartalmazó vektor neve: rekombináns plazmid. A plazmidnak két fontos részét kell kiemelni az általunk alkalmazott módszernél, mely a klónozást és az azt követő szelekciót nagymértékben megkönnyíti. Az egyik a plazmidokban lévő antibiotikum rezisztencia gének, a konkrét esetben az ampicillin-rezisztencia gén, mely szelekciós markerként használható. A rekombináns plazmiddal végzett transzformáció után ugyanis az antibiotikum jelenlétében csak azok a sejtek maradnak életben, melyek felvették a plazmidot. A másik, hogy a plazmid klónozó helyét egy olyan riporter génben helyezték el (lacZ), melynek működése egyszerűen az ún. kék-fehér szelekcióval detektálható. A módszer alapja, hogy a lacZ gén a β-galaktozidáz enzimet kódolja, amely a laktózt (tejcukrot) glükózra és galaktózra bontja, illetve az X-Gal (5-bróm-4-klór-3-indolin-β-D-galaktozid) kromogén szubsztrát hidrolízisét is katalizálja. A β-galaktozidáz szintézisét IPTG-vel (izopropil-tio-galaktozid) indukálhatjuk, ugyanis azok a vektorok, melyek idegen DNS-t nem tartalmaznak, működőképes β-galaktozidázt termelnek, így kék színű telepeket hoznak létre X-Gal jelenlétében. A lacZ génbe ékelődött idegen DNS miatt a rekombinánsok nem termelnek β-galaktozidázt és fehér telepeket hoznak létre (Bánfalvi, 1996).

A bakteriális klónozás során a rekombináns, vagyis a vizsgálandó DNS szakaszt tartalmazó, plazmiddal transzformált baktériumokban a donor DNS replikálódásával annak számos másolata készül el nagyon rövid idő alatt a baktériumsejtek szaporodása során. A baktériumtenyészetből nagy mennyiségben tudjuk visszaizolálni a felszaporítandó célgént tartalmazó plazmid molekulát a szelekciós elemeknek köszönhetően (Szeberényi, 2004; Klug et al., 2009).

A mikrobiális diverzitás és a szennyezettség és toxicitás összefüggéseivel számos szerző foglalkozott korábban is. Elemezték szénhidrogén szennyezett területek toxicitását, illetve annak változását a biodegradáció folyamatában (Blaise et al, 2004; Hubálek et al., 2007; Al-Mutairi et al, 2008). PCR és T-RFLP módszerrel vizsgálták szénhidrogénekkel szennyezett közegek mikrobiális újjlenyomatát (Bordenave et al, 2007; Malik, 2007), elemezték ezek matematikai összefüggéseit hozzánk hasonló statisztikai módszerekkel (Maila et al, 2005, Rodríguez-Martínez, 2006). Készítettek klónkönyvtárakat a vizsgált területeken, és elemezték azokat a közösség alkotó mikroba csoportok szempontjából. Egyes esetekben a szennyezett és a háttér mintákat is elemezték (Alfreider & Vogt, 2007; Paisse, 2008). Vizsgálatainkban arra vállalkoztunk, hogy három hazai szénhidrogénekkel szennyezett helyszín esetében mind a szennyezett, mind a háttér talajvíz mintákat (n=31) elemezve az előbb említett paraméterek mérését együttesen végezzük el és elemezzük. Ilyen összefoglaló, ezeket a változókat egy rendszerben vizsgáló, illetve statisztikailag elemző eredmények ismereteink szerint ez idáig nem születtek.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

A célkitűzéseknek megfelelő, a szakmai-tudományos munkát megalapozó munkarészek kapcsolatát egymáshoz viszonyítva az alábbi, 2. ábrán mutatjuk be. A dolgozat egyes részeit az ábrán jelölt fejezetek tartalmazzák részletesen.



2. ábra A szennyezett területeken végzett biológiai és geokémiai monitoring, valamint a szénhidrogén bontó mikroszervezetek szelekciós vizsgálatainak a dolgozatban követett kapcsolódási rendszere és az egyes témák megjelenése a fejezetekben

A doktori munka során három hazai, szénhidrogénekkel (benzin és gázolaj származékok) szennyezett helyszínen, biológiai- és geokémiai monitoringot működtettünk. A szennyezett területeken háttér és szennyezett talajvíz mintákat is vételeztünk. A monitoring rendszer egyes eredményei között a szakirodalomban fellelhető információkat kiegészítve statisztikai összefüggéseket kerestünk. Ennek eredményeit mutatom be dolgozatom első részében.

Másodlagos célom olyan szénhidrogén bontó mikroba törzsek izolálása volt, amelyeket ilyen területeken bioremediációs céllal alkalmazhatók. A bontó képesség *in vitro* elemzésén túl identifikáltuk az izolált mikrobákat és ez alapján megállapítottuk patogenitási tulajdonságaikat. A bontó mikrobákat 7 hazai szennyezett helyszín 47 izolátumából válogattuk ki a bontási tulajdonságok (előszelekció) alapján. Feltételezésünk az volt, hogy ilyen közegekben nagyobb eséllyel izolálhatók olyan mikrobák, amelyek képesek e szennyező anyagok metabolizálására. A bontási képességekkel bíró 6 mikroba törzs közül egy esetében a részletes identifikációs eredményeink igazolták, hogy az a tudomány számára ismeretlen, új faj.

3.1. Biológiai- és geokémiai monitoring rendszer

A biológiai- és geokémiai monitoring rendszer elnevezést dolgozatomban, a környezetvédelmi gyakorlatban alkalmazott módon használom. Ennek megfelelően a monitoring rendszerbe tartozó mérési módszerek:

- Felszín alatti vizek esetében általánosan használt, a helyszínen meghatározanó fizikai paraméterek: pH, hőmérséklet, oldott oxigén tartalom, redox potenciál és vezetőképesség.
- Kémiai analitikai paraméterek, ezen belül összes alifás szénhidrogén (TPH C_5-C_{40}), Benzol és származékai (BTEX), általános vízkémiai vizsgálatok (BOI_5, KOI_{ps}, hidrogén-karbonát, karbonát, hidroxid, klorid, fluorid, bromid, nitrát, ortofoszfát, szulfát, nitrit, ammónium, vas, mangán, kálium, nátrium, kálcium, magnézium, összes keménység).
- További alternatív elektron akceptorok mennyiségi jellemzése Fe(II) meghatározással, valamint szabad CO_2, CH_4 és hexánnal extrahálható anyagok (SZOE) analitikai mérésével.
- Összes élő sejtszám meghatározása Most Probable Number (MPN) módszerrel.
- Szénhidrogén bontó sejtszám meghatározás gázolaj-kőolaj keverékkel kiegészített Bushnell-Haas táptalajon.
- Talajvíz respirációs analízis OxiTop™ rendszerben
- Ökotoxikológiai elemzés ToxAlert 100™ *Aliivibrio fischeri* teszttel

Fenti vizsgálati rendszer alapállapot felmérés esetében kiegészül fémek és félfémek [6/2009. (IV. 14.) együttes rendelet alapján] kémiai analitikai, valamint a közegészségügyi szempontból kockázatos mikrobák tenyésztéses vizsgálataival (*Escherichia coli*, *Clostridium sp.*, *Enterococcus sp.*, *Coliform* szám, *Salmonella sp.* és *Pseudomonas aeruginosa* szám meghatározás).

3.1.1. A monitoring mintavételi helyszínek bemutatása

A monitoring helyszínek Biharkeresztes, üzemanyag töltőállomás, Ópusztaszer, olajvezeték törés és Zalaegerszeg, töltőállomás voltak. Mintavételezést Biharkeresztesen öt (2007. február 22., június 12., augusztus 28., november 27. és 2008. február 19.), Zalaegerszegen három (2006. május 18., november 7., 2007. február 6.), illetve Ópusztaszeren szintén három alkalommal (2006. május

31., augusztus 15., november 21.) végeztünk (7. sz. mellékelt táblázat). A monitoring célja az volt, hogy összefüggéseket keressünk a területeken mintázott szennyezett és háttér kutak analitikai és toxikológiai eredményei, valamint a kutakban kialakult mikrobaközösségek molekuláris biológiai jellemzői között. Ennek megfelelően a vizsgált területeken az előzetes kémiai analitikai vizsgálatok alapján mind szennyezett, mind háttér kutakból vételeztünk talajvíz mintákat. A zalaegerszegi területen két szennyezett (Z5, Z9) és egy háttér (Z4), az ópusztaszeri területen két szennyezett (OM7, OM8) és egy háttér (OM3), a biharkeresztesin egy szennyezett (BM7) és egy háttér (BM1) talajvíz mintavételi pontból származtak a mintáink. A háttér minták nem csak a kémiai analitikai eredmények alapján, de a helyszíneken megállapított talajvíz áramlási szempontból (havi rendszerességű talajvízszint mérés alapján) is háttérnek tekinthetők, vagyis a talajvíz a háttér területekről áramlik a szennyezett terület irányába.

3.1.2. Környezeti mintavételezés szennyezett területekről

A felszín alatti víz mintázását az MSZ 21464:1998 magyar szabvány előírásai alapján végeztük. A szabvány szerint talajvíz mintázása esetén a kúttérfogat körülbelül háromszoros mennyiségét ki kellett termelni és csak ezután végezhettük el a mintavételt. A háromszoros kúttérfogat kitermelése történhet gépi szivattyúk segítségével, de a mintázáshoz kézi eszközök szükségesek. A mintavételezés eszköze egy berántó zsinórra erősített rozsdamentes acél bailer volt. A mintavételhez a mintavevő eszközt a kúttalpig eresztettük, majd miután megtelt vízzel visszahúztuk, tartalmát, pedig a leeresztő csonk segítségével a mintavételi edényekbe töltöttük. A mintákat megfelelő, jól olvasható és megkülönböztethető jelzéssel láttuk el. A mintavételi edényeket buborékmentesen lezártuk és 6 órán belül vizsgálatokat végző laboratóriumba jutattuk. A mintákat laboratóriumba érkezésig fénytől elzártan, 0 és +4 ^{o}C között tároltuk.

3.1.3. Helyszíni vizsgálatok

A fizikai paraméterek helyszíni vizsgálatait HI 9828 Multiparameter Water Quality Meterrel (Hanna Isntruments Inc., USA) és Hach HQ30d (Hach Company, USA) típusú műszerekkel mértük. A mintavételi pontokból származó talajvíz minták helyszín vizsgálatával megállapítottuk a minták oldott oxigén, vezetőképesség, pH, valamint redox potenciál értékeit.

3.1.4. Akkreditált kémiai analitika

Az akkreditált kémiai analitikai vizsgálatokat a Wessling Hungary Kft. (1047 Bp, Fóti út 56.) laboratóriuma végezte a TPH és BTEX vizsgálati irányok méréséhez szükséges szabványosított módszerek (MSZ 1484-4:1998, WBSE 26: 2007, MSZ EN ISO 9377-2:2001) végrehajtásával, HP 6890 GC 08 FID/FID és HP 6890 GCMS 08-5975 készülékekkel.

3.1.5. Mikrobiológiai vizsgálatok

A mikrobiológiai vizsgálatok két részből álltak. Elsőként meghatároztuk a minták összes élő sejt számát TGE5 táptalajon (összetétele: 5,0 g tripton; 2,5 g élesztőkivonat; 5,0 g glükóz; 15 g agar 1 liter desztillált vízben), Most Probable Number (MPN) módszerrel. TGE5 táptalajon 3 párhuzamos hígítási sort (10^2-10^7) készítettünk (határhígításos módszerrel), majd a csöveket 28°C-on inkubáltuk. A csövekben lévő táptalajokon opálosodás jelezte, ha a hígításban szaporodtak a mikroszervezetek. A csövek kiértékelését Hoskins-féle valószínűségi táblázat alapján végeztük.

Másodikként a fent leírt MPN módszerrel meghatároztuk a talajvízminta szénhidrogén bontó sejt számát. A vizsgálathoz Bushnell-Haas táplevest (összetétele: 1,0 g KH_2PO_4; 1,0 g K_2HPO_4; 1,0 g NH_4NO_3; 0,2 g $MgSO_4$ x $7H_2O$, 0,05 g $FeCl_3$, 0,02 $CaCl_2$ x $2H_2O$, 0,001 g rezazurin 1 liter desztillált vízben, pH 7,0) és 5 µl gázolajat tartalmazó kémcsöveket használtunk, az inkubáció szobahőmérsékleten zajlott. A kiértékelést szintén három párhuzamos (hígítás: 10^2-10^7) MPN módszerrel végeztük, 21 nap elteltével. A csövek közül azokat tekintettük pozitívnak, amelyben a gázolajbontást jelző indikátor (rezazurin) színe megváltozott (kékről lilára) a kontrollhoz képest.

3.1.6. Toxikológiai vizsgálatok Aliivibrio fischeri tesztszervezettel

A toxikológiai mérést a MSZ EN ISO 11348-3:2000 magyar szabványt figyelembevételével, MERCK ToxAlert™ 100 típusú berendezéssel végeztük. A mérés elve az *Aliivibrio fischeri* baktériumok biolumineszkáló tulajdonsága. A fehérje alapú fénykibocsátás mértéke csökken, illetve megszűnik, ha a mintában a mikroszervezet számára toxikus anyagok találhatók. A vizsgálathoz a vételezett mintákból a készülék előírásainak megfelelően (1:2, 1:3, 1:4, 1:6, 1:8, 1:12, 1:16, 1:24, 1:32, 1:48) hígítási sort kellett készíteni s ezekkel elegyíteni az előzetesen előkészített baktérium szuszpenziót, majd a szabványban szereplő 30 perces kontaktidő után meghatároztuk a fénykibocsátás mértékének változását. A hígítási sor egyes elemeit, valamint a vizsgálatban szereplő kontroll minta lumineszcencia változását figyelembe véve matematikai számításokkal megadható a minta toxicitása, pontosabban biolumineszcencia-gátló hatása. Ezt a gátló hatást az EC_{50} érték meghatározásával fejezzük ki (EC_{50}: A szennyezett környezeti mintát akkora százalékban tartalmazó oldat, amely a mikroszervezet normális élettevékenysége során kibocsátott biolumineszcencia 50%-os csökkenését okozza). A gátló koncentráció kiszámítását a készülék automatikusan végzi.

3.1.7. Közösségi DNS minta feldolgozás a T-RFLP-hez

A közösségi DNS kivonásához a talajvízminták 500 ml-ét használtuk fel. A mintákat előzetesen 0,2 µm-es sterilezett cellulóz acetát membránon szűrtük át (Millipore, USA). A filtert sterilen kisebb darabokra vágtuk és rázőgyöngyöket tartalmazó Eppendorf csövekbe tettük a MoBio UltraClean Soil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories Inc., USA) előírásainak megfelelően. A

csöveket 3 percig kémcsőrázón alaposan megkevertük. A filter darabok eltávolítása után a DNS kivonást a gyártó előírásainak megfelelően végeztük. Negatív kontrollként az előzőekhez hasonlóan szűrt sterilezett nagy tisztaságú, ún. Milli-Q vizet használtunk. A DNS koncentrációt Hellma TrayCell küvettákban (Hellma GmbH, Germany) spektrofotometriával ellenőriztük a Lambda 35 spectrométerrel (PerkinElmer, USA). A DNS mintákat felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

A biológiai és geokémiai monitoring során a szennyezett területek talajvízmintáiból izolált közösségi DNS-t első lépésben terminális restrikciós fragment hossz polimorfizmus (T-RFLP) módszerével (Révész et al., 2006) elemeztük, így következtettünk az adott minta mikrobiális diverzitására. Annak érdekében, hogy a közösségi T-RFLP kromatogramon kapott terminális fragment csúcsokat identifikálni tudjuk (azaz hozzárendelhessük valamely taxonómiai csoporthoz), a közösségi DNS-ből klónkönyvtárat hoztunk létre. A klónkönyvtár feldolgozásának első lépése a klónozás, vagyis a közösségi DNS-ből individuális elemek leválasztása és amplifikációja. Ahhoz, hogy az egy-egy fragmenthez tartozó klónok identifikálása megtörténhessen a klónok szekvenálására is szükséges volt. Ezt követi egy újabb T-RFLP vizsgálat, amely során meghatároztuk az individuális, klónozott DNS T-fragment hosszúságát. Így azonosítani tudtuk az egyes mikrobához tartozó fragment csúcsot, vagyis megkereshettük, hogy az identifikált DNS szakasz a közösségi T-RFLP kromatogramon hol helyezkedik el. A T-RFLP vizsgálat főbb lépéseit az alábbi alfejezetekben mutatom be.

3.1.7.1. 16S rDNS PCR a T-RFLP-hez

A PCR-t az 5-karboxifluoreszceinnel jelölt 27 forward (5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’)_VIC és 519 reverse (5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3') 16S rDNS primerekkel végeztük (Lane, 1991). Steril PCR csövekbe összeállítottuk a PCR mastermixet (A PCR-hez szükséges anyagok keveréke az összes mintára számítva).

Egy mintára számított reagens mennyiség: 5µl PCR puffer, 3µl $MgCl_2$, 10 µl (1mM) dNTP, 1µl Taq polimeráz, 0,5µl- 0,5µl foward (27f VIC) és reverse primert (519r), 3µl DNS templát és MQ vizet 50 µl végső térfogatig. A templát DNS ebben az esetben a monitoring mintákból származó közösségi DNS volt. A cső tartalmát alapos keverés után 1000 rpm fordulatszám mellett, 1 percig centrifugáltuk. A PCR reakciót Eppendorf Mastercycler® készülékkel végeztük.

Beállításaink szerint az összemért PCR mastermix nem tartalmazta a Taq polimerázt. A preinkubáció során ugyanis 98 ºC-ra van szükség ahhoz, hogy a DNS szál széttekeredjen és a bázisok közötti hidrogénhidak felbomoljanak. A Taq polimeráz szerkezete ezt a hőmérsékletet nem bírja ki, ezért azt csak a következő (94ºC-os) szakaszban adagoljuk a mintáinkhoz. Ezt követően kezdődik a 35 ciklusból álló folyamat, amely három szakaszból áll:

1. 94 ºC-on a DNS denaturálódik az első ciklusban ekkor adagoljuk a a Taq-polimeráz enzimet. A ciklusok elején a Taq megóvása érdekében csak erre a hőmérsékletre hevítjük az oldatot.
2. A temperáló kamra hőmérséklete 56 ºC-ra csökken, ezzel megindulhat a primerek feltapadása (annealing) a DNS templát megfelelő helyeire.
3. A 72 ºC-os szakaszban a Taq-polimeráz szintetizálja az új DNS szálat, a reakcióelegyben jelen levő dNTP-k beépítésével (elongáció), a primerek kötőhelyeitől távolodva.

Ezeket a szakaszokat 35 ciklusban ismételve a kiindulási DNS-ből exponenciálisan növekedve megfelelő számú amplikonunk (10^6-10^9 kópia) keletkezik. A készülék a program végén 4 ºC-ra hűti a mintát, amit felhasználásáig hűtőben ugyanezen a hőmérsékleten tárolunk. A munka folyamán, a hibák kiszűrése érdekében negatív (DNS templát nélküli mastermix) és pozitív kontrollt is alkalmaztunk

Fentiek alapján a kialakított hőprofil a következő volt:

1. 98°C	3 perc	preinkubáció	
94 ^{o}C	10 mp	Taq polimeráz enzim bemérése	
2. 94°C	30 mp	denaturáció	35 ciklus
56°C	30 mp	anelláció	
72°C	30 mp	extenzió	
3. 72°C	10 perc	végső extenzió	
4. 4°C	∞	hűtés	

A PCR során a primerek segítségével a közösséget alkotó DNS-ekből azt a kb. 500 bázispárnyi amplifikáltuk, amelyet a szekvenciájuk meghatároz.

3.1.7.2. Agaróz gélelektroforézis

A PCR sikerességét és a megfelelő méretű fragmentek jelenlétét agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük. A gél elkészítéséhez 100 ml 1 x TBE (10,8 g Tris; 10,5 g bórsav; 0,93 g EDTA-Na; 1000 cm^3-re desztillált vízzel kiegészítve, pH: 8,3) pufferben magas hőmérsékleten 1 g nagy tisztaságú agarózt oldottunk fel, majd kézmelegre hűtve az oldatba 6 µl 1%-os ethidium-bromid festéket pipettáztunk és ezt a fésűsorokat tartalmazó, OWL típusú futtatókádba öntöttük. A gél megszilárdulását követően a fésűsorokat eltávolítottuk, az így kialakult zsebekbe 6 µl PCR termék és 3 µl STOP kék oldatot (18,6 g EDTA; 20 g sarcosyl; 600 ml glicerin; 0,5 g brómfenolkék; 1000 ml desztillált víz) elegyét pipettáztuk. Minden egyes mintasor mellé standardként 4 µl DNS markert (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas) vittünk fel.

A DNS fragmentek pH 7-es értéken negatív töltéssel rendelkeznek és a gélre kapcsolt egyenáram hatására a pozitív pólus felé vándorolnak: a nagyobb molekulák lassabban, míg a rövidebb fragmentek gyorsabban (a sebesség fordítottan arányos a DNS molekulasúly tízes alapú logaritmusával). Az előzetesen a gélhez adott etidium-bromid beépül a DNS-szálba és mivel UV fény alatt fluoreszkál, így a DNS szál vándorlása a gélben nyomon követhető transzilluminátor alatt. A mintákat 110 V feszültségen 30 percig futtattuk, majd UV fény alatt a célszekvenciák hosszát a markerhez viszonyítva ellenőriztük.

3.1.7.3. A PCR termék emésztése T-RFLP-hez

Annak érdekében, hogy a primerekkel amplifikált közösségi DNS-ek bakteriális diverzitásáról képet kapjunk, a 16S rDNS PCR termékeket restrikciós endonukleázokkal emésztettük. A restrikciós endonukleáz az amplifikált közösségi 16S rDNS szakaszait egy bizonyos bázis sorrend esetén hasítja. A hasítás következtében eltérő hosszúságú fragmentek keletkeznek. Ahogy azt a 2.6.2. fejezetben bemutattam a T-RFLP módszer lényege, hogy a hasított fragmentek közül csak a DNS szakasz 5'-terminális végéhez közelebb álló (jelölt) fragmenteket elemzi. Mivel akár több mikrobának is lehet azonos a hasítási pontja, ezáltal azonos lehet a terminális restrikciós fragment hosszúsága is. Vizsgálataink során az MspI (Fermenteas Inc.) restrikciós enzimet használtam, ami (C↓CGG) szekvenciát ismeri fel és hasítja. Az emésztés inkubációs ideje minimum 3 óra (maximum 12 óra) 37 ^{o}C-on. A reakcióelegy összeállítása: 2 µl restrikciós enzim puffer, 0,3 µl restrikciós enzim (3 U), 7,7 µl ultratiszta MQ-víz. A reakció keverékből 10 µl mérünk 10 µl PCR termékhez.

3.1.7.4. Az emésztett PCR termék tisztítása etanol-precipitációval

A PCR reakció termékeket a további feldolgozás előtt meg kell tisztítani a reakcióban jelenlévő puffer, $MgCl_2$, Taq polimeráz enzim és be nem épült dNTP maradványoktól. Erre az etanolos DNS precipitálási módszert alkalmaztuk. Lényege, hogy a PCR végterméket úgynevezett acetát mixszel (1,5 µl 2M-os nátrim-acetát; 7,25 µl MQ víz; 31,25 µl 95%-os etil-alkohol egy reakcióra számítva) kémcsőrázóval alaposan összekeverjük és szobahőmérsékleten 10 percig inkubáljuk (etanol precipitáció). Az oldatban lévő alkohol vízelvonó hatása segít a DNS kicsapódásában, míg a nátrium-acetát megakadályozza, hogy a megmaradt dNTP kiváljon az elegyből. Az inkubációt 30 perces centrifugálás követi (4600 rpm, 4 ^{o}C) és felülúszó leöntése után a mintákra 180 µl 70%-os EtOH-t pipettázunk, majd 15 percig 4600 rpm-en ismét centrifugáljuk. A felúszó ismételt eltávolítása után a pelletet 10 percig liofilező vákuum alatt vízmentesre szárítottuk és mintánként 20 µl Hi-Di formamidot mértünk rá, mely denaturált formában tartja a DNS-t. A kész elegyet 4°C-on, min. 24 órán át inkubáljuk.

3.1.7.5. T-RFLP analízis

A T-RFLP analízis folyamán az MspI restrikciós enzimmel emésztett PCR terméket kapilláris gélelektroforézissel vizsgáltuk. Ahogy azt említettem, a PCR során olyan fluoreszcensen jelölt primert használtunk (27f VIC), amelynek segítségével a terminális fragmenteket azonosítani lehetett a feldolgozás érdekében. Az eljárás első lépéseként a tisztított, MspI-gyel emésztett DNS-ből 1 µl-t adtunk 17,6 µl Hi-Di™ Formamid ($HCONH_2$) és 0,4 µl GeneScan™ 500 LIZ™ Size Standardhoz (sztenderd méretű DNS fragmentek). A két vegyület közül a Hi-Di™ formamid a DNS denaturálásához szükséges, míg a Size Standard a referencia fragmenteket tartalmazza, amelyekhez viszonyítjuk a mintában lévő fragmenteket. Mintáinkkal a kapilláris gélelektroforézist ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, USA) segítségével végeztük. Az eredményként kapott (kromatogramszerű) T-RFLP ábrákat GeneMapper szoftver segítségével értékeltük (Applied Biosystem, USA).

Vizsgálatainkban a T-RFLP vizsgálatok erdményeinek normalizálásához egy saját, C++ programnyelven írt programot használtunk. A megfelelő formátumra hozott nyers mérési eredményekből első lépésben az algoritmus az egyes fragmenthosszakat egész számra kerekíti. Amennyiben a kerekítések során ugyanazon fragmenhosszhoz több erdemény is tartozott, a nagyobb értéket vettük alapul. A második lépésben az algorimus megvizsgálta, hogy az egyes mintákban melyek azok a fragmentek amelyeknél a görbe alatti terület kisebb, mint az azonos mintában mérhető legnagyobb görbe alatti terület 1%-a. Amennyiben az adott fragmenthossz ilyen volt, akkor úgy tekintettük, hogy megléte nem jelentős, vagy mérési hibának („zajnak”) tekinthető a mintákban, ez alapján további elemzésétől eltekintettünk.

3.1.8. Klónkönyvtárak létrehozása

A fentiekhez hasonlóan első lépésben PCR segítségével a közösségi DNS mintából a 16S rRNS géneket 27f és 519r primerekkel amplifikáltuk. A keletkezett PCR terméket QIAGEN PCR Clean up Kit-tel tisztítottuk és DNS-ligáz enzimmel p-GemT Easy vektorral (Promega Co.) ligáltuk (fragmentek összekapcsolása). Ezt követően kompetens *Escherichia coli* sejteket transzformáltunk ligált vektorral. A vektort hordozó sejteket a 2.6.2. fejezetben bemutatott kék-fehér szelekció segítségével szelektáltuk. Ehhez ampicillint (100 µg/ml) tartalmazó LB (10 g pepton, 5 g élesztőkivonat, 10 g NaCl, 17 g agar, 1000 cm^3 desztillált víz) táptalajra X-Gal-t és IPTG-t vittük fel a gyártó által előírt koncentrációban, majd erre szélesztettük a transzformált *E. coli* sejteket, amiket 37 ^oC-on 24 órán át inkubáltuk. A kinőtt fehér telepeket sterilen átpontoztuk egy másik ampicillin tartalmú LB táplemezre, majd újabb 24 órát inkubáltuk 37 ^oC-on. Az inkubációt követően a tiszta, fehér telepeket egyenként 30 µl steril vízet tartalmazó Eppendorf csőbe vittük át

sterilen. Kémcsőkeverővel szuszpendáltuk a sejteket, majd a plazmid DNS elválasztásához 98 ^{o}C-on 5 percig denaturáltuk, ezt követően 14000 rpm-en 5 percig centrifugáltuk.

3.1.8.1. Klónkönyvtárak feldolgozása T-RFLP segítségével

A klónkönyvtár feldolgozásának első lépéseként ún. nested PCR technikával M13f (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') és M13r (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') primerek felhasználásával minden klónszekvenciát amplifikáltunk. A primerválasztás lényege, hogy ezen primerek feltapadási régiói csak a gazdaszervezetbe (*E. coli* Top10) beépített P-Gem-T Easy vektoron találhatóak meg, vagyis csak ezek a szakaszok amplifikálódnak a PCR során. Minden esetben negatív, illetve pozitív kontrollt is használtunk, hogy a fals negatív, illetve fals pozitív eredményeket elkerüljük. A PCR hőprofilja és a mastermix (6. táblázat) összeállítása egy reakcióelegyre számolva:

98°C	3 perc	kezdeti denaturáció	
94 ^{o}C	10 mp	Taq bemérése	
94°C	30 mp	denaturáció	30 ciklus
52°C	30 mp	anelláció	
72°C	30 mp	extenzió	
72°C	10 perc	végső extenzió	
4°C	∞	hűtés	

3. táblázat A polimeráz láncreakcióhoz (PCR) használt keverék összetétele a terminális restrikciós fragment hossz polimorfizmus(T-RFLP) elemzés fragmentjeinek azonosításához készített 16S rDNS alapú klónkönyvtárak esetében és mennyiségük egy mintára számítva.

Komponens	**Térfogat (µl)**
$MgCl_2$	3
Taq Buffer (Finnzymes, F-511)	5
dNTP (Finnzymes, F-560)	10
Taq polimeráz (Finnzymes F-501 DyNAzyme II)	1
Primer 1 (M13f)	0,5
Primer 2 (M13r)	0,5
DNS templát	3
MQ víz	27
Végtérfogat	**50**

A következő lépésben az első PCR után már csak a transzformált DNS régióból származó fragmentek 27f és 519r szakaszát amplifikáltuk és ehhez fluoreszcensen jelölt primert (27f VIC) használtunk, majd a továbbiakban T-RFLP segítségével vizsgáltuk a klónokat. A PCR reagensek és a körülmények megegyeztek a 3.1.7.1. alfejezetben leírtakkal és a PCR terméket ismételten agaróz gélelektroforézissel detektáltuk.

A restrikciós endonukleázokkal történő emésztés összetevői és menete megegyezik a 3.1.6.3-es pontban leírtakkal, de ebben az esetben templátként a nested PCR termék szolgált. A restrikciós emésztést követően etanol-precipitációs tisztítást végeztünk. Az emésztett PCR terméket tisztítás

után, 20 µl steril desztillált vízben, egy napig, 4 ^{o}C-on oldottuk fel, majd szintén a fent leírtak szerint elvégeztük a T-RFLP vizsgálatot. Ebben az esetben tehát megkaptuk a közösség egy-egy tagjának T-RFLP mintázatát. Ahhoz, hogy ezeket a klónokat taxonómiai szempontból is azonosítani tudjuk szekvenáló reakciót végeztünk a PCR termékkel.

3.1.8.2. Szekvenáló reakció

A szekvenálás elve az úgynevezett dideoxi-, vagy Sänger-féle láncterminációs módszer. A módszer nagyban hasonlít a fent leírt PCR-hez, de ebben az esetben a reakcióelegyben a dNTP mellett fluoreszcens festékkel jelölt módosított dideoxi-nukleotidok (a ribóz 2’ és 3’ C-atomjáról hiányzik az oxigén) is találhatók. A dideoxi, vagy A/T/G/C stop- nukleotidokat a polimeráz enzim nem különbözteti meg a normál bázisoktól (dNTP) és azokat a normál nukleotidokhoz hasonlóan beépíti a komplementer szálba, a hiányzó kapcsolódási pont (3’ -OH csoport) miatt azonban ezen a ponton a komplementer lánc szintézise megszakad. A reakció eredményeképpen a templát DNS különböző hosszúságú fragmentjei jönnek létre, végükön a módosított fluoreszcens nukleotidokkal. A fluoreszcencia jellemző a stop nukleotid tipusára (A/T/G/C), vagyis a láncvégi bázis felismerhető lesz. A szekvenáló reakcióelegy összetétele a következő, egy reakcióra (végtérfogat 10 µl) számítva: 1 µl BigDye, 1,5 µl BigDye puffer, 0,5 µl primer (519r) és 7 µl templátként szolgáló tisztított PCR termék.

A vizsgálat szakaszai is hasonlóak a PCR lépéseihez. A reakció egy 10 másodperces, 94 ºC-os denaturációval kezdődik, majd 54 ºC-on 15 másodperc alatt a primer a templátokhoz hibridizál, végül 72 ºC -on, 4 percig folyik a DNS szál szintézise. A három szakaszból álló ciklus az előzőhöz hasonlóan 30-szor ismétlődik, majd a gép 4 ºC-ra hűti a mintákat. A kapott végtermék az 519 reverz primer használata esetén kb. 500 bázispár hosszúságú, amely általában elegendő az adott baktériumtörzs pontos identifikációjához (Lane, 1991). A végterméket a 3.1.7.4. fejezetben bemutatott etanol precipitációval tisztítottuk.

3.1.8.3. Kapilláris gélelektroforézis

A dideoxi nukleotidokkal fluoreszcensen jelölt DNS fragmentek szeparálását és detektálását, azaz a különböző fragmenthosszúságú és ismert bázis végű módosított nukleotidok fluorszcenciájának mérését Applied Biosystems® ABI 310 DNA Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) genetikai analizátor segítségével végeztük.

3.1.8.4. Szekvencia hasonlóság elemzés

A kapilláris gélelektroforézis (szekvenálás) során megállapított nukleotid sorrend alapján a vizsgált mikroszervezetek faj szintű identifikációja elvégezhető. Mint azt az Irodalmi áttekintésben bemutattam a baktériumok identifikációjához a riboszóma 16S alegységét kódoló DNS szakaszt

használjuk fel, amely kb. 1500 bázispár hosszúságú, de már a szekvenáló készülékkel meghatározott kb. 500 bázispárnyi 16S rDNS nukleotid sorrend alapján is nagy biztonsággal elkülöníthetők a prokarióta mikrobák faji szinten. A meghatározáshoz a kapott szekvenciákat on-line módon a National Center for Microbiology Information nemzetközi szervezet GenBank adatbázisában található szekvenciákkal vetettük össze (NCBI GenBank, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) a BLAST algoritmus alapján (Altschul et al., 1997). Ezen felül alkalmaztuk a kifejezetten baktériumok identifikálására használható, a típustörzsek szekvenciáit tartalmazó leBibi (Bio Informatic Bacterial Identification) adatbázist (Devulder et al, 2003). Ha az adatbázisban található, egy fajhoz köthető, szekvenciák bármelyikének 16S rDNS bázissorrendje és a vizsgált törzsünk szekvenciájának homológiája meghaladja a 98%-ot, akkor a vizsgált törzs ugyanahhoz a fajhoz tartozik (Stackebrandt & Goebel, 1994; Tindall et al., 2010).

3.1.9. Statisztikai módszerek

A biogeokémiai monitoring tevékenység során gyűjtött eredmények közötti kapcsolatrendszer vizsgálatát statisztikai módszerekkel végeztük. A statisztikai vizsgálatok mindegyikét a STATISTICA 7 és Microsoft EXCEL szoftverek felhasználásával végeztük el (Microsoft Inc., Redmond, USA).

3.1.9.1. Spearman-féle rang korreláció

A korreláció számításával két tetszőleges változó értékei közötti kapcsolat vizsgálható. Amennyiben két változó értékei között pozitív, szignifikáns korreláció mutatható ki azt mondhatjuk, hogy a két változó egymástól függő, értékeik között egyenes arányosság áll fenn; amennyiben negatív, fordított. Amennyiben két változó közötti korreláció értéke nulla, akkor azok nem korrelálhatók. A korreláció maximális értéke +1, minimuma -1 lehet. A korrelációszámítás speciális esetei az ún. rangkorrelációk (pl.: Spearman-féle rangkorreláció), ezekben a két változó értékeiből képzett sorozatok korrelációját vizsgáltuk. Munkánk során az egyes minták kémiai analítikai és ökotoxikológiai vizsgálatok eredményeivel végeztünk korrelációszámítást a Spearman-féle rang korreláció felhasználásával.

3.1.9.2. Shannon-féle diverzitás elemzés

A biodiverzitás egy faj, a gének szintjén jelentkező sokfélesége, amely a populációk változatosságában mutatkozik meg (Láng, 2002). Ezen sokféleség számszerű jellemzésére alkalmas a Shannon-index, amely a biodiverzitás meghatározásának egyik gyakran alkalmazott markere a molekuláris biológiai paraméterek elemzésére (Maila et al, 2005, Rodríguez-Martínez, 2006). A módszer segítségével egy adott területen fellelhető fajok számának és egyedszámának ismeretében a különböző területek fajgazdagsága, sokfélesége hasonlítható össze. A T-RFLP vizsgálat

eredményeként kapott fragmenthosszakat tekintettük csoport reprezentánsoknak, a görbe alatti területetet pedig azok egyedszámának. Ezek alapján hasonlítottuk össze a közösségi DNS T-RFLP mintázatait a diverzitás mértéke szempontjából.

3.1.9.3. T-próba, Mann-Whitney U

A szennyezett és kontroll minták közötti T-RF különbségek kimutatásához t-próbát, illetve amennyiben a változók nem mutattak normális eloszlást, Mann-Whitney U tesztet használtunk. A statisztikai számításoknál az egyes változók a T-RFLP analízis egyes fragmenthosszai, valamint a kémiai analitikai és ökotoxikológiai vizsgálatok eredményei voltak.

3.1.9.4. Klaszter-analízis

A klaszter-analízis egy olyan, a vizsgált változók számát csökkentő eljárás, amelynek segítségével nagyméretű adattömböket homogén csoportokba tudunk rendezni. Ezeket a csoportokat klasztereknek nevezzük. Az egyes klasztereken belüli adatok valamilyen dimenzió szerint hasonlítanak egymáshoz, és e dimenzió mentén különböznek a többi klaszter elemeitől. A csoportosítás alapját különböző távolság- vagy hasonlóságmértékek képezik, amelyeket a különböző távolságmértékekkel (pl.: euklideszi-távolság, nem euklideszi-távolság, Pearson-távolság) jellemezhetjük. A klaszterezés algoritmusa lehet hierarchikus és nem hierarchikus. A hicherarchikus elemzés a klaszterezés más, előzőleg elkészített klaszterek segítségével, míg a nem hierarchikus klaszterezés újonnan képzett klaszterek segítségével végzi. A hierarchikus klaszterezés lehet összevonó és felosztó. Az összevonás során az algoritmus minden elemet különálló klaszternek tekint, majd ezeket olvasztja egyre nagyobb klaszterekbe. A felosztó módszer során eleinte minden minta egy klasztert alkot, majd ezekből választódnak le az egyes minták további klaszterekbe. Az összevonó klaszterezés során különböző csoportosítási módszerek léteznek, ezek közül munkánk során az ún. egyszerű láncmódszert („linear linkage method”) használtuk, amelynek során az egyes klaszterek közötti távolságot a két legközelebbi elem közötti euklédeszi-távolság alapján számítottuk ki. A klaszter-analízis segítségével munkánk során arra kerestük választ, hogy mennyiben hasonlítanak a különböző terültek T-RFLP mintázatai a minták szennyezettségétől függően, valamint ugyanez mennyire igaz azonos területeken, de más-más mintavételi időpontban.

3.1.9.5. Biomarker keresés

A biomarker keresés révén - célkitűzésünknek megfelelően - arra kerestük választ, hogy az általunk vizsgált minták felhasználásával kijelölhetők-e olyan fragmentek, amelyek megjelenése, illetve eltűnése alkalmas lehet a minták szénhidrogén szennyezettségének előrejelzésére. A keresést azokon a T-RF-eken végeztük el, amelyek a háttér és szennyezett minták között szignifikáns változást mutattak a statisztikai analízis alapján. A markerek jellemzéséhez specificitást és

szenzitivitást számoltunk. A diagnosztikus próbák szenzitivitása azt jelenti, hogy az adott módszerrel hány százalékos valószínűséggel lelhetők fel a valódi pozitív esetek. A specificitás pedig azt mutatja meg, hogy az adott módszer hány százalékos valószínűséggel jelzi előre a valódi negatív eseteket.

3.2. Szénhidrogén bontó mikroszervezetek izolálása

3.2.1. Szénhidrogén bontó mikrobák izolálása szennyezett környezeti mintákból

A doktori munka második részének célja az volt, hogy olajjal szennyezett közegekből eddig nem ismert, jó szénhidrogén bontó képességgel rendelkező törzseket izoláljunk, amelyeket a későbbiekben, pl. az előbb bemutatott monitoring területeken is, fel tudunk használni oltóanyagként. Ennek megfelelően hét, hazai, szénhidrogénekkel szennyezett területen (4. sz. táblázat) végeztünk talajvíz, biofilter, olajipari szennyvíz, illetve egy esetben talaj mintavételt. Azt valószínűsítettük, hogy ilyen szennyezett kárhelyeken nagyobb eséllyel izolálhatók olyan baktériumok, amelyek a szénhidrogéneket, mint szénforrást hasznosítani tudják élet- és anyagcsere folyamataikhoz, vagyis biodegradációra képesek. Az ilyen közegekből származó minták szennyezettségét akkreditált kémiai analitikai laboratórium által végzett vizsgálatok igazolták minden esetben. Az analitikai eredmények alapján a vételezett talaj- és talajvízminták szennyezettsége minden esetben meghaladta a hatályos „B” szennyezettségi határértéket a vizsgált szénhidrogén komponensek (TPH, BTEX) esetében. A mintavételezésekkel kapcsolatos információkat az alábbi 4. sz. táblázatban mutatom be.

4. számú táblázat A biodegradációban alkalmazható baktériumok izolálásának érdekében vett, hét, hazai, szénhidrogénekkel szennyezett helyszínekről származó minták bemutatása, a minták jeleivel

Mintavétel helye	Helyszín típusa	Minta típusa	Minták száma	Minták jele
Bátonyterenye	töltőállomás	talaj	1 db	CHBT
Sásd	töltőállomás	talajvíz	4 db	4S, 5S, 7S, 8S
Ópusztaszer	Olajvezeték törés	talajvíz	2 db	OM-7, OM-8
Szarvas	töltőállomás	talajvíz	1 db	SZM5
Egykori szovjet katonai repülőtér		biofilter	2 db	TBF1, TBF2
Zalaegerszeg	töltőállomás	talajvíz	2 db	Z5, Z9
Hazai kőolajfinomító		olajipari szennyvíz	2 db	ZFM 19, ZFM23
A mintázott területek száma: 7		**Összes minta (db):**	**14**	

A folyadék (talajvíz, szennyvíz) mintákat acél bailerrel, barna, műanyag kupakkal záródó, fél literes térfogatú üvegedénybe vételeztük. A szilárd (talaj) mintákat kb. 100g minta befogadására alkalmas, szintén barna, teflon szeptummal ellátott csavaros kupakkal záródó, porüveg edénybe vettük. A mintavételi eszközeinket, a mintavételt megelőzően autoklávban (120ºC-on, 20 percen át, 1 Atm nyomáson) sterileztük. A mintákat fénytől elzárva, hűtve (4ºC-on) tároltuk és a mintavételezést követően 24 órán belül a vizsgálólaboratóriumba szállítottuk.

A szelekcióhoz első lépésben a begyűjtött mintákból 10 ml-t, illetve a biofilter és talajminta esetében 10 g-ot sterilen 100 ml, egyedüli szénforrásként 2 cm^3 gázolaj-kőolaj keveréket tartalmazó

OIR-III táplevesbe (összetétele: 5,0 g $(NH_4)_2SO_4$; 0,5 g KH_2PO_4; 1,0 g K_2HPO_4; 0,5 g $MgSO_4 \times 7H_2O$; 0,2 g $CaCl_2 \times 6H_2O$; 0,01 g $FeSO_4 \times 7H_2O$; 0,5 g pepton; 0,5 g élesztőkivonat, 1 liter desztillált víz) mértük, 250 ml-es Erlenmeyer lombikokba. A szénforrás szűkítés (csak gázolaj-kőolaj) célja az volt, hogy csak a szénhidrogénekkel szemben toleráns, esetlegesen azt biodegradálni képes baktériumok szaporodjanak fel az oldatban. A szuszpenzió 72 órás 20 °C-on végzett rázatása (SARTORIUS BS-1 síkrázógépen, 150 rpm fordulaton) során kialakult szubmerz tenyészetből hígítási sorokat készítettünk: 9 ml desztillált víz és Tween 80 (felületaktív detergens) keverékét tartalmazó kémcsövekbe 1 ml pipettáztunk a rázatott tenyészetből (10^1 hígítás). Ebből a hígításból kémcsőrázós keverés után az azt követő 9 ml, hasonlóan összeállított oldatba mértünk 1 ml-t (10^2 hígítás), és így tovább 10^8 nagyságrendig (határhígításos módszer). A 10^2-10^8 hígításból TGE5 univerzális táptalajjal lemezt öntöttünk. 72 órás, 30ºC-os inkubációt követően meghatároztuk a környezeti minta összes élősejt számát CFU (Colony Forming Units)/ml mértékegységben kifejezve. A típusos, izolált telepekből többszöri tisztító szélesztéssel a mintára jellemző mikrobákat izoláltunk, unikális (egy baktérium törzset tartalmazó) tenyészeteket hozva létre.

3.2.2. Gravimetriás bontási kísérlet

A fentiek alapján izolált törzsekből folyékony 50 ml térfogatú TGE5 táplevesben rázatással nagy (~10^6-10^8 CFU/ml) élősejtszámú tenyészetet hoztunk létre, melyet újra, a már fent említett OIR-III gázolaj-kőolaj keveréket tartalmazó oldatba oltottuk. 120 órás rázatás után vizuális vizsgálattal (1. kép) különítettük el azokat a törzseket, amelyek látható módon egyértelműen megváltoztatták az olaj mennyiségét, állagát (pl. emulgeált olajcseppek, az olajgyűrű eltűnése), eloszlását a kontroll lombikhoz képest. Az így kiválogatott mintákból gravimetriás méréssel és extraháló szerekkel leválasztottuk a megmaradt olajat, melyet bepárlással forráspont különbség alapján elválasztottunk az oldószertől. Ehhez a folyékony tenyészet 100 cm^3-ét, 250 cm^3-es elválasztótölcsérben, 3x50 cm^3 petroléterrel, majd 1x50 cm^3 kloroformmal rázattuk. Az oldószeres fázisokat minden rázatás után Düren 619 G ¼ szűrőpapíron szűrtük át és ismert tömegű gömblombikokba öntöttük. A lombik oldószeres olajtartalmát 50-60°C-os vízfürdőn desztilláltuk, így a maradék oldószert is eltávolítottuk, majd a lepárlási maradékot századgramm-pontossággal mértük vissza. Az esetlegesen visszamaradt víz eltávolítása érdekében a mérés előtt a mintákat 50°C-on súlyállandóságig szárítottuk MEMMERT szárítószekrényben. Kontrollként szénhidrogént ugyanilyen arányban tartalmazó, oltatlan, de rázatott folyékony tenyészetet használtunk. A bepárlást Heidolph automata bepárló készülék segítségével végeztük. A maradék olaj tömegét a kontrollhoz viszonyítva megkaptuk a %-ban kifejezett szénhidrogén bontási eredményt. A vizsgálatokat 3 ismétlésben végeztük, így a három bontási eredmény átlagolásával nyertük adott törzs esetében a bontási % értékeket.

1. kép Szénhidrogén bontás hatására bekövetkező változás a ZFM 23.1 jelű, szénhidrogén származékokkal szennyezett területről izolált törzzsel oltott, OIR-III tápoldatot és gázolaj és kőolaj keveréket tartalmazó lombik (jobb oldalon) esetében a (120 órás, szobahőmérséklet) rázatás után, összehasonítva a kezeletlen kontrollal (bal oldalon)

3.2.3. Mikroszervezetek faji szintű identifikációja

A jó bontó képességekkel rendelkező izolált mikroszervezetek faj szintű identifikációját molekuláris biológiai módszerekkel, vagyis részleges 16S rDNS szekvencia analízis alapján végeztük el. A vizsgálat lépései:

- DNS tisztítás
- PCR reakció
- 16S rDNS szekvencia analízis
- Szekvencia hasonlóság elemzés

3.2.3.1. DNS tisztítás

A genomi DNS kivonását az előzetesen nutrient táptalajon, 48 órán át 30ºC-on 150 rpm fordulattal rázótermosztátban inkubált individuális (egy törzset tartalmazó) sejtszuszpenzióból végeztük. Az extrakcióhoz a kereskedelmi forgalomban kapható UltraClean® Microbial DNA Isolation Kitet használtuk (MoBio Laboratories Inc., USA). Az unikális baktériumszuszpenzióból a DNS kivonást az említett izoláló kit használati utasítását változatlanul követve hajtottuk végre.

3.2.3.2. PCR reakció

A 16S rDNS identifikációhoz szükséges szakaszát a klónozásnál bemutatott 27f 519r primerpárokat használtuk, valamint a közel teljes gén szekvencia meghatározáshoz a 16S rDNS szakaszt 27f és 1492r (5'-TACGGGTACCTTGTTACGACTT-3'), valamint 519f (5′-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3′) és 1492r primerek használatával amplifikáltuk (Lane, 1991). Az amplifikációt az automata Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Németország) készülék segítségével hajtottuk végre. Az 5. sz. táblázat mutatja a PCR során használt különböző anyagok mennyiségét egy reakcióelegyre számolva.

5. számú táblázat A 16S rDNS alapú, faji szintű identifikációhoz használt polimeráz láncreakció (PCR) során alkalmazott anyagok és mennyiségük egy mintára számítva

Komponens	**Térfogat (µl)**
$MgCl_2$	4
Taq Buffer (Finnzymes, F-511)	5
dNTP (Finnzymes, F-560)	10
Taq polimeráz (Finnzymes F-501 DyNAzyme II)	0,2
Forward primer	0,5
Reverse primer	0,5
BSA	5
DMSO	2
DNS templát	3
TWEEN 20	0,5
MQ víz	19,3
Végtérfogat	**50**

A PCR hőprofil összeállítása:

98°C	5 perc	preinkubáció	
94 °C	10 mp	Taq polimeráz enzim bemérése	
94°C	30 mp	denaturáció	35 ciklus
56°C	30 mp	anelláció	
72°C	60 mp	extenzió	
72°C	10 perc	végső extenzió	
4°C	∞	hűtés	

3.2.3.3. Agaróz gélelektroforézis

A PCR sikerességét és a megfelelő méretű fragmentek jelenlétét agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük a 3.1.7.2. fejezetben leírtak alapján.

3.2.3.4. PCR termék tisztítása

A PCR termékeket, vagyis a nagy számban amplifikált DNS szakaszt az *Advanced*™ PCR Clean Up Kit (Viogene Inc., USA) segítségével tisztítottuk, a gyártó utasításait követve. Ennek alapján az elektroforézis után megmaradt terméket egy 1,5 ml Eppendorf csőbe pipettázzuk és megadott tisztítófolyadék hozzáadása után kémcsőkeverővel homogenizáltuk. Az így keletkezett oldatot egy speciális silico-membrán réteggel ellátott oszlopra mértük. A membránhoz a 100 bázispár - 10 kilobázis méretű DNS fragmentek kötődnek, viszont a számunkra szükségtelen alkotók (pl.: primer dimerek, maradék dNTP) 1-2 perces centrifugálás hatására áthaladnak rajta. Az oszlop átmosását a protokoll szerint további két mosófolyadékkal is elvégeztük. A folyamat végén a csöveket még egyszer 3 percig centrifugáltuk maximális fordulatszámon, így eltávolítva a maradék

puffert. Az oszlopokat tiszta Eppendorf csőbe helyezve a membrán közepére 30 µl eluáló puffert mérünk, majd 10 perces szobahőmérsékleten történő inkubáció után 14500 rpm-en centrifugáltuk, így a cső alján már csak a tisztított PCR termék marad. A tisztítás eredményét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Az amplifikált DNS templátot szekvenáltuk.

3.2.3.5. Szekvenáló reakció és kapilláris gélelektroforézis, szekvencia elemzés

A szekvenálás menete megegyezett a 3.1.8.2. fejezetben leírtakkal. A kapilláris gélelektroforézist ebben az esetben is az Applied Biosystems® ABI 310 DNA Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) segítségével végeztük.

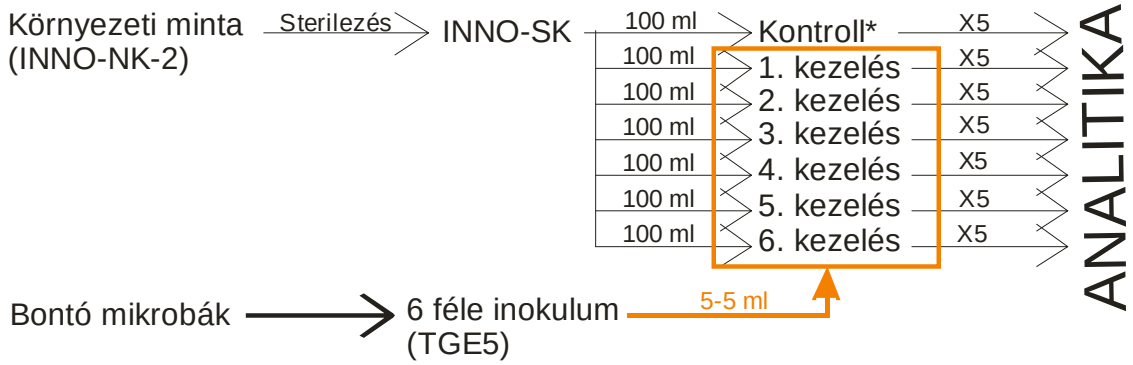
A kapilláris gélelektroforézis (szekvenálás) során kapott szekvenciákat on-line módon a NCBI GenBank és a leBibi adatbázisában található szekvenciákkal vetettük össze. 98%-os szekvencia hasonlóság esetén, a vizsgált törzset az adatbázisban fellelhető mikroba fajhoz tartozónak tekintettük (Stackebrandt & Goebel, 1994; Tindall et al., 2010), ahogy azt a 3.1.8.4. fejezetben bemutattuk.

3.2.4. Részletes biodegradációs vizsgálatok (bontási kísérlet)

Az izolált mikroszervezetek szénhidrogén bontási kapacitását nem kizárólag laboratóriumban összeállított, hanem eredeti, szennyezett területről származó környezeti minta esetében is igazolni kívántuk. Ennek megfelelően egy általunk kidolgozott módszer alapján extrahálható alifás szénhidrogéneket (EPH) tartalmazó talajvízmintát használtunk a mikrobatörzsek bontási képességének igazolására. Erre a célra egy csepeli helyszínről származó, szénhidrogénekkel szennyezett minta (INNO-NK-2) jelentette a további laboratóriumi kísérletek kiinduló mintáját. Ez utóbbi minta TPH szennyezettségét a kémiai analitika is alátámasztotta. Az INNO-NK-2 mintát a laboratóriumi kezelések előtt sterileztük. A sterilezett minta (steril kontroll) jele INNO-SK lett. Steril kontrollra azért volt szükség, mert a program során kiválasztott mikroszervezetek bontási kapacitását kívántuk vizsgálni, nem pedig a vízben esetlegesen természetesen jelenlévő közösségét. A sterilezést automata autoklávban 1,2 Atm nyomáson 120°C-on 20 percig végeztük. Az analitikai vizsgálatok alapján a kontroll a sterilezés után is tartalmazott elegendő szerves szennyezőanyagot ahhoz, hogy a bontási kísérletet kivitelezzük. Az INNO-SK-val megegyező mintákkal 6 párhuzamos kezelést végeztünk, illetve egy kontrollt készítettünk (összesen 7 minta). A kezelések során a szennyezett környezeti mintát a szelekciós vizsgálataink során izolált mikrobákkal oltottuk be. A kísérletben az újonnan izolált mikrobák közül a TBF2/20.2, a ZFM23.1 és 4S-8 törzsek bontási képességét vizsgáltuk *in vitro*, környezeti mintán. Az SZM54.2, valamint az OM7-2 törzseket a kísérlet indításáig nem sikerült kellő mértékben felszaporítani a TBF2/20.1-et pedig patogenitása okán zártuk ki a további vizsgálatból. A kísérletben negatív kontrollként sterilezett környezeti minta szerepelt, amelyet az oltott mintákkal azonos körülmények között rázattam öt

napon át. Pozitív kontrollként három különböző beállításban az ún. SAFEREMED bioremediációs oltóanyag tagjait használtuk fel. A SAFEREMED oltóanyag alkotó mikrobák egy szabadalmilag védett know how részei, amelyek pontosan meghatározott és jelentős mértékű olajbontó képességgel rendelkeznek (Atzél, 2008) és bioremediációban alkalmazzák őket. A bontási kísérletben pozitív kontrollként felhasznált törzsek: NCP-3: *Pseudomonas putida*; AK-35: *Rhodococcus erythropolis*; AK-38: *Rhodococcus gordoniae*; AK-40: *Rhodococcus rhodochrous*, CHB-15: *Micrococcus nishinomiayensis*. A kontrollként felhasznált törzs kombinációk: NCP3/AK-38; AK-40/CHB-15; AK-38/AK-35. A párhuzamos kezelések előtt az INNO-SK-val megegyező, sterilezett mintákat kezelésenként 7x100 ml-t rázólombikba osztottuk szét. A kezeléseket 5 ismétlésben végeztük majd a bontott terméket homogenizáltuk az analitikai vizsgálathoz szükséges 500 ml minta előállításához. A 3. ábra alapján összeállított, 24 órás, TGE5 ferde agaron felszaporított törzstenyészetekből származó, individuális baktérium törzseket 48 órán át rázattuk folyékony TGE5 tápoldatban. A TGE5-ön felszaporított baktérium szuszpenzióval 5 ml mennyiségben oltottuk be az egy bontási rendszerbe tartozó lombikokat.

A szétosztott környezeti mintát minden kezelés esetében azonos mennyiségben oltottuk be, míg a negatív kontroll esetében 5 ml sterilezett desztillált vizet alkalmaztunk, a koncentráció azonosság érdekében. (Azon kezelések esetén, amikor az oltás 2 mikroba törzzsel történt, az inokulum mennyisége 2,5-2,5 ml volt.) A kontroll mintákat és a beoltott „bontási rendszereket” öt napon át szobahőmérsékleten rázattuk. A rázatás után a kontroll mintákat és a bontási rendszereket a párhuzamos kezelések homogenizálásával analitikai vizsgálatra alkalmas térfogatú átlagmintát készítettünk, melyet az említett akkreditált kémiai analitikai laboratórium vizsgált a továbbiakban.



3. ábra A részletes biodegradációs képesség elemzéshez használt bontási kísérlet sematikus ábrája. Az INNO-NK-2 jelű környezeti minta szennyezett területről származó talajvíz, amelyet a bontó mikróbákkal végzett oltás előtt sterileztünk, annak érdekében, hogy ne a mintában lévő mikroszervezetek bontó képessége érvényesüljön.

3.3. <u>Új baktériumfaj leírásához szükséges vizsgálatok</u>

A fent bemutatott, bontási kapacitással rendelkező, mikroszervezetek keresése során olyan mikroszervezetet izoláltunk, amelynek szekvenciája az alkalmazott referencia adatbázis (NCBI GenBank, leBibi) identifikált mikroba törzseivel csak kb. 93% körüli homológiát mutatott. Az eredmény alapján ez a törzs egy eddig ismeretlen, új faj jelölt. Az eredmény tudományos

alátámasztásához a 16S rDNS alapon elért molekuláris biológiai eredmény kiegészítésre szorult, azaz a közel teljes 16S rDNS szekvenciát meg kellett határozni, valamint a 2.3.1. fejezetben bemutatott identifikációs vizsgálatokat is el kellett végezni.

3.3.1. Molekuláris biológiai vizsgálatok

3.3.1.1. Filogenetikai vizsgálatok

A fent leírtak alapján a szennyezett közegből izolált, ismeretlen fajhoz tartozó törzs szekvenciáját összehasonlítottuk az NCBI GenBank és a leBibi adatbázisaiban található publikációk és típustörzsek szekvenciáinak eredményeivel. A többszörös összehasonlítást a CLUSTAL_X (Thompson et al., 1997) programmal végeztük. Ezután a MEGA4 (Tamura et al, 2007) szoftver felhasználásával az új faj rendszertani elhelyezéséhez filogenetikai törzsfát készítettünk. Ez a taxonómiai vizsgálatokhoz használható szoftver három algoritmust használ a törzsfa elkészítéséhez, ebből kettő ún. távolság alapú módszer: a „neighbour-joining" (Saitou & Nei, 1987), és a „minimum-evolution" (Rzhetsky & Nei, 1992), valamint egy karakter alapú módszer, a „maximum-parsimony", vagyis „legnagyobb takarékosság" algoritmus (Swofford, 1993). Az evolúciós távolságot a Kimura-féle kétparaméteres modelszámítása alapján értékeltük (Kimura,1983).

3.3.1.2. Guanin és citozin arány analízis

A teljes genomi DNS guanin és citozin (G+C) tartalmának vizsgálatát, megbízás alapján, a Német Mikroorganizmusok és Sejtkultúrák Nemzeti Gyűjteménye (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ) végezte. A vizsgálat során a DNS-t enzimatikusan emésztették nukleotid alkotókra, mely alkotókat reverz fázisú HPLC készüléken választották el (Tamaoka & Komagata, 1984; Mesbah et. al 1989).

3.3.1.3. DNS-DNS hibridizáció

A viszonylag kis szekvencia hasonlóság miatt a DNS-DNS hibridizáció elvégzésére nem volt szükség ez a vizsgálat ugyanis csak 97% feletti hasonlóság esetén elvárt (Tindall et al., 2010). Mivel az általunk azonosított törzs szekvenciája a közeli rokon ismert törzsek közül csak 93% körüli hasonlóságot mutatott, ezért ezt a vizsgálatot nem végeztük el.

3.3.2. Fenotípusos vizsgálatok

3.3.2.1. Morfológiai leírás

A modern taxonómiai elemzéseket megalapozó filogenetikai vizsgálatokon túl az új faj leíráshoz továbbra is fontosak a klasszikus mikroszkópos vizsgálatok, illetve Gram-festés elvégzése, de ide tartozik a törzs hőmérséklet, pH és táptalaj preferenciájának leírása, a kemotaxonómiai jellemzés, az asszimilációs tesztek, illetve az enzim aktivitás meghatározása.

Vizsgálataink során 72 órán át 30ºC-on TGE5 és R2A agaron (összetétele: 0,5 g élesztőkivonat; 0,5 g proteózpepton; 0,5 g kazein hidrolizátum; 0,5 g glükóz; 0,5 g keményítő; 0,3 g K_2HPO_4; 0,05 g MgSO4 x $7H_2O$; 0,3 g nátrium-piruvát; 15 g agar; 1 liter desztillált víz, pH 7,2±0,2, 25 ºC) inkubált sejtek morfológiáját 1000-szeres nagyítású fény mikroszkóppal (Zeiss docuval) vizsgáltuk. A Gram-festést Buck (1982) módszere szerint végeztük. A növekedés hőmérsékleti és pH tartományát és optimumát TGE5 táptalajon, illetve táplevesben öt napon át tartó tenyésztéssel, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 28, 30, 32, 37 40, 42 és 45ºC-on, illetve pH 2.0–10.0 között, 1 pH egység léptékkel mérve határoztattuk meg a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében (NCAIM). A só tolerancia vizsgálatot R2A agaron, 5 napon át inkubált 1–10% (w/v) NaCl oldattal végeztük. Valamint leírtuk a törzs növekedési képességét 30ºC-on nutrient-, tripton szója (TSA) és MacConkey agaron (MERCK 105450, 105458, 104029).

Az OF teszt, a citrát hasznosítás, a kataláz aktivitás, az eszkulin hidrolízis, a nitrát redukció, a TWEEN 80 hidrolízis, a zselatin hidrolízis, az almasav hasznosítás, fenilalanin deamináció, valamint a hidrogén-szulfid produkció vizsgálatát szintén az NCAIM végezte Barrow and Feltham, 1993 előírásai alapján. A további asszimilációs teszteket, valamint az enzim aktivitás leírását API 20NE, API 20E, API ID 32GN, API 50CH és API ZYM teszt kitek (bioMérieux, France) segítségével végeztük el a gyártó előírásait követve. Az új faj leírások elvárásainak megfelelően vizsgálatainkat nem csak saját mikroba törzsünk esetében, hanem az összehasonlíthatóság érdekében a már leírt *Olivibacter* típustörzsekkel is elvégeztük. A vizsgálatok elvégzéséhez a törzseket nemzetközi mikrobiológiai gyűjteményekből szereztük be. Az OF tesztet, citrát bontást, kataláz aktivitást, az eszkulin és zselatin hyidrolízist, 5% NaCl koncentráció melletti növekedést, a malonát bontást a fenilalanin deaminációt a teszteken felül Barrow és Feltham (1993) módszereivel is megerősítettem.

3.3.2.2. Sejtmembrán zsírsav anaílzis

Az új faj jelölt törzs sejtmembrán-zsírsav analízisét szintén a DSMZ végezte. Az analízis során agar-lemezre szélesztett 40 mg sejttenyészetből felvett biomasszából történt a zsírsav-metilészterek kinyerése szaponifikálással, metilációval és extrakcióval (Miller, 1982; Kuykendall et al. 1988). A zsírsav-metil-észtereket Sherlock Microbial Identification System (MIS) használatával különítették el. Az identifikációs rendszer a gázkromatogram alapján, a MIS Standard Software (Microbial ID) használatával automatikusan azonosítja a zsírsavkomponenseket, valamint százalékos arányukat (Kämpfer & Kroppenstedt, 1996). A zsírsav analízist az összehasonlító törzsek esetében nem az eddigi publikációkban megjelent eredmények figyelembe vételével, hanem a típustörzsek ismételt vizsgálatával értékeltük. Vagyis a törzseket azonos táptalajon és inkubációs

körülmények között tenyésztették, mint az új faj jelölt izolátumot, így elkerülhető volt az adatok ebből adódó eltérése.

3.3.2.3. Respiratórikus kinon analízis

A respiratórikus kinon és lipokinon analízist szintén a DSMZ végezte. A respiratórikus lipokinonok elválasztása 100 mg biomasszából, a respiratórikus kinonok elválasztása metanol-hexán keverékkel történt (Tindall 1990a; 1990b, 2007). A respiratórikus lipokinonok (menakinonok és bikinonok) elválasztását szilikagélen (Macherey-Nagel Art. NO. 805 023) végezték vékonyréteg kromatográfia segítségével (oldószerként hexán és metil-terc-butiléter 9:1 arányú keveréke szolgált). A vékonyréteg lemezről eltávolításra kerültek a menakinonoknak és ubikinonoknak megfelelő UV elnyelő sávok, majd megtörtént ezek HPLC analízise. A mérést LDC Analytical (Thermo Separation Products) HPLC készülékhez kapcsolt reverz fázisú kolonnán (Macherey-Nagel, 2 mm x 125 mm, 3 mm, RP18) végezték, eluensként metil-alkoholt használtak. A respiratórikus lipokinonokat 269 nm hullámhosszon detektálták.

3.3.2.4. Poláros lipidek meghatározása

Az új faj jelölt törzs poláros lipid tartalmának vizsgálatát a DSMZ végezte Minnikin és mtsai (1979) útmutatásának megfelelően.

3.3.3. Elektronmikroszkópos felvétel készítése

Az elektronmikroszkópos felvételek elkésztéséhez a vizsgált törzs 48 órás, 30 ^{o}C-on R2A táplevesben inkubált tenyészetét használtuk fel. A mintából 5 ml szuszpenziót aktív szénnel bevont gridekre cseppentünk és 5 percig hagytuk adszorbeálódni a felületen, szobahőmérsékleten. A minták negatív festéséhez egy csepp 1% -os uranil-acetátot kellett a gridre tenni, amelyet egy perc várakozás után eltávolítottunk, majd első lépésben szobahőmérsékleten légszárazra, ezután folyékony CO_2-dal a kritikus pontig szárítottuk (Bozzola & Russell, 1991). A preparátumot Zeiss EM 910 elektronmikroszkóppal, 40kV gyorsító feszültségen vizsgáltuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Szénhidrogénekkel szennyezett területek biológiai és geokémiai vizsgálata

Mint azt a 3.1. fejezetben bemutattam a szennyezés és a területek mikrobiológiai változásának nyomon követése érdekében három, magyarországi, szénhidrogénekkel szennyezett helyszínen biológiai és geokémiai monitoring rendszert működtettünk. A talajvíz minták a három terület szennyezett és háttér mintavételi pontjaiból származtak. A mintavételi helyszíneket, azok pontjait, illetve az alkalmakat külön-külön számolva 31 minta mikrobiológiai és analitikai eredményeit elemeztük (n=31). A talajvíz mintákkal oldott oxigén, redox potenciál, pH, csíraszám, szénhidrogén bontó csíraszám, *Aliivibrio fischeri* ökotoxikológiai teszt (ToxAlert 100®), valamint TPH, BTEX méréseket végeztünk (1. mellékelt táblázat).

Első lépésben összefüggést kerestünk a három területen az akkreditált kémiai analitikai laboratórium által vizsgált szennyező komponensek (TPH, BTEX) mkoncentrációja és a ToxAlert 100, *Aliivibrio fischeri* alapú sztenderdizált (ISO 11348) mikrobiológiai ökotoxikológiai módszer (3.1.6. fejezet) eredményei között. Igazolni kívántuk, hogy az egyes minták ökotoxikológiai és kémiai analitikai eredményei között összefüggések statisztikailag is kimutathatók. Ennek eldöntésére Spearman-féle rangkorrelációs koefficiens számítást végeztünk, STATISTICA szoftverrel. A vizsgálathoz az összes terület minden mintavételi pontjának eredményét felhasználtuk, függetlenül attól, hogy melyik területről származott a minta, valamint, hogy az analitikai eredmények alapján az szennyezett, vagy háttér. A statisztikai értékelés eredményét a 6. sz. táblázat foglalja össze.

6. számú táblázat A három hazai helyszínről származó szennyezett és háttér talajvíz minták (n=31) szennyező anyag mennyiségének és a Tox Alert 100™ által számított toxicitásának (EC_{50}) összehasonlítása a STATISTICA, matematikai statisztikai szoftverrel számított Spearman-féle rangkorrelációval. A rangkorreláció értéke -1 és +1 közötti érték lehet. A két változó közötti összefüggés annál szorosabb, minél közelebb van a mért érték a +1, illetve -1 értékhez. A szoftver analízis eredménye alapján minden érték tekintetében szignifikáns összefüggést mutattunk ki a két változó között.

Kockázatos anyag	EC_{50}
Benzol	-0,617135
Toluol	-0,686002
Etil-benzol	-0,650600
Xilolok	-0,763680
Egyéb alkil benzolok	-0,766920
VAPH (C6-C12)	-0,747321
VPH (C5-C12)	-0,719477
VALPH (C5-C12)	-0,798951
EPH (C10-C40)	-0,809142
TPH (C5-C40)	-0,812834

A STATISTICA szoftverrel számított rangkorreláció eredményei alapján az összes vizsgált kémiai analitikai paraméter és a mért EC50 értékek között egyértelmű, szignifikáns negatív előjelű korreláció mutatható ki. Ezek alapján igazolható, hogy a minták toxicitása a vizsgált szennyező

anyagok mennyiségével korrelál, vagyis a tesztben használt mikroba (*Aliivibrio fischeri*) élettevékenységét a mintákban lévő szennyezőanyagok mennyisége negatívan befolyásolja. A tesztszervezet tehát valóban érzékenyen reagál a szennyezésekre, vagyis a lumineszcencia jelentősen csökkent a kontrollhoz képest, a higítási sorban alkalmazott, szennyezett talajvízek esetében. A statisztikai elemzés arra is rámutatott, hogy a szoros korreláció nem csak a szennyezett talajvíz mintákat jelezheti nagy biztonsággal, de a háttér minták esetében jóval kisebb toxicitást mutat. A toxikológiai módszer eredményei alapján tehát a szennyezett és háttér minták is jól elkülöníthetők. Fentiek alapján tehát olyan esetben, ha a kémiai analitikai eredmények nem igazolják a szennyezettséget és mégis toxicitás tapasztalható, akkor mindenképpen valamilyen más (pl. a szénhidrogén szennyezőktől eltérő szennyező) kémiai komponens jelenlétére kell gyanakodnunk.

Az *Aliivibrio fischeri* alapú toxikológiai vizsgálatok és szenyezettségi adatok matematikai statisztikai elemzését számos szerző (White & Claxton, 2004; Gilli et al, 2005; Ocampo-Duque, 2008) alkalmazta különböző közegek (ivóvíz, talaj, felszín alatti víz, üledék) esetében, de BTEX illetve TPH szennyezett talajvíz szennyezettségi és toxikológiai eredményeinek statisztikai elemzésére ez idáig nem volt eredmény, különösen háttér és szennyezett minták összevetésére.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (I. tézis, a 4.1. fejezet eredményei alapján): Spearman-féle rangkorrelációs számítás szerint három hazai, szénhidrogénekkel szennyezett kárhely eltérő időpontokban vett háttér és szennyezett mintáinak toxikológiai, valamint TPH és BTEX kémiai analitikai eredményei alapján igazoltuk, hogy a vizsgált területek talajvizeinek szennyezettsége és *Aliivibrio fischeri* alapú mikrobiológiai toxicitása között szignifikáns, egyenes arányú összefüggés áll fenn.

Fenti tézisünk alapján úgy gondoltuk, hogy az ökotoxikológiai teszt eredményeihez hasonlóan, a szennyezés hatása mérhető lesz e a területek molekuláris biológiai alapú mikrobiális diverzitásában is. Azt feltételeztük tehát, hogy a háttér mintavételi pontok mikrobiális közössége diverzebb lesz, mint a szennyezett területekről származóké. Ezért második lépésben Shannon-féle diverzitás indexet számítottunk a mintákhoz tartozó T-RFLP kromatogramok fragment elemzései alapján. Az MspI restrikciós endonukleáz hasítása után minden mintavételi pont esetében meghatároztuk (16S rDNS alapú T-RFLP-vel) a mintában található 5’-terminális fragmentek (OTU-k) mennyiségét és minőségét. A fragment minősége a terminális szakasz bázis hosszával, míg a mennyisége a görbe alatti területtel jellemezhető, vagyis a megjelent T-RFLP fragmenteket egy-egy csoportként, míg a görbe alatti területet a csoport számosságaként értelmeztem.

A 16S rDNS alapú T-RFLP egy tulajdonképpeni „ujjlenyomata” a helyi mikrobaközösséget alkotó mikrobák genetikai változatosságának. Ezek alapján a mintavételi pontok T-RFLP fragmentjeinek számát és milyenségét figyelembe véve a minták Shannon-féle diverzitási indexe kiszámolható. A háttér és szennyezett kutak eredményeinek összehasonlításával értékeltük, hogy az egyes területeken a szennyezés hatására mennyiben változik a diverzitás, vagyis az OTU-k sokfélesége. Az azonos mintavételi pontból származó eredmények esetében a számított Shannon-indexek átlagát vettük figyelembe. Az eredmények alapján a vizsgált mintavételi pontok diverzitás indexeinek átlagát tekintve az biharkeresztesi BM1 jelű minta esetében a 2008. 02. 19-i mintavétel esetében mértük a legnagyobb diverzitást (3,592), illetve a 2007. 05. 08-i mintavétel Z4 jelű zalaegerszegi háttér minta eredménye (0,642) bizonyult a legkevésbé annak (1. mellékelt táblázat).

A továbbiakban meghatároztuk a területek T-RFLP alapú diverzitás indexeinek átlagát és szignifikáns összefüggéseket kerestünk a területek diverzitás értékei között az adatok alapján. Az általunk végzett Man Whitney U teszt eredményei alapján (n=31) vizsgálataink eredményeképpen nem találtunk szignifikáns összefüggést (p érték 0,05 felett volt) a diverzitás indexek átlaga és a szennyezett terület elhelyezkedése között (7. sz. táblázat).

7. számú táblázat A három hazai mintavételi helyszín szennyezett és háttér talajvíz mintáinak (n=31) terminális restrikciós fragment hossz polimorfizmus (T-RFLP) elemzése alapján számított Shannon-féle diverzitás indexek átlaga és összefüggéseik a területek vonatkozásában a STATISTICA szoftverrel számított p értékek alapján. A különbség akkor szignifikáns, ha p érték 0,05 alatt van.

	Shannon index átlag	Biharkeresztes	Zalaegerszeg	Ópusztaszer
Biharkeresztes	2,40		0,947318	0,181968
Zalaegerszeg	2,50	0,947318		0,266131
Ópusztaszer	3,02	0,181968	0,266131	

Az *Aliivibrio fischeri* toxikológiai teszt eredményei alapján feltételeztem, hogy ahogyan a teszt mikroba is igen érzékenyen jelezte a szennyezett talajvízmintákat, így a természetes mikroba közösség diverzitását is csökkenti a szennyezés. Ezt a feltételezésemet sem a diverzitás indexek számított átlaga, sem az adatok szignifikanciájának meghatározása (szintén Man Whitney U módszerrel számolva) nem támasztotta alá (8. sz. táblázat). Vagyis a T-fragmentek, mint OTU-k alapján számított mikrobiális diverzitás nem csökkent a szennyezés megjelenésének hatására.

8. számú táblázat A három hazai mintavételi helyszín szennyezett és háttér talajvíz mintáinak (n=31) terminális restrikciós fragment hossz polimorfizmus (T-RFLP) elemzése alapján számított Shannon-féle diverzitás indexek átlaga és összefüggéseik a szennyezettség vonatkozásában a STATISTICA szoftverrel számított p értékek alapján. A különbség akkor szignifikáns, ha p érték 0,05 alatt van.

	Shannon index átlag	Háttér	Szennyezett
Háttér	2,40		0,128736
Szennyezett	2,80	0,128736	

Összesítve a szennyezések és a területek eredményeit (9. sz. táblázat) megállapítható, hogy korrelációszámítás alapján sem a területek, sem a szennyezett-háttér minták sem ezek kombinációi között nincs szignifikáns összefüggés, hiszen a táblázatban számított p érték ebben az esetben is 0,05 felett volt. Ez azt is jelenti, hogy e három terület genetikai diverzitása, sokfélesége sem a területektől sem a mintavételi pontok szennyezettségétől nem függ szignifikáns módon.

9. táblázat A három hazai mintavételi helyszín szennyezett és háttér talajvíz mintáinak (n=31) terminális restrikciós fragment hossz polimorfizmus (T-RFLP) elemzése alapján számított Shannon-féle diverzitás indexek átlaga és összefüggéseik a területek és a szennyezettség vonatkozásában a STATISTICA szoftverrel számított p értékek alapján. A különbség akkor szignifikáns, ha p érték 0,05 alatt van.

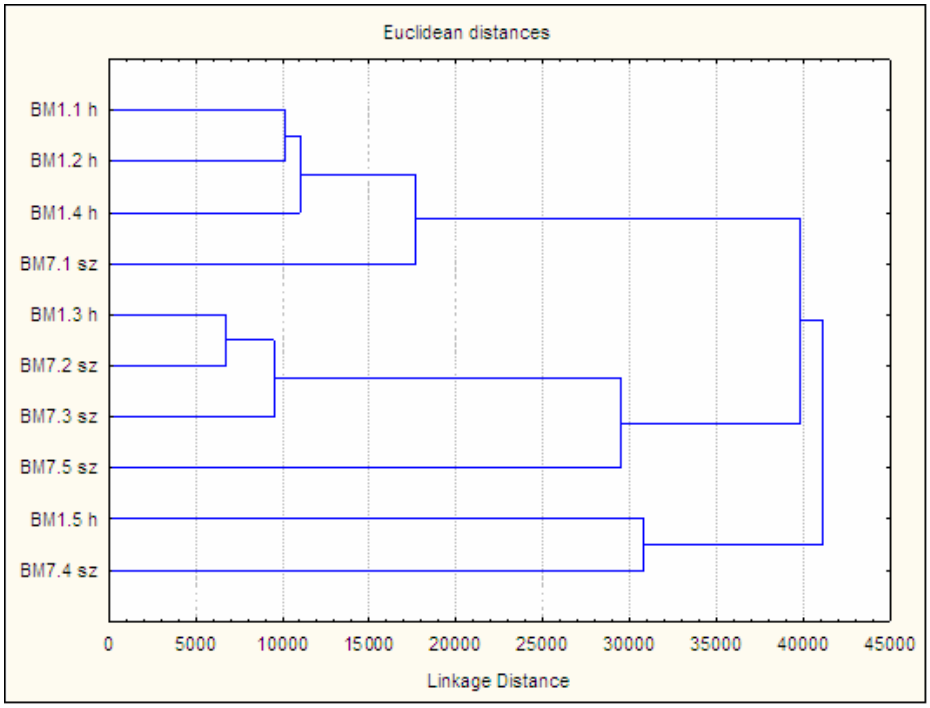
			Biharkeresztes		Zalaegerszeg		Ópusztaszer	
Terület	**Minőség**	**Shannon index átlag**	háttér	szenny.	háttér	szenny.	háttér	szenny.
Bihar-keresztes	háttér	2,50		0,997424	0,944026	0,945292	0,992550	0,678641
	szenny.	2,30	0,997424		0,998075	0,748653	0,927846	0,396160
Zala-egerszeg	háttér	2,12	0,944026	0,998075		0,440558	0,755194	0,164354
	szenny.	2,88	0,945292	0,748653	0,440558		0,999972	0,988552
Ópuszta-szer	háttér	2,79	0,992550	0,927846	0,755194	0,999972		0,981972
	szenny.	3,13	0,678641	0,396160	0,164354	0,988552	0,981972	

Ez a megállapítás érdekes eredmény annak fényében, hogy láttuk a sztenderdizált teszt mikroba esetében a szennyezés hatására kialakuló és azzal együtt változó toxicitást (6. számú táblázat). A fentiek alapján azt gondoljuk, hogy a szennyezés valószínűsíthetően toxikus hatással van a vizsgált területeken jó néhány közösségalkotó mikrobára, de ezek helyét valószínűleg más, a szennyezéssel szemben kevéssé érzékeny mikroszervezetek kolonizálják, így lehetséges, hogy a Shannon-indexben számított összes diverzitás érték nem változik jelentősen. Magyarázható lehet ez azzal is, hogy a T-RFLP módszer a helyszínen meglévő DNS kimutatására alkalmas függetlenül attól, hogy azok élő vagy élettelen biomasszához tartoznak.

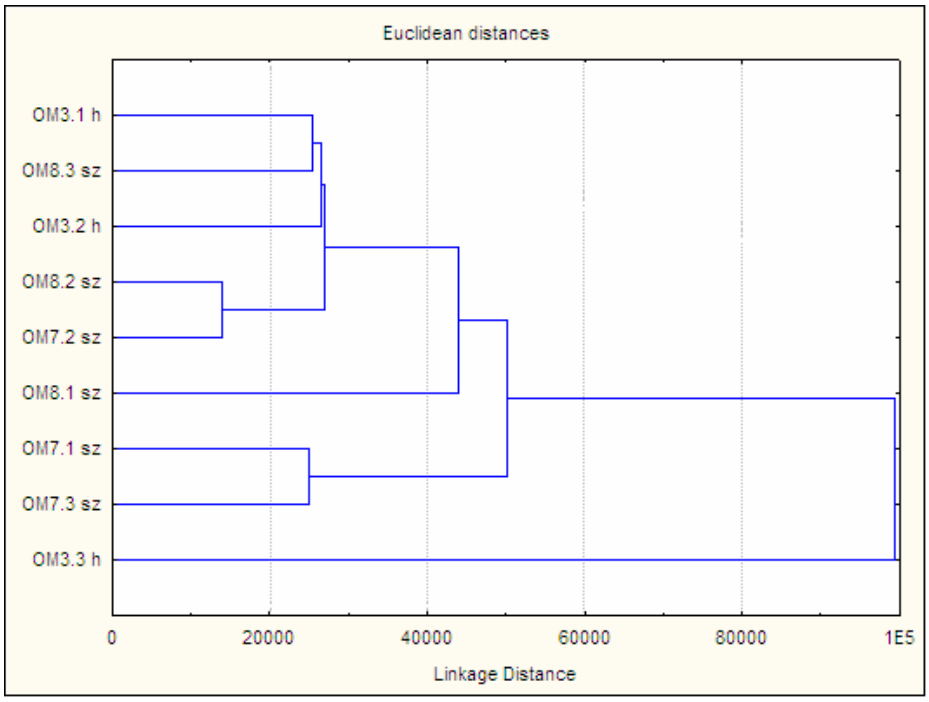
Annak kimutatására, hogy a fenti minták milyen mértékben hasonlítanak egymásra, vagyis hogy a diverzitás azonosság adódhat e abból, hogy a T-RFLP az élő és élettelen szervezetekhez tartozó DNS-t is képes kimutatni, klaszter analízist végeztünk. A klaszter képzés lényege, hogy a minták T-RFLP mintázatainak hasonlósága alapján azonos csoportokat képezzen és megállapítsa a minták közti hasonlóság (rokonság) mértékét. A klaszter elemzés a szennyezett és háttér minták vonatkozásában egyértelműen eldöntheti, hogy milyen mértékben hat a vizsgált területek mikrobiológiai összetételére a szénhidrogén szennyezés.

A klaszter elemzések eredménye alapján a mintavételi eredményeket helyszínenként külön (4-6. ábra) és együtt (7. ábra) vizsgálva is hasonló következtetésre juthatunk. A klaszter elemzés a Shannon-féle diverzitás eredményekkel mutat összefüggéseket, ugyanis ebben az esetben is a minták közötti különbözőség a helyszíneken belül független azok szennyezettségének mértékétől. A

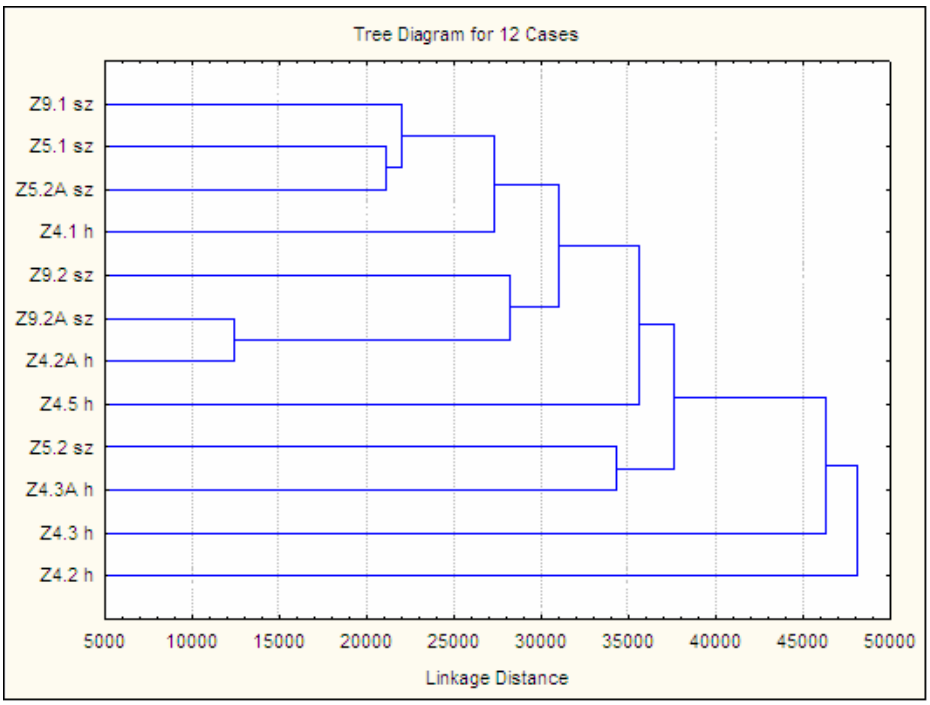
mintavételi helyszíneket külön-külön vizsgálva egy helyszínen belül nem csoportosulnak azonos klaszterbe a szennyezett, illetve a háttér mintavételi pontok mintái. Vizsgálataink alapján a minták T-RFLP újlenyomatai nem is az egyes mintavételi időpontok szerint csoportosulnak (4.-6. ábra)



4. ábra Szennyezett és háttér talajvízminták baktérium közösségeinek összehasonlítása terminális restrikciós fragment hossz polimorfizmus (T-RFLP) alapján végzett klaszter analízis módszerrel (Mintavételi hely: Biharkeresztes, töltőállomás; sz: szennyezett, h: háttér; a minta jelében lévő utolsó szám a mintavételi időpontot jelöli)

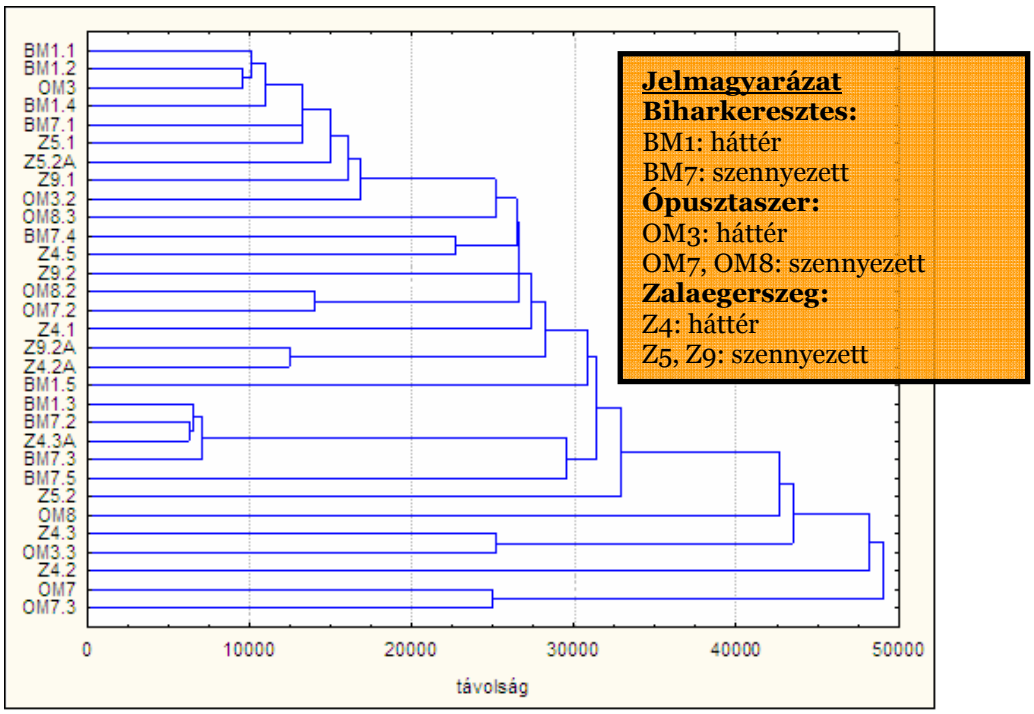


5. ábra Szennyezett és háttér talajvízminták baktérium közösségeinek összehasonlítása terminális restrikciós fragment hossz polimorfizmus (T-RFLP) alapján végzett klaszter analízis módszerrel (Mintavételi hely: Ópusztaszer, vezetéktörés; sz: szennyezett, h: háttér; a minta jelében lévő utolsó szám a mintavételi időpontot jelöli)



6. ábra Szennyezett és háttér talajvízminták baktérium közösségeinek összehasonlítása terminális restrikciós fragment hossz polimorfizmus (T-RFLP) alapján végzett klaszter analízis módszerrel (Mintavételi hely: Zalaegerszeg, töltőállomás; sz: szennyezett, h: háttér; a minta jelében lévő utolsó szám a mintavételi időpontot jelöli)

A helyszínenkénti értékelés alapján arra gondolhatunk, hogy mivel a talajvíz a háttér területekről áramlik a szennyezett irányba, ezért (ha a szennyezettség nem, akkor) a háttér minták közössége határozza meg leginkább a szennyezett minták összetételét. Ennek vizsgálatára végeztük az összes helyszín T-RFLP eredményeit együttesen értékelő klaszter elemzést. Az összes mintavételi pont (n=31) eredményeinek együttes klaszter elemzése szerint elmondható, hogy a T-RFLP eredmények alapján az azonos klaszterek nem a helyszínek alapján csoportosulnak (7. ábra). A klaszter elemzés alapján egymástól mintavételi időben és térben is távolálló minták közösségei mutatnak viszonylag nagy azonosságot. Ilyen például az ópusztaszeri OM3 és a biharkeresztesi BM1, vagy biharkeresztesi BM1.3, BM7.2 minta és a zalaegerszegi Z4.3A minták közös klaszterbe rendeződése. Illetve ugyanazon helyszínről származó minták genetikai ujjlenyomata között is jelentős különbségek lehetnek attól függően, hogy mikor történt a mintavételezés. Az elemzés alapján tehát a klaszter csoportok sem a helyszín sem a szennyezettség mértéke alapján nem rendeződnek. Közeli rokonnak látszanak egymástól (földrajzilag is) távol eső pontok mintái és távolinak azonos helyszínekről, illetve mintavételi pontokból származó klaszterek. Ez tehát igazolja a Shannon analízissel megállapított eredményünket, miszerint a diverzitás mértéke a mintavételi pont helyétől és a szennyezettségtől független.



7. ábra A három hazai szénhidrogénekkel szennyezett területről származó szennyezett és háttér talajvízminták (n=31) baktérium közösségeinek összehasonlítása terminális restrikciós fragment hossz polimorfizmus (T-RFLP) alapján végzett klaszter analízis módszerrel. Szennyezett és háttér minták jele a jelmagyarázatban (a minta jelében lévő utolsó szám a mintavételi időpontot jelöli)

Fentiek szerint tehát az *Aliivibrio fischeri* toxikológiai teszt szervezet esetében igazolt szignifikáns változás a területek diverzitás értékeiben nem volt nyomon követhető. Vagyis a vizsgálati helyszíneken a T-RFLP fragmentek és a Shannon-féle diverzitás statisztikai elemzése alapján a természetes közegek mikrobiális diverzitását a szennyezés megjelenése szignifikáns módon nem változtatta meg. Amennyiben változás van, az valószínűsíthetően más (egy vagy több) környezeti tényező hatására következik be. Eredményeink alátámasztják A. Fahy és munkatársainak (2005) megfigyeléseit, miszerint BTEX vegyületekkel szennyezett talajvizek T-RFLP közösségi elemzése és a geokémiai vizsgálatok klaszter elemzése alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a különböző területeken található közösség alkotók összetétele nem elsősorban a benzol toxikus hatása alatt áll. Úgy találták, hogy a közösség változatossága ezen vegyültek jelenléte és a bontásuk eredményeképpen kialakuló környezeti változások szerint rendeződik, különös tekintettel a redox potenciál csökkenésére.

4.1.1. Biomarkerek keresése a szennyezés előfordulásának megállapítására

Mint azt előbb bemutattuk a T-RFLP elemzés nem mutatott szignifikáns eltérést a Shannon-féle diverzitásban a három vizsgált területen, sőt a fragmentek alapján is ezzel megegyező eredményre jutottunk. Ennek ellenére kerestünk olyan terminális fragmenteket, amelyek statisztikai elemzés alapján csak az egyik, vagy másik tulajdonságnak megfelelő területeken fordulnak elő, vagyis olyanokat, amelyek a szennyezettség alapján azonos típusú (szennyezett/háttér), illetve azonos területről származó mintákhoz rendelhetők. Vizsgálataink során a biomarker keresés

módszerét követtük. A hasonlóságok megjelölése érdekében csak azokat a fragmenteket vettük figyelembe, amelyek a minták (n=31) legalább 25%-ánál szerepeltek.

Az egyes területek összevetésekor az ópusztaszeri minták mutatták a legnagyobb különbségeket a többi terület mintáihoz hasonlítva. Az ópusztaszeri mintákban a másik két helyszín mintáihoz képest a 70-es, 80-as, 129-es, 131-es, 132-es, 165-ös, 202-es és 204-es T-RFLP fragmentek szignifikánsan magasabb mennyiségben, míg a 146-os fragment szignifikánsan alacsonyabb mennyiségben volt kimutatható. A biharkeresztesi mintákban a 63-as, a zalaegerszegi mintákban a 76-os T-RFLP fragmentek szignifikánsan magasabb mennyiségben voltak kimutathatók a másik két helyszínnel összevetve. A szennyezett-háttér jellemzők összevetése során azt találtam, hogy a 123-as, 165-ös és 202-es fragmentek a szennyezett mintákban szignifikánsan magasabb mennyiségben fordultak elő, mint a háttér mintákban. A 162-es T-RFLP fragment a háttér mintákban volt szignifikánsan nagyobb mennyiségben kimutatható.

A fentiek alapján elemeztük, hogy e három terület vizsgálata alapján kijelölhetők-e olyan fragmentek, amelyek alkalmasak lehetnek szennyezettség kimutatására, előrejelzésére. Vagyis van-e olyan T-RFLP fragment, amelynek előfordulása együtt jár a szennyezettség megjelenésével. Ennek érdekében szenzitivitási és specifitási vizsgálatokat végeztünk. A szennyezett és háttér minták között szignifikáns mennyiségi változást mutató fragmentek közül a 162-es fragment 50% alatti specificitást és szenzitivitást mutatott, a 123-as és 202-es fragmentek ezzel szemben 85% feletti specificitást mutattak, ugyanakkor szenzitivitásuk 53%-os és 41%-os volt. A szennyezett és háttér minták elkülönítésében a legnagyobb, 59%-os szenzitivitást a 165-ös fragment mutatta, ugyanakkor ebben az esetben a módszer specificitása 79%-os volt.

Összefoglalva azt mondhatjuk, hogy az általunk vizsgált fragmentek közül kettő, a 123-as és 202-es mutatott elfogadható szintű pontosságot a szennyezettség előre jelzéséhez. Ezek a módszerek magas specificitásuk révén nagy valószínűséggel kevés álpozitív, ugyanakkor viszonylag alacsony szenzitivitásuk alapján túlzottan sok álnegatív eredményt adnak. Szemléletesen ezt úgy képzelhetnénk el, hogy a fragment megjelenése nem egyértelműen dönti el a minta szennyezettlenségét, másképpen a negatívnak (háttér) jelzett minták esetében sok lehet a pozitív (szennyezett), ugyanakkor a módszer által pozitívnak (szennyezettnek) ítélt minták túlnyomó többsége valóban pozitívnak (szennyezettnek) tekinthető. A továbbiakban megpróbáltuk meghatározni, hogy e két fragment milyen mikrobiális taxonokhoz köthető. Ennek érdekében a 31 mintából hét esetében (1. mellékelt táblázat, zölddel jelölve) elkészítettem a minták klónkönyvtárait a fragmentek azonosítása érdekében. Vagyis munkánk további részében meg kívántuk határozni, hogy az előbb bemutatott fragmentek milyen mikroszervezetekhez tartozhatnak.

4.1.2. A bakteriális közösség elemzése klónkönyvtárakkal

A cél megvalósítása érdekében klónkönyvtárakat készítettünk, mintánként kb. 100-100 klón vizsgálatával. A dolgozat elkészültéig két biharkeresztesi két zalaegerszegi valamint három ópusztaszeri minta klónkönyvtárainak feldolgozását végeztük el (1. mellékelt táblázatban zöld színnel jelölve):

Az ópusztaszeri mintaterület 2006. november 21.-én vett mintáit vizsgáltuk. Hasonlóan az 3.1. fejezetben ismertetett mintavételekhez az OM7 és az OM8 mintavételi pontból származó minták voltak szennyezettek BTEX komponensekkel, míg az OM3-as kutat tekintettük háttérnek, mind szennyezés, mind a vízföldtani adottságok (talajvíz áramlási irány) szempontjából. A minták jele: OM3.3, OM7.3, OM8.3. A monitoring eredmények alapján viszonylag magas oldott oxigén értékeket mértünk ezzel szemben a redox potenciál csökkent oxigén ellátottsági szintet jelzett. A zalaegerszegi terület 2006. május 18.-án vételezett mintáiból a ZM9 szennyezett és a "B" határérték feletti benzol koncentráció ellenére háttérként kezelt ZM4 mintavételi pontból származó talajvíz vizsgálatait végeztük el. A minták jele: ZM4.1, ZM9.1. Az oldott oxigén mennyiség mindkét kútban igen alacsony értéket mutatott. A biharkeresztesi minták közül a 2007. február 22.-én mintázott BM1 (háttér) és BM7 (szennyezett) talajvíz mintavételi pontokat vontuk be a további vizsgálatokba. A minták jele: BM1.1, BM7.1. Az oldott oxigén értékek e területeken is hipoxikus körülményekre utaltak. A klónkönyvtárak eredményei alapján az alábbi mikroba fajokat határoztuk meg (10. sz. táblázat):

10. számú táblázat A jelentős* 16S rDNS klónok meghatározása a vizsgált mintákból, az NCBI GenBank és leBibi adatbázisok alapján. (A táblázat folytatódik a következő oldalon!)
*Jelentős klónok: nagy számban előforduló és/vagy ismert szénhidrogén bontási képességgel rendelkező klónok.
** Proteobaktérium osztályok görög betűvel jelölve
Minták jele után zárójelben: A vizsgált klónok száma az adott minta esetében

Klónok száma	Legközelebbi rokon faj*	T-RF (Msp)	Azonosság (%)	Osztály**
OM3.3 (115)				
8	*Albidoferax ferrireducens*	484-486	96,5 – 98,7	Béta (β-)
6	*Vogesella indigofera*	424, 484	96,7 - 100	Béta (β-)
5	*Pseudomonas jessenii*	484	99,1 – 100	Gamma (γ-)
4	*Rhodoferax antarcticus*	486, 490	97,4 - 99,1	Béta (β-)
4	*Pseudomonas anguilliseptica*	484, 487, 489	98,1 - 99,6	Gamma (γ-)
3	*Rhodoferax fermentans*	478, 479	98,5 – 99,1	Béta (β-)
3	*Leptothrix cholodnii*	132, 140	95,8 – 99,5	Béta (β-)
1	*Pseudomonas frederiksbergensis*	490	100	Gamma (γ-)
OM8.3 (112)				
32	*Malikia spinosa*	481,482	95,5 – 100	Béta (β-)
8	*Dechloromonas aromatica*	430, 431	99,3	Béta (β-)
7	*Gallionella capsiferriformans*	119	92,6 – 99,5	Béta (β-)
5	*Albidoferax ferrireducens*	488, 489	90,9 – 97,9	Béta (β-)
4	*Geothrix fermentans*	484	98,0	*Holophagae*

Klónok száma	Legközelebbi rokon faj*	T-RF (Msp)	Azonosság (%)	Osztály**
3	*Rhodoferax antarcticus*	486, 490	95,1 – 98,7	Béta (β-)
3	*Denitratisoma oestradiolicum*	485, 486	91,8 – 93,0	Béta (β-)
ZM4.1 (106)				
3	*Dehalobacter restrictus*	141, 489	99,0 - 99,5	Epszilon (ε-)
2	*Novosphingobium aromaticivorans*	150	98,0 – 98,5	Alfa (α-)
2	*Flavobacterium xinjaingense*	85	99,1 - 100	Flavobaktériumok
2	*Denitratisoma oestradiolicum*	486	91,7 – 93,3	Béta (β-)
1	*Sphingomonas dokdonensis*	150	97,9	Alfa (α-)
1	*Sphingomonas jaspsi*	150	97,0	Alfa (α-)
1	*Sphingomonas xenophaga*	162	99,9	Alfa (α-)
1	*Sphingomonas mucosissima*	150	96,3	Alfa (α-)
1	*Albidoferax ferrireducens*	487	98,7	Béta (β-)
1	*Azoarcus aromaticum*	79	98,5	Béta (β-)
1	*Hydrogenophaga flava*	162	98,8	Béta (β-)
1	*Malikia granosa*	293	96,0	Béta (β-)
1	*Flavobacterium johnsoniae*	85	97,9	Flavobaktériumok
1	*Pseudomonas jessenii*	137	100	Gamma (γ-)
ZM9.1 (104)				
4	*Asticcacaulis benevestitus*	436	98,1 - 98,5	Alfa (α-)
3	*Albidoferax ferrireducens*	488, 489	97,2 - 99,4	Béta (β-)
3	*Nevskia ramosa*	129, 131	92,5 - 97,7	Gamma (γ-)
2	*Oleomonas sagaranensis*	440	100	Alfa (α-)
2	*Curvibacter gracilis*	485, 487	98,7 - 99,0	Béta (β-)
1	*Asticcacaulis excentricus*	435	97,5	Alfa (α-)
1	*Novosphingobium aromaticivorans*	150	98,5	Alfa (α-)
1	*Rhodoferax fermentans*	489	97,3	Béta (β-)
1	*Denitratisoma oestradiolicum*	481	90,5	Béta (β-)
1	*Polaromonas vacuolata*	480	95,3	Béta (β-)
1	*Hydrogenophaga atypica*	472	99,9	Béta (β-)
BM1.1 (68)				
6	*Malikia spinosa*	483	99,4 – 100	Béta (β-)
4	*Acidovorax delafieldii*	481	97,7 - 100	Béta (β-)
4	*Pseudomonas anguilliseptica*	487	99,5 – 99,9	Gamma (γ-)
3	*Acinetobacter lwoffii*	488	98,9 – 99,2	Gamma (γ-)
3	*Herbaspirillum sp.* AKB-2008-TE24	486	95,1 – 99,5	Béta (β-)
2	*Acidovorax defluvii*	481	98,8 – 99,5	Béta (β-)
2	*Acinetobacter beijerinckii*	488	99,5 – 100	Gamma (γ-)
1	*Hydrogenophaga atypica*	n/a	99,5	Béta (β-)
BM7.1 (86)**				
12	*Malikia spinosa*	481, 482, 483	99,6 - 100	Béta (β-)
9	*Albidoferax ferrireducens*	484, 489	95,2 – 98,0	Béta (β-)
2	*Leptothrix cholodnii*	131	99,5	Béta (β-)
2	*Pseudomonas putida*	486	99,3	Gamma (γ-)
1	*Pseudomonas anguilliseptica*	487	99,9	Gamma (γ-)
1	*Rhodoferax antarcticus*	486	95,7	Béta (β-)

Az OM3.3 háttér minta klón szekvenciái legnagyobb részben a β-*Proteobaktérium* csoport tagjai. A legnagyobb számban előforduló klónok az *Albidoferax, Vogesella, Pseudomonas* és *Rhodoferax* nemzetség tagjai voltak. A *Leptothrix cholodnii* rokon klónok izolálása ezen a területen azért lényeges, mert az irodalmi adatok (Rouf & Stokes, 1964; Stokes & Johnson, 1965) alapján aerob mikroba, ám jelen vizsgálati körülmények között (a redox potenciál értékek alapján) hipoxikus területen is előfordul. Az OM8.3 szennyezett minta szekvenciái szintén a β-*Proteobaktériumok* csoportjába tartoztak. A legdominánsabb klón csoport tagjait a szekvenálás eredményei alapján *Malikia spinosa*-ként határoztuk meg. A *Comamonadaceae* családba tartozó 2005-ben leírt mikroba esetében az aromás szénhidrogén bontó képességet ez idáig nem jegyeztek fel (Spring et al., 2005). Feltételezhető, hogy ha a mikroba a mintában lévő igen jelentős BTEX és TPH szennyezettség (benzol: 1990 μg/l; toluol: 1580 μg/l, etil-benzol: 69 μg/l, xilolok: 1570 μg/l; egyéb alkil-benzolok: 667 μg/l; TPH: 3200 μg/l) mellett képes életben maradni, akkor vagy szénhidrogén bontó, vagy igen jelentős tűrőképességgel kell rendelkeznie. A minta másik jelentős számban meghatározott klónja a *Dechloromonas aromatica*. Ebben az esetben az irodalmi adatok is alátámasztják, hogy képes a benzol oxidációjára oxigénszegény környezetben, vagyis előfordulása a vizsgált helyszín analitikai eredményei alapján is megalapozott (Coates et al., 2001). Kiemelendő még, hogy ezen a területen, a háttér mintához hasonlóan nagy számban mutattuk ki az *Albidoferax* és *Rhodoferax* nemzetség tagjait. A mintában előforduló *Gallionella ferruginea subsp. capsiferriformans,* mint mikroaerofil mikroba (Emerson et al., 2011), illetve az obligát anaerob *Acidobacteria* genuszba tartozó *Geothrix fermentans* klónok (Coates, 1999) szintén alátámasztják a korlátozott oxigénfelvétel lehetőségét a vizsgált mintában.

A zalaegerszegi ZM4.1 háttér minta klónjai a szekvencia elemzések alapján leginkább az α-*Proteobaktérumok* csoportjába tartoztak. Előfordulás alapján ezt követték a γ-*Proteobaktériumok,* míg, érdekes módon, az ópusztaszeri helyszínen felülreprezentált β-*Proteobktérium* klónok csak viszonylag kis számban voltak detektálhatóak. Az α-*Proteobaktérium* csoportba tartozó *Sphingomonadaceae* család képviselői közül két klónt is *Novosphingobium aromaticivorans*-ként határoztunk meg. A β-*Proteobaktériumok* közül a *Comamonadaceae*, illetve a *Rhodocyclaceae* családokba tartozó klónokat azonosítottuk, vagyis fakultatív anaerob baktériumokat. A legnagyobb számban kimutatott *Dehalobacter restrictus* klónok jelenléte szintén az anaerob körülmények indikátora (Holliger et al, 1998). A ZM4.1 (hattér) mintával összehasonlítva kissé eltérő volt a ZM9.1 (szennyezett) mintavételi pontban talált mikrobiális közösség összetétele. Habár ebben az esetben is az α-*Proteobaktériumok* alkották a klónok legnagyobb csoportját, de ebben a mintában nagyjából ugyanekkora mennyiségben mutattunk ki β-*Proteobaktériumokat*. A γ-*Proteobaktériumok* szemben a háttér kút eredményeivel mennyiségileg a harmadik helyre szorultak

a szekvencia elemzések alapján. Az ismert aromás szénhidrogén bontó tulajdonságokkal rendelkező baktériumfajok közül az α-*Proteobaktériumokhoz* tartozó *Oleomonas sagaranensis* jelenlétét mutattuk ki a mintában. Az irodalmi adatok alapján ez a mikroba képes benzol, toluol és fenol jelenlétében is növekedni. Ma azonban még keveset tudni arról, hogy a baktérium milyen anyagcsere folyamatokon keresztül bontja le ezeket a monoaromás szennyezőket (Kanamori et al., 2002). A mintában lévő β-*Proteobaktériumok* közül a legtöbb klón a *Comamonadaceae* családhoz tartozott ezen belül is az *Albidoferax*, *Rhodoferax*, *Curvibacter*, *Polaromonas* és *Hydrogenophaga* nemzetségbe. A γ-*Proteobaktériumok* közé tartozó klónok közül ismert szénhidrogén bontási tulajdonsággal rendelkezőket nem mutattunk ki.

A biharkeresztesi háttér minta (BM1.1) klónjainak szekvenciái alapján erre a mintára a β- és γ-*Proteobacktériumok* jelenléte jellemző, közülük is dominánsan a β-*Proteobaktériumok* fordultak elő. A β-*Proteobaktériumok* legjelentősebb képviselői a mintában a *Malikia spinosa*, valamint az *Acidovorax* nemzetségbe tartozó két faj, az *A. delafieldii*, illetve *A. defluvii* voltak. A γ-*Proteobaktériumok* közül a mintából legfőképpen az *Acinetobacter* és *Pseudomonas* nemzetség tagjait detektáltuk. A BM7.1 szennyezett mintavételi kút talajvizének eredményeit összevetve a háttér mintával azt mondhatjuk, hogy a klónok nagy többsége ebben az esetben is a β- és γ-*Proteobaktériumok* közé sorolható. Ebben az esetben is a legnagyobb számban kimutatott mikobafaj a *Malikia spinosa* volt, valamint a hátter mintában nem detektált *Albidoferax ferrireducens*. A *Leptothrix cholodnii* klónokat a biharkeresztesi mintán kívül az ópusztaszeri háttér mintából is sikerült kimutatni. A kimutatott γ-*Proteobaktériumok* legfőképpen a *Pseudomonas* nemzetségbe tartoztak.

A 16S rDNS klónkönyvtárak értékelései alapján összefoglalóan elmondhatjuk, hogy a szekvenálás eredményei szerint a mikroaerofil, valamint a fakultatív anaerob mikroszervezetek nagy száma volt jellemző a vizsgált mintákra. A klónokat főként a β-*Proteobacteriák-hoz* sorolhatjuk és ezek közül is a leginkább a *Comamonadaceae* család tagjai jelentek meg a szennyezett mintákban. Korábban Alfreider és munkatársai (2002) vizsgálták egy szennyezett talajvizet kezelő in situ klórbenzol tisztító berendezés mikrobiális diverzitását és hozzánk hasonlóan ők is β-*Proteobaktérium* dominánsnak írták le az oxigénben szegény befolyó és elfolyó talajvíz közösségét.

Az ópusztaszeri mintaterület monitoring eredményei alapján viszonylag magas oldott oxigén értékeket mértünk ezzel szemben a redox potenciál csökkent aeráltsági szintet jelzett. A zalaegerszegi területen az oldott oxigén mennyiség mindkét kútban igen alacsony értéket mutatott. A biharkeresztesi terület esetében az oldott oxigén értékek e területeken is hipoxikus körülményekre utaltak.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (II. tézis 4.1 fejezet eredményei alapján): Három, szénhidrogénekkel szennyezett hazai terület háttér és szennyezett talajvízmintáiból (n=31) származó T-RFLP eredmények több irányú statisztikai vizsgálata (Man Whitney U, klaszter elemzés) és klónkönyvtárainak elemzése kimutatta, hogy a talajvíz szennyezettsége és a baktérium közösség diverzitása között nincs szignifikáns összefüggés.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (III. tézis, 4.1 fejezet eredményei alapján): Három, magyarországi, szénhidrogénekkel szennyezett helyszín talajvíz mintáiban, a 16S rDNS klónkönyvtárak alapján meghatározott bakteriális közösség összetételében, a Béta-Proteobaktériumok domináltak. Az eredményeket nemzetközi publikációban adtuk közre (Táncsics et al., 2010).

4.2. Szénhidrogén bontó mikroszervezetek keresése

A szennyezett területek statisztikai elemzését követően dolgozatom másodlagos célja olyan szénhidrogén bontó mikrobák keresése volt, amelyek oltóanyag alkotóként alkalmazhatóak az előzőekben bemutatott területeken a szennyezés felszámolására. A 3.2.1. fejezetben bemutatott szennyezett területekről származó olajjal rázatott mintákból összesen 47 törzset izoláltunk (11. sz. táblázat).

11. számú táblázat Szennyezett területekről gyűjtött törzsek száma és jelölése

Mintavétel helye	Helyszín típusa	Törzsek száma	Telepmorfológia alapján elkülönített baktérium törzsek jele
Bátonyterenye	töltőállomás	10 db	20CHBT2, 20CHBT3, 20CHBT4, 4CHBT1, 4CHBT2, 4CHBT3, 4CHBT4, 4CHBT5, 4CHBT6, 4CHBT7
Sásd	töltőállomás	4 db	4S-8, 5S-1, 7S-4, 8S-5P
Ópusztaszer	olajvezeték sérülés	5 db	OM7-1, OM7-2, OM7/4.3, OM8/4.1 OM8-2
Szarvas	töltőállomás	5 db	SZM5/20.1, SZM5/20.2, SZM5/20.3, SZM5/4.1 SZM5/4.2
Egykori szovjet katonai repülőtér		13 db	TBF1/20.1 TBF1/20.2, TBF1/20.3, TBF1/20.4, TBF1/20.5, TBF2/20.1, TBF2/20.2, TBF2/20.3, TBF2/4.1 TBF2/4.2, TBF2/4.3, TBF2/4.4, TBF2/4.5
Zalaegerszeg	töltőállomás	8 db	Z5/20.2, Z5/20.3, Z5/20.4, Z5/20.5, Z5/20.6 Z5/4.1, Z9/20.1, Z9/20.5,
Hazai kőolajfinomító		2 db	ZFM19.1, ZFM23.1
Összesen:		**47 db**	-

A gravimetriával vizsgált, három ismétlésben végzett, bontási arány megállapítása után az eredmények alapján az izolált 47 törzsből hat csökkentette legalább 20%-os mértékben kiindulási gázolaj-kőolaj keverék mennyiségét a kontroll mintához viszonyítva. Az átlagolt bontási eredményeket a 12. sz. táblázat tartalmazza. A gravimetria alapján hat mikroba törzs közül a TBF2/20.1. jelű 64,62%-ban volt képes bontani laboratóriumi körülmények között a kőolaj-gázolaj keveréket. A ZFM 23.1 és SZM5/4.2 jelű baktériumok közel 50%-osan, az OM 7-2 és S/8 jelzésűek kb. 30%-ban tudták lebontani a folyékony tápoldatban lévő olaj keveréket. A TBF2/20.2. esetében a

bontás 30% alatt maradt. A további (faji identifikációra, toxikus elem-tűrő képességre irányuló) vizsgálatokat csak e hat törzs esetében folytattuk.

12. számú táblázat Az (n=47) újonnan izolált, hét hazai szénhidrogénekkel szennyezett területről származó baktérium törzs közül vizuális vizsgálat alapján elkülönített törzsek szénhidrogén bontó képessége gravimetriás vizsgálattal

Minta jele	**Olajbontási arány a kontrollhoz képest %-ban (3 párhuzamos mérés átlaga)**
Kontroll	0
TBF2/20.1	64,62
TBF2/20.2	21,09
ZFM 23.1	47,94
SZM5/4.2	44,94
OM 7-2	31,15
4S-8	33,10

4.2.1. A szénhidrogén bontó törzsek taxonómiai besorolása

A szénhidrogén bontó képességgel rendelkező hat törzset 16S rDNS szekvencia analízissel faji szinten azonosítottuk (3.1.8.4. fejezet alapján). A szekvenálás során kapott bázissorrendeket az nemzetközi adatbázisok eredményeivel (GenBank, leBibi) hasonlítottuk össze, az „Anyag és módszer” fejezetben leírt molekuláris biológiai módszerek segítségével. Vizsgálataink alapján megállapítottuk, a TBF2/20.1 jelölésű, egykori szovjet repülőtér biofilter mintájából származó törzs részleges 16S rDNS szekvenciáját az alábbiak szerint (507 bázispár):

AAATAAAAACTATAAAATATTCAGTCTATTCTGCGGTACGTCCACTATCTGAGGTATTA
CTTCAGTAGCCTCCTCCTCGCTTAAGTGCTTTACACCATAAGGCCTTCTTCACACACGC
GGCATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTA
GGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCGGATCATCCTCTCAGACCCGCTACAG
ATCGTCGCCTTGGTAGGCCTTTACCCCACCAACTAGCTAATCCGACTTAGGCTCATCTA
TTAGCGCAAGGTCCGAAGATCCCCTGCTTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCAT
TCCTTTCGAAATGTTGTCCCCCACTAATAGGCAGATTCCTAAGCATTACTCACCCGTCC
GCCGCTAAGTGATAGTGCAAGCACCATCACTCCGCTCGACTTGCATGTGTTAAGCCTGC
CGCCAGCGTTCATCTGAGCGGGGAATCAAACCATT

Ugyancsak 3.1.8.4.-ben leírtak szerint meghatároztuk a TBF2/20.2 jelölésű, a szintén az egykori szovjet katonai reptér biofilteréből származó törzs közel teljes 16S rDNS szekvenciáját (1428 bázispár):

GCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCCTATACATGCAAGTCGAACGGGATCGGGGGC
TTCGGTCCCCGTGAGAGTGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTGAGCAACCTGCCCGTCCC
AGGGGGATAGCCCGGAGAAATCCGGATTAATACCGCATGAGAATGCAGGTCCGCATG
GGCCTTCGTTTAAATATTCATAGGGGACGGATGGGCTCGCGTGACATTAGCTTGTTGG
CGGGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGATGTCTAGGGGCTCTGAGAGGAGAAACCCCC
ACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTG
GTCAATGGGGGGAACCCTGAACCAGCCATGCCGCGTGCAGGAAGACGGCCCTACGGG
TTGTAAACTGCTTTTGCACGAGAATAACCCCGGTATGTATACCGGGCTGAATGTACCG
TGAGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGA
GCGTTATCCGGAATTATTGGGTTTAAAGGGTGCGTAGGCGGCGCGCTAAGTCAGGGGT
GAAAGACGGTGGCTCAACCATCGCAGTGCCTTTGATACTGGCGCGCTTGAATTGTACC
TGAGGTAGGCGGAATGTGGCAAGTAGCGGTGAAATGCATAGATATGCCACAGAACAC
CGATTGCGAAGGCAGCTTACCAAAGTACGATTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGG

ATCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGAACACTCGATGTC
GGCGATAGACTGGTCGGCGTCCAAGCGAAAGCGTTAAGTGTTCCACCTGGGAGTACG
CCCGCAAGGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGAGGAGCATG
TGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCCGGGCTTGAAAGTTACTGAATTGT
CCAGAGATGGACAAGGTCCTTCGGGACAGGAAACTAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCA
GCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATGTTTAGT
TGCCAGCACGTCAAGGTGGGGACTCTAAACAGACTGCCTGTGCAAACAGAGAGGAAG
GCGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTCCGGGGCTACACACGTGCTACAA
TGGGGGGTACAGAGGGCAGCGACACCGCGAGGTGAAGCCAATCTCAGAAAGCCCCTC
ACAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTTGGATTCGCTAGTAATCGC
GTATCAGCAATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGC
CATGAAAGCCGGGGGTACCTAAAGCATGTAACCGCAAGGAGCGGTCAGG

Fentiek alapján szekvenáltuk a ZFM 23.1 jelölésű, magyarországi kőolajfinomító olajipari szennyvizéből származó törzset (1249 bázispár):

AGTCGAGCGGTAAGGCCTTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG
GGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATG
ACCTCCTGTNGCATGGNNNGNGGTGGAAAGATTTATCGGTGCAGGATGGGCCCGCGGC
CTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGA
GAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGAT
GACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCT
GCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAA
GCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGTTCGTAGGCGGTTTGTCGCGTCGTTTGTG
AAAACCAGCAGCTCAACTGCTGGCTTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAG
GGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCG
GTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAACGAAAGCGTGGGTAG
CGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGG
TTCCTTCCACGGAATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTAC
GGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCAT
GTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATATACCGGAAAG
CTGCAGAGATGTGGCCCCCCTTGTGGTCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGC
TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTATGTTGC
CAGCACGTTATGGTGGGGACTCGTAAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTG
GGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGG
CCAGTACAGAGGGCTGCGAGACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCTGGTCTCAG
TTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTC

Az eddigiekhez hasonlóan meghatároztuk az SZM5/4.2 jelölésű, szarvasi üzemanyag töltőállomás környezetében lévő talajvíz mintavételi pontból származó törzs részleges 16S rDNS szekvenciáját (444 bázispár) is:

ACTAACGTATTAGGTTATGCCCTTCCTCCCACTTAAAGTGCTTTACATCCGAAGACCTT
CTTCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTGTCCAATATTCCCCACTG
CTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGACTGATCATCCTCTCA
GACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATCCGACC
TAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCTCCCGTAGGACGTATG
CGGTATTAGCGTCCGTTTCCGAGCGTTATCCCCCACTACCAGGCAGATTCCTAGGCATT
ACTCACCCGTCCGCCGCTCGCCACCAGGTACAAGTACCCGTGCTGCCGCTCGACTTGCA
TGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCATTGGA

Az OM7-2 jelölésű, az ópusztaszeri olajvezeték törés területén lévő szennyezett talajvíz mintavételi pontból származó törzs részleges 16S rDNS szekvenciája (1115 bázispár):

AGTCGAGCGGTAAGGCCTTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTG
GGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAaACTGGGTCTAATACCGGATATGA
CCTCCTGTNGCATGGNNNGNGGTGGAAAGATTTATCGGTGCAGGATGGGCCCGCGGCC
TATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAG
AGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATG
ACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTG
CAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAG
CGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGTTCGTAGGCGGTTTGTCGCGTCGTTTGTGA
AAACCAGCAGCTCAACTGCTGGCTTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTGCAGG
GGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGT
GGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAACGAAAGCGTGGGTAGCG
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGGGTT
CCTTCCACGGAATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACGG
CCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGT
GGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATATACCGGAaAGCTG
CAGAGATGTGGCCCCCCTTGTGGTCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTATGTTGCCAG
CACGTTATGGTGGGGACTCGTAAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGG
ACGACGTCAAGTCAT

Végül meghatároztuk a 4S-8 jelölésű sásdi töltőállomás szennyezett, talajviz mintavételi pontjából származó törzs részleges 16S rDNS szekvenciáját (1351bp):

AGTCGAACGATGAAGCCCAGCTTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACAC
GTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGAT
AGGACCTCGGGATGCATGTTCCGGGGTGGAAAGGTTTTCCGGTGCAGGATGGGCCCGC
GGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCC
TGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGG
GATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTACCGACGAAGCGCAAGTGACGGTA
GGTACAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTG
CGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTCGCGTCGTCT
GTGAAAACCCGCAGCTCAACTGCGGGCTTGCAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTG
CAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACA
CCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGG
TAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGT
GGGTTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGA
GTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGA
GCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATACACCGG
ACCGCCCCAGAGATGGGGTTTCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGT
CAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTG
TTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAA
GGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACA
ATGGCCGGTACAGAGGGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTC
TCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGC
AGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGT
CATGAAAGTCGGTAACACCCG

A fent bemutatott 16S rDNS szakaszok szekvenciáit a nemzetközi adatbázisokban lévő adatokkal összehasonlítva az alábbi (13. sz. táblázat) identifikációs eredményeket kaptuk.

13. számú táblázat A gravimetriás mérés alapján szénhidrogén bontó képességgel rendelkező, újonnan izolált 6 törzs faji szintű identifikációjának eredménye 16S rDNS szekvencia analízis alapján.

Minta jele	Meghatározás	Szekvencia azonosság
TBF2/20.1	*Acinetobacter rhizosphaerae*	98,14%
TBF2/20.2	*Olivibacter sp. nov.*	93,25%
ZFM 23.1	*Rhodococcus erythropolis*	99,60%
SZM5/4.2	*Pseudomonas mandelii*	99,31%
OM 7-2	*Rhodococcus erythropolis*	99,55%
4S-8	*Rhodococcus ruber*	100,00%

Az eredmények alapján az 4S-8, ZFM23.1 és az OM7-2 jelű törzs a *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó fajok. A *Rhodococcus*-ok tipikus talajlakó baktériumok, melyek gyorsan megjelennek szennyezett területeken. Olajbontó képességüket számos irodalom említi és számos aromás vegyület lebontásában is közreműködnek, sok esetben használják fel a nemzetség tagjait biodegradációs folyamatokban, oltóanyagok gyakori alkotói nem patogén tulajdonságuk, jó bontási képességeik, ipari használhatóságuk, telepmorfológia szempontjából egyszerű megkülönböztethetőségük (általálános táptalajon jellegzetes, piros szín) és tág tűrőképességük miatt (Kim et al; 2002; Aislabie et al, 2006; Zhukov et al., 2007; Borràs et al, 2010, Lee et al, 2010). Rendszertani besorolásuk (Euzéby, 1997 nyomán): *Actinobacteria* (törzs) › *Acitonobacteria* (osztály) › *Actinomycetales* (rend) › *Nocardiaceae* (család) › *Rhodococcus* (nemzetség). Az 4S-8 jelű töltőállomás olajszármazékkal szennyezett vizéből származó törzs *Rhodococcus ruber*, a telepek színe nevéhez hűen pirosas-rózsaszín árnyalatú. Az ZFM 23.1 kőolajfinomító talajvizéből, illetve az OM7-2 jelű, olajipari vezetéktörés szennyezett talajából származó törzs a molekuláris biológiai elemzés alapján *Rhodococcus erythropolis*.

A TBF2/20.1.-es jelű egykori katonai repülőtér kármentesítésben használt biofilteréből származó törzs a szekvencia analízis szerint az *Acinetobacter rhizosphaerae* faj képviselője, melyet 2009-ben Peix és munkatársai írtak le első ízben. Az *Acinetobacter* genus általános jellemzője, hogy képviselői ubikviter baktériumok, Gram negatívak, csillótlan coccus, coccobacillus vagy pálca alakúak. Szinte bárhol előfordulnak, egyes képviselőik opportunista kórokozók és nozokomiális[1] fertőzéseket okozhatnak. Az *Acinetobacter* nemzetség rendszertani besorolása (Euzéby, 1997 nyomán): *Proteobacteria* › *Gammaproteobacteria* › *Pseudomonadales* › *Moraxellaceae* › *Acinetobacter*. A faj által képviselt (az Európa Tanács, WHO által meghatározott) kockázat alapján az általunk izolált *Acinetobacter rhizospharae* az 2-es rizikócsoportba tartozik, vagyis fakultatív humán patogén mikroba. Mivel tehát az itt kimutatott törzs humán megbetegedést is okozhat

[1] Nozokomiális: kórházból eredő, kórházhoz tartozó (Forrás: Losonczy, 1989)

legyengült immunrendszerű emberek esetében (fakultatív patogén), így bioremediációban történő felhasználása nem lehetséges.

A másik, ugyanerről a helyszínről származó törzs (TBF2/20.2.) esetében a szekvencia analízis az adatbázisban fellelhető szekvenciák közül olyannal mutat 99% feletti egyezést, amelyet faji szinten még nem írtak le Az NCBI GenBank és a leBibi adatai alapján a törzs rokonsági viszonyait tekintve az *Olivibacter sp.* nemzetség tagjaival rokon. Az ismert és azonosított törzsek közül egy *Olivibacter* fajjal (*Olivibacter ginsengisoli*) mutat genetikai hasonlóságot, de igen csekély mértékben (~93%). A részletes fajleírást a 4.3 fejezetben mutatjuk be.

Az SZM5/4.2 jelölésű izolátum molekuláris biológiai meghatározása alapján az elsőként francia kutatók által ásványvízből izolált *Pseudomonas mandelii* (Verhille et al, 1999). Rendszertani besorolása (Euzéby, 1997): *Proteobacteria* › *Gammaproteobacteria* › *Pseudomonadales* › *Pseudomonadaceae* › *Pseudomonas.*

4.2.2. Bontási kísérlet

A szénhidrogén bontó képesség igazolására az „Anyag és módszer” fejezetben bemutatott *in vitro* kísérlet állítottuk össze. A kísérlet végén mind a kezelt, mind kontroll beállításokat akkreditált laboratóriumba szállítottuk, ahol TPH (EPH + VPH összes, ill. szénatomszám szerinti eloszlás), BTEX komponensekre kémiai analitikai vizsgálatokat végeztettünk.

A 14. sz. táblázat eredményei alapján a vizsgált törzsek valóban képesek voltak az olajszennyezéseket jellemző összes alifás szénhidrogén (TPH) szennyezőanyag mennyiségének jelentős csökkentésére. A monoaromás BTEX vegyületek bontásia azonban nem volt igazolható, mivel az öt napos rázatás végén egyetlen minta sem tartalmazott ilyen vegyületeket. Ennek magyarázata az lehet, hogy a nem légmentesen zárt rázólombikokban ezek az illékony szennyezőanyagok kipárolognak az oldatból. Az eredmények alapján a legkiválóbb bontási százalékot a vizsgált törzsek közül a 4S-8 jelű *Rhodococcus ruber* adta. Az ezzel a törzzsel kezelt minta a kezeletlen, steril végponthoz (SK) képest **78%-al kevesebb TPH szennyezőanyagot tartalmazott**. A másik két vizsgált törzs (TBF2/20.2, ZFM23.1) is 70% feletti bontást produkált a TPH komponensek esetében. A gravimetriás mérések eredményeit, miszerint az általunk újonnan izolált és faji szinten azonosított mikroszervezetek képesek szénhidrogén biodegradációra, tehát akkreditált kémiai analitikai vizsgálat is alátámasztotta.

Az, hogy az újonnan izolált törzsek a gravimetriás mérésnél jóval magasabb bontási kapacitást mutattak a fenti eredmények alapján valószínűsíthetően azzal magyarázható, hogy a gravimetria során olyan gázolaj és kőolaj keveréket adunk a tápoldathoz, ahol a nyers kőolaj nehezen bontható komponensek (egészen magas szénláncú) is előfordulnak. A környezeti mintában ezzel szemben gázolajszennyezés volt, amely jórészt vízben oldott állapotban volt jelen a mintában.

Vagyis az izolált törzsek könnyebben hozzáférhettek a szennyező anyagokhoz. Az eredmények tehát alátámasztották, hogy a gravimetria során szelektálni lehet azokat a törzseket, amelyek életképesek a gázolaj-kőolaj keveréken és ezek nagy valószínűséggel, jó hatásfokkal degradálhatják a hazai szennyezett területekre jellemző, finomított termékek okozta szennyezéseket.

14. számú táblázat A szénhidrogén származékokkal szennyezett környezeti mintán végzett bontási kísérlet TPH és BTEX vizsgálatainak kémiai analitika eredménye (mérte: Wessling Hungary Kft.). Az újonnan izolált törzsek bontási képességének összevetése *in vivo* bioremediációban már alkalmazott törzskeverék tagjaival.
* *In vivo* bioremediációban már alkalmazott törzskeverék tagjai ** Újonnan izolált törzsek
SK: a kezeletlen steril kontrollban mért szennyezőanyag koncentráció a bontási kísérlet végén

Komponens	**NCP3 - AK38***	**AK40 - CHB15***	**AK38 - AK35***	**TBF2/20.2****	**ZFM23.1****	**4S-8****	**SK**
Mértékegység	**µg/dm^3**						
Benzol	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
Toluol	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Etilbenzol	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Xilolok összesen	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Egyéb alkilbenzolok összesen (16)	<15	<15	<15	<15	<15	<15	<15
VAPH (C6-C12)	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
n-Hexán [1, 2]	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
n-Dekán [1, 2]	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
VALPH (C5-C12)	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
VPH (C5-C12)	<25	<25	<25	<25	<25	<25	<25
EPH (C10-C40)	1370	345	648	592	654	559	2530
TPH (C5-C40)	**1370**	**345**	**648**	**592**	**654**	**559**	**2530**
TPH bontási%	**45,85%**	**86,36%**	**74,39%**	**76,60%**	**74,15%**	**77,90%**	**-**

Az összeállított SAFEREMED törzskombinációk igazolták, hogy a bontás a mikrobiális tevékenységnek köszönhető és nem más természetes és/vagy mesterséges fogyás eredménye. Érdekes és egyben az alkalmazott kutatás szempontjából lényeges, hogy a vizsgált törzsek egyenként is jóval magasabb bontási százalékot értek el az NCP-3 - AK38 keveréknél és értékük nagyjából megegyezett az AK38 - AK35 törzskeverékével. Vagyis a kísérlet eredménye felhívja a figyelmet arra, hogy az általunk izolált mikroszervezetek a bontási kísérlet eredményei alapján meghaladják egy, már a gyakorlatban alkalmazott szénhidrogén bontó törzskeverék tagjainak degradációs kapacitását. Ez az eredmény megalapozhatja a jövőben bioremediációs oltóanyagként történő felhasználásukat.

Az analitikai vizsgálatokkal együtt elvégeztettük a kezelt és a kontroll minták szénatomszám szerinti eloszlás vizsgálatát, vagyis a C_5-C_{40} lánchosszúságú TPH alkotó komponensek előfordulását. A kromatogramok elemzése alapján kideríthető, hogy a vizsgált mikroszervezetek, illetve keverékek mely szénhidrogének bontására alkalmazhatók leginkább. A 15. sz. táblázatban a kontrollhoz viszonyított mennyiség százalékában jellemezzük a bontás hatékonyságát a különböző lánchosszúságú szénhidrogén vegyületek esetében.

15. számú táblázat A szénhidrogén származékokkal szennyezett környezeti mintán végzett bontási kísérlet C-atom szám szerinti eloszlás vizsgálatainak kémiai analitika eredménye az összes alifás szénhidrogén (TPH) szennyezők esetében (mérte: Wessling Hungary). Az újonnan izolált törzsek bontási képességének összevetése *in vivo* bioremediációban már alkalmazott törzskeverék tagjaival.
* *In vivo* bioremediációban már alkalmazott törzskeverék ** Újonnan izolált törzsek

Színmagyarázat a bontási%-okhoz

20-50% 70-100%
50-70%

	NCP3 - AK38*	AK40 - CHB15*	AK38 - AK35*	TBF2/20.2**	ZFM23.1**	4S-8**
	Bontási% SK-hoz viszonyítva					
C10-11	-50,00	-59,49	-65,55	-51,24	-51,17	-63,21
C11-12	50,00	11,86	43,24	39,50	37,94	18,39
C12-13	72,97	61,21	78,27	67,30	69,04	58,09
C13-14	61,36	62,80	72,05	58,75	60,94	52,71
C14-15	52,27	62,23	72,05	69,56	47,92	47,14
C15-16	32,65	61,97	63,32	65,61	42,52	44,21
C16-17	8,82	61,49	54,79	61,24	39,63	46,00
C17-18	13,04	73,72	61,34	67,69	48,94	59,91
C18-19	14,47	82,77	68,57	75,27	55,09	70,47
C19-20	0,00	75,88	56,48	63,69	48,85	62,80
C20-21	-0,64	71,34	54,07	60,82	46,12	59,98
C21-22	-0,28	74,32	54,17	58,25	50,92	61,73
C22-23	-1,80	75,34	53,92	57,01	51,77	61,82
C23-24	-2,10	75,23	53,58	56,79	52,26	61,67
C24-25	-2,11	74,39	52,40	55,51	52,67	59,80
C25-26	-3,70	73,75	51,39	55,91	51,91	57,99
C26-27	-3,82	73,52	50,27	54,69	52,12	55,60
C27-28	-3,63	73,90	50,92	56,30	51,72	56,49
C28-29	-1,07	75,33	51,85	56,63	53,80	57,30
C29-30	-0,98	79,40	52,30	58,24	53,40	58,17
C30-31	-0,30	76,46	51,98	56,79	54,72	58,89
C31-32	1,55	77,01	54,08	59,72	54,95	61,81
C32-33	-1,14	76,25	50,00	53,83	53,57	59,01
C33-34	0,58	76,86	54,07	57,92	53,65	62,63
C34-35	-2,41	75,96	48,43	51,45	51,98	58,83
C35-36	0,29	76,45	53,40	56,28	52,97	62,93
C36-37	-2,77	76,04	47,63	51,26	50,94	58,77
C37-38	-1,23	76,26	54,25	54,31	51,87	62,88
C38-39	-2,35	74,94	47,59	49,89	50,02	58,81
C39-40	0,00	75,10	53,50	51,69	51,19	62,41
C40-41	0,65	74,49	52,08	54,81	51,95	61,60

A szénatomszám szerinti eloszlást összefoglaló táblázat eredményei alapján jól érthetővé válik, hogy miért alkalmaztunk törzskeverékeket pozitív kontrollként, hiszen a keverékekre a C-atom számok alapján más-más bontási profil jellemző. Az NCP-3 - AK38 keverék csak a rövid C11-C16 hosszúságú szénláncokat, azaz a TPH frakció igen szűk tartományát bontja. Ehhez hasonlóan a rövid szénláncok esetében bont a legjobb hatásfokkal az AK38 - AK35, de bontási hatékonysága kitart a hosszabb szénláncú vegyületek esetében is. Előbbiektől eltérően a rövid és hosszú szénláncú vegyületek lebontására is használható az AK40 - CHB15 kombináció. Az újonnan izolált 4S-8 és ZFM23.1 jelzésű törzsek bontási képükben jelentősen eltérnek a törzskeverékek bontási képeitől. Jellemzően a rövid és hosszú szénláncú vegyületek esetében is kimutatható a bontásuk. A bontási% jellemzően 50-70% között található. Az új faj jelölt TBF2/20.2 kiegyensúlyozott bontási képpel rendelkezik az öt napos rázatás eredményei alapján. A ZFM 23.1 50% alatti mértékben bontotta a C14-C18 és C19-C21 szénatomszámú vegyületeket. A 4S8 a mérések tanulsága szerint a C18-C19 tartományban bont leginkább.

A táblázatban szereplő mínusz értékek magyarázata, hogy a mikrobák bontó enzimei először általában kisebb láncokra hasítják a hosszabbakat, vagyis láncközi darabolásokat hajtanak végre, ezért növekszik jellemzően a C10-11 komponensek aránya az oldatban a vizsgálat végére. A hosszabb fragmentek esetében tapasztalt 4% alatti mínusz értékek valószínűleg mérési pontatlanságnak tudhatók be.

4.3. A TBF2/20.2 jelű törzs rendszertani besorolása

Mint azt a 2.3. fejezetben bemutattam a baktériumok 98% feletti 16S rDNS szekvencia hasonlóság alapján faji szinten meghatározhatók. Ha a hasonlóság nem éri el ezt az értéket, akkor új faj jelöltről van szó. Ahhoz, hogy az új mikroba törzset önnálló fajként leírhassuk az említett fejezetben bemutatott további vizsgálatokat kell végeznünk. A szénhidrogén bontó mikrobák izolálása során a TBF2/20.2 jelzésű törzset az alacsony szekvencia hasonlóság (93%) miatt nem lehetett faji szinten azonosítani, így új faj jelöltnek tekintettük. Az eredmény alátámasztására elvégzett vizsgálatokat az alábbiakban mutatjuk be.

4.3.1. Filogenetikai jellemzés

A részleges 16S rRNS gén szekvencia alapján az általunk izolált törzs az *Olivibacter* nemzetség tagjaival rokon (Chun et al, 2007). Közülük is a legközelebbi rokonságban (93.5%) az *Olivibacter ginsengisoli* nevű törzzsel áll. Bármely *Olivibacter* törzzsel összehasonlítva a TBF2/20.2 kisebb, mint 97%-os szekvencia egyezést mutatott, ezek alapján kijelenthetjük, hogy a törzs valóban új faj jelöltnek tekinthető. Érdekes módon a nemzetközi adatbázis tartalmazott olyan mikrobát, amellyel törzsünk 99%-os egyezést mutatott, de az ezt a törzset izoláló kínai kutató azt

faji szinten nem írta le (GenBank No.: EU63696). Hasonló eredményre jutottunk Kanaly és munkatársai által 2002-ben izolált mikroszervezetet esetében, amellyel jelölt törzsünk szintén 99%-os szekvencia homológiát mutat, de ezt a törzset az azt izoláló kutatók szintén nem írták le új fajként. Ez utóbbi, BPC8-as jelzésű törzset egyébként egy dízel olajjal szennyezett talajból mutatták ki és az ott található baktérium közösség benz[a]pirén (poliaromás szénhidrogén) bontó képességét igazolták. Arról, hogy a bontás ennek a törzsnek köszönhető, vagy más közösség alkotó mikrobának nincs információ. A TBF2/20.2 jelzésű, általunk izolált törzs 16S rDNS szekvenciája az NCBI adatbázisban is regisztrálásra került Gen Bank No.: HM021721 regisztrációs számmal, az alábbi szekvencia sorrenddel (8. ábra):

```
   1 gctcaggatg aacgctagcg gcaggcctat acatgcaagt cgaacgggat cgggggcttc
  61 ggtccccgtg agagtggcgc acgggtgcgt aacgcgtgag caacctgccc gtcccagggg
 121 gatagcccgg agaaatccgg attaataccg catgagaatg caggtccgca tgggccttcg
 181 tttaaatatt catagggggac ggatgggctc gcgtgacatt agcttgttgg cggggtaacg
 241 gcccaccaag gcgacgatgt ctaggggctc tgagaggaga aacccccaca ctggtactga
 301 gacacggacc agactcctac gggaggcagc agtaaggaat attggtcaat gggggggaacc
 361 ctgaaccagc catgccgcgt gcaggaagac ggccctacgg gttgtaaact gcttttgcac
 421 gagaataacc ccggtatgta taccgggctg aatgtaccgt gagaataagg atcggctaac
 481 tccgtgccag cagccgcggt aatacggagg atccgagcgt tatccggaat tattgggttt
 541 aaagggtgcg taggcggcgc gctaagtcag gggtgaaaga cggtggctca accatcgcag
 601 tgcctttgat actggcgcgc ttgaattgta cctgaggtag gcggaatgtg gcaagtagcg
 661 gtgaaatgca tagatatgcc acagaacacc gattgcgaag gcagcttacc aaagtacgat
 721 tgacgctgag gcacgaaagc gtggggatcg aacaggatta gataccctgg tagtccacgc
 781 cctaaacgat gaacactcga tgtcggcgat agactggtcg gcgtccaagc gaaagcgtta
 841 agtgttccac ctgggagtac gcccgcaagg gtgaaactca aaggaattga cgggggcccg
 901 cacaagcgga ggagcatgtg gtttaattcg atgatacgcg aggaacctta cccgggcttg
 961 aaagttactg aattgtccag agatggacaa ggtccttcgg gacaggaaac taggtgctgc
1021 atggctgtcg tcagctcgtg ccgtgaggtg ttgggttaag tcccgcaacg agcgcaaccc
1081 ctatgtttag ttgccagcac gtcaaggtgg ggactctaaa cagactgcct gtgcaaacag
1141 agaggaaggc ggggacgacg tcaagtcatc atggccctta cgtccggggc tacacacgtg
1201 ctacaatggg gggtacagag ggcagcgaca ccgcgaggtg aagccaatct cagaaagccc
1261 ctcacagttc ggatcggggt ctgcaactcg accccgtgaa gttggattcg ctagtaatcg
1321 cgtatcagca atgacgcggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc ccgtcaagcc
1381 atgaaagccg ggggtaccta aagcatgtaa ccgcaaggag cggtcagg
```

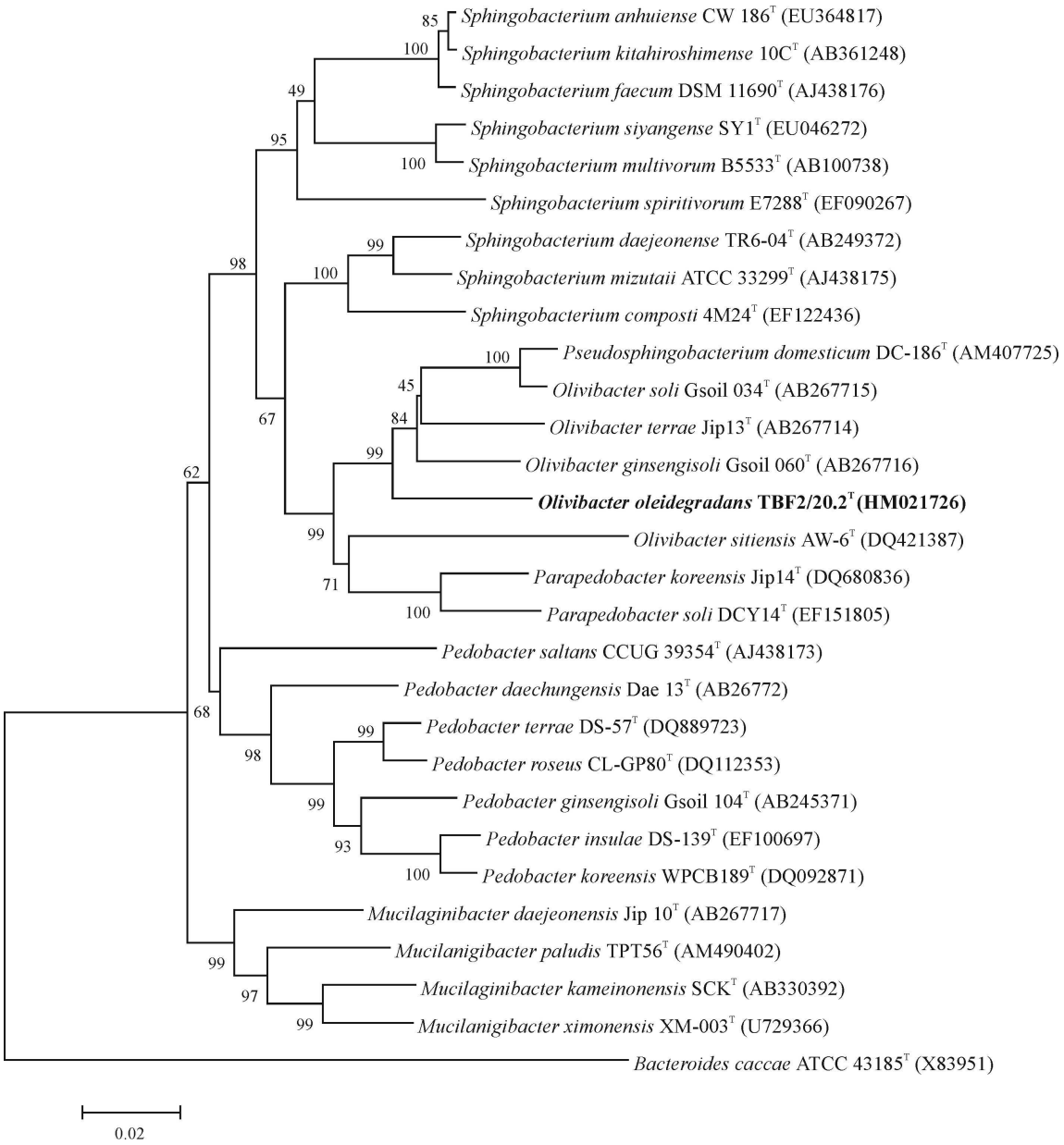
8. ábra Az új faj jelölt TBF2/20.2 jelű törzs 16S rDNS részleges szekvencia sorrendje a NCBI GenBankban közölt formában (GenBank No.: HM021721)

Az NCBI GenBank-ban letétbe helyezett 16S rDNS szekvenciákkal a BLAST algoritmus alapján az izolátum egyértelműen az *Olivibacter* nemzetség tagja. Ezt az eredményt megerősítette a leBibi adatbázis eredménye a típustörzsek összevetése alapján is. Rendszertani besorolása:

Domén: *Bacteria*
Törzs: *Bacteroidetes*
Osztály: *Sphingobacteria*
Rend: *Sphingobacteriales*
Család: *Sphingobacteriaceae*
Nemzetség: *Olivibacter*

Az eredményeink alapján szerkesztett törzsfa (9. ábra) a TBF2/20.2 taxonómiai helyzetét mutatja az *Olivibacter* nemzetség tagjaihoz, valamint néhány közeli rokon nemzetséghez viszonyítva. A törzsfáról jól leolvasható, hogy a legközelebbi rokon fajnak az *Olivibacter ginsengisoli* tekinthető. Vagyis a filogenetikai vizsgálatok eredményei alátámasztják, hogy egy

eddig még ismeretlen, a tudományos szakirodalmak által le nem írt új baktérium fajt izoláltunk. Ahhoz, hogy ezt egyértelműen igazolhassuk az ismertetett filogenetikai vizsgálatokon felül további vizsgálatokat kellett elvégezni (2.3. fejezetben bemutatott módszerekkel). Mivel az izolált szervezethez legközelebb álló mikroszervezet 16S rDNS homológiája 97% alatt volt (~93%) ezért DNS-DNS hibridizációra nem volt szükség az új faj leíráshoz. A vizsgálatok eredményeit irodalmi adatok alapján minden esetben összevetettük a nemzetségen belül már leírt és publikált fajok hasonló tulajdonságaival. Vizsgálataink alapján a törzs DNS-ének G+C tartalma (41,2 mol%) a nemzetség többi tagjához hasonlóan 40 mol% körüli (16. táblázat).



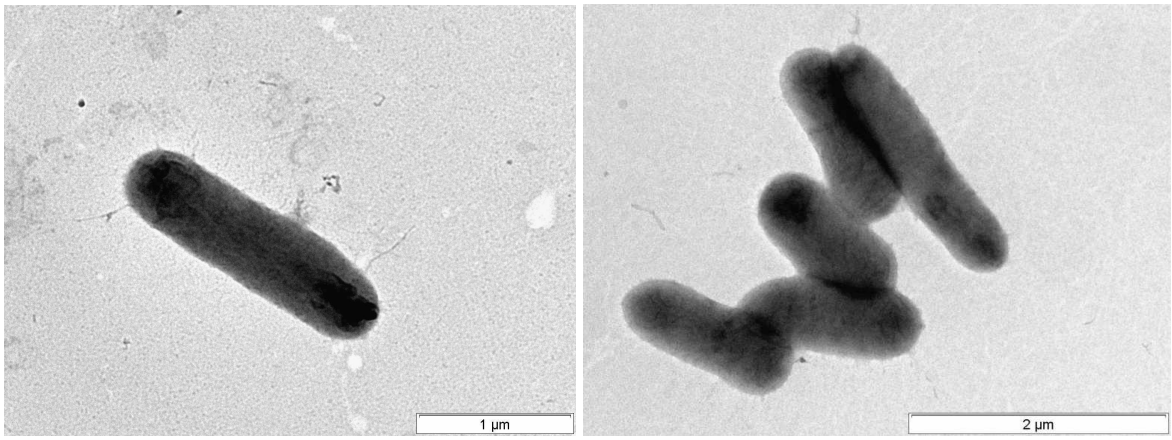
9. ábra A részleges 16S rRNS gén szekvencia alapján szerkesztett törzsfa, **kiemelve** az új faj jelölt TBF2/20.2 törzs taxonómiai helyét (MEGA4 szoftverrel szerkeztve)

4.3.2. Fenotípusos vizsgálatok

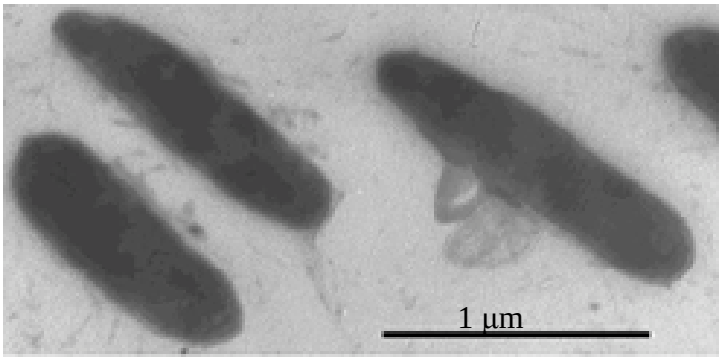
4.3.2.1. Morfológiai vizsgálatok

A telepmorfológiai vizsgálatok szerint TGE5 agaron a TBF2/20.2 törzs 1,0-2,0 mm átmérőjű ép szélű, kerek, konvex felszínű telepeket alkot. A telepek színe opálos, sárgás, de ez függ az inkubáció hosszától. Hosszabb időn túl (egy-két hét) a szobahőmérsékleten tartott telepek világosbarna árnyalatot kapnak.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatok eredménye alapján a vizsgált törzs sejtjei 1000x nagyítás mellett kb. 1,8 µm hosszúak és 0,6 µm szélesek, végein lekerekített, pálcika alakúak (10. a., b. ábra). A sejtek sima felszínűek, flagellumok, csillók vagy egyéb képletek nem találhatók rajta. Az elektron mikroszkópos felvétel hasonló az *Olivibacter* nemzetségről eddig megjelent egyetlen felvételhez, amelyet az *O. sitiensis*-ről, a nemzetség típustörzséről készítettek (Ntougias et al., 2007; 11. ábra). A képek alapján kijelenthető, hogy a flagellumok hiánya a nemzetség eddig azonosított tagjaira jellemző morfológiai bélyeg.



10. a., b. ábra Az új faj jelölt TBF2/20.2 törzs elektronmikroszkópos (EM) felvételei



11. ábra Az *Olivibacter sitiensis* negatív festett EM morfológiája (Ntougias, et al., 2007)

4.3.2.2. Fiziológiai fenotípusos és enzimatikus jellemzés

Ahogy azt a 3.3.2. fejezetben bemutattam a kísérletek során megvizsgáltuk a TBF2/20.2 törzs szaporodását különböző szelektív agarokon, eltérő hőmérsékleteken, továbbá NaCl jelenlétében. A TBF2/20.2 törzs enzimatikus jellemzését az említett API tesztekkel (bioMérieux, France) végeztük

a gyártó előírásai alapján. A vizsgálatok eredményét kiegészítve az asszimilációs tesztekkel és a DNS G+C tartalommal a 16. sz. táblázatban mutatjuk be.

16. számú táblázat Az új faj jelölt TBF2/20.2. törzs fenotípusos karakterisztikája, összevetve az *Olivibacter* nemzetség más tagjaival: *O. soli, O. ginsengisoli, O. terrae* (Wang et al., 2008), *O. sitiensis* (Ntouigas, 2007).

Jelmagyarázat: +: növekedés/asszimiláció; -:nincs növekedés/asszimiláció; +gy: gyenge növekedés; G+C: Guanin és Citozin

Tulajdonság	**TBF2/20.2**	***O. soli* Gsoil 034**	***O. ginsengisoli* GSoil 060**	***O. terrae* Jip13**	***O. sitiensis* AW-6**
Növekedés 5ºC-on	+	-	-	-	+
Növekedés 15ºC-on	+	+	+	+	+
Növekedés 30ºC-on	+	+	+	+	+
Növekedés 37ºC-on	+	+	-	-	+
Növekedés 42ºC-on	+	-	-	-	+
Növekedés 4% NaCl	-	+	+	+	-
Növekedés MacConkey agaron	-	-	-	-	-
Enzimaktivitás:					
Zselatin hidrolízis	-	+	+	-	-
Észteráz (C4)	-	-	+	+	+
Észteráz lipáz (C8)	-	-	-	+	-
Naftol-AS-BI-foszfohidroláz	+	-	-	-	+
β-galaktozidáz	+	-	-	-	-
β-glükoronidáz	-	-	-	+	-
α-mannozidáz	+	-	-	-	-
α-fukozidáz	-	+	-	-	-
Asszimiláció:					
D-Adonitol	+	+	-	-	-
D-Lixóz	+	+	-	-	-
D-Mannitol	-	+	-	-	-
D-Melezitóz	+	+gy	-	-	-
D-Turanóz	+	+gy	-	+gy	-
Inozitol	-	-	+	-	-
L-Arabinóz	+	+	-	+gy	-
L-Hisztidin	-	-	-	-	+
N-Acetil-glükózamin	+	-	-	-	-
G+C tartalom (mol%)	41.2	39.2	43.6	40.6	45.6

A vizsgálatok alapján a TBF2/20.2 jelű törzs több lényeges tulajdonságban is eltér a hozzá filogenetikailag legközelebb álló *Olivibacter ginsengisoli*-tól és az *Olivibacter* génusz további képviselőitől. A vizsgált törzsünk 5 és 42ºC-on is képes növekedésre, 4%-os NACl jelenlétében nem növekszik, *β*-galaktozidáz és *α*-mannozidáz aktivitással rendelkezik, valamint asszimilálja a D-adonitolt, D-lixózt, D-melezitózt, D-turanózt és az N-acetil-glükózamint, de nem képes inozitol asszimilációra az *O. ginsengisoli*-val ellentétben. Az összes vizsgálati eredményt tartalmazó táblázatot a dolgozat 2. sz. melléklete tartalmazza.

4.3.2.3. Kemotaxonómiai jellemzés

A kemotaxonómiai vizsgálatátok sejtmembrán zsírsav analízisre, a respiratórikus kinonok és respiratórikus lipokinonok, valamint a poláros lipidek analízisre terjedtek ki. A vizsgálatokat a DSMZ GmBH végezte. Az eredmények alapján a menakinonok közül 98%-ban Menaquinone 7 (MK-7) jelent meg. MK-6 komponenst csak a fennmaradó 2%-ban tudtak kimutatni. Az, hogy a respiratórikus kinonok közül jelentős többségben található az MK-7, megfelel a nemzetség többi tagjánál tapasztaltaknak. Poláros lipidek közül foszfatidil-etanolamint (PE), aminofoszfolipideket (PN1-PN2), foszfolidideket (PL1-PL3), lipideket (L1-L4) és egy atipusos glikolipidet (GL1) mutattunk ki.

Más *Olivibacter* fajokhoz hasonlóan, a domináns zsírsav-metilészterek az iso-$C_{15:0}$ (39,43%) és az iso-$C_{17:0}$ 3-OH (14,46%), valamint a $C_{16:0}$ (4,54%) voltak a TBF2/20.2 esetében is. Ez szintén alátámasztja a törzsek egy nemzetségbe tartozását. Unikális tulajdonsága azonban, hogy a többi fajhoz képest viszonylag alacsony százalékban (26,01%) tartalmazta a 3. számú főkomponenst (iso-$C_{15:0}$ 2-OH és/vagy $C_{16:1}$ w7c.). A TBF2/20.2. és a további *Olivibacter* fajok zsírsavösszetételének összehasonlítását a 17. sz. táblázatban mutatom be részletesen.

A vizsgálati eredmények alapján egyértelműen kijelenthető, hogy az általunk izolált TBF2/20.2 törzs új faj, amely az *Olivibacter* nemzetség tagja, de annak tagjaitól egyértelműen elkülöníthető taxonómiai bélyegekkel rendelkezik.

17. számú táblázat A TBF2/20.2 jelű törzs és a rokon fajok képviselőinek sejtmembrán zsírsav analízis eredménye, összevetve az *Olivibacter* nemzetség más tagjaival: *O. soli, O. ginsengisoli, O. terrae* (Wang et al., 2008), *O. sitiensis* (Ntouigas, 2007)**.**

*Ismeretlen zsírsav komponens; ECL: equivalent chain length: egyenlő lánchosszúságot jelöl
**Összegzett komponensnek tekintettük azokat a zsírsavakat, melyeket gázkromatográf nem tudott elválasztani a Microbial Identification System (Microbial ID) szoftver segítségével.
Összegzett komponens 1: iso-$C_{15:1}$ H és/vagy $C_{13:0}$ 3OH.
Összegzett komponens 3: iso-$C_{15:0}$ 2-OH és/vagy $C_{16:1}$ ω7c.
Összegzett komponens 4: iso-$C_{17:1}$ I és/vagy anteiso-$C_{17:1}$ B.

Zsírsav komponensek	**TBF2/20.2**	***O. soli* Gsoil 034^T**	***O. ginsengisoli* GSoil 060^T**	***O. terrae* Jip13^T**	***O. sitiensis* AW-6^T**
$C_{14:0}$	1,57	1,12	1,59	2,10	0,34
$C_{16:0}$	**4,54**	**4,88**	**5,30**	**4,22**	**4,54**
$C_{14:1}$ω5c	0,24	-	-	-	-
$C_{16:1}$ω5c	0,54	1,53	0,58	-	1,17
$C_{15:1}$ω6c	0,30	-	-	-	-
iso-$C_{15:0}$	**39,43**	**29,60**	**28,24**	**27,61**	**31,18**
anteiso-$C_{15:0}$	0,30	0,66	-	0,32	-
iso-$C_{15:0}$ 3-OH	1,94	2,51	2,51	2,49	1,87
iso-$C_{15:1}$ F	0,13	-	-	-	-
iso-$C_{16:0}$ 3-OH	0,24	0,34	0,39	-	-
iso-$C_{17:0}$	0,97	0,13	0,37	0,43	0,31
iso-$C_{17:0}$ 3-OH	**14,46**	**12,86**	**13,97**	**12,34**	**10,97**
iso-$C_{17:1}$ω9c	1,88	1,16	0,96	1,29	1,75
$C_{14:0}$ 2-OH	0,68	0,27	0,31	0,34	-
$C_{15:0}$ 2-OH	0,26	-	-	-	-
$C_{16:0}$ 2-OH	1,68	2,23	2,62	2,87	0,59
$C_{16:0}$ 3-OH	0,7	2,18	2,85	1,64	0,63
$C_{16:1}$ 2-OH	0,14	-	0,33	0,48	-
$C_{17:0}$ 2-OH	-	0,33	-	-	-
$C_{17:0}$ CYCLO	0,86	-	-	-	-
Ismeretlen komponens*					
ECL 13,565	0,71	0,64	0,80	0,80	1,21
ECL 16,582	1,18	0,96	0,91	0,92	0,81
Összegzett komponens**					
1	0,33	-	-	-	-
3	**26,01**	**38,42**	**38,26**	**42,16**	**44,23**
4	0,38	0,19	-	-	0,41

4.3.3. Az Olivibacter nemzetség bemutatása

Az *Olivibacter* nemzetség az újonnan leírt nemzetségek egyik legfiatalabbika: 2007-ben egy görög kutatócsoport (Ntouigas és mukatársai) írta le egy akkor azonosított törzs esetében. A nemzetség típustörzseként megjelölt AW-6 jelű izolátumot az olívaolaj előállítás egyik melléktermékéből (alpeorujo, olívaolaj pogácsa) mutatták ki. A törzs az *Olivibacter sitiensis* nevet kapta utalva származására, ugyanis az alpeorujo minta, amelyből izolálták, Kréta szigetének északkeleti részén található Sitia településről (Toplou Apátság) származott. A genusz leírása tehát az *Olivibacter sitiensis* típustörzs (=DSM 17696^T=CECT 7133^T) jellemzői alapján történt. A

típustörzs Gram-negatív, 1-2 mikron méretű, flagellum nélküli, pálca alakú mikroszervezet. Szabálytalan, krémes fehér színű telepeket képez, amelyek nem termelnek endospórákat. Szigorúan aerob szervezetek. Oxidáz-kataláz pozitívak. A légzési láncukban menakinon-7 van jelen. Fő zsírsavkomponenseik: C16 : 1v7c és/vagy iso-C15 : 0 2-OH, iso-C15 : 0, iso-C17 : 0 3-OHés C16 : 0. A DNS guanin + citozin tartalma 45,6 mol%. A típustörzs hőmérsékleti és pH tűrőképessége 5–45 ºC és pH 5-7, optimuma 32 ºC és pH 7. A Tween 20-at nem hidrolizálja. Glükóz, protokatekol, xilóz, cisztein, fruktóz, galaktóz, hisztidin, laktóz, szorbitol, és szacharóz szubsztrátokat jól hasznosítja. Érzékeny ampicillin, bacitracin, chloramphenicol, penicillin, rifampicin, tetracycline és trimethoprim készítményekre, de rezisztensek kanamycin, polymyxin B and streptomycin antibiotikumokra.

Az *Olivibacter* génusz a *Sphingobacteriaceae* család tagja (Euzéby, 1997). Jelen értekezés írásának idejéig a genusban leírt fajok száma négyre bővült. 2008-ban egy koreai-kínai kutatócsoport tagjai (Wang et al., 2008) további három *Olivibacter* fajt azonosítottak dél-koreai mintákból. A törzsekből kettőt - az *Olivibacter soli*t, valamint az *Olivibacter ginsengisoli*t - egy Pocheon tartománybeli ginzengföld talajából, míg a harmadikat (*Olivibacter terrae*) egy szarvasmarha trágyát és rizs szalmát tartalmazó komposztból izolálták, amely Chungwon Tartományból származott. A nemzetség jelenleg tehát összesen négy *Olivibacter*-ként elfogadott fajt számlál. A fajok száma azonban várhatóan változni fog, ugyanis az *Olivibacter* nemzetség tagjaihoz taxonómiailag igen közel állnak a szintén a közelmúltban leírt és érdekes módon külön nemzetségként elfogadott *Parapedobacter koreensis* és *Pseudosphingobacter domesticum* fajok.

A fent bemutatott eredmények alapján, eddig ismeretlen, új fajként leírható TBF2/20.2 törzs, *Olivibacter sp. nov.* utalva szénhidrogén bontó képességére az *Olivibacter oleidegradans* elnevezést kapta.

4.3.4. Az új baktériumfaj (*Olivibacter oleidegradans*) bemutatása

Olivibacter oleidegradans [o.le.i.de.gra'dans., L. n. *oleum* oil; L. part. adj. *degradans* visszaalakítja az eredeti formára, utalva a típustörzs bontó (degradáló) képességére; N.L. part. adj. *oleidegradans* olaj (szénhidrogének) bontásra képes].

A törzs sejtjei Gram negatív, aerob, nem motilis, végükön lekerekített pálcikák, amelyek flagellumokkal nem rendelkeznek és spórát nem képeznek. Méretük kb. 0,6 × 1,8-2,0 μm. R2A agaron a kör alakú, konvex telepek sima felszínűek és nem lumineszkálnak. 5 napos 30 ºC-os inkubáció alatt átlátszatlan sárgás színű telepeket képeznek. A törzs jól növekedik TGE, TSA és nutrient agarokon, ezzel szemben MacConkey agaron nem szaporodik. Vizsgálataink alapján 15-45 ºC-os hőmérsékleten és pH 6.0-9.0 kémhatás mellett is szaporodóképes, az optimális növekedési hőmérséklet: 30-37ºC pH: 6,5–7,0. Már 2%-os NaCl koncentráció is gátolja a növekedését. Az

enzimatikus tesztek közül mind az oxidáz mind a kataláz teszt pozitív eredményt adott. Pozitív enzimaktivitási eredményeket kaptunk savas foszfatáz, alkalikus foszfatáz, leucin arilamidáz, valin-arilamidáz, naftol-AS-BI-foszfohidroláz, *β*-galaktozidáz, *α*-glükozidáz, *β*-glükozidáz, *α*-mannozidáz és *N*-acetil-*β*-glükózaminidáz esetében. Vizsgálataink alapján amigdalin, arbutin, D-adonitol, D-arabinóz, D-cellobióz, D-fruktóz, D-glükóz, D-laktóz, D-lixóz, D-maltóz, D-mannóz, D-melezitóz, D-melibióz, D-raffinóz, D-ribóz, D-szaharóz, D-trehalóz, D-turanóz, eszkulin, L-arabinóz, L-rhamnóz, methyl-*α*D-glükopiranozid, metil-*α*D-mannopiranozid, *N*-acetil-glükózamin, szalicin asszimilációra képes a mikroba. Negatív reakciókat regisztráltunk zselatin hidrolízis, ureáz, tween hidrolízis, leucin arilamidáz, észteráz (C4), észteráz lipáz (C8), β-glükuronidáz, *α*-fukozidáz enzimek esetében, valamint az adipinát, malonát, kaprin sav, citrát, 3-hidroxibenzoát, 4-hidroxibenzoát, 3-hidroxibutyrát, D-arabitol, D-fukóz, D-mannitol, D-szorbitol, D-tagatóz, dulcitol, erithriol, fenilacetát, gentibióz, glicerol, glikogén, inozitol, itaconát, laktát, L-alanin, L-fukóz, L-hisztidin, L-prolin, L-szerin, L-szorbóz, L-xilóz, 2-keto-D-glükonát, kálium 5-ketoglükonát, L-prolin, propionát, szuberát, valerát és xilitol asszimiláció, valamint N-acetyl-β-glükózaminidáz, napfhol-AS-BI-phosphohidroláz, savas foszfatáz, alkalin foszfatáz, cisztin arilamidáz, α-glükozidáz, β-glücozidáz, α-galaktozidáz, β-galaktozidáz, α-mannozidáz, leucin arilamidáz, szalicin, valin-arilamidáz esetében. A domináns zsírsavak a nemzetség többi tagjához hasonlóan az iso-$C_{15:0}$, főkomponens 4 (iso-$C_{15:0}$ 2-OH és/vagy $C_{16:1}$ ω7c), iso-$C_{17:0}$ 3-OH , valamint a $C_{16:0}$ voltak. Szintén a nemzetségre jellemzően a Menaquinon 7 (MK-7) komponens fordult elő legnagyobb mennyiségben (98%) a respiratórikus kinonok közül, emellett 2%-os mennyiségben MK-6-ot is kimutattunk. A poláros lipidek közül foszfatidiletanolamint (PE), aminofoszfolipideket (PN1-PN2), foszfolipideket (PL1-PL3), lipideket (L1-L4) és egy atipusos glikolipidet (GL1) mutattunk ki.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (IV. tézis, 4.3 fejezet eredményei alapján): A szénhidrogénekkel szennyezett területekről izolált mikrobák közül a TBF2/20.2 jelű törzs új, a tudomány számára ismeretlen faj, amely az *Olivibacter* nemzetség tagja. Elvégeztük az új faj nemzetközi követelményeknek megfelelő leírását, melynek az *Olivibacter oleidegradans* nevet adtuk, utalva olajbontó képességére.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (V. tézis, 4.2. és 4.3 fejezet eredményei alapján): A gravimetriás mérések és gázkromatográfiás vizsgálattal nyomon követett bontási (biodegradációs) kísérlet alapján elsőként igazoltunk az *in vitro* szénhidrogén bontó képességet környezeti mintán az *Olivibacter* nemzetség esetében.

Fenti eredményeinket nemzetközi publikációban adtuk közre (Szabó et al, 2011).

5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

Dolgozatom bevezetésében három célkitűzést jelöltünk meg. Egyrészt szénhidrogénekkel szennyezett helyszínek mikrobiológiai diverzitását kívántuk vizsgálni három, magyarországi, kárhely esetében. **Következtetéseinket e három helyszín fent bemutatott időpontjaiban és területein vételezett talajvíz minták alapján, az általunk alkalmazott módszerek eredményeképpen vontuk le a bakteriális közösségre vonatkozóan.** A vizsgált szennyezett helyszíneken több alkalommal (minimum háromszor) biológiai és geokémiai mintavételezést végeztünk annak érdekében, hogy meghatározzuk, hogy a szennyezés mennyiben változtatja meg a vizsgált területek mikrobiológiai diverzitását. Vizsgálatainkban nem kizárólag a szennyezett területrészről származó, hanem a szennyezett kárhely kémiai analitikai, valamint talajvíz áramlási szempontból is háttérnek számító területéről is mintákat vettünk és a szennyezett talajvízmintákhoz hasonlóan értékrltük azokat. A háttér és a szennyezett minták TPH és BTEX szennyezettségi és az *Aliivibrio fischeri* célszervezetet alkalmazó toxikológiai vizsgálat EC_{50} értékeinek elemzése alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált területek talajvizeinek szennyezettsége és mikrobiológiai toxicitása között szignifikáns, egyenes arányú összefüggés áll fenn. Fentiek alapján **elsőként sikerült igazolnunk ilyen matematikai összefüggést kémiai analitikai (TPH és BTEX) és toxikológiai eredmények között azonos területről származó szennyezett és háttér minták esetében**.

A toxikológiai és kémiai analitikai eredmények alapján azt feltételeztük, hogy a szennyezett területek diverzitását is nagymértékben befolyásolja a minták szennyezettsége. Ennek megfelelően a toxikológiai vizsgálatokkal egy időben vett szennyezett és háttér minták diverzitását molekuláris biológiai alapú, T-RFLP módszerével (genetikai ujjlenyomat) értékeltük. A T-RFLP eredményeket több típusú statisztikai elemzéssel (Man Whitney U, klaszter analízis) elemezve úgy találtuk, hogy a három hazai kárhelyen vett mintáink esetében nincs szignifikáns összefüggés a minták T-RF-ekre (mint OTU-ra) alapozott mikrobiális közösségének diverzitása és a szennyezettség mértéke között, sőt sok esetben az azonos területek eltérő időpontban vett mintáinak T-RFLP képe is lényegesen eltér egymástól. Vagyis **a három hazai kárhelyről származó háttér és szennyezett talajvíz minták molekuláris biológiai elemzése alapján a szennyezettség nem befolyásolja szignifikáns mértékben azok mikrobiológiai összetételét és genetikai sokféleségét (diverzitását).**

E megállapításunk ellenére második célkitűzésünknek megfelelően a T-RFLP-k alapján keresetünk olyan fragmenteket, amelyek csak a szennyezett, illetve csak a háttér mintákra jellemzőek. Célunk az volt, hogy megjelöljük azokat a fragmenteket, amelyek megjelenése köthető bizonyos típusú (szennyezett, illetve háttér) mintákhoz, vagyis biomarkerként alkalmazhatóak. A vizsgálathoz csak azokat a fragmenteket vettük figyelembe, amelyek a vizsgált három helyszín és mintázási időpontok mindegyikén a talajvízminták legalább 25%-ánál kimutathatók voltak.

Eredményeink alapján a három kárhely szennyezett és háttér részterületeiről származó talajvíz minták elemzése alapján T-RFLP fragmentek közül kettő, a 123-as és a 202-es mutatott elfogadható szintű pontosságot a szennyezettség előrejelzéséhez. E két fragment a szennyezettség szempontjai alapján magas specifitással és alacsony szenzitivitással rendelkezett. Ez alapján nagy valószínűséggel kevés álpozitív, ugyanakkor viszonylag alacsony szenzitivitásuk alapján túlzottan sok álnegatív eredményt adnak. A biomarker keresés eredményei alapján tehát következtetésként megállapítható, hogy statisztikailag kijelölhetők olyan fragmentek, amelyek jelenléte információt adhat a minta szennyezettségéről. Várhatóan **a szennyezett területeken általunk elsőként alkalmazott biomarker keresés a továbbiakban több mintavételi helyszín eredményei alapján vezethet olyan T-RFLP fragmentekhez, amelyek az általunk találtakhoz hasonlóan magas specifitással és nagyobb szenzitivitással rendelkeznek.** Ebben a témában tehát szélesebb körben vett mintavételezés eredményei alapján további módszerfejlesztés javasolható.

A T-RFLP elemzés és a biomarker keresés eredményei alapján úgy gondoltuk, hogy lényeges az általunk talált fragmentek taxonómiai identifikációja, annak érdekében, hogy meghatározzuk milyen mikroszervezetek dominálnak a vizsgált területeken. Ennek érdekében, kiindulva a talajvizekből izolált közösségi 16S rDNS-ből 7 minta esetében klónkönyvtárakat készítettünk. Várakozásunk ellenére a biomarker vizsgálatban megtalált fragmentek azonosítása nem sikerült, de az elemzés alapján a közösségalkotó mikrobákról további ismereteket szerezhettünk. Eredményeink alapján, mind a kárhelyeken vett szennyezett, mind a háttér mintákban jelen vannak olyan baktériumok, amelyek az irodalmi adatok alapján képesek az olajszármazékok bontására, előfordulásukat valószínűsíthetően mégsem a szennyező anyagok minősége, koncentrációja határozza meg elsődlegesen, hanem más környezeti tényezők, akár önmagukban, akár kölcsönhatásban egymással és a szennyezettség összetételével. Irodalmi adatok alapján úgy gondoljuk, hogy a környezeti tényezők közül kiemelkedő jelentősége lehet a közeg oxigén ellátottságának (Fahy et al, 2006; Alfreider & Vogt, 2007; Aburto et al, 2009).

A dolgozat harmadik célkitűzésének eleget téve 7 hazai, szénhidrogénekkel szennyezett kárhelyről szénhidrogén komponensek bontására alkalmas baktériumokat izoláltunk, amelyek bontó képességük alapján okszerűen felhasználhatók lehetnek akár az említett monitoring helyszíneken. A szennyezett területekről 47 törzset különítettünk el klasszikus mikrobiológiai (tenyésztéses) módszerekkel, szelekciós táptalajt alkalmazva (egyedüli szénforrás gázolaj, kőolaj keverék). Gravimetriás vizsgálataink és akkreditált kémiai analitikai eredményekkel alátámasztott bontási kísérleteink alapján 6 mikroba törzs bizonyult *in vitro* alkalmasnak szénhidrogén bontásra. Ezek közül a TBF2/20.2 *Olivibacter oleidegradans sp. nov.*, a ZFM 23.1, *Rhodococcus erythropolis*, illetve a 4S-8 *Rhodococcus ruber* törzsek esetében a bontási képességet szennyezett területről származó talajvízmintán (bontási kísérlet) is igazoltuk (18. sz. táblázat).

18. számú táblázat A szénhidrogénekkel szennyezett hazai helyszínekről újonnan izolált szénhidrogén bontó mikrobák 16S rDNS identifikációjának eredménye és a gravimetriás, valamint környezeti mintán végzett bontási kísérlet alapján megállapított bontási százalékok, összehasonlítva a kísérletben alkalmazott kezeletlen kontrtoll mintákkal.

Minta jele	Identifikáció eredménye (NCBI GenBank, leBibi)	Gravimetria	Bontási kísérlet
		bontási %	
TBF2/20.1	*Acinetobacter rhizosphaerae*	64,62	n/a
TBF2/20.2	*Olivibacter sp. nov.*	21,09	76,60
ZFM 23.1	*Rhodococcus erythropolis*	47,94	74,15
SZM5/4.2	*Pseudomonas mandelii*	44,94	n/a
OM 7-2	*Rhodococcus erythropolis*	31,15	n/a
4S-8	*Rhodococcus ruber*	33,10	77,90

Az újonnan izolált törzsek faji szintű besorolását 16S rDNS alapú vizsgálatokkal Tindall et al, 2010 előírásait követve végeztük. A bontó törzsek identifikációjának eredménye, hogy az izolált **TBF2/20.2 jelzésű törzs az *Olivibacter* nemzetség eddig nem ismert képviselője. Az új mikroba a fajleíráshoz szükséges vizsgálatok elvégzése után az *Olivibacter oleidegradans* nevet kapta, utalva szénhidrogén bontó képességére. Ez egyben az *Olivibacter* nemzetség szénhidrogén bontó képességének is első tudományos igazolása.**

Munkánk eredményei alapján javasoljuk:

- A T-RFLP alapú biomarker keresés további folytatását olyan fragmentekre fókuszálva, amelyek nagy mértékű specifitásuk és szenzitvitásuk alapján jelezhetik szénhidrogén szennyezések megjelenését.
- A fent említett biomarkerek megjelölése után azok identifikációját molekuláris biológiai alapon, így faji szinten is meghatározható lenne, hogy mely taxonok jelennek meg és/vagy tűnnek el ilyen szennyezések hatására.
- Az izolált bontó törzsek T-RFLP képének meghatározását a bioaugmentációt megelőzően, olyan genetikai marker alkalmazását, amellyel nyomon követhető az inokuláló törzs mennyiségi, életképességi változása a kezelt terület mikroba közösségében (pl. RNS alapú T-RFLP vizsgálatok).
- A szénhidrogén bontó mikrobák környezeti tényezőkkel szembeni érzékenységének és fermentálhatóságának vizsgálatát a bioaugmentációs célnak megfelelően
- Bioaugmentáció kivitelezését a monitoring tevékenységgel érintett területeken alapozva az újonnan izolált bontó mikrobákra.
- A szénhidrogén bontó képesség vizsgálatát az *Olivibacter* nemzetség további tagjainak esetében. Az *Olivibacter oleidegradans* bontási képességének, enzim rendszerének feltérképezése genetikai/molekuláris biológiai vizsgálatokkal. *Olivibacter* specifikus primer tervezése a gyors identifikáció érdekében.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánkkal kapcsolatban az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. Szénhidrogénekkel szenyezett hazai területekről származó talajvíz minták esetében statisztikai módszerekkel vizsgálni kívántuk, hogy a szennyezés mennyiben változtatja meg a bakteriális közösség diverzitását, faji összetételét.
2. Molekuláris biológiai módszerek segítségével (T-RFLP, klónkönyvtár) olyan közösség alkotókat kerestünk, amelyek ugyanazon területről származó szennyezett és háttér mintákra jellemzőek, vagyis a környezetvédelmi gyakorlat számára a jövőben ún. biomarkerként alkalmazhatók.
3. A dolgozat második részében célunk olyan szénhidrogén bontó baktériumok izolálása volt, amelyek szintén szennyezett területekről származnak és igazolt bontási tulajdonságaik alapján okszerűen felhasználhatók lehetnek bioaugmentációban, akár az első részben bemutatott monitoring helyszíneken.

Első két célkitűzésem elérése érdekében 3 hazai, szénhidrogénekkel szennyezett területen, három éven át (2006-2008) biológiai és geokémiai monitoring rendszert működtettünk. Következtetéseinket e három helyszín egymástól eltérő időpontjaiban és fent bemutatott háttér és szennyezett területein vételezett talajvíz minták többcélú elemzése alapján vontuk le a bakteriális közösségre vonatkozóan. A három helyszínről származó, talajvízminták TPH és BTEX vizsgálati eredményeit a minták *Aliivibrio fischeri* alapú toxikológiai eredményeivel összefüggésben statisztikai módszerekkel elemeztük. **A statisztikai módszerekkel a TPH és BTEX szennyezettségi és az *Aliivibrio fischeri* célszervezetet alkalmazó toxikológiai vizsgálat EC_{50} értékeinek elemzése alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált területek talajvizeinek szennyezettsége toxicitása között szignifikáns, egyenes arányú összefüggés áll fenn**. Ezek alapján feltételeztük, hogy ez az összefüggés a bakteriális diverzitásban, illetve a közösség alkotó mikrobák összetételében is nyomon követhető. Feltételezéseinket molekuláris biológiai módszereken alapuló rendszer eredményei és ezeknek több módszerrel kivitelezett statisztikai elemzései (Man Whitney U, klaszter analízis) mintáink esetében (n=31) nem igazolták. **Eredményeink alapján a vizsgált szennyezett területek talajvizeinek diverzitását, valamint a közösség összetételét nem a mintázott közeg szennyezettsége alakítja döntően a vizsgált helyszíneken.** Ehhez hasonlóan a vizsgált területeken a T-RFLP vizsgálatok alapján nem mutattunk ki olyan biomarkereket, amelyek egyértelműen és kizárólagosan egy típusú (szennyezett vagy háttér) mintákra jellemzőek.

Harmadik célkitűzésünknek megfelelően 7 hazai helyszín szénhidrogén származékokkal szennyezett közegeiből 47 baktérium törzset izoláltunk. A 47 mikroszervezetből 6 mutatot

biodegradációs képességet olajszármazékok esetében. E hat törzs közül egy a szakirodalmi adatok alapján fakultatív patogén baktériumnak bizonyult, amely korházi eredetű (nozokomiális) fertőzésekért felelős, így a további vizsgálatokból kizártuk, hiszen ez a törzs a későbbiekben bioaugmentációban nem használható fel. A maradék öt törzs esetében gravimertiás és GC alapú kémiai analitikai vizsgálatok eredményei alapján igazoltuk a szénhidrogén (TPH) bontó képsségét. Egy esetében olyan baktérium törzset izoláltunk, amely a molekuláris biológiai és egyéb vizsgálatok eredménye alapján egy **eddig ismeretlen, új baktérium faj. A faj leírását elvégeztük és annak - utalva a törzs szénhidrogén bontási képességére - az *Olivibacter oleidegradans* nevet adtuk.**

Munkánk eredményeként valamennyi célkitűzésünk teljesült és a beállított kísérletekből több, új tudományos eredmény is született, amelyeket öt tézis formájában összegeztünk.

7. ENGLISH SUMMARY

Three objectives were formulated in this PhD dissertation:

1. A statistical examination of the changes in a bacterial community and its diversity caused by hydrocarbon contaminations in polluted groundwater samples from Hungarian sites.
2. Operational taxonomic units (OTUs) based on moelcular biological methods (T-RFLPs and clone libraries) that exclusively mark pollution in groundwater were looked for that could be used as biomarkers of contaminated or uncontaminated groundwater in environmental practice.
3. The isolation and identification of new hydrocarbon degrading bacterial strains from contaminated sites that are able to be used in bioaugmentation processes. Verification of hydrocarbon degradation ability of the isolated strains.

For the first and second objectives biological and geochemical monitoring was performed in three Hungarian hydrocarbon contaminated sites between 2006 and 2008. Results about the bacterial community were established by the outcomes of several different analyses that were fulfilled with the samples from contaminated and background (by the results of pollutant concentration and groundwater flow) groundwater monitoring wells from these sites. Samples were taken on different dates during the monitoring for the examination. Altogether 31 groundwater samples were taken from these sites. In the first step the concentration of total petrol hydrocarbons (TPH), the BTEX concentration and *Aliivibrio fischeri* toxicological results were compared by statistical methods. **From the results of statistical analyses, significant coherence was verified between the toxicity of the samples and the measured concentration of pollutants (n=31).** Based on these results it was thought that this kind of coherency should be the same between the contamination rate and the bacterial diversity or the composition of the community in the samples. Examination of the bacterial diversity and community of the groundwater samples were based on molecular microbiological methods (T-RFLP and clone libraries). By the outcomes of statistical assays (Man Whitney U test, cluster analyzis) the hypothesis was not verified. In particular there was not any significant coherency between the contamination rates and results of the molecular microbiological methods (T-RFLP, clone libraries). **According to the analysis of the 31 groundwater samples from the Hungarian hydrocarbon contaminated sites it can be said that there is no significant relationship between the bacterial diversity or the composition of the community and the measured values of the BTEX and TPH contaminants**. T-RFLP biomarkers that are able to exclusively mark the samples with the same pollution conditions (contaminated or background) was not found.

For the third objective, different samples were taken from seven from oil polluted Hungarian sites. Forty-seven bacterial strains were isolated from these samples. Biodegrading ability of hydrocarbons was verified by gravimetrical methods in six strains of the 47. These six strains were identified by genetical methods (16S rDNA sequencing). From the results of the identification one of these oil degraders was found to be a facultetive pathogen microbe which causes nosocomial infections and therefore cannot be used in environmental clean-up (bioaugmentation). In the case of the remaining five microbes, hydrocarbon (TPH) degrading ability was also verified with *in vitro* examination in groundwater samples from a diesel oil contaminated sample by gas-chromatographic analysis. According to the results of genetical and phenotipical examinations, one of the isolated bacteria was **identified as an unknown bacterium species**. Detailed description of the new species was done and it was named (because of its oil degrading ability) ***Olivibacter oleidegradans*.**

In the Ph.D. dissertation three objectives were drawn and achieved. The work yielded several new scientific results which were discussed in five theses.

8. IRODALOMJEGYZÉK

201/2001. (X. 25.) Kormányrendelet az ivóvíz minőségi követelményeiről és az ellenőrzés rendjéről

219/2004. (VII. 21.) Kormányrendelet a felszín alatti vizek védelméről

6/2009. (IV. 14.) „A földtani közeg és a felszín alatti víz szennyezéssel szembeni védelméhez szükséges határértékekről és a szennyezések méréséről” című KvVM-EüM-FVM együttes rendelet

Aburto, A., Fahy, A., Coulon, A. F., Lethbridge, G., Timmis, K. N., Ball, A. S., McGenity, T.J. (2009) Mixed aerobic and anaerobic microbial communities in benzene-contaminated groundwater. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 317-328 p.

Aislabie J., Saul D. J., Foght, J. M. (2006): Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils, Extremophiles, 10, 171-179

Alexander, M. (1997). *Introduction to soil microbiology* (2nd ed.). New York: Wiley

Alfreider A., Vogt C. (2007): Bacterial diversity and aerobic biodegradation potential in a BTEX-contaminated aquifer. *Water, air and soil pollution*, 183, 415-426

Alfreider, A., Vogt, C., Babel, W. (2002) Microbial diversity in an in situ reactor system treating monochlorobenzene contaminated groundwater as revealed by 16S ribosomal DNA analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 25, 232-240.

Al-Mutairi, N., Bufarsan, A., Al-Rukaibi, F. (2008): Ecorisk evaluation and treatability potential of soils contaminated with petroleum hydrocarbon-based fuels. *Chemosphere*, 2008, 142-148 p.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J., (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402. p.

Anton, A., Borián, Gy., Forgács, J., Horváth, Zs., Lukács, L., Lelik, Zs. (2006): Környezettechnika II, VITUKI Kht, Budapest, 98-99, 260 p.

Arai, H., Akahira, S., Ohishi, T., Maeda, M., Kudo, T. (1998) Adaptation of *Comamonas testosteroni* TA441 to utilize phenol: organization and regulation of the genes involved in phenol degradation. *Microbiology*, 144, 2895-2903.

Atlas, R. M. (1981): Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 45, 180-209

Atzél, B. (2008) Bioaugmentációs eljárások biológiai monitoringja. Szent István Egyetem, Gödöllő, PhD dolgozat.

Baker, G. C., Smith J. J., Cowan D. A., (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbioogical Methods* 55, 541-55.

Bánfalvi, G. (1996): Molekuláris biológia, József Attila Tudományegyetem, Természettudományi Kar, JATEPress, Szeged, 340-348, 351-355, 358-363, 374-375, 376 p.

Barótfi, I. (2000) Környezettechnika, Mezőgazda Kiadó, Budapest, 571-588 p.

Barrow, G. I., Feltham R. K. A. (1993) Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press, Cambridge

Bedard, D. L., (2003): Polychlorinated biphenyls in aquatic sediments: environmental fate and outlook for biological treatment. In: HÄGGBLOM, M. M. & BOSSERT, I.D.: *Dehalogenation: Microbiological Processes and Environmental Applications*. Kluwer Academic Publishers, Boston

Blaise, C., Gagné F., Chèvre N., Harwood,M., Lee, K., Lappalainen, J., Chial, B., Persoone, G., Doe, K. (2004): Toxicity assessment of oil-contaminated freshwater sediments, Environmental Toxicology, 19, 267-273 p.

Bordás I. in: Tompa, A (2005): Kémiai biztonság és toxikológia, Medicina Könyvkiadó, Budapest

Bordenave, S., Goñi-Urriza, S. M., Caumette, P., Duran, R. (2007): Effects of Heavy Fuel Oil on the Bacterial Community Structure of a Pristine Microbial Mat. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6089–6097 p.

Boross L., Sajgó M. (1993): A biokémia alapjai, Mezőgazda kiadó, Budapest, 13 p.

Borràs, E., Caminal, G., Sarrà, M., Novotný, C. (2010): Effect of soil bacteria on the ability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)removal by Trametes versicolor and Irpex lacteus from contaminated soil. *Soil Biology & Biochemistry* 42, 2087-2093 p.

Bozzola, J. J. & Russell, L. D. (1991): Electron microscopy, Jones and Bartlett Publishers, New York

Breuer H. (1995): SH Atlasz, Kémia, Springer Hungarica Kiadó, Budapest 298-329. p.

British Petrol (2010): Statistical Review of World Energy, 2010 June, BP – British Petrol, www.bp.com/statisticalreview

Brohon, B., Delolme, C., Gourdon, R. (2001). Complementarity of bioassays and microbial activity measurements for the evaluation of hydrocarbon contaminated soils quality. *Soil Biology & Biochemistry* 33, 883–891 p.

Brookes, P. C. (1995). The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soils* 19, 269–279 p.

Buck, J. D. (1982). Nonstaining (KOH) method for determination of Gram reactions of marine bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 44, 992–993.

Callow, P. (1993): Handbook of Ecotoxicology, Blackwell Science Ltd.

Cashion, P., Holder-Franklin, M. A., McCully, J., Franklin, M. (1977). A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. *Analitical Biochemistry* 81, 461–466.

Chaineau, C. H., Morel, J. L., Oudot J. (1996): Land treatment of oil-based drill cuttings in an agricultural soil. *Journal of Environmental Quality* 25, 858-867.

Chapman, P. M. (1996). Presentation and interpretation of sediment quality triad data. *Ecotoxicology* 5, 327–339.

Chun, J., Lee, J. H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K. & Lim, Y. W. (2007): EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 2259-2261.

Coates, J. D., Chakraborty, R., Lack, J. G., O'Connor, S. M., Cole, K. A., Bender, K. S., Achenbach, L. A. (2001) Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*. *Nature* 411, 1039-1043.

Coates, J. D., Ellis, D. J., Gaw, C. V., Lovley, D. R. (1999) *Geothrix fermentans* gen. nov., sp. nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 1615-1622.

Dési, I. (2001): Népegészségtan, Semmelweis Kiadó, Budapest, 273-284., 323-367., 399-402., 421-450. p.

Devulder, G., Perrière, G., Baty, F., Flandrois, J. P. (2003): BIBI, a Bioinformatics Bacterial Identification Tool, *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 1785-1787 p.

Díaz E. (Ed.) (2008): Microbial degradation - Genomics and molecular biology, Caister Academic Press, Norfolk, UK

Dibblef, J. T., Bartha, R. (1979): Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludget, *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 729-739 p.

Dura, Gy. (2005): Környezet egészségtani jegyzetek, Fodor József Országos Közegészségügyi Központ Országos Környezetegészségügyi Intézete, 208p., 115-136.p.

Dura, Gy., Gruiz, K. (2001): Ökotoxikológiai vizsgálat és a környezeti kockázat felmérése, Kármentesítési kézikönyv 3., Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium, Budapest

Emerson, D., Rentz, J. A., Plaia, T. (2011) *Sideroxydans lithotrophicus*, gen. nov., sp. nov. and *Gallionella capsiferriformans* sp. nov., oxygen-dependent ferrous iron-oxidizing bacteria that grow at circumneutral pH. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* In press.

Euzéby, J. P. (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 590–592. http://www.bacterio.net

Fahy A., Lethbridge G., Earle R., Ball A. S., Timmis K. N., McGenity T. J. (2005) Effects of long-term benzene pollution on bacterial diversity and community structure in groundwater. *Environmental Microbiology* 7, 1192–1199 p.

Fahy, A., Ball, A. S., Lethbridge, G., Timmis, K. N., McGenity, T. J. (2008) Isolation of alkali-tolerant benzene-degrading bacteria from a contaminated aquifer. Lett. Appl. Microbiol. 47, 60-66.

Fahy, A., McGenity T. J., Timmis K. N., Ball A. S. (2006) Heterogeneous aerobic benzene-degrading communities in oxygen-depleted groundwaters. *FEMS Microbiology Letters* 58, 260-270 p.

Fischer E. (1997): A funkcionális sejttan alapjai, Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs, 177 p., 75-76 p.

Gilli, G., Schiliro, T., Pignata, C., Traversi, D., Carraro, E., Baiocchi, C., Aigotti, R., Giacosa, D., Fea, E. (2005) Application of semipermeable membrane device for assessing toxicity in drinking water. *Chemosphere*, 61, 1691-1699 p.

Goldstein, M. G., Mallory, L. M. & Alexander, M. (1985): Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 977-983. p.

Gruiz K., Horváth, B., Molnár, M. (2001): Környezettoxikológia, Vegyi anyagok hatása az ökoszisztémára, Műegyetemi Kiadó, 7-24., 35-46, 96-101 p.

Hancsók, J., (2004): Korszerű motor és sugárhajtómű üzemanyagok – III. alternatív motorhajtóanyagok, Veszprémi Egyetemi Kiadó, Veszprém, 22 p.

Hazen, T. C., Dubinsky, E. A., De Santis, T. Z., Andersen, G. L., Piceno, Y. M., Singh, N., Jansson, J. K., Probst, A., Borglin, S. E., Fortney, J. L., Stringfellow, W. T., Bill, B., Conrad, S. M., Tom, L. M., Chavarria, K. L., Alusi, T. R., Lamendella, R., Joyner, C. D., Spier, C., Baelum, J., Auer, M., Zemla, M. L., Chakraborty, R., Sonnenthal, E. L., D'Haeseleer, P., Holman, H. N., Osman, S. Lu, Zhenmei, Van Nostrand, J. D., Deng, Y., Zhou, J., Mason, O. M. (2010): Deep-Sea Oil Plume Enriches Indigenous Oil-Degrading Bacteria, *Science*: 330, 6001, 204-208

Heszky, L., Fésűs, L., Hornok, L. (2005): Mezőgazdasági Biotechnológia, Agroinform Kiadó, Budapest, 37-38.p., 44-45.p., 241-247.p.

Holliger, C., Hahn, D., Harmsen, H., Ludwig, W., Schumacher, W., Tindall, B., Vazquez, F., Weiss, N., Zehnder, A.J. (1998) Dehalobacter restrictus gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloroethene in an anerobic respiration. *Archives of Microbiology* 169, 313-321.

Hubálek, T., Vosáhlová, S., Matêjů, V., Kováčová C., Novotný C. (2007): Ecotoxicity Monitoring of Hydrocarbon-Contaminated Soil During Bioremediation: A Case Study. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52, 1-7

Juhász, Á (2010): in Magyar kutatók a Mexikói-öböl olajfaló baktériumairól, Magyar Televízió, Ma reggel, 2010. augusztus 26.

Kämpfer, P. & Kroppenstedt, R. M. (1996). Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Canadian Journal of Microbiology* 42, 989-1005 p.

Kanaly, R.A., Harayama, S. and Watanabe, K. (2002) *Rhodanobacter* sp. strain BPC1 in a benzo[a]pyrene-mineralizing bacterial consortium. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5826-5833.

Kanamori, T., Rashid, N., Morikawa, M., Atomi, H., Imanaka, T. (2002) *Oleomonas sagaranensis* gen. nov., sp. nov., represents a novel genus in the alpha-Proteeobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 210, 255-261.

Katsivela, E., Moore, E. R. B. and Kalogerakis, N. (2008): Biodegradation of Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons: Specificity among Bacteria Isolated from Refinery Waste Sludge *Water, Air, & Soil Pollution: Focus*, 3, 103-115

Kim D., Kim Y. S., Kim, S. K., Kim S. W., Zylstra G. J., Kim Y. M. and Kim E (2002): Monocyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by *Rhodococcus* sp. Strain DK17. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3270-3278.

Kimura, M. (1983). The Neutral Theory of Molecular Evolution. Cambridge: Cambridge University Press.

Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., Palladino, M. A. (2009): Concepts of Genetics, ninth edition, Pearson International Edition, 8 p., 255-260.p., 272-273.p., 323-326 p., 328 p., 332-333.p., 341-342.p, 764 p.

Korda, A., Santas, P., Tenete A., Santas R. (1997): Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, 677-686.

Kuykendall, L. D., Roy, M. A., O'Neill, J. J. & Devine, T. E. (1988): Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradorhizobium japonicum*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38, 358-361.

Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. in Nucleic Acid Techniques In: Bacterial Systematics, eds Stackebrandt E, Goodfellow M (Wiley, New York), 115-175 p.

Láng, I. (szerk.) (2002): Környezet- és természetvédelmi lexikon, Akadémiai kiadó, Budapest, 125-126, 138, 163, 182-183, 259, 523, 539, 656 p.

Latha, K., Lalithakumari, D. (2001): Transfer and expression of a hydrocarbon-degrading plasmid pHCL from *Pseudomonas putida* to marine bacteria, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 523-528 p.

Leahy, J. G., Colwell, R. R. (1990): Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*: 54, 305-315. p.

Lee, E. H., Kim, J., Cho, K. S., Ahn, Y. G., Hwang G. S. (2010) Degradation of hexane and other recalcitrant hydrocarbons by a novel isolate, *Rhodococcus* sp. EH831. *Environmental Science and Pollution Research* 17, 64-77

Leitgib, L., Kálmán, J., & Gruiz, K. (2007). Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites. *Chemosphere*, 66, 428–434 p.

Li, H., Boufadel, M. C. (2010): Long-term persistence of oil from the *Exxon Valdez* spill in two-layer beaches. *Nature Geoscience* 3, 96 - 99 p.

Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., Forney, L. J. (1997): Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4516-4522 p.

Maier, R. M. (2000): Microorganisms and organic pollutants. In: Maier, R. M., I. L. Pepper and Ch. P. Gerba: Environmental Microbiology. Academic Press, New York, 624 p., 363-402 p.

Maila, M. P., Randima, P., Surridge K., Drřnen K., Cloete, T. E. (2005) Evaluation of microbial diversity of different soil layers at a contaminated diesel site. International Biodeterioration and Biodegradation 55, 39–44

Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., Naidu R. (2008): The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environment International*, 34, 265–276

Margesin, R., Schinner, F. (2001): Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an Alpine glacier skiing area. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3127-3133 p.

Margesin, R., Walder, G., & Schinner, F. (2000). The impact of hydrocarbon remediation (diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbons) on enzyme activities and microbial properties of soil. *Acta Biotechnologica*, 20, 313–333 p.

Markó L. (2005): Szerves Kémia I., Veszprémi Egyetem, egyetemi jegyzet

Marsh, T. L. (1999): Terminal restriction fragment lenght polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products, *Current opinion in Microbiology*, 2, 323-327.p.

Mesbah, M., Premachandran, U., Whitman, W. B. (1989). Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by highperformance liquid chromatography. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39, 159–167.

Miller, L.T. (1982): A single derivatization method for bacterial fatty acid methyl esters including hydroxy acids. *Journal of Clinical Microbiology* 16, 584-586.

Minnikin, D. E., Collins, M. D. Goodfellow, M. (1979): Fatty acid and polar lipid composition in the classification of *Cellulomonas, Oerskovia* and related taxa. *Journal of Applied Bacteriology* 47, 87-95. p.

Moeseneder, M. M., Arrieta, J. M., Muyzer, G., Winter, C., Herndl, G. J. (1999): Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3518-3525.p.

Nádor K., (1982): Kémia, Mezőgazdasági Kiadó Budapest, 61-63 p.

Nagy, J. (2000): Szerves kémia II. Műszaki Kiadó, Budapest, 91-93 p.

Németh T. (szerk) (2001): Kármentesítési kézikönyv 4. - Kármentesítési technológiák, Környezetvédelmi Minisztérium, Budapest, 17 p.

Ntougias, S., Fasseas, C. & Zervakis, G. I. (2007). Olivibacter sitiensis gen. nov., sp. nov., isolated from alkaline olive-oil mill wastes in the region of Sitia, Crete. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 398–404.

Nunan, N., Daniell, T. J., Singh, B. K., Papert, A., McNicol, J. W., Prosser, J. I. (2005): Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils, characterized using molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 6784-6792. p.

Nyer, E. K. (1993): Practical techniques for groundwater and soil remediation. Lewis Publishers, Boca Raton, Avn Arbor, London, Tokyo

Ocampo-Duque, W., Sierra J., Ferré-Huguet N., Schuhmacher M., Domingo J., L. (2008): Estimating the environmental impact of micro-pollutants in the low Ebro River (Spain): An approach based on screening toxicity with *Vibrio fischeri*. *Chemosphere*, 72, 715-721

O'Sullivan, L.A., Mahenthiralingam, E. (2005) Biotechnological potential within the genus *Burkholderia, Letters for Applied Microbiology* 41, 8-11.

Paisse, S., Coulon, F., Goñi-Urriza, M., Peperzak, L., McGenity, T. J., Duran, R. (2008): Structure of bacterial communities alonga hydrocarbon contamination gradient ina coastal sediment *FEMS Microbiology Ecology*, 66, 295-305

Parvez, S., Venkataraman, C., Mukherji, S. (2006): A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals, Environment International, 32, 265-268

Peix, A., Lang E., Verbarg S., Spröer C., Rivas R., Santa-Regina I., Mateos P. F., Martínez-Molina E., Rodríguez-Barrueco C., Velázquez E. (2009): *Acinetobacter* strains IH9 and OCI1, two rhizospheric phosphate solubilizing isolates able to promote plant growth, constitute a new genomovar of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 32, 334-341 p.

Pesti M., Bíró S., Hornok L., Kevei F., Kucsera J., Maráz A., Szűcs Gy., Vágvölgyi Cs. (2001): Általános mikrobiológia, Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs, 304, 67-69, 82, 83 p.

Płaza G. A., Nałęcz-Jawecki**,** G., Pinyakong O., Illmer, P., Margesin, R. (2009): Ecotoxicological and microbiological characterization of soils from heavy-metal- and hydrocarbon contaminated sites, *Environmental Monitoring and Assessment*, 163, 477-488

Płaza, G. A., Łukasik, K., Wypych, J., Nałęcz-Jawecki**,** G., Berry, C., Brigmon R. L. (2008): Biodegradation of Crude Oil and Distillation Products by Biosurfactant-Producing Bacteria, *Polish Journal of Environmental Studies*, 17, 87-94

Płaza, G. A., Nałęcz-Jawecki, G., Ulfig, K., & Brigmon, R. L. (2005). The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. *Chemosphere* 59, 289–296 p.

Rácz, L., Tölgyessy, Gy., Papp, L., Lesný Gy. (2002): Környezeti kémia – A környezet kémiája, analítikája és technológiája, EKF Líceum Kiadó, Eger, 221 p.

Renoux, A. Y., Tyagi, R. D., Roy, Y., & Samson, R. (1995). Ecotoxicological assessment of bioremediation of a petroleum-contaminated soil. In: R. E. Hinchee, F. J. Brockman, & C. M. Vogel (Eds.), Microbial processes for bioremediation, 259-264 p.

Révész, S., Sipos, R., Kende, A., Rikker, T., Romsics, C., Mészáros, É., Mohr, A., Táncsics, A., Márialigeti, K. (2006) Bacterial community changes in TCE biodegradation detected in microcosm experiments. *International Biodeterioriation and Biodegradation* 58, 239-247

Rodríguez-Martínez E. M., Pérez, E. X., Schadt, C. W., Zhou, J., Massol-Deyá, A. A. (2006) Microbial Diversity and Bioremediation of a Hydrocarbon-Contaminated Aquifer (Vega Baja, Puerto Rico). *Environmental Research and Public Health*, 3, 292-300

Rombke, J., Breure, A. M., Mulder, C., Rutgers, M. (2005). Legislation and ecological quality assessment of soil: Implementation of ecological indication systems in Europe. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, 201–210 p.

Rouf, M. A., Stokes, J. L. (1964): Morphology, nutrition and physiology of *Sphaerotilus discophorus*. *Archives of Microbiology* 49, 132-149 p.

Ryan, M. P., Pembroke, J. T., Adley, C. C. (2007) *Ralstonia pickettii* in environmental biotechnology: potential and applications. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 754-764 p.

Rzhetsky, A., Nei, M. (1992). A simple method for estimating and testing minimum evolution trees. *Molecular Biology and Evolution* 9, 945-967.

Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350-1354

Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406–425.

Salanitro, J. P., Dorn, P. B., Huesemann, M. H., Moore, K. O., Rhodes, I. A., Jackson, L. M., et al. (1997). Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environmental Science & Technology*, 31, 1769–1776.

Saterbak, A., Toy, R. J., Wong, D. C. L., McMain, B. J., Williams, M. P., Dorn, P. B., Louis P. Brzuzy, Eric Y. Chai, Joseph P. Salanitro (1999). Ecotoxicological and analytical assessment of hydrocarboncontaminated soils and application to ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 1591–1607 p.

Schütte, U. M. E., Abdo, Z., Bent, S. J., Shyu, C., Williams C. J., Pierson, J. D., Forney L. J. (2008) Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80, 365-380

Sipos, R., Székely, A. J., Palatinszky, M., Révész, S., Márialigeti, K., Nikolausz, M. (2007): Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targetting bacterial community analysis. *FEMS Microbiological Ecology* 60, 341-350.p.

Spring, S., Wagner, M., Schumann, P., Kampfer, P. (2005) *Malikia granosa* gen. nov., sp. nov., a novel polyhydroxyalkanoate- and polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge, and reclassification of *Pseudomonas spinosa* as *Malikia spinosa* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 621-629.

Stackebrandt, E. and Goebel, B. M. (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 Bacteriology* 44, 846–849.

Stokes, J. L., Johnson, A. H. (1965) Growth factor requirements of two strains of *Sphaerotilus discophorus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 31, 175-180.

Swofford, D. L. (1993). Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP), Version 3.1.1. University of Illinois, Champaign.

Szabó I. M. (1989). A bioszféra mikrobiológiája. Akadémiai Kiadó, Budapest: 1170-1171 p.

Szabó I. M. (2008): Az általános talajtan biológiai alapjai. Mundus Magyar Egyetemi Kiadó, Budapest

Szabó I., Szoboszlay, S., Kriszt, B., Háhn, J., Harkai P., Baka E., Táncsics, A., Kaszab, E., Privler, Z., Kukolya, J. (2011): *Olivibacter oleidegradans* sp. nov. hydrocarbon degrading strain isolated from a clean-up facility (biofilter) set up on a Hungarian hydrocarbon contaminated site first published on January 21, 2011 as doi: 10.1099/ijs.0.026641-0

Szeberényi J. (2004): Molekuláris sejtbiológia, Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs, 553 p., 33-38 p.

Szoboszlay S., Kriszt B. (2010): Környezeti elemek védelme, Szent István Egyetemi Kiadó, Gödöllő, 107 p. ,48-59, 81-89 p.

Szoboszlay, S., Solymosi, J. & Kriszt, B. (2002): The biodegradation of hydrocarbon compounds concerning to environmental safety *Academic and Applied Research in Military Science* 1, 103-106. p.

Tamaoka, J. and Komagata, K. (1984). Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiology Letters* 25, 125-128.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596-1599.

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

Thompson, D. J., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G.(1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25, 4876-4882.

Tindall B. J., Rosselló-Móra R., Busse H. J., Ludwig W., Kämpfer P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 249-66.

Tindall, B. J. (1990a). A comparative study of the lipid composition of *Halobacterium saccharovorum* from various sources. *Systematic and Applied Microbiology* 13, 128-130

Tindall, B. J. (1990b). Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiology Letters* 66, 199-202.

Tindall, B. J., Sikorski, J., Smibert , R. M., Kreig, N. R. (2007). Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. In: Methods for General and Molecular Microbiology 3rd edn. Pp. 330-393. Editors: C. A. Reddy, T. J. Beveridge, J. A. Breznak, G. Marzluf, T. M. Schmidt, L. R. Snyder ASM Press, Washington DC, USA

Tóth Á., Táncsics A. (2009): Baktériumokkal a kőolajszennyezések ellen. *Élet és Tudomány* 2, 45-47

Turner, P. C., McLennan, A. G., Bates, A. D., White, M. R. H. (2000): Molecular Biology, second edition, BIOS Scientific Publishers, 11., 33-32., 113-115., 117-120., 160-163., 165-169. p.

Urbanczyk, H., Ast, J. C., Higgins, M. J., Carson, J., Dunlap, P., V. (2007): Reclassification of Vibrio fischeri, Vibrio salmonicida and Vibrio wodains as *Aliivibrio fischeri* gen. nov, comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* gen. nov, comb. nov. and *Aliivibrio wodains* gen. nov, comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2823-2829 p.

van Kraats, J. (1996). Environmental impact assessment in water management. *European Water Pollution Control*, 6, 3–4.

Verhille, S., Baida, N., Dabboussi, F., Izard, D., Leclerc, H. (1999): Taxonomic study of bacteria isolated from natural mineral waters: proposal of *Pseudomonas jessenii* sp. nov. and *Pseudomonas mandelii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 22, 45–58.

Walker, J. D., Seesman, P. A., Colwell, R. R. (1975): Effect of South Luisiana crude oil and No. 2. fuel oil on growth of heterotrophic microorganisms, including proteolytic, lypolitic, chitinolytic and cellulolytic bacteria. *Environmental Pollution*, 9, 13–33. p.

Wang, L., Ten, L. N., Lee, H. G., Im, W. T., Lee, S. T. (2008). *Olivibacter soli* sp. nov., *Olivibacter ginsengisoli* sp. nov. and *Olivibacter terrae* sp. nov., from soil of a ginseng field and compost in South Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 1123-1127.

Watanabe, K., Yamamoto, S., Hino, S., Harayama, S. (1998): Population dynamics of phenol-degrading bacteria in activated sludge determined by *gyrB*-targeted quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*: 64, 1203–1209. p.

Weaver, R. F., Hedrick, W. P. (1997): Genetika, Panem Könyvkiadó, Budapest, 9, 12, 131, 135, 137, 146, 341, 416-417, 459 p.

Weber, W. J. J. & Corseuil, H. X. (1994): Inoculation of contaminated subsurface soils with enriched indigenous microbes to enhance bioremediation rates. *Water research* 28, 1407-1414 p.

White, P., A. & Claxton, L. D. (2004): Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutation Research*, 567, 227-345 p.

WHO (2008): Guidelines for Drinking Water Quality, vol. 1, 3rd ed. Geneva

WHO (2010): Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, *WHO IARC*, 92

Wilson, S. C. & Jones, K. C. (1993): Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a rewiev. *Environmental Pollution* 81, 229-249. p.

Zhukov, D. V., Murygina, V. P., Kalyuzhnyi, S. V. (2007): Kinetics of the degradation of aliphatic hydrocarbons by the bacteria *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43, 587-592

1. mellékelt táblázat A biológiai és geokémiai monitoring mintavételi helyszínei, analitikai eredményei (**zölddel** kiemelve: A klónkönyvtár vizsgálatok mintái, **narancssárga keret:** vizsgálati eredmények B szennyezettségi határérték felett)

	Minta		Dátum	Szén-hidrogén Szennye-zettség	Shannon-f diverzitás	Oldott oxigén (mg/l)	Redox potenciál (mV) normál Hidrogén	pH	Sejt-szám (TGE5 MPN3)	CH-bontó sejt-szám	EC50 (%)	Benzol	Toluol	Etil-benzol	Xilolok	Egyéb alkil benzolok	VALPH (C5-C12)	EPH (C10-C40)	TPH (C5-C40)
												„B" szennyezettségi határérték (µg/l)							
												1	20	20	20	20	-	-	100
1	**BM1.1**	BihariereszteS	2007.02.22	háttér	2,6021676	9,4	363	7,80	75000	1500		<0,2	<1	<1	<5	<20	<25	<25	50
2	BM1.2		2007.06.12	háttér	1,3333441	13,6	357	6,63	93000	3900	69,0	<0,2	<1	<1	<5	<20	<25	<25	50
3	BM1.3		2007.08.28	háttér	1,580321	10,8	25	6,75	93000	2300	233,3	<0,2	<1	<1	<5	<20	<25	<25	50
4	BM1.4		2007.11.27	háttér	3,4101367	17,4	379	6,85	43000	930	67,7	<0,2	<1	<1	<5	<20	<25	<25	50
5	BM1.5		2008.02.19	háttér	3,5917722	12,8	259	8,70	2300	36	147,8	<0,2	<1	<1	<5	<20	<25	<25	50
6	**BM7.1**		2007.02.22	szennyezett	2,2314341	1,8	246	7,45	9300	930	39,2	0,9	<1	<1	**26**	**113**	250	71	**250**
7	BM7.2		2007.06.12	szennyezett	1,9645371	93	346	7,35	430000	2300	55,8	<0,2	<1	<1	<5	<20	<25	<25	50
8	BM7.3		2007.08.28	szennyezett	1,8893351	97,0	216	7,58	43000	9300	52,9	0,4	<1	<1	14	**81**	<25	<25	50
9	BM7.4		2007.11.27	szennyezett	2,8452355	4,3	204	7,00	9300	4300	32,3	**3,3**	<1	<1	6	**52**	31	<25	50
10	BM7.5		2008.02.19	szennyezett	2,589109	15,8	247	8,10	15000	210	89,5	**13,9**	<1	2	8	**115**	137	<25	**152**
11	**Z9.1**	Zalaegerszeg	2006.05.18.	szennyezett	2,8118919	1,2	240	9,07	1,1E+09	120000	11,6	**7690**	**2690**	<1	**8050**	**3740**	3000	1000	**3080**
12	Z9.2		2006.11.07.	szennyezett	2,8355523	n/a	258	7,70	430000	23000	43,6	<0,2	<1	<1	<5	<20	<25	60	60
13	Z9.2A		2007.02.06	szennyezett	3,0602407	94,8	362	7,80	93000	23000	22,9	<0,2	<1	<1	<5	<20	<25	25	50
14	Z5.1		2006.05.18.	szennyezett	2,3864272	n/a	228	8,42	23000	23000	4,8	**18500**	**55300**	**8130**	**29400**	**15700**	22600	31400	**33000**
15	Z5.2		2006.11.07.	szennyezett	2,8764817	n/a	205	6,80	230000	43000	7,2	**199**	**1530**	**838**	**7070**	**6650**	22500	3780	**23600**
16	Z5.2A		2007.02.06	szennyezett	3,3162326	63,8	154	7,80	150000	93000	10,8	**20,4**	**281**	**84**	**1230**	**2380**	4370	3510	**6720**
17	**Z4.1**		2006.05.18.	háttér	3,5269647	0,3	480	6,95	23000	7500	203,5	**2,3**	5	<1	<5	<20	<25	<25	50
18	Z4.2		2006.11.07.	háttér	2,6374472	38,0	184	6,70	93000	23000	45,1	<0,2	<1	<1	<5	<20	<25	<25	50
19	Z4.2A		2007.02.06	háttér	3,0708518	38,3	416	7,86	9300	4300	47,8	<0,2	<1	<1	<5	<20	<25	169	50
20	Z4.3		2007.08.14.	háttér	1,8568054	29,00	n/a	7,15	21000	930	45,5	<0,2	<1	<1	<5	<20	<25	25	50
21	Z4.3A		2007.05.08	háttér	0,6417968	77,8	329	6,80	430000	930000	32,1	<0,2	<1	<1	<5	<20	<25	83	83
22	Z4.5		2008.01.08	háttér	1,0090277	23,4	396	6,30	23000	430	99,8	<0,2	<1	<1	<5	<20	<25	28	50
23	OM3	Ópusztaszer	2006.05.31	háttér	2,6638416	n/a	421	7,57	4300	750	49,6	<0,2	<1	<1	<5	<20	<25	<25	50
24	OM3.2		2006.08.15	háttér	3,1074982	n/a	224	9,28	43000	7500	99,1	<0,2	<1	<1	<5	<20	<25	<25	50
25	**OM3.3**		2006.11.21	háttér	2,604826	35,3	228	7,22	23000	930	106,6	**77,9**	<1	<1	<5	<20	<25	<25	50
26	OM8		2006.05.31	szennyezett	3,3683834	n/a	150	6,97	43000	7500	20,8	**3910**	**2910**	**186**	**1360**	**858**	13000	545	**4290**
27	OM8.2		2006.08.15	szennyezett	3,0075569	n/a	50	6,83	23000	4500	17,3	**5170**	**2950**	**194**	**1870**	**785**	4500	2410	**6590**
28	**OM8.3**		2006.11.21	szennyezett	3,1642512	44,0	212	6,67	39000	4300	31,2	**1990**	**1580**	**69**	**1570**	**667**	2820	416	**3200**
29	OM7		2006.05.31	szennyezett	3,1542516	n/a	166	6,82	4300	930	21,7	**3640**	**2140**	**155**	**1020**	**718**	10200	1710	**4050**
30	OM7.2		2006.08.15	szennyezett	3,0558202	n/a	123	7,03	15000	9300	24,2	**2510**	**1570**	**104**	**768**	**511**	1900	1960	**3480**
31	**OM7.3**		2006.11.21	szennyezett	3,0394709	34,0	153	6,55	43000	930	15,0	**4140**	**2480**	**117**	**1420**	**549**	2040	119	**2150**

2. mellékelt táblázat A TBF2/20.2^T, az *Olivibacter soli* Gsoil 034^T, az *O. ginsengisoli* Gsoil 060^T, az *O. terrae* Jip13^T, illetve az *O. sitiensis* AW-6^T típus törzsek fenotipizálási vizsgálatainak eredménye

Jelmagyarázat: +: növekedés/asszimiláció; -:nincs növekedés/asszimiláció; +gy: gyenge növekedés, n/a: nincs adat

Vizsgált tulajdonság	**TBF2/20.2^T**	***O. soli* Gsoil 034^T**	***O. ginsengisoli* GSoil 060^T**	***O. terrae* Jip13^T**	***O. sitiensis* AW-6^T**
Növekedés 5ºC-on	+	-	-	-	+
Növekedés 15ºC-on	+	+	+	+	+
Növekedés 30ºC-on	+	+	+	+	+
Növekedés 37ºC-on	+	+	-	-	+
Növekedés 42ºC-on	+	-	-	-	+
Növekedés 4% NaCl-nál	-	+	+	+	-
Enzimatikus aktivitás:					
Oxidáz	+	+	-	+	+
Kataláz	+	+	+	+	+
Zelatin hidrolízis	-	+	+	-	-
Ureáz	-	-	-	-	-
Savas foszfatáz	+	+	+	+	+
Lúgos foszfatáz	+	+	+	+	+
Észteráz (C4)	-	-	+	+	+
Észteráz lipáz (C8)	-	-	-	+	-
Lipáz(C14)	+gy	-	-	-	+gy
Leucin-arilamidáz	+	+	+	+	+
Valin-arilamidáz	+	+	+	+	+
Cisztin arilamidáz	+gy	+	+	+	+
Naftol-AS-BI-foszfohidroláz	+	-	-	-	+
α-galaktozidáz	+gy	-	+	+	-
β- galaktozidáz	+	-	-	-	-
β-glükoronidáz	-	-	-	+	-
α-glükozidáz	+	+	+	+	+
β-glükozidáz	+	+	+	+	+gy
α-mannozidáz	+	-	-	-	-
α-fukozidáz	-	+	-	-	-
N-acetil-*β*-glükózaminidáz	+	+	+	+	+
Asszimilációs tesztek					
3-hidroxibenzolsav	-	-	-	-	-
3-hidroxibutilsav	-	-	-	-	-
4-hidroxibenzolsav	-	-	-	-	-
Adipinát	-	-	-	-	-
Malonát	-	-	-	-	-
Amigdalin	+	+	-	+	+gy
Arbutin	+	-	+gy	+gy	-
Caprinsav	-	-	-	-	-
Kimotripszin	+gy	n/a	n/a	n/a	+
Citrát	-	-	-	-	-
D-Adonitol	+	+	-	-	-
D-Arabinóz	+	+	+gy	+gy	+gy
D-Arabitol	-	-	-	-	-
D-Cellobióz	+	+	+	+	-
D-Fruktóz	+	+	+	+	+gy
D-Fukóz	-	-	-	-	-

D-Galaktóz	+gy	+	+	+	+gy
D-Glükóz	+	+	+	+	+
D-Laktóz	+	+	+	+	-
D-Lixóz	+	+	-	-	-
D-Maltóz	+	+	+	+	-
D-Mannitol	-	+	-	-	-
D-Mannóz	+	+	+	+	+
D-Melezitóz	+	+w	-	-	-
D-Mellibióz	+	+	+	+	-
D-Raffinóz	+	+	+	+	-
D-Ribóz	+	+	-	+gy	-
D-Saccharóz	+	+	+	+	-
D-Sorbitol	-	-	-	-	-
D-Tagatóz	-	-	-	-	-
D-Trehalóz	+	+	+	+	-
D-Turanóz	+	+gy	-	+gy	-
D-Xilóz	+	+	+gy	+gy	-
Dulcitol	-	-	-	-	-
Erithriol	-	-	-	-	-
Eszkulin	+	+	+	+	+
Fenilacetát	-	-	-	-	-
Gentiobióz	-	-	-	-	-
Glicerol	-	-	-	-	-
Glicogén	-	-	-	-	-
Inozitol	-	-	+	-	-
Inulin	+gy	+gy	-	-	-
Itakonát	-	-	-	-	-
Laktát	-	-	-	-	-
L-Alanin	-	+	n/a	-	-
L-Arabinóz	+	+	-	+gy	-
L-Fuckóz	-	-	-	-	-
L-Hisztidin	-	-	-	-	+
L-Prolin	-	-	-	-	-
L-Rhamnóz	+	+	+gy	+	-
L-Szerin	-	-	-	-	-
L-Szorbóz	-	-	+gy	-	-
L-Xilose	-	-	-	-	-
Metil-αD-glükopiranozid	+	+	+	+	-
Metil-αD-mannopiranozid	+	+	+	+	-
N-Acetil-glükózamin	+	-	-	-	-
Kálium 2-ketoglükonát	-	-	-	-	-
Kálium 5-ketoglükonát	-	-	-	-	-
Propionsav	-	-	-	-	-
Szalicin	+	+	+gy	+	-
Szuberát	-	-	-	-	-
Szukróz	+	+	+	+	+
Tripszin	+	n/a	n/a	n/a	+
Valeriát	-	-	-	-	-
Xilitol	-	-	-	-	-
DNA G+C mennyiség (mmol)	41,2	39,2	43,6	40,6	45,6

9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Munkám elvégzéséhez nyújtott segítségét, irányító tanácsait és véleményeit köszönöm témavezetőnek, szakmai-tudományos mentoromnak, *Dr. Szoboszlay Sándornak*.

Köszönöm a Szent István Egyetem (SZIE) Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék tanszékvezetőjének, *Dr. Kriszt Balázsnak* a szakmai és tudományos lehetőségeket, amelyek által dolgozatom megvalósulhatott. Köszönöm SZIE *Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék*, valamint a *Környezetipari Regionális Egyetemi Tudásközpont* egykori és jelenlegi dolgozóinak. Segítségük nélkül dolgozatom nem jöhetett volna létre.

Köszönettel tartozom az *Agruniver Holding Kft.*, valamint a *Bio-Build Kft.* vezetőinek, egykori és jelenlegi munkatársaimnak, akikkel a gyakorlati környezetvédelmben szereztem elévülhetetlen tapasztalatokat.

Köszönöm a tudományos együttműködés lehetőségét *Prof. Dr. Márialigeti Károly* tanszékvezetőnek, valamint a közös munkát *Dr. Révész Sárának*, illetve az *Eötvös Loránd Tudományegyetem, Mikrobiológiai Tanszék* egykori és jelenlegi munkatársainak.

Köszönöm a támogatást *Dr. Bujáki Gábor* kollégiumi főigazgatónak és SZIE Gödöllői Kollégium minden dolgozójának.

Hálás köszönettel tartozom *szüleimnek, feleségemnek, családomnak, szeretteimnek és barátaimnak*, akik támogattak tanulmányaimban és az élet egyéb területein.

Köszönöm továbbá egykori és jelenlegi *tanáraimnak*, akik hivatásszerűen szeretik munkájukat, amivel nekem is irányt mutattak.

Dolgozatomat születendő gyermekemnek ajánlom.

Köszönetemet fejezem ki a doktori kuatásaimat támogató projekteknek:

- Szent István Egyetem, Környezetipari Regionális Egyetemi Tudásközpontja, Pázmány Péter (PÁZMÁNY RET-12/2005) program, Nemzeti Kutatási és Technológiai Hivatal
- Baross Pályázati Program: „Környezeti monitoring kutatásokat szolgáló innovációs fejlesztés a Szent István Egyetem Regionális Egyetemi Tudásközpont (RET) keretein belül” (KM FOKT 06 KMKINNOV)
- INNOCSEKK Program: „Nagy toxikus elem koncentrációt toleráló szénhidrogénbontó mikroszervezeteket tartalmazó oltóanyag előállítás bioremediációs célra”, Nemzeti Kutatási és Technológiai Hivatal (KM FOKT 06 KMKINNOV)
- BIOKOMP4 Jedlik Ányos Pályázat OM 00120/2007
- KMOP-2007-1.1.1.