SZENT ISTVÁN EGYETEM
KÖRNYEZETTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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. A téma aktualitása, jelentősége 4
2. Célkitűzések, előzmények 5
3. Anyag és módszer 6
3.1. Biológiai- és geokémiai monitoring rendszer 6
3.1.1. A monitoring mintavételi helyszínek és mintázás 6
3.1.2. Közösségi minta feldolgozás a terminális restrikciós fragment hossz polimorfizmus (T-RFLP) vizsgálathoz 6
3.1.3. Klónkönyvtárak létrehozása és feldolgozása 7
3.1.4. Statisztikai módszerek 7
3.2. Szénhidrogén bontó mikroszervezetek izolálása 8
3.2.1. Mikroszervezetek faji szintű identifikációja 8
3.2.2. Részletes biodegradációs vizsgálatok (bontási kísérlet) 8
3.3. Új baktériumfaj leírásához szükséges vizsgálatok 9
4. Eredmények 10
4.1. Szénhidrogénekkel szennyezett területek biológiai és geokémiai vizsgálata 10
4.1.1. Biomarkerek keresése a szennyezés előfordulásának megállapítására 11
4.1.2. A bakteriális közösség elemzése klónkönyvtárakkal 12
4.2. Szénhidrogén bontó mikroszervezetek keresése 13
4.2.1. A szénhidrogén bontó törzsek taxonómiai besorolása 14
4.2.2. Bontási kísérlet 14
4.3. A TBF2/20.2 jelű törzs rendszertani besorolása 15
4.3.1. Az új baktériumfaj (*Olivibacter oleidegradans*) bemutatása 18
5. Következtetések, javaslatok 20
6. A témában megjelent publikációk listája 24

1. A TÉMA AKTUALITÁSA, JELENTŐSÉGE

A kőolaj és származékai jelenleg a leggyakoribb környezetszennyező anyagok a világon és hazánkban. A környezetvédelmi gyakorlat egyik leggyakoribb kihívása a felszín alatti vizek és a földtani közeg szénhidrogén szennyezettségének felszámolása. A szénhidrogén szennyezések által érintett területek aránya minden erőfeszítés ellenére világszerte nő. A XXI. században az emberiség által teremtett civilizált környezet szinte minden működési folyamata energiaigényes, melynek alapját a fosszilis energiahordozók jelentik. Az kőolaj iránti növekvő kereslet és az eddigi kitermelő helyek kimerülése olyan, eddig fel nem tárt, vagy nehezen elérhető készletek irányába hajtják a feltárásokat, amelyeket ez idáig gazdasági, vagy más okból nem tekintettek kitermelendő területeknek. Ebből következik, hogy olyan olajmezők kiaknázása is megkezdődött/megkezdődik, ahol eddig a környezeti, természeti szempontok szabtak gátat a kitermelésnek (pl. természetvédelmi területek). Ezek a folyamatok sajnálatos módon a jövőre nézve előrevetítik azt is, hogy a továbbiakban is számítanunk kell komoly olajszennyezésekre nem csak a világ távol eső részeiben, de Európában és hazánkban is.

A szennyezés bekövetkezése után a környezeti elemek, valamint a természeti értékek olyan mértékben károsodhatnak, hogy azok helyreállítása jelentős mennyiségű gazdasági eszköz, illetve energia befektetést igényel, ha az egyáltalán lehetséges. Az ilyen szennyezések felszámolására ma már számos módszer áll rendelkezésünkre. A módszerek lehetnek például fizikai, kémiai, termikus, vagy szigeteléses eljárások, valamint biológiai módszerek. 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.

A szénhidrogének lebontásának kulcs szervezetei a baktériumok mellett a mikrobiális gombák is. Jelen dolgozatban a szennyezett területek mikroba populációjának jellemzését csak a szerves szennyező anyagok mikrobiológiai biodegradációban részt vevő bakteriális közösség elemzésén keresztül mutatjuk be.

2. CÉLKITŰZÉSEK, ELŐZMÉNYEK

Munkánkkal kapcsolatban az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. Szénhidrogénekkel szennyezett 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.

Első két célkitűzésünk érdekében 3 hazai, szénhidrogénekkel szennyezett területen, három éven keresztül (2006-2008) biológiai és geokémiai monitoring rendszert működtettünk. Következtetéseinket e három helyszín egymástól eltérő időpontjaiban, illetve (szennyezettség és talajvíz áramlás szempontjából) 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. Feltételeztük, hogy a területeken a szennyezés megjelenése a bakteriális diverzitásban, illetve a közösség alkotó mikrobák összetételében is nyomon követhető. Feltételezéseinket molekuláris biológiai módszereken (T-RFLP, klónkönyvtár) alapuló rendszer eredményei és ezeknek több módszerrel kivitelezett statisztikai elemzései (Man Whitney U, klaszter analízis) kívántuk igazolni. A vizsgált területeken a molekuláris biológiai vizsgálatok alapján olyan biomarkereket kerestünk, amelyek egyértelműen és kizárólagosan egy típusú (szennyezett vagy háttér) mintákra jellemzőek.

Harmadik célkitűzésünknek megfelelően 7 hazai, szénhidrogén származékokkal szennyezett helyszínről baktérium törzseket izoláltunk. Az izolált törzsek esetében első lépésben gravimertiás, majd az eredmények alapján GC alapú kémiai analitikai vizsgálatokat végeztünk környezeti mintán. 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 faji szinten identifikáltuk.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

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: fizikai paraméterek (pH, hőmérséklet, oldott oxigén tartalom, redox potenciál és vezetőképesség); kémiai analitikai paraméterek (TPH, BTEX és általános vízkémiai vizsgálatok); alternatív elektron akceptorok mennyiségi elemzése; összes élő sejtszám és szénhidrogén bontó csíraszám meghatározása MPN módszerrel, OxiTop™ talajrespirációs vizsgálat és ToxAlert 100™ *Aliivibrio fischeri* teszt.

3.1.1. A monitoring mintavételi helyszínek és mintázás

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 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 rendszerességgel végzett talajvízszint mérés alapján) is háttérnek tekinthetők, vagyis a talajvíz a háttér területekről áramlik a szennyezett irányba. A felszín alatti víz mintázását az MSZ 21464:1998 magyar szabvány előírásai alapján végeztük.

3.1.2. Közösségi minta feldolgozás a terminális restrikciós fragment hossz polimorfizmus (T-RFLP) vizsgálathoz

A biológiai és geokémiai monitoring során a szennyezett területek talajvízmintáiból izolált közösségi DNS-t első lépésben terminális restrikciós fragment hossz polimorfizmus (T-RFLP) módszerével 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 szekvenálásra volt szükség. Ezt követte 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 vizsgálathoz a PCR-t az 5-karboxifluoreszceinnel jelölt 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') VIC és 519r (5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3') 16S rDNS primerekkel végeztük (Lane, 1991). Annak érdekében, hogy a primerekkel amplifikált közösségi DNS-ek bakteriális diverzitásáról képet kapjunk, a 16S rDNS PCR termékeket MspI restrikciós endonukleázzal emésztettük. A T-RFLP analízis folyamán az MspI restrikciós enzimmel emésztett PCR terméket kapilláris gélelektroforézissel vizsgáltuk.

3.1.3. Klónkönyvtárak létrehozása és feldolgozása

A fentiekhez hasonlóan 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 kék-fehér szelekció segítségével szelektáltuk. A klónkönyvtárak feldolgozását nested PCR technikával M13f (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') és M13r (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') primerek felhasználásával amplifikáltunk klónszekvenciákat. 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 MspI alapú T-RFLP segítségével vizsgáltuk a klónokat. Ezeket szekvenáltunk is és a megállapított nukleotid sorrend alapján a vizsgált mikroszervezetek faj szintű identifikációjukat elvégeztük.

3.1.4. 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). Az alkalmazott módszerek: Spearman-féle rang korreláció, Shannon-féle diverzitás elemzés, T-próba, Mann-Whitney U teszt, klaszter-analízis és biomarker keresés.

3.2. Szénhidrogén bontó mikroszervezetek izolálása

Hét, hazai, szénhidrogénekkel szennyezett területen végeztünk mintavételt (1. sz. táblázat). 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.

1. 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 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. 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 szelektált mikrobákkal gravimetriás bontási kísérletet végeztünk.

3.2.1. 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 szekvenciákat on-line módon a NCBI GenBank és a leBibi (Bio Informatic Bacteria Identification) adatbázisában található szekvenciákkal vetettük össze. 98%-os szekvencia hasonlóság esetén, a vizsgált törzset az adatbázisban fellelhető mikroba fajhoz tartozónak tekintettük.

3.2.2. Részletes biodegradációs vizsgálatok (bontási kísérlet)

Az izolált mikroszervezetek szénhidrogén bontási kapacitását nem kizárólag laboratóriumban összeállított, hanem 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. A kezelések során a szennyezett környezeti mintát a szelekciós vizsgálataim 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. A kísérletben negatív kontrollként a sterilezett környezeti minta szerepelt, amelyet az oltott mintákkal azonos körülmények között rázattam öt napon át. Pozitív kontrollként három különböző beállításban egy *in vivo* bioremediációban alkalmazott oltóanyag tagjait használtuk fel.

3.3. Új baktériumfaj leírásához szükséges vizsgálatok

A fent bemutatott, bontási kapacitással rendelkező, mikroszervezetek keresése során olyan mikroszervezetet izoláltunk (TBF2.20.2), 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. Az új faj leírás érdekében elvégzett vizsgálatok:

- Molekuláris biológiai vizsgálatok: filogenetikai vizsgálatok (16S rDNS közel teljes szekvencia analízis), guanin és citozin arány meghatározás
- Fenotípusos vizsgálatok: morfológiai leírás, sejtmembrán zsírsav analízis, respiratórikus kinon és lipokinon analízis, poláros lipidek meghatározása, elektronmikroszkópos morfológiai vizsgálatok.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Szénhidrogénekkel szennyezett területek biológiai és geokémiai vizsgálata

Összefüggést kerestünk a három magyarországi területen, az akkreditált kémiai analitikai laboratórium által vizsgált szennyező komponensek (TPH, BTEX) koncentrációja és a ToxAlert 100, *Aliivibrio fischeri* alapú sztenderdizált (ISO 11348) mikrobiológiai ökotoxikológiai módszer eredményei között. Ennek érdekében Spearman-féle rangkorrelációs koefficiens számítást végeztünk, STATISTICA szoftverrel (2. sz. táblázat).

2. 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 között 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

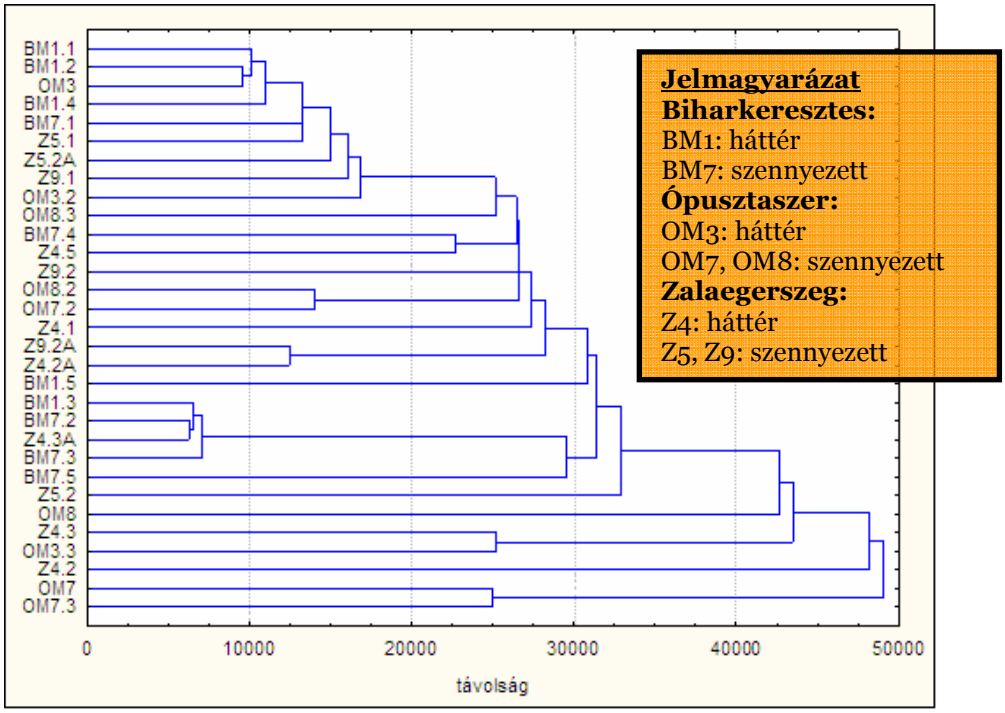
ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (I. tézis, a 4.1. fejezet eredményei alapján): Spearman-féle rangkorrelációs számítás alapján három hazai, szénhidrogénekkel szennyezett kárhely eltérő időpontokban vett háttér és szennyezett mintáinak toxikológiai, valamint TPH és BTEX kémiai analitikai eredményei alapján igazoltuk,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

A továbbiakban meghatároztuk a vizsgált területek T-RFLP alapú Shannon-féle diverzitás indexeit és szignifikáns összefüggéseket kerestünk a diverzitás értékek és a szennyezettségi adatok között Man Whitney U teszt eredményei alapján. A T-RFLP eredmények alapján klaszter elemzést is végeztünk. A statisztikai elemzések eredményei alapján 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 (3. sz. táblázat, 1. ábra)

3. 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	



1. 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)

4.1.1. Biomarkerek keresése a szennyezés előfordulásának megállapítására

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.

4.1.2. A bakteriális közösség elemzése klónkönyvtárakkal

Céljaink 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 (4. táblázat).

4. 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*
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*	150	98,5	Alfa (α-)

Klónok száma	Legközelebbi rokon faj*	T-RF (Msp)	Azonosság (%)	Osztály**
	aromaticivorans			
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-)

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 területekről összesen 47 törzset izoláltunk. A gravimetriával vizsgált, három ismétlésben végzett, bontási arány megállapítása alapján az izolált 47 törzsből hat csökkentette legalább 20%-os mértékben kiindulási gázolaj-kőolaj keverék mennyiségét a kontroll mintához viszonyítva (5. sz. táblázat)

5. számú táblázat Az újonnan izolált, hét hazai szénhidrogénekkel szennyezett területről származó baktériumtörzs (n=47) 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 faj szinten azonosítottuk. A szekvenálás során kapott bázissorrendeket az nemzetközi adatbázisok eredményeivel (GenBank, leBibi) hasonlítottuk össze (6. táblázat)

6. 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%

4.2.2. Bontási kísérlet

A szénhidrogén bontó képesség igazolására szennyezett területről származó talajvízminta felhasználásával *in vitro* kísérlet állítottuk össze, amelyeket gázkromatográfiás mérésekkel támasztottunk alá. A 7. sz. táblázat eredményei alapján a vizsgált törzsek valóban képesek voltak az olajszennyezéseket jellemző összes alifás szénhidrogén (TPH) szennyezőanyag mennyiségének jelentős csökkentésére.

7. 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 ** 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						
TPH (C5-C40)	1370	345	648	592	654	559	2530
TPH bontási%	45,85%	86,36%	74,39%	76,60%	74,15%	77,90%	-

4.3. A TBF2/20.2 jelű törzs rendszertani besorolása

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 az „Anyag és módszer" részben bemutatott vizsgálatokat kellett végezni. A vizsgálatok eredményeit mutatja be a 8, 9 számú táblázat, valamint 2-4. ábra

8. számú táblázat Az új faj jelölt TBF2/20.2. törzs fenotípusos karakterisztikája, összevetve az *Olivibacter* nemzetség más tagjaival: *O. soli*, *O. ginsengisoli*, *O. terrae*, *O. sitiensis*.

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

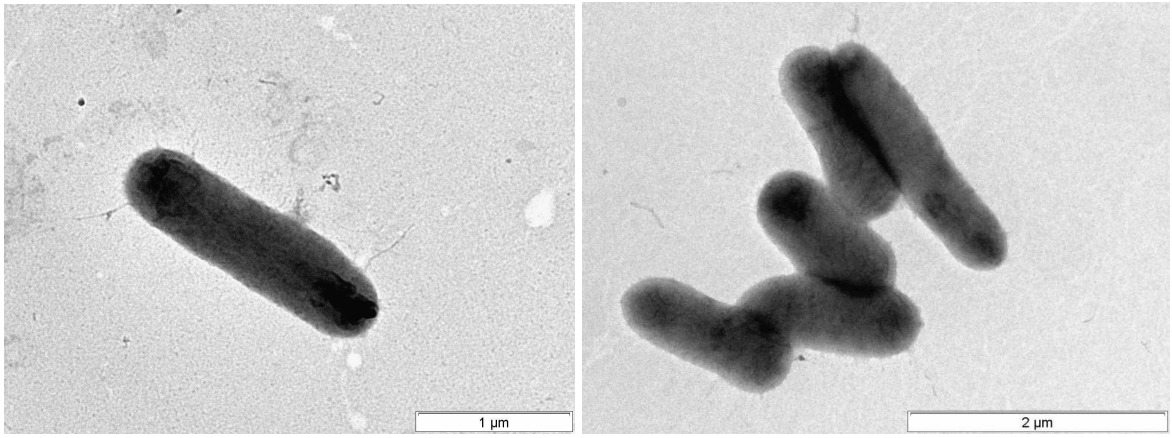
9. számú táblázat A TBF2/20.2 jelű törzs és a rokon fajok képviselőinek sejtmembrán zsírsav analízis eredménye, összevetve az *Olivibacter* nemzetség más tagjaival: *O. soli, O. ginsengisoli, O. terrae, O. sitiensis*.

*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

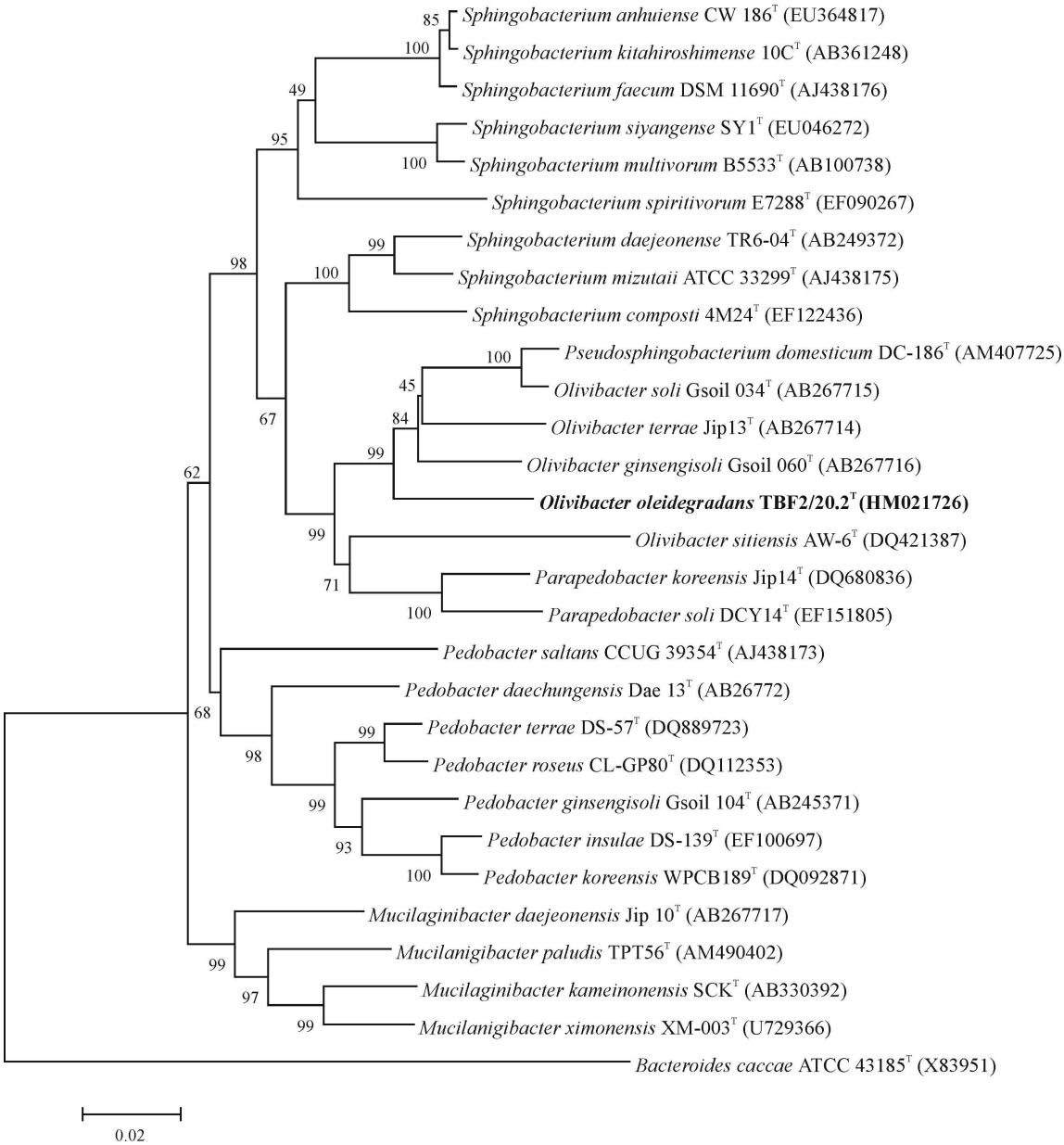
```
   1 gctcaggatg aacgctagcg gcaggcctat acatgcaagt cgaacgggat cgggggcttc
  61 ggtccccgtg agagtggcgc acgggtgcgt aacgcgtgag caacctgccc gtcccagggg
 121 gatagcccgg agaaatccgg attaataccg catgagaatg caggtccgca tgggccttcg
 181 tttaaatatt catagggggac ggatgggctc gcgtgacatt agcttgttgg cggggtaacg
 241 gcccaccaag 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
```

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



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

A kemotaxonómiai vizsgálatátok eredménye 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.



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

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 morfológiai bélyegekkel rendelkezik.

4.3.1. 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. A fajleíráshoz szükséges enzimatikus és asszimilációs teszteket elvégeztük. 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 poláris 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 első célkitűzéseként 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 értékeltük 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 *Aliivibrio fischeri* alapú 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 általam 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.

A dolgozat harmadik célkitűzésének eleget téve 7 hazai, szennyezett kárhelyről szénhidrogén vegyületek bontására alkalmas baktériumokat izoláltunk, amelyek bontó képességük alapján okszerűen felhasználhatók lehetnek akár az említett szénhidrogénekkel szennyezett 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 (10. sz. táblázat).

10. 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 és a nemzetközi előírásokat betartva végeztük. A bontó törzsek identifikációjának nem várt 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 szénhidrogénbontó 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 tagjai esetében. Az *Olivibacter oleidegradans* bontási képességének, enzim rendszerének feltérképezése genetikai/molekuláris biológiai vizsgálatokkal. *Olivibacter* specifikus primer tervezése a gyors identifikáció érdekében.

6. A TÉMÁBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

Folyóiratcikk:

Szoboszlay S., Atzél B., Cserháti M., **Szabó I.** (2004): Szénhidrogénnel szennyezett talajok bioremediációja. *Biokémia*, 28 (2) 37-40

Kaszab, E., Bedros, J. R., Szoboszlay, S., Atzél, B., **Szabó, I.,** Cserháti, M., Kriszt, B. (2006): Problems with environmental safety on bioremediated sites. *AARMS, (Academic and Applied Research in Military Science)*, 5 (3) 383-397.

Kaszab, E., Kriszt, B., Atzél, B., Szabó, G., **Szabó, I.,** Harkai, P., Szoboszlay, S. (2010): The occurrence of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* on hydrocarbon contaminated sites. *Microbial Ecology*, 59 (1): 37-45. [IF(2009): 3,251]

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. [IF(2010): 2,643] (§: Both authors contributed equally to this study.)

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, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, first published on January 21, 2011 as doi: 10.1099/ijs.0.026641-0, [IF(2009): 2,113]

Teljes közlemény konferencia kiadványban:

I. Szabó, S. Szoboszlay, B. Atzél, M. Cserháti, S. Rúzs-Molnár, B. Kriszt (2007): Tests of microbiological hydrocarbon degradation on contaminated groundwater samples. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 54 (Suppl.): 121.

Szabó, I., Háhn, J., Harkai, P., Kaszab, E., Szoboszlay, S. (2009): Effects of heavy metal components on hydrocarbon degrading bacteria as abiotic stress on hydrocarbon contaminated sites. *Cereal Research Communications* 37 (Suppl 4): 561-564.

***Összes közlemény impakt faktora (IF):* 14,345**