



Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**MIKROAEROB BENZOLLEBONTÁSRA KÉPES MIKROBAKÖZÖSSÉGEK VIZSGÁLATA STABIL
IZOTÓPOS MÓDSZERREL**

Harkainé Bedics Anna

Gödöllő

2025

A doktori iskola

Megnevezése: Környezettudományi Doktori Iskola

Tudományága: Környezettudomány

Vezetője: Csákiné Dr. Michéli Erika, MTA lev. tagja
Egyetemi tanár, Intézetigazgató
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Szent István Campus
Környezettudományi Intézet

Témavezető: Dr. Táncsics András, MTA doktora
Egyetemi tanár, tanszékvezető
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Szent István Campus
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet
Molekuláris Ökológia Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

Tartalomjegyzék

1.	A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK.....	4
2.	ANYAG ÉS MÓDSZER.....	6
2.1.	A BTEX-bontó dúsítótenyészetek összeállítása.....	6
2.2.	A tenyésztett baktériumközösséghez kapcsolódó vizsgálatok.....	7
2.3.	Új baktériumfajok leírásához használt módszerek.....	7
2.4.	A baktériumközösség feltárásához használt módszerek	8
2.5.	Stabil izotópos vizsgálat.....	8
3.	EREDMÉNYEK ÉS AZOK MEGBESZÉLÉSE.....	10
3.1.	Mikroaerob benzollebontó dúsítótenyészetek eredményeinek értékelése	10
3.2.1.	<i>A dúsítótenyészetek benzol biodegradációs hatékonysága</i>	<i>10</i>
3.2.2.	Mikroaerob dúsítótenyészetek baktériumközösségének vizsgálata 16S rDNS amplikonszekvenálással	11
3.2.3.	<i>A dúsítótenyészetekből izolált tenyésztethető baktériumközösség összetétele</i>	<i>12</i>
3.2.	Stabil izotópos módszerrel (SIP) vizsgált benzollebontó mikrokozmoszok eredményeinek értékelése.....	14
3.2.1.	<i>Aerob és mikroaerob benzollebontó mikrobaközösségek vizsgálata 16S rDNS amplikonszekvenálással</i>	<i>14</i>
3.2.2.	<i>A mikrobaközösségek alakulása a könnyű és a nehéz DNS frakciókban</i>	<i>15</i>
3.3.	Új aromás szénhidrogén lebontásra képes baktériumfajok leírása.....	18
3.3.1.	<i>Pinisolibacter aquiterrae B13^T törzs jellemzése és új fajként történő leírása.....</i>	<i>18</i>
3.3.2.	<i>Ideonella benzenivorans B7^T törzs jellemzése és új fajként történő leírása.....</i>	<i>19</i>
3.3.3.	<i>Acidovorax benzenivorans D2M1^T törzs jellemzése és új fajként történő leírása.....</i>	<i>20</i>
4.	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS A JAVASLATOK.....	22
5.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	25
6.	AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK	26
7.	IRODALOMJEGYZÉK.....	28

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

Az egyik legsúlyosabb károkat a természetes ökoszisztémákban a kőolajszennyezések okozzák, melyeket jól példáz a Deepwater Horizon olajfúró torony katasztrófája (Mexikói-öböl, 2010), amit a történelem egyik legnagyobb olajszerencsétlenségként tartanak számon. Azonban nem csak a tengerek és óceánok, hanem a szárazföld is érintett az kőolaj által okozott környezetszennyezésben, pl. az elmúlt évtized legjelentősebb szárazföldi olaj által okozott káreseményét a Keystone Pipeline (Kansas, 2022) csővezeték szivárgása által kibocsátott kőolaj okozta. Emellett számos egyéb történelmi esemény is tanúsítja a kőolajszennyezés okozta környezeti károk súlyosságát.

Napjainkban a kőolaj kitermelése, szállítása és feldolgozása következtében keletkező olajszennyezés, valamint a természetes vízi és szárazföldi ökoszisztémákban okozott károk egyre nagyobb közfigyelmet kapnak. A szénhidrogén vegyületek a földtani közeg, a felszíni és felszín alatti vizek elővilágát is visszafordíthatatlanul átalakítják és rombolják, emellett humán egészségkárosító hatásuk is számottevő. Az olajszennyezés kiterjedése és az általa okozott károk mértéke egyrészt a kőolajalkotó komponensek, másrészt a talaj fizikai és kémiai tulajdonságaitól függenek. Bizonyos kőolajszármazékok toxikus és karcinogén tulajdonságúak lehetnek, mely vegyületek a táplálékláncban akkumulálódva a mikroorganizmusokon és elsődleges termelő szervezeteken át a fogyasztókig, így akár az emberig is eljutnak.

Az olajszennyezések megnövekedett mértéke miatt annak felszámolására is egyre nagyobb hangsúly kerül, a tudományban is gyakran központi szerepet kapnak az ezzel foglalkozó tanulmányok. A fizikai és kémiai kármentesítési eljárások mellett a bioremediációs tevékenységek is fokozottan előtérbe kerülnek, mivel költséghatékony és kis környezeti terheléssel járó módszerek. Ennek során ugyanis a mikroorganizmusok szénhidrogén bontó képességét használják fel a szennyezett területek helyreállítására. Az olajszennyezésnek kitett ökoszisztémák baktériumközösségei ugyanis idővel adaptálódnak az új szénforráshoz és megkezdődik a kőolaj-szénhidrogének lebontása. A mikroorganizmusok különböző mechanizmusokkal távolítják el a szennyezőanyagot, egyes baktériumok például rendelkeznek a kőolaj lebontásához szükséges enzimrendszerrel, melyet kódoló gének horizontális géntranszfer útján terjednek a mikrobaközösségben segítve ezzel az új szénforráshoz való gyors és hatékony adaptációt. A mikroorganizmusok együttműködése révén a szennyezőanyagok széles spektrumát képesek lebontani, melynek hatékonyságát a hőmérséklet, a pH és az elérhető tápanyagok mellett az alternatív elektronakceptorok elérhetősége, illetve a megfelelő elektronakceptor és elektrondonor arány is befolyásolja.

A benzol humán egészségügyi és környezetvédelmi szempontból is a legártalmasabb valamennyi monoaromás szénhidrogén vegyület közül. Emellett azonban számos petrokémiai termék alapanyaga, ipari felhasználása hatalmas mértékeket öltött, így a benzollal történő expozíciónak kis mértékben mindannyian ki vagyunk téve nap mint nap. A felszín alatti kőolajszennyezések esetén jelentős problémát jelentenek az olyan illékony komponensek, mint a benzol, mely toxikus hatását súlyosbítja, hogy oxigénszegény környezetben perzisztens vegyület, emellett a talajvízben oldódva kiterjedt szennyezések esetén az ivóvízhálózatot is elszennyezheti.

Ezek miatt egy kőolajjal szennyezett kárhely baktériumközösségének vizsgálata, a benzollebontásra képes mikroorganizmusok azonosítása és genomjának vizsgálata közelebb vihet a benzol és más aromás szénhidrogének lebontásának genetikai hátterének megismerésén át egy hatékony bioremediációs stratégia kidolgozásához és alkalmazásához.

Mindezek fényében kutatásunk elsődleges céljai a következők voltak:

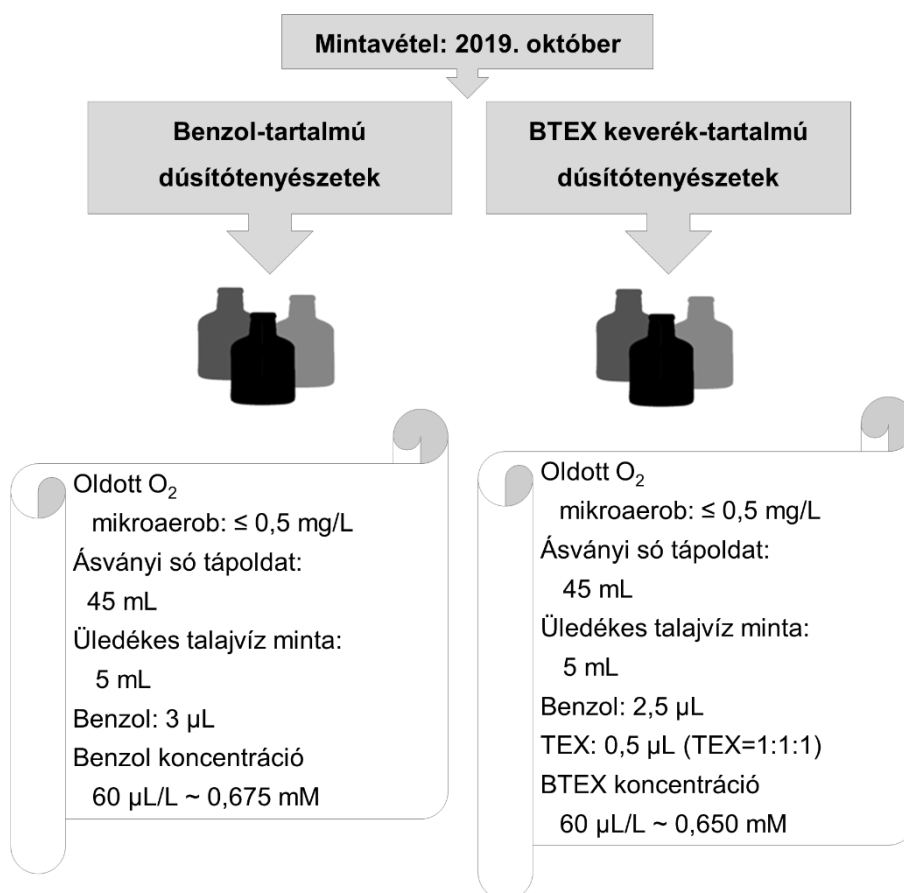
- ❖ A kutatás alapkérdése volt, hogy mely baktériumok képesek mikroaerob körülmények között a benzol biodegradációjára.
 - Ezen belül az oxigénlimitáció és a benzol, mint egyedüli szén-, és energiaforrás baktériumközösségre gyakorolt hatását vizsgáltuk.
 - Céljaink között szerepelt, hogy feltárjuk, hogy a többi BTEX komponens jelenléte hogyan befolyásolja a baktériumközösség alakulását és a benzol mikroaerob lebontását.
 - Célul tűztük ki a benzol mikroaerob biodegradációjában közvetlenül szerepet játszó baktériumok körének feltárását stabil izotópos jelölés módszerével.
- ❖ A kutatás célja volt továbbá az is, hogy a kísérletek során új, akár mikroaerob benzollebontásra is képes baktériumtörzseket izoláljunk és elvégezzük a fajleíráshoz szükséges vizsgálatokat.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

Célkitűzéseinkben említett kutatási kérdések megválaszolása érdekében kísérleteinket két fő irány mentén végeztük el. A vizsgálatok alapjául szolgáló talajvíz-üledék minták egy kőolajszármazékokkal szennyezett délnyugat-magyarországi, Siklós városban (45° 51' 25.8"N, 18° 17' 32.3"E) található kárhelyről származtak.

2.1. A BTEX-bontó dúsítótenyészetek összeállítása

Az első kísérletben mikroaerob, kizárólag benzol tartalmú, illetve a monoaromás szénhidrogének keverékét tartalmazó dúsítótenyészeteket hoztunk létre, melyekben a BTEX vegyületek egyedüli szén-, és energiaforrásként voltak jelen. A dúsítótenyészetek segítségével az oxigénlimitáció, valamint a benzol, mint kizárólagosan hasznosítható szén-, és energiaforrás a baktériumközösség diverzitására gyakorolt hatását vizsgáltuk. Ezen kívül az első kísérlet keretein belül feltártuk a többi aromás szénhidrogén jelenlétének hatására a baktériumközösség sokszínűségében bekövetkező változást, valamint, hogy a közös térben jelenlévő összes BTEX vegyület hogyan befolyásolja a benzol mikroaerob lebontását. A dúsítótenyészetek összeállításának részleteit az 1. ábra foglalja össze.



1. ábra: A dúsítótenyészetek összeállításának sematikus ábrája.

A dúsítótenyészetek létrehozásához minden szérumüvegbe 45 mL ásványi sókat tartalmazó mesterséges talajvíz tápoldat (Fahy et al. 2006) került, ezen kívül valamennyi dúsítótenyészet tartalmazott 5 mL siklósi üledékes talajvíz mintát és 3 μ L benzolt vagy BTEX-vegyületek keverékét (2,5 μ L benzol és 0,5 μ L egyéb TEX vegyület). Mindkét esetben három párhuzamos dúsítótenyészzettel dolgoztunk. Az üvegekben mikroaerob ($\leq 0,5$ mg/L oldott O_2) körülményeket tartottunk fent. A mikroorganizmusok működése révén elhasznált oxigént folyamatosan pótoltuk az üvegekben steril levegő beinjektálásával. A dúsítótenyészeteket öt hétig, hetente átolttva tartottuk fent, mely idő alatt az üvegekben a szénforrásként szolgáló BTEX-eket is pótoltuk. Az ötödik hét folyamán a BTEX-vegyületek koncentrációját 24 óránként GC-MS mérőműszer segítségével detektáltuk.

2.2. A tenyésztett baktériumközösséghez kapcsolódó vizsgálatok

A tenyésztendő baktériumtörzsek izolálását hagyományos módszerrel végeztük az ötödik heti dúsítótenyészetekből. A különböző morfológiájú telepeket tisztító szélesztéssel új R2A lemezekre oltottuk és tartottuk fent. A törzsek faji szintű azonosításához a tiszta tenyészetekből DNS-t izoláltunk UltraClean Microbial DNA Kit (Qiagen, Németország) felhasználásával, majd ezt követően polimeráz láncreakció segítségével amplifikáltuk a 16S rRNS gént és a *C23O* funkciógéneket kódoló génszakaszt, melyet Sanger-szekvenálás segítségével azonosítottunk. Azon törzsek esetében, melyek 16S rRNS alapján potenciálisan új fajjelöltként lettek azonosítva, illetve melyek rendelkeztek a PCR alapján az I.2.C-típusú *C23O* génnel, teljes genom szekvenálást is végeztünk Illumina NextSeq platformon a Seqomics Kft. segítségével. A teljes genom alapú filogenetikai vizsgálatokhoz a MiGA pipeline-t (Rodriguez et al. 2018, [http1](http://1)), a Genome-Genome Distance Calculator (GGDC) 2.1- es verzióját (Meier-Kolthoff et al. 2013, [http2](http://2)) és az OAT szoftvert (Lee et al. 2016) használtuk. Annak meghatározására, hogy mely BTEX-vegyületek bontására képesek a genom alapján a vizsgált törzsek, a Genoscope MAGE platform (Vallenet et al. 2006, 2009) és a CLC Genomics Workbench Tool v21 (Qiagen, Németország) volt segítségünkre. Ezt követően pedig az új fajjelöltek esetében vizsgáltuk azok BTEX bontó képességét GC-MS (Trace 1300 GC – ISQ Single Quadrupole MS; Thermo Fisher Scientific Inc., USA) segítségével 24 óránként történő gáztér analízissel. Végül elvégeztük az új fajok leírásához szükséges vizsgálatokat.

2.3. Új baktériumfajok leírásához használt módszerek

A BTEX vegyületeket, különösképpen a benzolt bontani képes új fajok izolálására különös hangsúlyt fektettünk a kutatások során, ugyanis a megfelelő bontási potenciállal rendelkező

törzsek sikeresen alkalmazhatók a későbbiekben bioremediációs célokra. A fajleírás során a baktériumtörzseket a polifázikus taxonómia módszerét alkalmazva jellemeztük, mely szerint fenotípusos, kemotaxonómiai, genotípusos és filogenetikai szempontokat egyaránt figyelembe véve vizsgáltuk az izolátumokat (Tindall et al. 2010).

2.4. A baktériumközösség feltárásához használt módszerek

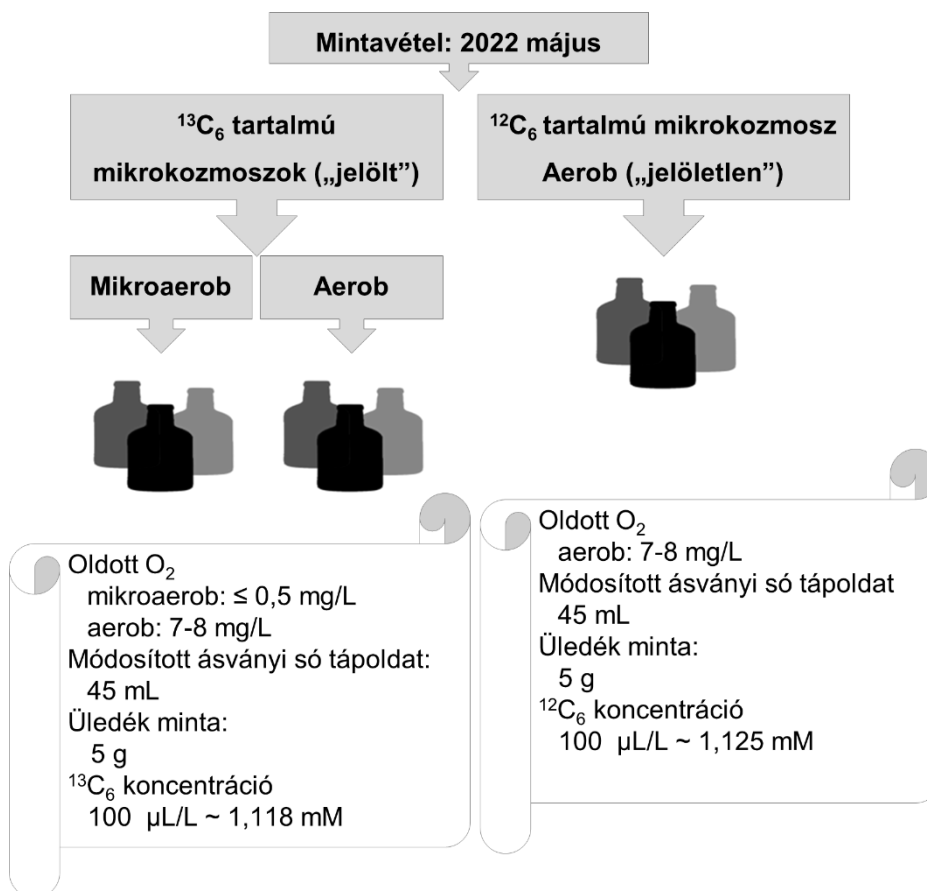
A dúsítótenyészetekben szelektíven felszaporodott mikrobaközösség átfogó elemzéséhez először a közösség genom DNS-ének izolálását végeztük el a már stabil szénhidrogén-bontó baktériumközösséget tartalmazó ötödik heti tenyészetekből a NucleoSpin Soil Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Németország) segítségével. Ezt követően T-RFLP (terminális restrikciós fragmenthossz polimorfizmus) segítségével tártuk fel a dúsítótenyészetekben lévő mikrobaközösség diverzitását. A PCR során VIC jelölt (Life Technologies™, USA) forward primert használtunk, majd a termékek restrikciós emésztését az *AluI* (AG↓CT) (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) enzimmel végeztük el. A T-RFLP analízis alapján kiválasztottuk az ötödik heti végponti minták párhuzamosaiból azokat a reprezentatív tagokat, melyekből 16S rDNS amplikon szekvenálás készült. A 16S rDNS változó V3 és V4 régióinak amplifikálását Illumina MiSeq platformon a Seqomics Kft. (Mórahalom) végezte el. A filogenetikai adatelemzést ezt követően a MOTHUR szoftver (v1.41.1) segítségével végeztük (Schloss et al. 2009) a MiSeq SOP (Standard Operation Procedure) ajánlása alapján (Kozich et al. 2013, [http3](http://www.mothur.org/)).

2.5. Stabil izotópos vizsgálat

A második kísérlet során stabil izotópos vizsgálat segítségével azonosítottuk a benzol mikroaerob biodegradációjában aktívan részt vevő mikroorganizmusokat valamennyi szénatomon jelölt benzolt tartalmazó mikrokozmosz kísérletek felhasználásával, valamint feltártuk az aerob és a mikroaerob benzolbontó baktériumközösségek között egy hét inkubálást követően megnyilvánuló hasonlóságokat és különbséget.

A kísérlethez a mikrokozmoszokat hasonlóan állítottuk össze, mint a dúsítótenyészeteket (2. ábra). A szérumüvegekbe vitaminokkal kiegészített módosított ásványi só tápoldat került, ezen kívül valamennyi mikrokozmosz tartalmazott 5 g siklósi üledékmintát (2022 májusi mintavétel) és 5 µL stabil izotóposan jelölt benzolt, illetve a három párhuzamos kontroll esetében jelöletlen benzolt. Három párhuzamos üvegben aerob (7-8 mg/L oldott O₂), másik háromban pedig mikroaerob (≤ 0,5 mg/L oldott O₂) körülményeket tartottunk fent. Az elhasznált levegő folyamatos visszapótlásával az üvegekben stabil mikroaerob állapotot tartottunk fent. A

mikrokozmoszokat egy hétig inkubáltuk rázó termosztátban 28°C-on, 150 rpm-en. A hét folyamán a benzol koncentrációját 24 óránként GC-MS segítségével monitoroztuk.



2. ábra: A mikrokozmoszok összeállításának sematikus ábrája.

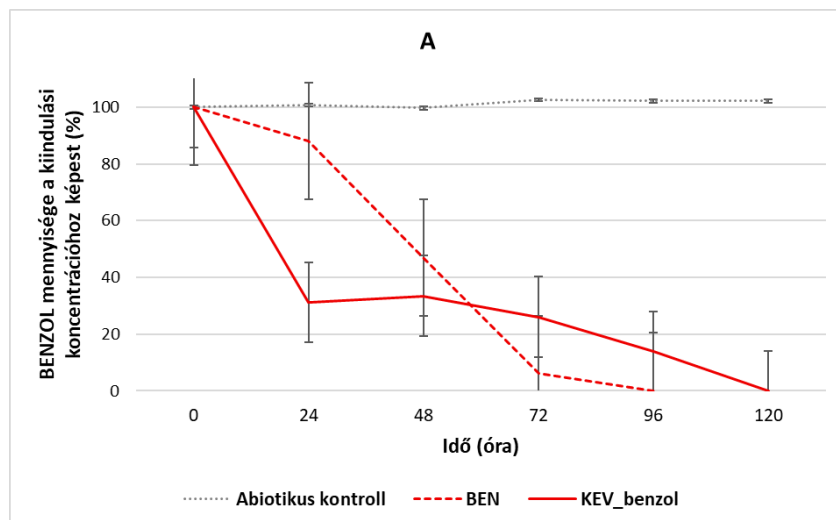
A mikrokozmoszokból kivont DNS mintákat T-RFLP analízissel vizsgáltuk, ezt követően sűrűség szerint cézium-kloridos grádiens ultracentrifugálással választottuk el, majd az egyes frakciók 16S rDNS kópiaszámát qPCR segítségével határoztuk meg, mely alapján következtettünk arra, hogy mely frakciók tartalmazzák a jelölt és a jelöletlen DNS-t. A nehéz frakciók csúcsát 1,72-1,74 g/mL, a könnyű frakciókét pedig 1,66-1,68 g/mL sűrűségértéknél detektáltuk, mely megfelel a szakirodalomban tapasztaltaknak (Lueders et al. 2004, Winderl et al. 2010). Az eredeti, frakcionálás előtti aerob és mikroaerob közösségből kivont DNS mintákból, illetve a qPCR segítségével meghatározott 16S rDNS kópiaszámok alapján sikeresen elkülönített könnyű (¹²C₆) és nehéz (¹³C₆) DNS frakciók csúcsaiból, valamint a köztes frakciókból 16S rDNS Illumina ampliton szekvenálás történt, hogy végül beazonosítsuk a mikrobaközösség azon tagjait, melyek képesek a benzolt metabolizálni aerob és mikroaerob körülmények között.

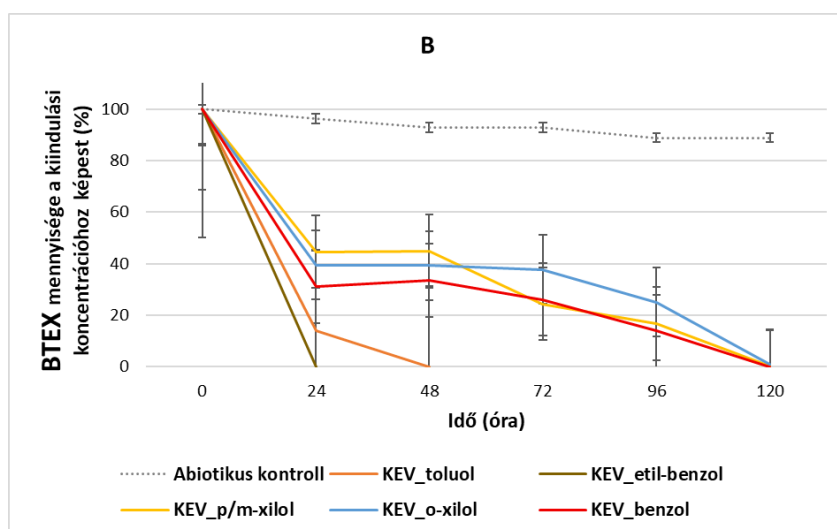
3. EREDMÉNYEK ÉS AZOK MEGBESZÉLÉSE

3.1. Mikroaerob benzollebontó dúsítótenyészetek eredményeinek értékelése

3.2.1. A dúsítótenyészetek benzol biodegradációs hatékonysága

A 3. A ábrán a benzol tartalmú dúsítókban és a BTEX keverék tartalmú dúsítókban lévő benzol fogyása látható. Összességében megállapítható, hogy a benzollebontás hatékonyabb volt abban az esetben, amikor a benzol, mint egyedüli szén-és energiaforrás volt jelen a dúsítótenyészetekben, azonban 24 órán belül a keverék tartalmú üvegekben nagyobb mértékben indult meg a benzollebontás. A 3. B ábrán a csak BTEX keverék tartalmú dúsítókban lévő komponensek fogyását láthatjuk, mely alapján a BTEX vegyület közötti szubsztrátinterakciókról vontunk le következtetéseket. Oxigénszegény környezetben a toluol és az etil-benzol egymásra, valamint a benzol biodegradációjára is serkentő hatással vannak, ezért bizonyult hatékonyabbnak a benzollebontás az első 24 órában (Dou et al. 2008). Emellett megfigyelhető, hogy az első nap a xilol vegyületek is nagyobb ütemben fogytak, melynek hátterében szintén a toluol és etil-benzol jelenléte lehet, ugyanis e vegyületek alacsony koncentrációban serkentő hatást gyakorolhatnak a xilol izomerek lebontására. Ugyanakkor a xilolok, főként a *p*-, és *o*-xilol kometabolikus lebontását is megfigyelték toluol jelenlétében (Chang et al. 1993, Oh et al. 1994, Littlejohns et al. 2008), ugyanis a két vegyület hasonlóságából adódóan lebontási útvonalaik átfednek egymással (Evans et al. 1992, Tsao et al. 1998). Az általunk összeállított kísérletben feltételezhetően a benzol és a xilol izomerek kölcsönösen gátolták egymás biodegradációját, mely magyarázza, hogy az első 24 óra után csökkenő tendenciát mutató benzol, *p*-, *m*-, és *o*-xilol vegyületek lebontása miért lassult le annyira, hogy további 96 órára volt szükség, hogy teljesen eltűnjenek az üvegekből.

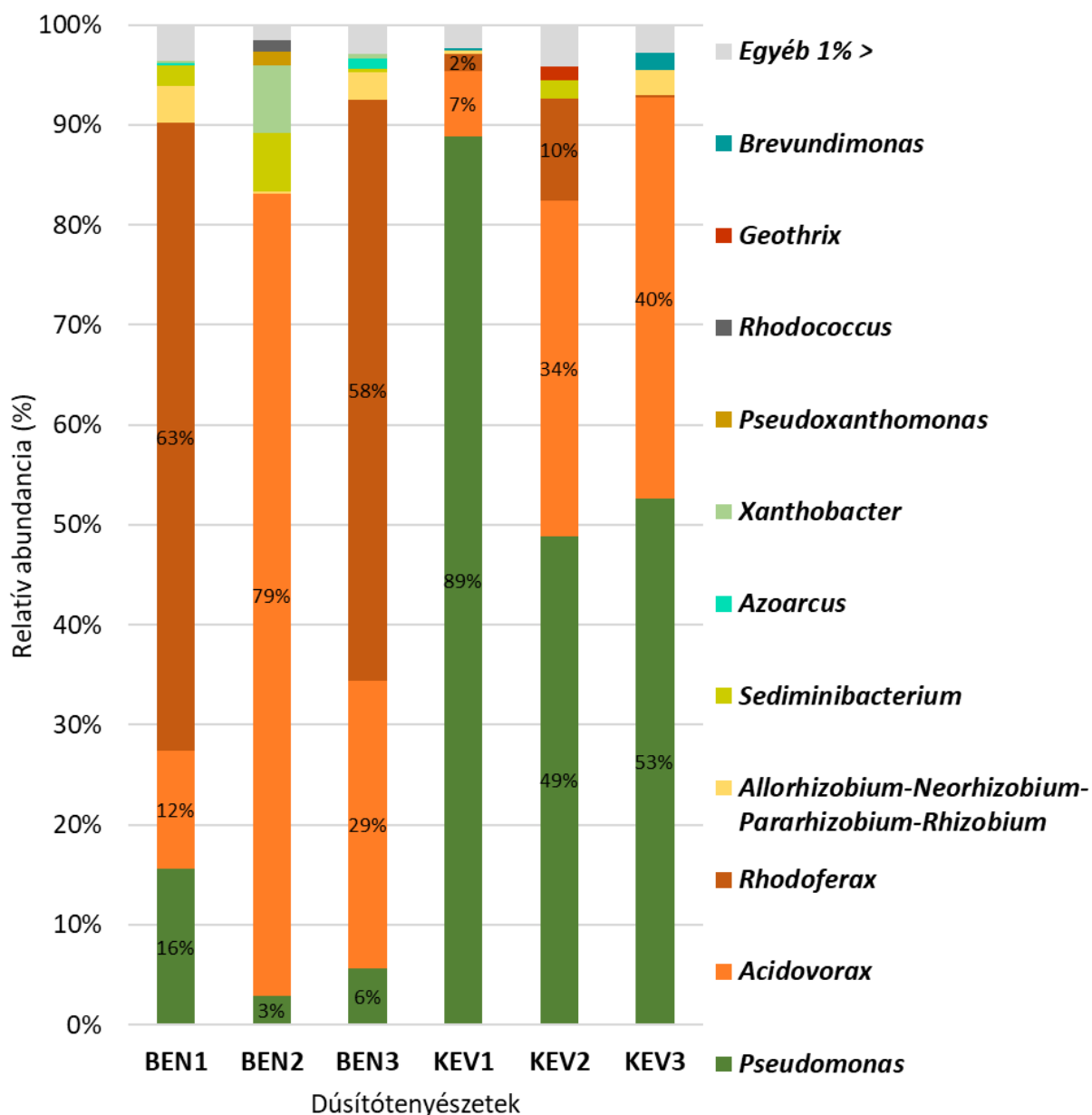




3. ábra: Az ötödik heti dúsítótenyészetek BTEX lebontásának nyomon követése. A BTEX vegyületek mennyiségét a kiindulási koncentrációhoz (0. órában történt GC-MS mérés) képest %-os arányban ábrázoltuk. **A**- a mikroaerob benzollebontás összehasonlítása a benzol (BEN) és BTEX keverék (KEV) tartalmú dúsítótenyészetekben; **B**- a BTEX keverék tartalmú dúsítótenyészetekben (KEV) lévő aromás szénhidrogén komponensek fogyása. A (B) ábra abiotikus kontrollja valamennyi BTEX vegyület 24 óránként mért átlagából adódott (összesen 60 $\mu\text{L/L}$ koncentrációban).

3.2.2. Mikroaerob dúsítótenyészetek baktériumközösségének vizsgálata 16S rDNS amplikonszekvenálással

A benzol és más BTEX keverék tartalmú dúsítótenyészetek baktériumközössége összetételében hasonló volt egymáshoz, azonban a domináns fajok arányában jelentős eltéréseket tapasztaltunk (4. ábra). Míg a csak benzolt tartalmazó tenyészetekben a *Rhodoferrax* nemzetség tagjai voltak dominánsok, a keverék tartalmúakat leginkább a *Pseudomonas* nemzetség uralta. Ezen kívül az *Acidovorax* nemzetség is számottevő volt és hasonló abundanciával volt jelen mindkét típusú dúsítótenyészet esetében. A BEN2 mintában a csak benzolt tartalmazó dúsító tenyészetekre jellemző *Acidovorax*, míg a KEV1-es mintákban a szintén a BTEX keveréket tartalmazó dúsítótenyészetekben domináns *Pseudomonas* mutatott sokkal intenzívebb növekedést, mely adódhatott a kezdeti üledékes talajvíz minta inhomogenitásából is, illetve az is előfordulhat, hogy ezek a fajok a szénforrásért folytatott kompetíció során három mintából egyben sikeresebbnek bizonyultak társaiknál. A legjelentősebb nemzetségek mellett a *Geothrix* és a *Brevundimonas* nemzetségeket is azonosítottuk a keverék tartalmú dúsítókból, illetve a *Rhizobium*, *Azoarcus*, *Pseudoxanthomonas* és *Xanthobacter* nemzetségek detektálására is sor került a benzollebontó tenyészetekből.

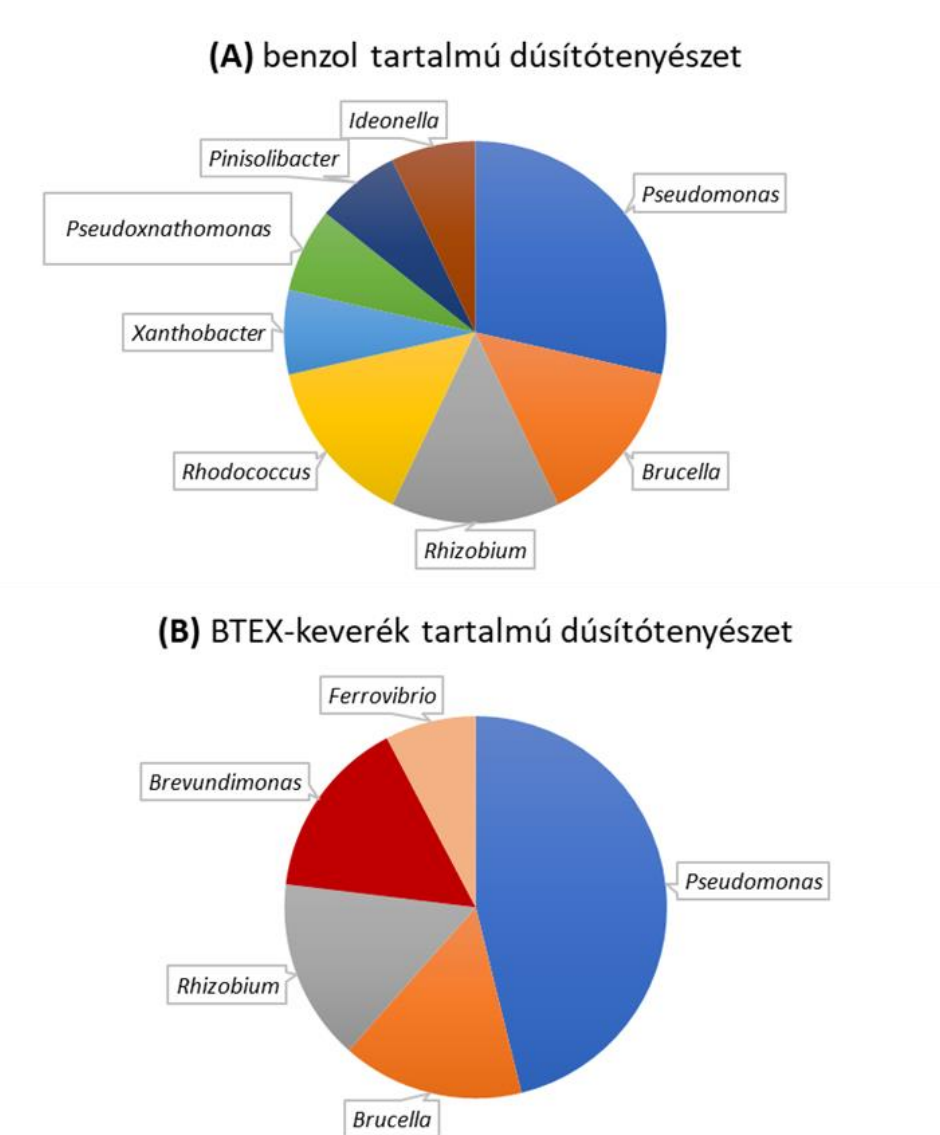


4. ábra: A BEN és KEV dúsítótenyészetek baktériumközösségeinek nemzetség szintű eloszlása a 16S rRNS gén Illumina ampikon szekvenálási adatai szerint. Csak az 1%-nál nagyobb abundanciával rendelkező taxonokat ábrázoltuk.

3.2.3. A dúsítótenyészetekből izolált tenyésztethető baktériumközösség összetétele

Az 5. heti dúsítótenyészetekből baktériumtörzsek izolálására is sor került. A hagyományos tenyésztési eljárás során diverz, tíz különböző nemzetséget magába foglaló baktériumközösséget sikerült létrehozni a dúsítótenyészetekből az összesen izolált 26 db törzsből (5. ábra). Tenyésztési eljárással a domináns közösségalkotó fajok közül egyedül a *Pseudomonas* nemzetségbe tartozókat sikerült izolálni mindkét típusú dúsítótenyészetből. A tenyésztett baktériumközösség két, számunkra legjelentősebb tagját a benzollebontó dúsítótenyészetből izoláltuk. Az egyik a

mindössze egy típustörzset magába foglaló *Pinisolibacter* nemzetségbe tartozott és a 16S rRNS gén alapján 97,4%-os hasonlóságot mutatott a *P. ravus* E9^T törzssel, mely alapján feltételezhető volt, hogy az általunk izolált törzs a *Pinisolibacter* nemzetség egy új fajként leírható tagja lehet, melyet most először sikerült tenyésztésbe vonni aromás szénhidrogénnel szennyezett felszín alatti környezetből. A másik izolátumunk az *Ideonella dechloratans* CCUG 30977^T törzssel állt legközelebbi rokonságban, a 16S rRNS gén hasonlósága 99,15% volt a két törzs között, ugyanakkor az I.2.C. C23O génekre specifikus PCR eredménye szerint rendelkezik ezzel a funkciógénnel, mely alapján feltételeztük, hogy a törzs az *Ideonella* nemzetség egy potenciálisan új fajjelöltje.



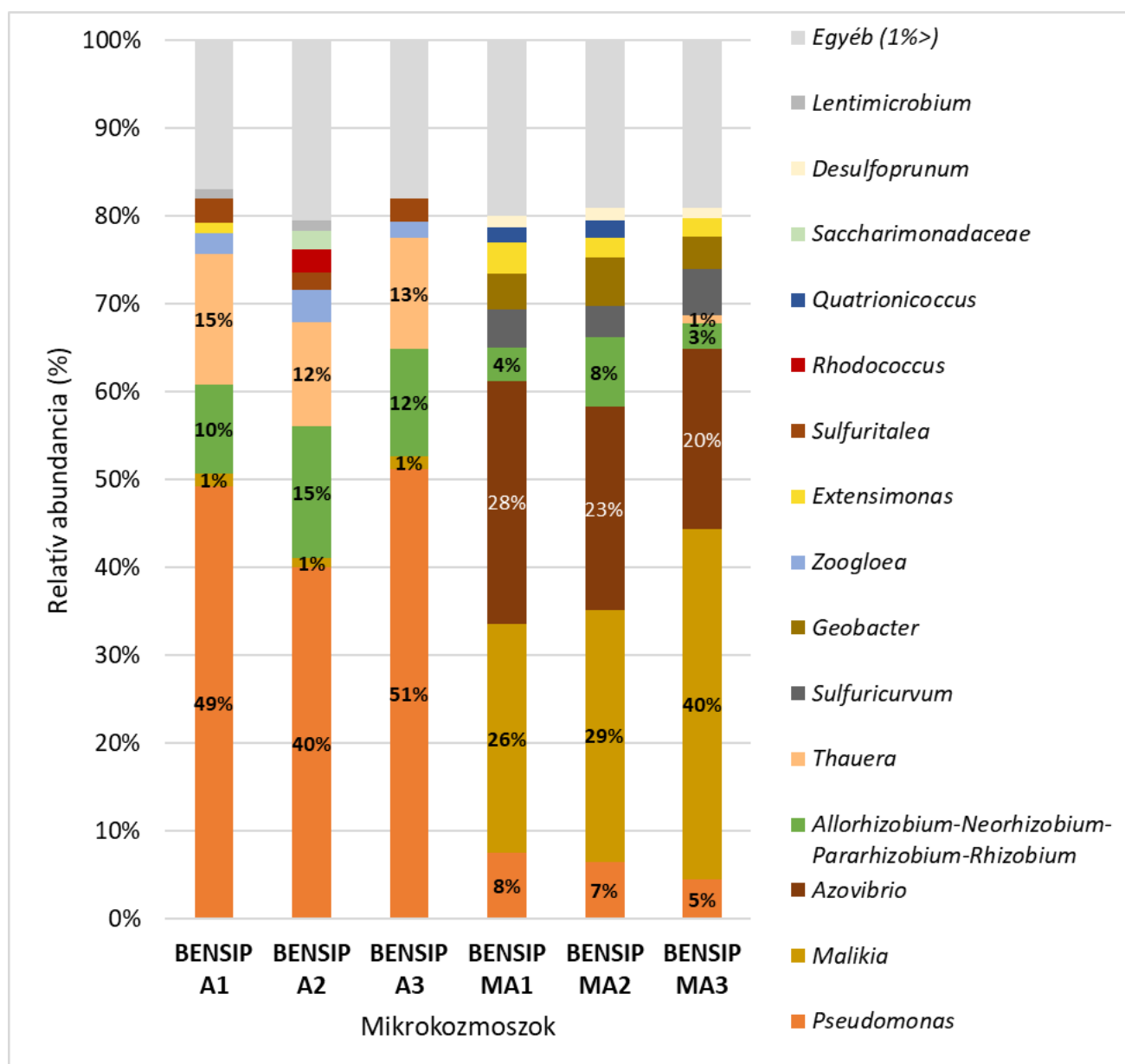
5. ábra: A dúsítótenyészetekből izolált baktériumtörzsek nemzetség szintű bemutatása. **A** – benzolbontó dúsítótenyészet tenyésztett baktériumközössége; **B** – keverék (BTEX) tartalmú dúsítótenyészet tenyésztett baktériumközössége

3.2. Stabil izotópos módszerrel (SIP) vizsgált benzollebontó mikrokozmoszok eredményeinek értékelése

3.2.1. Aerob és mikroaerob benzollebontó mikrobaközösségek vizsgálata 16S rDNS amplikonszekvenálással

Az aerob mikrokozmoszokat a *Pseudomonas* nemzetség tagjai dominálták 40-51% relatív abundancia értékkel, ezen kívül a *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* (10-15%) és a *Thauera* (12-15%) nemzetségek tagjai voltak kiemelkedő mennyiségben jelen. A főbb *Pseudomonas* OTU-k a *P. aromaticivorans* (35-45%) és a *P. stutzeri* fajkomplex tagjaihoz (4-5%) kapcsolódtak 99,4%-os 16S rRNS génszekvencia hasonlóságot mutatva, melyek jelentős aromás szénhidrogén-bontó mikroorganizmusok (Banerjee et al. 2022, Brown et al. 2017, Li et al. 2022). Valamennyi aerob mikrokozmoszban kevésbé domináns, azonban jelentős közösségalkotó tagok voltak a *Zoogloea* (2-3%), a *Sulfuritalea* (~2%) és a *Malikia* (~1,5%) nemzetség tagjai is.

A mikroaerob mikrokozmoszok esetében a *Malikia* (26-40%) és *Azovibrio* (20-28%) nemzetség tagjai uralták a közösséget. Megfigyelhető, hogy a *Pseudomonas* nemzetség abundanciája jelentősen csökkent az aerob mikrokozmoszokhoz képest, melynek hátterében a *P. aromaticivorans* OTU 1% körülire történő redukálódása állhat az aerobban tapasztalt 35-45%-hoz képest. Az *Azovibrio* nemzetséget kizárólag a mikroaerob mikrokozmoszokban sikerült azonosítani, aerob körülmények között nem mutattuk ki a jelenlétüket. A nemzetség ökológiai szerepéről és szénhidrogénbontó képességéről keveset tudunk. Táncsics és munkatársai (2023) sikeresen azonosították az *A. restrictus* fajt egy mikroaerob xilol-bontó dúsítótenyészetben, melyben a *Rhodoferrax* nemzetséggel feltételezhetően hasonló ökológiai niche-t töltöttek be. Ezt megelőzően soha nem számoltak be az *Azovibrio* BTEX lebontásában betöltött funkciójáról, ugyanis ennek a baktériumnak az ökológiai szerepe gyakran rejtve marad még a releváns környezeti mikrobiológiai vizsgálatok során is. Az *Azovibrio* nemzetséget képviselő OTU legközelebbi rokona szintén az *A. restrictus* volt, mellyel mindössze 95,7%-os 16S rRNS génszekvencia hasonlóságot mutatott. Táncsics és munkatársai (2024) alapján a kárhelyről izolált *Azovibrio* nemzetségbe tartozó baktérium feltételezhetően a *meta*-hasítási útvonalat használja a benzol lebontására. A stabil izotóposan jelölt benzolbontó mikrokozmoszok (BENSIP) baktériumközösségének nemzetség szintű eloszlását a 6. ábra foglalja össze.

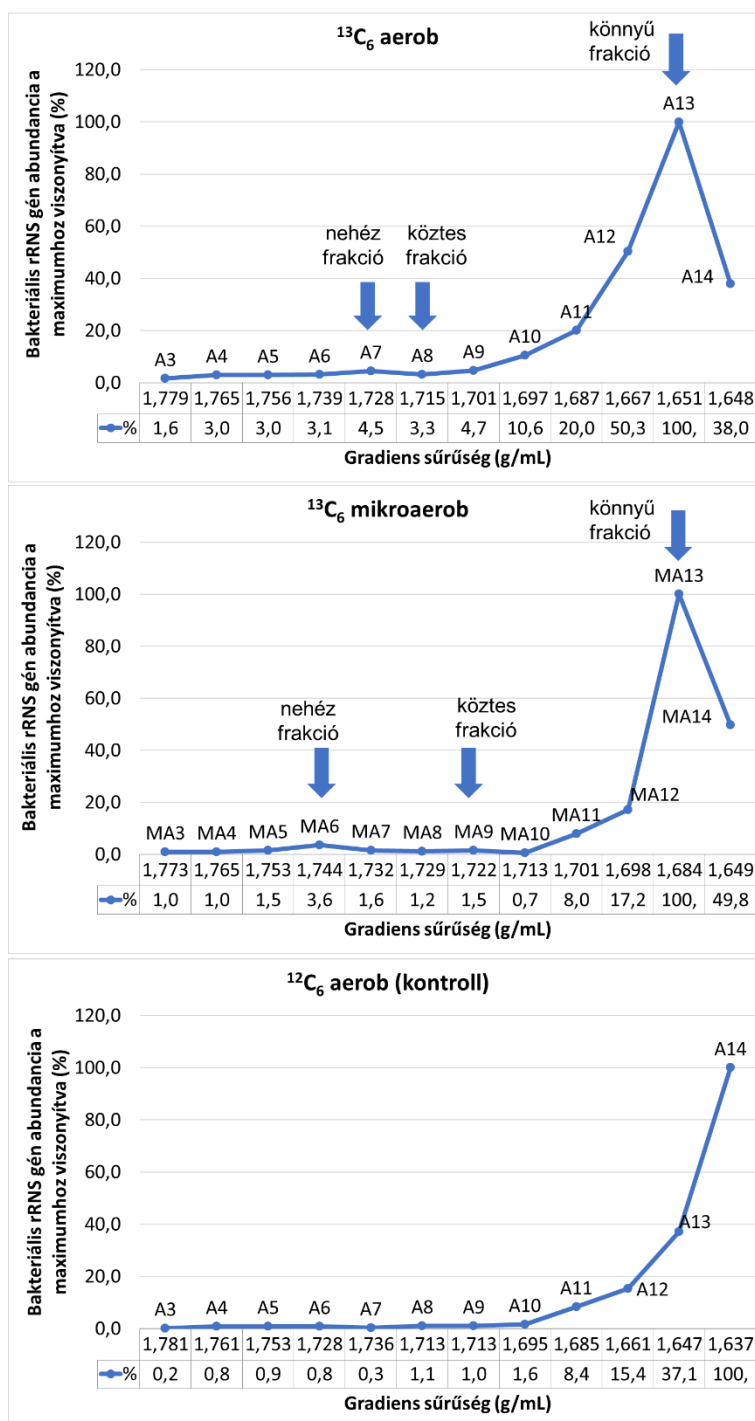


6. ábra: A stabil izotóposan jelölt benzol-bontó mikrokozmoszok (BENSIP) baktériumközösségének nemzetség szintű eloszlása az Illumina 16S rRNS gén amplikon szekvenálás adatai szerint. Csak az 1%-nál nagyobb abundanciával rendelkező taxonokat ábrázoltuk. **A-** aerob; **MA-** mikroaerob.

3.2.2. A mikrobaközösségek alakulása a könnyű és a nehéz DNS frakciókban

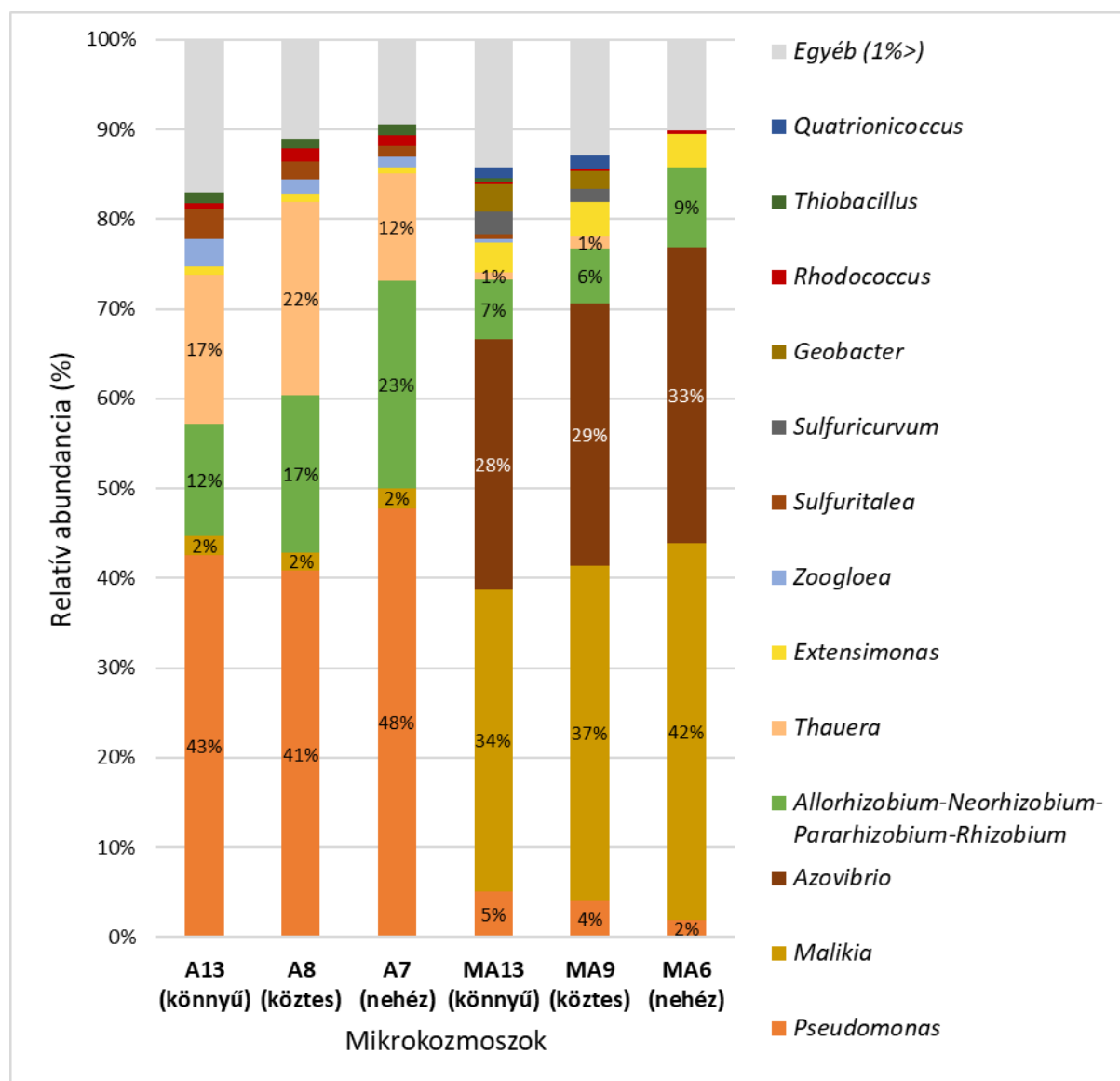
A DNS minták sűrűség szerinti ultracentrifugálással történő elválasztása után az egyes frakciók 16S rDNS kópiaszámát qPCR segítségével határoztuk meg, mely alapján következtettünk arra, hogy mely frakciók tartalmazzák a jelölt (nehéz frakció: A7, MA6) és a jelöletlen (könnyű frakció: A10-A14, MA11-MA14) DNS-t, emellett megkülönböztettünk köztes frakciókat (A8, MA7-MA10) is a 16S rDNS kópiaszáma, illetve a sűrűség értékek alapján. A nehéz frakció tartalmazza a közösség azon tagjainak DNS-ét, melyek a metabolizmus során az izotóposan jelölt

benzolt beépítették a DNS-láncba. Az 7. ábrán egy jelöletlen benzolt tartalmazó aerob kontroll, illetve az izotóposan jelölt benzol tartalmú aerob és mikroaerob mikrokozmoszokból elválasztott frakciók qPCR eredményei láthatók.



7. ábra: A sűrűség szerint elválasztott frakciók, valamint a könnyű és a nehéz DNS csúcsok elkülönítése a 16S rRNS gén abundanciája alapján. A frakciók (A- aerob frakciók, MA- mikroaerob frakciók) számozása 3-tól 14-ig tart (az 1-2-es, valamint a 15-18-as frakciók ki lettek zárva a további vizsgálatokból). Az x tengely alatti táblázatban felül az egyes frakciókhoz hozzárendelt gradiens sűrűség értékek (g/mL), alul pedig a 16S rRNS gén abundanciájának %-os értékei láthatók.

A könnyű és a nehéz DNS csúcsok meghatározása után ezek frakcióiból (MA6, MA13, A7, A13), illetve a kiválasztott köztes DNS frakciókból (A8, MA9) 16S rDNS amplikon szekvenálást végeztünk, melynek eredménye látható a 8. ábrán.



8. ábra: A stabil izotóposan jelölt benzolbontó mikrokozmoszokból elválasztott könnyű és nehéz DNS frakciók baktériumközösségének nemzetség szintű eloszlása az Illumina 16S rRNS gén amplikon szekvenálás adatai szerint. Csak az 1%-nál nagyobb abundanciával rendelkező taxonokat ábrázoltuk. A- aerob; MA- mikroaerob.

Az aerob mikrokozmoszokban a *Pseudomonas* és *Rhizobium* nemzetségeket benzolbontóként azonosítottuk, ugyanis a nehéz DNS-frakcióban megnövekedett abundanciával voltak jelen (*Pseudomonas*: 48%, *Rhizobium*: 23%) a könnyű frakcióhoz viszonyítva

(*Pseudomonas*: 43%, *Rhizobium*: 12%), azonban ahhoz, hogy egyértelműen kijelenthessük a *Pseudomonas* nemzetség aerob benzolbontásban betöltött szerepét, e nemzetség esetében érdemes faj szinten is megvizsgálni, hogy melyekre vonatkozik pontosan a mennyiségi gyarapodás. A *P. aromaticivorans* OTU esetében a könnyű frakcióban megfigyelt 37%-os abundancia 43%-ra nőtt a nehéz DNS-frakcióban, azonban a *P. stutzeri* OTU esetében ezzel ellentétes tendencia volt megfigyelhető, mivel a könnyű frakcióban detektáltuk nagyobb arányban a jelenlétét (4% és 2,7%). A tapasztalt eredmények alapján a *P. aromaticivorans* baktériumfaj egyértelműen kiemelkedő benzolbontóként azonosítható aerob körülmények között. További érdekes megfigyelés volt, hogy a *Thauera* nemzetséghez tartozó baktériumok abundanciája a köztes frakcióban (22%) volt a legjelentősebb. Ennek a jelenségnek pontos magyarázata nem ismert, ugyanakkor feltételezhető, hogy a generációs ideje hosszabb ezeknek a baktériumoknak, mint a többinek, és kevésbé dúsul fel a DNS-ükben a nehéz izotóp annak ellenére, hogy képesek bontani a benzolt. A mikroaerob mikrokozmoszok esetében a két fő közösségmeghatározó szereplő, a *Malikia* és az *Azovibrio* egyértelműen benzolbontóként azonosíthatóak, ugyanis mindkét nemzetség számottevően nagyobb abundanciát mutatott a nehéz frakcióban (*Malikia* - 42%, *Azovibrio* - 33%) a könnyű frakcióhoz viszonyítva (*Malikia* - 34%, *Azovibrio* - 28%). A mikroaerob mikrokozmoszok esetében a kiválasztott MA9-es köztes frakcióban nem tapasztaltunk egyik taxon esetében sem jelentős feldúsulást, valóban köztes frakcióként működött.

3.3. Új aromás szénhidrogén lebontásra képes baktériumfajok leírása

3.3.1. *Pinisolibacter aquiterrae* B13^T törzs jellemzése és új fajként történő leírása

Az *Ancalomicrobiaceae* családba sorolt (*Hyphomicrobiales*; szinonimája: *Rhizobiales*) *Pinisolibacter* nemzetség a közelmúltban került leírásra Dahal és munkatársai által (2018), a család szerepéről korábban nem számoltak be kőolajszennyezett területek természetes közösségeiben. A *Pinisolibacter aquiterrae* faj, mivel nemzetségének mindössze második képviselője, ezért nem csak a *Pinisolibacter* sp. B13^T törzs jellemzésén keresztül kerül leírásra, hanem két azonos fajhoz tartozó izolátumon elvégzett kísérletek által mutatjuk be a fajt. A B13^T törzs mellett a másik törzs, a *Pinisolibacter* sp. MA2-2 jelölésű, mely Dr. Sinchan Banerjee által került izolálása egy *xilol*-izomerek azonos arányú keverékéből létrehozott mikroaerob dúsítótényezsetből, melyhez a mintát 2019 októberében gyűjtöttük Siklósról.

A 16S rRNS génszekvenciák összehasonlító elemzése szerint a B13^T és az MA2-2 törzsek a *Pinisolibacter ravus* E9^T (97,4%), a *Siculibacillus lacustris* SA-279^T (96,3%) és az *Ancalomicrobium adetum* NBRC 102456^T (94,05%) törzsekkel állnak a legközelebbi rokonságban, melyekkel egy leszármazási ágon klasztereződtek.

A B13^T törzs teljes genom analízise alapján rendelkezik a monoaromás szénhidrogének lebontásához szükséges genetikai háttérrel. Egy részleges *meta*-gyűrűhasítási útvonalat kódoló génklaszter részeként sikerült azonosítani az alphaproteobaktériumokra jellemző I.2.B típusú katekol-2,3-dioxigenáz (*C23O*) gént. Az általunk azonosított *meta*-gyűrűhasítási útvonalat kódoló génklaszter nem bizonyult teljesnek, mivel hiányoztak belőle a gyűrű aktiválásához szükséges gének, csak a gyűrűhasításhoz és az útvonal alsóbb lépéseinek katalizálásához szükséges gének voltak megtalálhatóak. Ugyanakkor egy, az aromás gyűrű aktivációjára képes toluol-monooxigenázt kódoló génklasztort is találtunk a genomban, amely potenciálisan kiegészítheti a részleges *meta*-gyűrűhasítási útvonalat kódoló génklasztort, és aromás szénhidrogén-lebontó képességet biztosít a B13^T törzs számára. A katekol-2,3-dioxigenázt, illetve a toluol-monooxigenázt kódoló génklasztort az MA2-2 törzsben is megtaláltuk, mely teljes mértékben megegyezett a B13^T típustörzsben azonosítottal. Ezen kívül a B13^T és az MA2-2 törzs genomjában is fellelhető az etil-benzol metabolizmus egyik lehetséges kezdeti enzimét kódoló gén, az etil-benzol-dehidrogenáz.

A *Pinisolibacter* sp. B13^T és MA2-2 törzsek aromás szénhidrogén-bontó képességét a GC-MS vizsgálatok segítségével is igazoltuk, mely alapján a hat aromás szénhidrogén közül a B13^T és MA2-2 törzs egyedüli szénforrásként kizárólag az etil-benzolt volt képes hasznosítani. Azonban az összes BTEX vegyület jelenlétében végzett kísérletekben azt tapasztaltuk, hogy valamennyi aromás szénhidrogén bontására képes volt, melynek során feltehetően az aromás vegyületek egymás lebontási hatékonyságát serkentik, illetve közben kometabolikus folyamatok aktiválódtak.

A faj leírásához szükséges vizsgálatokat a nemzetközi követelményeknek megfelelően a polifázikus taxonómia szemléletét követve végeztük el. A *Pinisolibacter* B13^T törzsszel végzett filogenetikai, morfológiai, biokémiai és kemotaxonómiai vizsgálatok eredményei alapján a B13^T jelű törzs a *Pinisolibacter* nemzetségen belül egy új fajt képvisel, melynek a *Pinisolibacter aquiterrae* nevet adtuk. A típustörzset letétbe helyeztünk az LMG 32346^T és az NCAIM B.02665^T azonosítókkal a törzsgyűjteményeknél.

3.3.2. *Ideonella benzenivorans* B7^T törzs jellemzése és új fajként történő leírása

A B7^T törzs a legtöbb BTEX bontó nemzetséget magába foglaló *Comamonadaceae* családon belül az *Ideonella* nemzetség tagja, melyen belül a teljesgenom alapú filogenetikai elemzések alapján az *Ideonella dechloratans* CCUG 30898^T törzsszel volt a legszorosabb rokonságban, azonban az *Ideonella* nemzetségen belül külön leszármazási vonalat alkot.

A B7^T törzs teljes genom analízise során megvizsgáltuk, hogy rendelkezik-e a monoaromás szénhidrogének lebontásához szükséges genetikai háttérrel, mely során azonosítottuk a katekol-2,3-dioxigenáz (C23O) gént egy fenol-lebontásért felelős génklaszterben, amely egy többkomponensű fenol-hidroxilázt (mPH) és egy teljes *meta*-hasítási útvonalat kódolt. Ezen kívül sikerült azonosítani az etil-benzol dioxigenáz egyik alegységének kódolásáért felelős gént, így feltételeztük, hogy a B7^T törzs részt vehet az etil-benzol metabolizációjában is. Azonban a xilolok metil-benzil-alkohollá történő képződését katalizáló xilol-monooxigenáz gének hiányoztak, így a törzs xilol-bontáshoz szükséges genetikai háttere hiányosnak bizonyult.

A B7^T törzs aromás szénhidrogén bontó képességéről GC-MS mérések segítségével is meggyőződünk, melynek során megfigyeltük, hogy a B7^T törzs képes volt aerob és mikroaerob módon egyaránt lebontani a benzolt, a toluolt és az etil-benzolt, mint egyedüli szén- és energiaforrást. A B7^T törzs nem volt képes a xilolokat egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítani, azonban az összes BTEX komponens jelenlétében valamennyi xilol-izomer mennyisége csökkent 48 órán belül, viszont miután a benzol, toluol és etil-benzol teljesen lebomlott a környezetükből, a xilolok koncentrációja nem csökkent tovább, melynek oka, hogy aerob viszonyok között a benzol és a toluol jelenlétében a xilol vegyületek kometabolizálódnak, viszont ezek hiányában egyedüli szénforrásként nem volt képes a xilol vegyületek teljes lebontására a törzs.

A faj leírásához szükséges vizsgálatokat a nemzetközi követelményeknek megfelelően a polifázikus taxonómia szemléletét követve elvégeztük. Az *Ideonella* B7^T törzzsel végzett filogenetikai, morfológiai, biokémiai és kemotaxonómiai vizsgálatok eredményei alapján megállapítható, hogy a B7^T jelű törzs az *Ideonella* nemzetségen belül egy új fajt képvisel, melynek az *Ideonella benzenivorans* nevet adtuk. A típustörzset letétbe helyeztünk az LMG 32345^T és az NCAIM B.02664^T azonosítókkal a törzsgyűjteményeknél.

3.3.3. *Acidovorax benzenivorans* D2M1^T törzs jellemzése és új fajként történő leírása

Banerjee és munkatársai (2022) által egy *meta*-xilol lebontó dúsítótenyészetből izolált *Acidovorax* sp. törzs jellemzésére is sor került a dolgozat keretein belül. A törzs az *Acidovorax delafieldii* DSM64^T törzzsel áll legközelebbi rokonságban a 16S rRNS gén alapján (99,93%), akárcsak a benzol-tartalmú (BEN) dúsítótenyészetekben az *Acidovorax* nemzetséget képviselő OTU. Ezek alapján feltételezhetően a kárhely egy endemikus, domináns közösségalkotó fajáról van szó, mely potenciálisan részt vehet a mikroaerob benzollebontásban, így a genomelemzés és az új fajként történő leírás eredményei a jelen dolgozat keretén belül kerülnek bemutatásra. A teljes

genom alapú filogenetikai elemzések alapján a D2M1^T törzs az *Acidovorax* nemzetségen belül új fajként írható le.

A genomelemzés során azonosítottuk az I.2.C-típusú katekol-2,3-dioxigenáz (*C23O*) gént egy teljes *meta*-gyűrűhasítási útvonalat kódoló fenol-lebontó génklaszter részeként, melyben az aromás gyűrű aktivációját a több-komponensű fenol-hidroxiláz (mPH) rendszer látja el. Három, a klasztert határoló IS3 és IS5 családba tartozó, transzpozonokat kódoló ORF-et is azonosítottunk „downstream” helyzetben. Az ilyen mobilis genetikai elemek elősegítik a horizontális géntranszfert, és ezáltal biztosítják a mikoorganizmusok gyors alkalmazkodását az új szennyezőanyagokhoz és növelik a *C23O* génnek diverzitását (Díaz 2004). A transzpozonok jelenléte a fenol-bontó génklaszter közelében feltehetően azt jelzi, hogy a D2M1^T törzs horizontális géntranszfer révén tett szert a génklaszterre. Az *Acidovorax* törzs az extradiol hasítási útvonala mellett a teljes genom elemzése alapján rendelkezett az aromás gyűrű intradiol hasításáért felelős klórkatekol 1,2-dioxigenáz génnel, azonban az *orto*-hasítási útvonal egyéb génjeit nem sikerült azonosítani a gén közelében. Ezek alapján feltételeztük, hogy a BTEX-vegyületek jelenlétének hatására a *meta*-gyűrűhasítási útvonal génjei fejeződnek ki és az aromás szénhidrogének lebontása ezen keresztül történik. Az etil-benzol lebontás egy másik lehetséges útja a naftalin lebontásához szükséges enzimek segítségével valósul meg (Lee és Gibson 1996, Lee et al. 2019), melyre találtunk bizonyítékot a genomban, mely alapján feltételezhető, hogy a D2M1^T törzs az etil-benzol lebontására is képes lehet.

Az *Acidovorax* sp. D2M1^T törzs aromás szénhidrogén-bontó képessége a GC-MS vizsgálatok segítségével győződünk meg, mely mérési eredményei alapján a D2M1^T törzs képes volt aerob és mikroaerob módon a benzolt és az etil-benzolt egyedüli szén-, és energiaforrásként hasznosítani, míg a xilolok bontására nem volt képes. Más monoaromás szénhidrogének jelenlétében egy nagyon lassú folyamat eredményeként a toluol is lebomlott 5 napon belül, hasonlóan a benzolhoz. Oxigénszegény környezetben a toluol és az etil-benzol egymásra, valamint a benzol biodegradációjára is serkentő hatással vannak, azonban aerob körülmények között gátolják a benzol biodegradációt. A toluol aerob lebontását azonban a benzol jelenléte fokozza (Littlejohns és Daugulis 2008). A két jelenség együtt magyarázattal szolgálhat a toluol lebomlására és a két vegyület közel azonos ütemben történő csökkenésére.

A faj leírásához szükséges vizsgálatokat a nemzetközi követelményeknek megfelelően a polifázikus taxonómia szemléletét követve elvégeztük. Az *Acidovorax* D2M1^T törzssel végzett filogenetikai, morfológiai, biokémiai és kemotaxonómiai vizsgálatok eredményei alapján megállapítható, hogy a D2M1^T jelű törzs az *Acidovorax* nemzetségen belül egy új fajt képvisel, melynek az *Acidovorax benzenivorans* nevet adtuk. A típustörzset letétbe helyeztünk az DSM 115238^T és a NCAIM B.02679^T azonosítókkal a törzsgyűjteményeknél.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS A JAVASLATOK

A kőolajszennyezés mértéke jelentősen megnövekedett a globalizáció és az iparosodás miatt, így az olaj napjaink egyik leggyakoribb környezetkárosító anyaga. Valamennyi BTEX vegyület közül legkártékonyabbnak a benzol mondható humán egészségügyi és környezetvédelmi szempontból is (ATSDR 2015, Arnold et al. 2013, Dési 2001). A mikroorganizmusok az ökoszisztémák regenerációjában kulcsszerepet játszanak, ugyanis idővel a mikrobiális ökoszisztéma adaptálódik az új szénforráshoz és megkezdik a szennyezőanyag lebontását enzimkatalizált folyamatok által. Egy diverz enzimmérettel rendelkező közösség együttműködése által valósulhat meg a kevert szennyezés teljes spektrumának eltávolítása (Goldschneider et al. 2006), emellett jelentős szerepet játszhatnak a kometabolikus és egyéb szubsztrát-kölcsönhatások a lebontás során (Littlejohns és Daugulis 2008). Az aromás vegyületek lebontási folyamatának kulcsenzimjei általában olyan mono-, és dioxigenázok, melyek az aromás gyűrű aktivációját, majd a hasítását végzik, végül további átalakítási lépéseket követően a reakciótermékek a központi anyagcsereútvonalak révén hasznosulnak (Pérez-Pantoja et al. 2010). Az I.2.C-típusú katekol-2,3-dioxigenáz enzimek jelentős szerepet töltenek be az oxigénszegény felszín alatti környezetekben történő aromás szénhidrogének lebontásában, ugyanis nyomnyi mennyiségű oxigén jelenlétében is aktívak maradnak és így az aromás vegyületekkel szennyezett oxigénlimitált közegekben jelentős e gének diverzitása a baktériumközösségben (Eltis és Bolin 1996, Kukor és Olsen 1996, Tánicsics et al. 2012, 2013). A gének sokszínűségét fokozza, hogy a közösségen belül horizontális géntranszfer útján terjednek (Villa et al. 2019). Napjaink releváns tudományos célkitűzése az olyan benzollebontó baktériumközösségek és baktériumtörzsek vizsgálata, melyek a felszín alatti oxigénszegény környezetben is mutatnak biodegradációs aktivitást.

Eredményeink alapján az, hogy mely baktériumközösség tagjai válnak dominánssá, nagyban függ a szénforrás típusától, illetve attól, hogy az aromás szénhidrogén önmagában vagy egyéb BTEX vegyületekkel együtt van jelen a baktériumok környezetében. Emellett egy szennyezett kárhely kármentesítése során nem szabad figyelmen kívül hagyni az aromás vegyületek közti szubsztrát interakciók biodegradációra gyakorolt hatását, ugyanis a természetes ökoszisztémákban többségében kevert szennyezésekről beszélhetünk. Elvégzett kísérleteink alapján egyértelmű megerősítést nyert, hogy az aromás szénvegyület típusa mellett az oldott oxigén mennyisége is nagy hatást gyakorol az aerob lebontó baktériumközösség összetételére, ugyanis más mikroszervezetek vettek részt a benzol biodegradációjában aerob és mikroaerob körülmények mellett. Továbbá nem csak a domináns közösségalkotók feldúsulásából következtethetünk az

egyes nemzetségek biodegradációs képességére, hanem a stabil izotópos vizsgálatok eredményeinek köszönhetően megerősíthetjük azok kiemelkedő szerepét a benzollebontásban.

A dúsítótenyészetes és a mikrokozmoszok közösségösszetételének eltérőségére magyarázatul szolgálhat, hogy az eltérő inkubációs idő jelentős hatást gyakorolhatott a baktériumközösség alakulására, melynek során nem csak az számított, hogy öt héten át benzol tartalmú közeget biztosítottunk, hanem hogy öt héten át mikroaerob körülményeknek volt kitéve az alapközösség, mely alatt stabil mikroaerob benzolbontóvá alakult. Egy öt hetes dúsítófolyamat során az elérhető szénforrásért folytatott kompetíció révén ugyanis a gyorsabban szaporodó nemzetségek nagyobb teret nyerhetnek, míg az egy hetes inkubációs idő után végzett közösségmonitorozás során nagyobb valószínűséggel detektálunk olyan fajokat, melyek öt hét alatt háttérbe szorulhatnak. Emellett a hasonló ökológiai niche-t betöltő nemzetségek, mint a *Rhodospirillum rubrum* és az *Azotobacter vinelandii* esetében, szintén előfordul, hogy hol az egyik, hol a másik nemzetségbe tartozó fajok válnak dominánssá.

A tudomány számára ismeretlen, új fajok izolálására remek lehetőség nyílik egy aromás szénhidrogénnel szennyezett felszín alatti kárhelyen, ugyanis a sok élőlény számára toxikus, nagy mennyiségben jelenlévő kőolajszennyezés erős szelekciós nyomást gyakorol az ott élő endemikus közösségre, mely által ezeken a területeken elterjedt baktériumfajok magas genetikai diverzitással rendelkeznek, így lényegében az említett kárhelyek evolúciós forrópontoknak tekinthetők. A molekuláris technikák fejlődésével napjainkban a tenyésztéses vizsgálatokra kisebb hangsúly helyeződik. Ugyanakkor az általunk izolált új fajokkal végzett vizsgálatok is rámutatnak arra, hogy a molekuláris biológiai módszerekkel felállított hipotézisek megerősítésére, valamint az eredmények kiegészítésére a klasszikus mikrobiológiai módszerek ma is kiválóan alkalmasak, mivel a baktériumok számos, felhasználhatóságuk tekintetében igen fontos tulajdonságára, mint pl. a metabolizációs képességükre csak így derülhet fény.

Az egyes baktériumtörzsekkel végzett bontási kísérletek során nagy hangsúlyt kapott, hogy az új fajok egyedüli szén-, és energiaforrásként is képesek legyenek egy-egy BTEX vegyületet metabolizálni, az *Ideonella benzeivorans* B7^T és az *Acidovorax benzenivorans* D2M1^T esetében pedig kiváltképp a benzolt hasznosítani, ugyanis a természetes környezetben, akár csak egy esetleges oltóanyag konzorciumban azok a baktériumok működnek jól együtt a kőolajszennyező lebontásában, melyek képesek egymás bontási spektrumát kiegészíteni. Ennélfogva fontos, hogy egy perzisztens, nagy környezeti kockázatot jelentő vegyület, mint amilyen a benzol is, önmagában is hasznosítható szénforrás legyen a vizsgált baktérium számára. Ritka, hogy egy, az aromás vegyületek bontásához szükséges genetikai háttérrel rendelkező törzs csak a benzol lebontására legyen képes és más monoaromás szénhidrogént egyáltalán ne tudjon hasznosítani, azonban, ha önmagában nem is, de a BTEX vegyületek közti szubsztrát interakciók és

kometabolizmus révén egyéb komponensek lebontásában is részt vehetnek a benzolbontó törzsek, így a környezetbe kijutva is versenyképes szénhidrogén lebontók lehetnek kevert BTEX szennyezés esetén is. Azonban fontos megjegyezni, hogy egy domináns közösségalkotót, mint pl. az *Acidovorax benzenivorans* D2M1^T, mely bizonyítottan képes metabolizálni a benzolt, ha kijuttatjuk a környezetbe, feltételezhetően könnyebben veszi fel a versenyt, mint egy kevésbé kompetitív faj.

Valamennyi elvégzett vizsgálatunk eredményének köszönhetően ma már pontosabb képet alkothatunk az aromás szénhidrogénekkal szennyezett felszín alatti területek mikrobiális közösségeiről, illetve a közösségalkotó mikroorganizmusok szerepéről. A molekuláris módszerek segítségével a benzollebontásban szerepet játszó domináns közösségalkotókra derült fény, míg a stabil izotópos vizsgálatokkal lehetőségünk nyílt arra, hogy az egyes közösségalkotók ökológiai szerepét tisztázhassuk, akárcsak a tenyésztési módszer segítségével izolált új fajok genomanalízise által. Tudjuk, hogy elsősorban mely taxonok megjelenésére számíthatunk a benzollal szennyezett közegekben mikroaerob körülmények mellett (pl. *Rhodoferrax*, *Acidovorax*, *Pseudomonas*, *Malikia*, *Azovibrio*), mely tudás kicsi, de fontos részletként hozzátesz a kőolajjal szennyezett területek kármentesítési technológiáinak fejlesztéséhez. A klasszikus mikrobiológia pedig az új fajok számos tulajdonságának és metabolikus képességének feltárásában volt segítségünkre. Az általunk izolált törzsekről bontási kísérletek és genomelemzésük révén is bebizonyosodott a BTEX biodegradációs potenciáljuk, így ezek a törzsek alapját képezhetik egy esetleges szabadalomnak, mely során önmagában vagy konzorciumként felhasználásra kerülhetnek egy aromás szénhidrogénekkal szennyezett kárhely bioaugmentációja során oltóanyagként.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

I. tézis: A kizárólag benzolt és a benzol dominanciája mellett toluol, etil-benzol és xilolok keverékét is tartalmazó 5 hetes, hetente átoltott mikroaerob dúsítótényészetek vizsgálata rámutatott arra, hogy a *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó baktériumok a kevert aromás szénhidrogének jelenlétében váltak abundáns közösségalkotókká. Ezzel szemben a kizárólag benzol tartalmú közegben nagyobb részt a *Rhodoferrax* nemzetségbeli mikroszervezetek voltak domináns szereplők.

II. tézis: Stabil izotóposan jelölt, benzolt tartalmazó mikrokozmoszokkal folytatott molekuláris vizsgálatokkal igazoltuk, hogy aerob környezetben a *Pseudomonas* és a *Rhizobium*, mikroaerob körülmények között pedig a *Malikia* és az *Azovibrio* nemzetségek játszanak szerepet, mint jelentős, baktériumközösségben is versenyképes benzollebontók. Az *Azovibrio* esetében egyértelmű megerősítést nyert a nemzetség aromás szénhidrogén-lebontásban betöltött ökológiai szerepe is.

III. tézis: A mikroaerob benzollebontó dúsítótényészetből sikeresen izoláltunk egy, a *Pinisolibacter* nemzetséghez tartozó baktériumtörzset, mely teljes genom analízise alapján I.2.B-típusú katekol-2,3-dioxigenáz enzimmel rendelkezik. A faj leírásához szükséges vizsgálatokat a nemzetközi követelményeknek megfelelően elvégeztük. Gázkromatográffal kapcsolt tömegspektrometria (GC-MS) segítségével igazoltuk, hogy aerob körülmények között a törzs képes az etil-benzol teljes lebontására. Az új fajnak a *Pinisolibacter aquiterrae* nevet adtuk.

IV. tézis: Sikerült izolálnunk a mikroaerob benzollebontó dúsítótényészetekből egy *Ideonella* nemzetségbeli baktériumtörzset, melynek a nemzetközi követelményeknek megfelelő leírását elvégeztük. A törzs rendelkezik egy olyan fenol-degradációs génklaszterrel, melyben kódolva van az I.2.C-típusú katekol-2,3-dioxigenáz gén egy teljes *meta*-gyűrűhasítási útvonal részeként. Gázkromatográffal kapcsolt tömegspektrometria (GC-MS) segítségével végzett vizsgálatok alapján igazoltuk, hogy a törzs képes aerob és mikroaerob körülmények között is lebontani a benzolt, az etil-benzolt és a toluolt. Az új fajnak az *Ideonella benzenivorans* nevet adtuk.

V. tézis: Molekuláris genetikai vizsgálatok alapján igazoltuk, hogy a benzolbontó dúsítótényészetek egyik domináns közösségalkotó, *Acidovorax* nemzetségbe tartozó mikroszervezete egy ez idáig ismeretlen baktériumfaj, mely rendelkezik az I.2.C-típusú katekol-2,3-dioxigenáz génnel. Gázkromatográffal kapcsolt tömegspektrometria (GC-MS) segítségével végzett vizsgálatok alapján igazoltuk, hogy a törzs képes aerob és mikroaerob körülmények között is lebontani a benzolt és az etil-benzolt. A törzs nemzetközi követelményeknek megfelelő leírását elvégeztük és az új fajnak az *Acidovorax benzenivorans* nevet adtuk.

6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Tudományos folyóiratokban megjelent, lektorált, teljes szövegű tudományos közlemény:

Bedics, A., Táncsics, A., Tóth, E., Banerjee, S., Harkai, P., Kovács, B., Kriszt, B. (2022). Microaerobic enrichment of benzene-degrading bacteria and description of *Ideonella benzenivorans* sp. nov., capable of degrading benzene, toluene and ethylbenzene under microaerobic conditions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 115(9), 1113-1128.

Bedics, A., Banerjee, S., Bóka, K., Tóth, E., Benedek, T., Kriszt, B., & Táncsics, A. (2022). *Pinisolibacter aquiterrae* sp. nov., a novel aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from benzene-, and xylene-degrading enrichment cultures, and emended description of the genus *Pinisolibacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72:005229.

Bedics, A., Táncsics, A., Banerjee, S., Tóth, E., Harkai, P., Gottschall, G.G., Bóka, K., Kriszt, B. (2024). *Acidovorax benzenivorans* sp. nov., a novel aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from a xylene-degrading enrichment culture. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 74(1), 006219.

Banerjee, S., **Bedics, A.,** Tóth, E., Kriszt, B., Soares, A. R., Bóka, K., & Táncsics, A. (2022). Isolation of *Pseudomonas aromaticivorans* sp. nov from a hydrocarbon-contaminated groundwater capable of degrading benzene-, toluene-, m-and p-xylene under microaerobic conditions. *Frontiers in Microbiology*, 13, 929128.

Banerjee, S., **Bedics, A.,** Harkai, P., Kriszt, B., Alpula, N., & Táncsics, A. (2022). Evaluating the aerobic xylene-degrading potential of the intrinsic microbial community of a legacy BTEX-contaminated aquifer by enrichment culturing coupled with multi-omics analysis: uncovering the role of *Hydrogenophaga* strains in xylene degradation. *Environmental Science and Pollution Research*, 29 (19), 28431-28445.

Táncsics, A., Banerjee, S., Soares, A., **Bedics, A.,** & Kriszt, B. (2023). Combined omics approach reveals key differences between aerobic and microaerobic xylene-degrading enrichment

bacterial communities: *Rhodoferrax* - a hitherto unknown player emerges from the microbial dark matter. *Environmental Science & Technology*, 57 (7), 2846-2855.

Táncsics, A., **Bedics, A.**, Banerjee, S., Soares, A., Baka, E., Probst, A. J., & Kriszt, B. (2024). Stable-isotope probing combined with amplicon sequencing and metagenomics identifies key bacterial benzene degraders under microaerobic conditions. *Biologia Futura*, 75(3), 301-311.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2015. Benzene toxzine. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
https://www.atsdr.cdc.gov/sites/toxzine/benzene_toxzine.html
- Arnold, S. M., Angerer, J., Boogaard, P. J., Hughes, M. F., O'Lone, R. B., Robison, S. H., & Robert Schnatter, A. (2013). The use of biomonitoring data in exposure and human health risk assessment: benzene case study. *Critical reviews in toxicology*, 43 (2), 119-153.
- Banerjee, S., Bedics, A., Tóth, E., Kriszt, B., Soares, A. R., Bóka, K., & Táncsics, A. (2022). Isolation of *Pseudomonas aromaticivorans* sp. nov from a hydrocarbon-contaminated groundwater capable of degrading benzene-, toluene-, m-and p-xylene under microaerobic conditions. *Frontiers in Microbiology*, 13, 929128.
- Banerjee, S., Bedics, A., Harkai, P., Kriszt, B., Alpula, N., & Táncsics, A. (2022). Evaluating the aerobic xylene-degrading potential of the intrinsic microbial community of a legacy BTEX-contaminated aquifer by enrichment culturing coupled with multi-omics analysis: uncovering the role of Hydrogenophaga strains in xylene degradation. *Environmental Science and Pollution Research*, 29 (19), 28431-28445.
- Brown, L. M., Gunasekera, T. S., & Ruiz, O. N. (2017). Draft genome sequence of *Pseudomonas stutzeri* Strain 19, an isolate capable of efficient degradation of aromatic hydrocarbons. *Genome Announcements*, 5, 10-1128.
- Chang, M. K., Voice, T. C., & Criddle, C. S. (1993). Kinetics of competitive inhibition and cometabolism in the biodegradation of benzene, toluene, and p-xylene by two *Pseudomonas* isolates. *Biotechnology and Bioengineering*, 41 (11), 1057-1065
- Dahal, R. H., Chaudhary, D. K., & Kim, J. (2018b). *Pinisolibacter ravus* gen. nov., sp. nov., isolated from pine forest soil and allocation of the genera *Ancalomicrobium* and *Pinisolibacter* to the family Ancalomicrobiaceae fam. nov., and emendation of the genus *Ancalomicrobium* Staley 1968. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68 (6), 1955-1962.
- Dési, I. (Szerk.) (2001): Népegészségtan, Semmelweis Kiadó, Budapest, 273-284., 323-367., 399-402., 421- 450.
- Díaz, E. (2004). Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology*, 7:173–180.

- Dou, J., Liu, X., & Hu, Z. (2008b). Substrate interactions during anaerobic biodegradation of BTEX by the mixed cultures under nitrate reducing conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 158 (2-3), 264-272.
- Eltis, L. D., & Bolin, J. T. (1996). Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases. *Journal of Bacteriology*, 178 (20), 5930-5937.
- Evans, P. J., Ling, W., Goldschmidt, B., Ritter, E. R., & Young, L. Y. (1992). Metabolites formed during anaerobic transformation of toluene and o-xylene and their proposed relationship to the initial steps of toluene mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (2), 496-501.
- Fahy, A., McGenity, T. J., Timmis, K. N., Ball, A. S. (2006): Heterogeneous aerobic benzene-degrading communities in oxygen-depleted groundwaters, *FEMS Microbiology Ecology* 58, 260–270.
- Goldschneider, N., Hunkeler, D., & Rossi, P. (2006). Review: Microbial biocenoses in pristine aquifers and an assessment of investigative methods. *Hydrogeology Journal*. 14, 926-941.
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., & Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (17), 5112-5120.
- Kukor, J. J., & Olsen, R. H. (1996). Catechol 2, 3-dioxygenases functional in oxygen-limited (hypoxic) environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (5), 1728-1740.
- Littlejohns, J. V., & Daugulis, A. J. (2008). Kinetics and interactions of BTEX compounds during degradation by a bacterial consortium. *Process Biochemistry*, 43 (10), 1068-1076.
- Lee, K., & Gibson, D. T. (1996). Toluene and ethylbenzene oxidation by purified naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816-4. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (9), 3101-3106.
- Lee, I., Ouk Kim, Y., Park, S. C., & Chun, J. (2016). OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66 (2), 1100-1103.
- Lee, Y., Lee, Y., & Jeon, C. O. (2019). Biodegradation of naphthalene, BTEX, and aliphatic hydrocarbons by *Paraburkholderia aromaticivorans* BN5 isolated from petroleum-contaminated soil. *Scientific reports*, 9 (1), 860.
- Li, X., Yang, Z., Wang, Z., Li, W., Zhang, G., & Yan, H. (2022). Comparative genomics of *Pseudomonas stutzeri* complex: Taxonomic assignments and genetic diversity. *Frontiers in Microbiology*, 12, 755874.

- Lueders, T., Manefield, M., & Friedrich, M. W. (2004). Enhanced sensitivity of DNA-and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environmental Microbiology*, 6 (1), 73-78.
- Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H. P., & Göker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics*, 14, 1-14.
- Oh, Y. S., Shareefdeen, Z., Baltzis, B. C., & Bartha, R. (1994). Interactions between benzene, toluene, and p-xylene (BTX) during their biodegradation. *Biotechnology and Bioengineering*, 44 (4), 533-538.
- Pérez-Pantoja D, González B, Pieper DH (2010) Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons. In: Timmis, K. N. (Szerk.). *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Berlin, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 799–837.
- Rodriguez-R, L. M., Castro, J. C., Kyrpides, N. C., Cole, J. R., Tiedje, J. M., & Konstantinidis, K. T. (2018b). How much do rRNA gene surveys underestimate extant bacterial diversity?. *Applied and Environmental Microbiology*, 8 (6), 14-18.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J., Weber, C. F. (2009): Introducing mothur: open-source platform-independent community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (23), 7537-7541.
- Táncsics, A., Szoboszlai, S., Szabó, I., Farkas, M., Kovács, B., Kukolya, J., Mayer, Z., Kriszt, B, (2012): Quantification of subfamily I.2.C catechol 2,3-dioxygenase mRNA transcripts in groundwater samples of an oxygen-limited BTEX-contaminated site. *Environmental Science Technology*, 46 (1), 232-240.
- Táncsics, A., Farkas, M., Szoboszlai, S., Szabó, I., Kukolya, J., Vajna, B., Kovács, B., Benedek, T., Kriszt, B, (2013): One-year monitoring of meta-cleavage dioxygenase gene expression and microbial community dynamics reveals the relevance of subfamily I.2.C extradiol dioxygenases in hypoxic, BTEX-contaminated groundwater. *Systematic and Applied Microbiology*, 36 (5), 339-350.
- Táncsics, A., Banerjee, S., Soares, A., Bedics, A., & Kriszt, B. (2023). Combined omics approach reveals key differences between aerobic and microaerobic xylene-degrading enrichment bacterial communities: Rhodoferax - a hitherto unknown player emerges from the microbial dark matter. *Environmental Science & Technology*, 57 (7), 2846-2855.

- Táncsics, A., Bedics, A., Banerjee, S., Soares, A., Baka, E., Probst, A. J., & Kriszt, B. (2024). Stable-isotope probing combined with amplicon sequencing and metagenomics identifies key bacterial benzene degraders under microaerobic conditions. *Biologia Futura*, 75(3), 301-311.
- 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 (1), 249-266.
- Tsao, C.-W., Song, H.-G., & Bartha, R. (1998). Metabolism of benzene, toluene, and xylene hydrocarbons in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4924 -9.
- Vallenet, D., Labarre, L., Rouy, Z., Barbe, V., Bocs, S., Cruveiller, S., Lajus, A., Pascal, G., Scarpelli, C., & Medigue, C. (2006). MaGe: a microbial genome annotation system supported by synteny results. *Nucleic Acids Research*, 34 (1), 53-65.
- Vallenet, D., Engelen, S., Mornico, D., Cruveiller, S., Fleury, L., Lajus, A., Rouy, Z., Rosche, D., Salvignol, G., Scarpelli, C., & Médigue, C. (2009). MicroScope: a platform for microbial genome annotation and comparative genomics. *Database*, 2009.
- Villa, T. G., Feijoo-Siota, L., Sánchez-Pérez, A., Rama, J. R., & Sieiro, C. (2019). Horizontal gene transfer in bacteria, an overview of the mechanisms involved. *Horizontal gene transfer: breaking borders between living kingdoms*, 3-76.
- Winderl, C., Penning, H., Netzer, F. V., Meckenstock, R. U., & Lueders, T. (2010). DNA-SIP identifies sulfate-reducing Clostridia as important toluene degraders in tar-oil-contaminated aquifer sediment. *The ISME journal*, 4 (10), 1314-1325.

Internetes hivatkozások:

[http1: http://microbial-genomes.org](http://microbial-genomes.org)⁶

[http2: https://ggdc.dsmz.de/](https://ggdc.dsmz.de/)

[http3: http://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP](http://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP)