



MAGYAR AGRÁR- ÉS  
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

SZÉNHIDROGÉNEK AEROB ÉS MIKROAEROB LEBONTÁSÁBAN RÉSZTVEVŐ  
MIKROBA KÖZÖSSÉGEK ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATA KOMPLEX DÚSÍTÓ  
TENYÉSZETEK SEGÍTSÉGÉVEL

DOI: 10.54598/000550

Révész Fruzsina

Gödöllő

2021

## **A doktori iskola**

**Megnevezése:** Környezettudományi Doktori Iskola

**Tudományága:** Környezettudomány

**Vezetője:** Csákiné Dr. Michéli Erika  
Intézetigazgató, egyetemi tanár  
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem  
Környezettudományi Intézet  
Talajtani Tanszék

**Témavezető:** Dr. Táncsics András  
Tudományos főmunkatárs  
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem  
Regionális Egyetemi Tudásközpont

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

# Tartalomjegyzék

<b>1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	3
<b>2. ANYAG ÉS MÓDSZER</b> .....	5
2.1. Dúsítási kísérletek körülményei .....	5
2.2. Baktériumközösségek feltárásához használt módszerek .....	5
2.2. Tenyésztési előkísérlet körülményei .....	8
2.3. Új baktériumfaj leírásához elvégzett vizsgálatok .....	8
<b>3. EREDMÉNYEK</b> .....	9
3.1. Oxigénlimitáció hatása benzollal és toluollal kiegészített dúsító tenyészetek mikrobaközösségeire .....	9
3.1.1. A benzollal és toluollal kiegészített dúsító tenyészetekből kimutatott, I.2.C alcsaládba tartozó klónszekvenciák diverzitása .....	11
3.1.2. A benzollal és toluollal kiegészített dúsító tenyészetekből izolált baktériumtörzsek ismertetése .....	12
3.1.3. <i>Malikia spinosa</i> AB6-os törzs teljes genomjának feltárása.....	13
3.2. Oxigénlimitáció hatása kőolaj/gázolaj keverékkel kiegészített dúsítótenyészetek mikrobaközösségére .....	14
3.2.1. A kőolaj/gázolaj keverékkel kiegészített dúsító tenyészetekből kimutatott <i>alkB</i> gének diverzitása .....	17
4.2.3. Az ismeretlen <i>alkB</i> genotípus filogenetikai azonosítása metagenom asszociált genom analízis segítségével.....	19
3.3. Új, aromás szénhidrogének lebontására képes baktériumfaj ( <i>Sphingobium aquiterrae</i> sp. nov.) leírása.....	21
<b>4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS A JAVASLATOK</b> .....	22
<b>5. IRODALOMJEGYZÉK</b> .....	25
<b>6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA</b> .....	29

## 1. A munka előzményei, célkitűzések

A népesség és az emberi igények növekedésével folyamatosan nő az emberiség által felhasznált energiamennyiség is. Bár számos alternatív megoldást ismerünk, energiaellátásunkat ma még jórészt a fosszilis energiahordozók – kőszén, kőolaj, földgáz – elégetéséből nyerjük. A kőolajszármazékok ezenkívül fontos alapanyagként és oldószerként szolgálnak az iparban és a mindennapokban. Kitermelésük, szállításuk, tárolásuk és felhasználásuk során a szabályozások ellenére nagyon gyakran következnek be balesetek, illetve figyelmen kívül hagyásból adódó szennyezések. Ezek alapján nem meglepő, hogy hazánkban és a világon is a kőolajszármazékok számítanak a leggyakrabban előforduló környezetszennyező anyagoknak. A környezetbe kerülve évtizedekre hatással lehetnek a környező ökoszisztémára, teratogén és karcinogén hatásaik miatt pedig különösen veszélyesek az élővilágra, beleértve az embert is. A legjobb megoldás a szennyezések megelőzése lenne, azonban, ahogy a gyakorlat is mutatja, ez sajnos számos esetben nem valósul meg.

Ha a szennyezés már bekövetkezett, rendelkezésünkre állnak olyan módszerek, melyekkel megfékezhetjük a problémát, esetenként pedig helyre is állíthatjuk az eredeti állapotokat. Alapvetően három kármentesítési útról beszélhetünk, melyek lehetnek fizikai, kémiai, illetve biológiai, más néven bioremediációs eljárások. Utóbbiak napjainkban fokozottan előtérbe kerültek, hiszen amellet, hogy ezen eljárások jelentik környezetünkre a legkisebb veszélyt, ezek a legköltséghatékonyabb módszerek is. A bioremediációs beavatkozások során a prokarióta szervezetek xenobiotikumbontó képességét használjuk ki. A baktériumok mérhetetlen sokszínűsége és az azonosítás korlátai miatt a fajoknak csak töredékét ismerjük. Ahhoz, hogy a kármentesítési eljárásokat továbbfejlesszük, hatékonyságukat növeljük, ismereteink bővítésére van szükség. Míg az aerob körülmények között „dolgozó” mikroorganizmusokat már sikerrel alkalmazzuk a kőolajszennyezések biodegradációjában, addig a mikroaerob körülmények között is aktív mikroszervezetek kármentesítés során betöltött

szerepére viszonylag kevés figyelem jutott, pedig a mélyen fekvő, oxigénlimitált talajrétegekben nagy szükség lehet rájuk. Egyes baktériumok olyan enzimrendszerrel rendelkeznek, amely lehetővé teszi számukra, hogy alacsony oldott oxigénkoncentráció mellett is hatékony anyagcserét folytassanak. Ezeknek az enzimeknek a termelését speciális funkciógének kódolják, melyek vizsgálata hatékony eszköz lehet a környezetben zajló metabolikus aktivitás, illetve egyes baktériumok anyagcseréjének vizsgálatára.

Mindezek fényében kutatásunk során szeretnénk volna feltárni, hogy:

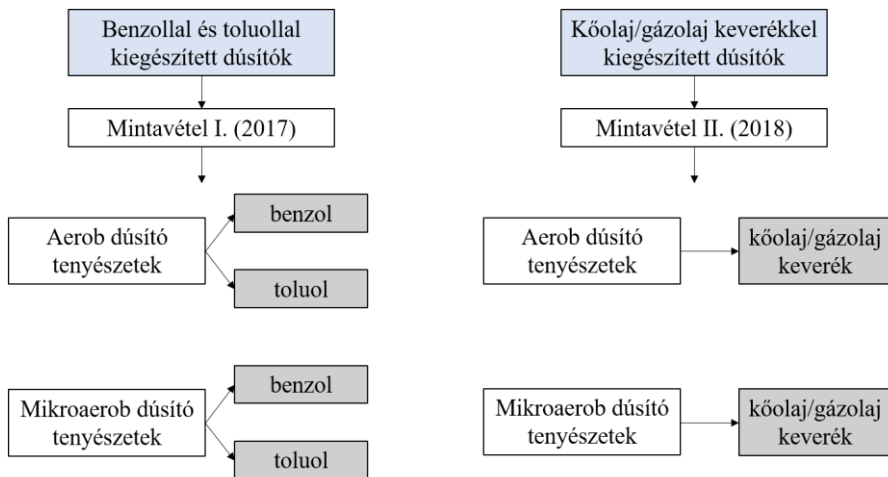
- faji összetétel, illetve metabolikus képességek terén milyen mértékben térnek el egymástól az aromás és alifás szénhidrogének lebontásában szerepet játszó mikroba közösségek aerob és a mikroaerob körülmények között;
- az aromás és alifás szénhidrogének lebontásában résztvevő funkciógének mely fajokhoz köthetők, illetve mely komponensek lebontásában van szerepük.

Célunk volt továbbá, hogy a kísérletek során minél több új, szénhidrogén-lebontásra képes baktérium törzset izoláljunk.

## 2. Anyag és módszer

### 2.1. Dúsítási kísérletek körülményei

Annak érdekében, hogy vizsgálni tudjuk az oxigénlimitáció hatását a szénhidrogének lebontásában résztvevő baktériumközösségek összetételére és metabolikus képességeikre, két dúsítási kísérletet végeztünk el. Mind a kettőben aerob (7-8 mg/L oldott oxigén koncentráció) és mikroaerob ( $\leq 0,5$  mg/L oldott oxigén koncentráció) dúsítókat hoztunk létre. Az egyik kísérletben **aromás szénhidrogének** (toluol vagy benzol), a másik kísérletben pedig **alifás szénhidrogének** (kőolaj/gázolaj keverék) szolgáltak egyedüli szén- és energiaforrásként a baktériumok számára (1. ábra).

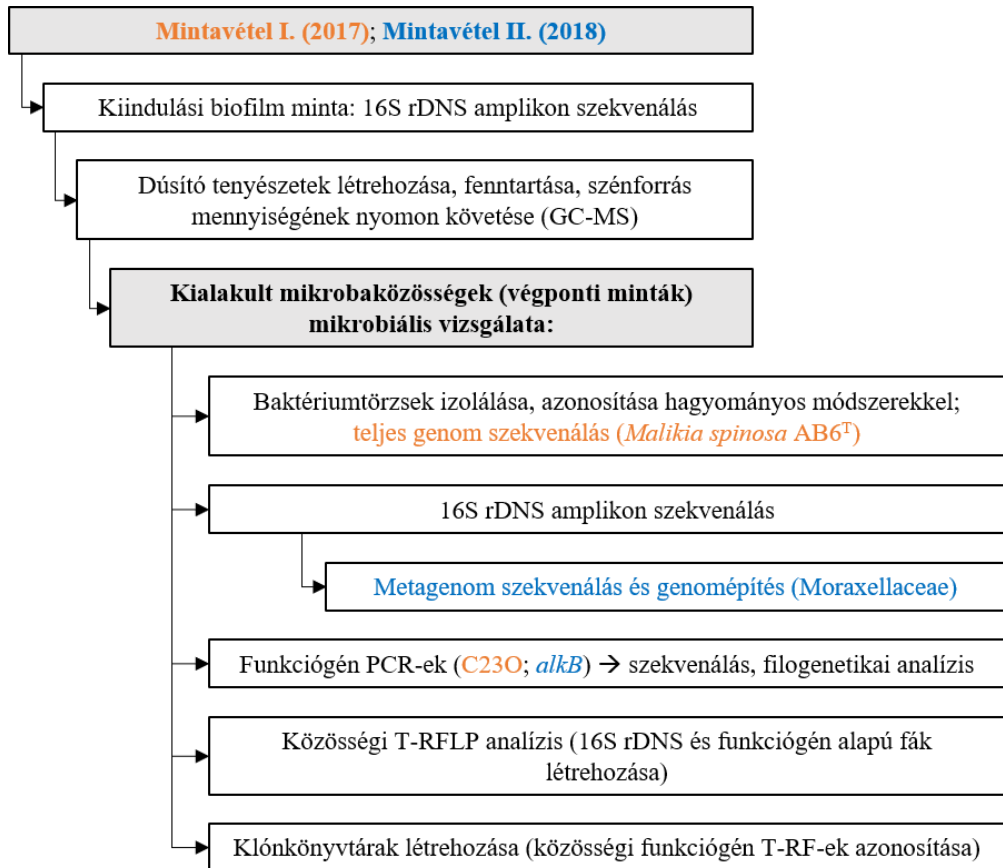


**1. ábra:** A dúsítási kísérletek sematikus ábrája (szürke háttérű szövegdobozokban: az alkalmazott szénforrás típusa)

### 2.2. Baktériumközösségek feltárásához használt módszerek

Dúsítási kísérleteinkhez mindkét esetben egy kőolajszármazékokkal – főként alifás és monoaromás vegyületekkel – szennyezett, közép-magyarországi kárhelyről vettük a kiindulási inokulumbként szolgáló biofilm mintákat. Táploldatként ásványi anyagokat és vitaminokat tartalmazó mesterséges talajvíz

oldatot használtunk. A dúsító tenyészeteket hetente, öt héten keresztül oltottuk át, a szénforrás fogyását ez idő alatt GC-MS segítségével követtük nyomon. Az így kialakult baktériumközösségeket mikrobiális vizsgálatoknak vetettük alá (2. ábra).



**2. ábra:** A dúsítási kísérletekhez kapcsolódó eljárások egymásra épülésének vázlatos ábrája (feketével szedett szövegek: mindkét kísérletben elvégzett módszer; narancssárgával szedett szövegek: csak a benzollal és toluollal kiegészített dúsító tenyészetek esetében elvégzett módszer; kézzel szedett szövegek: csak a kőolaj/gázolaj keverékkel kiegészített dúsítók esetében elvégzett módszer)

16S rDNS ampikon szekvenálást végeztünk a kiindulási biofilm mintákon, valamint az ötödik heti, végponti minták párhuzamosainak egy-egy tagjából. A V3 és V4 régiók amplifikálása a Seqomics Kft. által, Illumina MiSeq

platformon történt. Az alifás szénhidrogének lebontását vizsgáló dúsító tenyészetek esetében metagenom szekvenálást és metagenom asszociált genom analízist is végeztünk annak érdekében, hogy azonosítsuk a dúsítókban talált ismeretlen alkán-1 monooxigenáz (*alkB*) genotípust. Az aromás szénhidrogén-lebontást vizsgáló kísérlet során teljes genom szekvenálást végeztünk az aerob benzol-lebontó dúsítóból izolált *Malikia spinosa* AB6-os törzsön. A dúsító tenyészetek végponti mintáiból hagyományos módszerekkel baktériumtörzseket izoláltunk.

Megvizsgáltuk a szénhidrogének lebontásában kulcsszerepet játszó funkciógének diverzitását a dúsító tenyészetekben, illetve azok jelenlétét a tiszta tenyészetekben. Ehhez az aromás szénhidrogének lebontását vizsgáló dúsítók esetében az I.2.C típusú katekol 2,3-dioxigenáz (C23O) gének szekvenciáit sokszoroztuk fel a Tánicsics és munkatársai (2013) által kifejlesztett XYLE3F és XYLE3R primerek segítségével. Az alifás szénhidrogének lebontását vizsgáló dúsítók esetében az *alkB* gén szekvenciáit sokszoroztuk fel az *alkB* 1f\_deg és *alkB* 1r\_deg primereket alkalmazva (Kloos et al. 2006, Pérez-de-Mora et al. 2011).

A mikrobaközösség összetételének, valamint a funkciógének diverzitásának vizsgálatára és a dúsítókban történő változások nyomon követésére a T-RFLP (terminális restrikciós fragmenthossz polimorfizmus) módszerét alkalmaztuk. A PCR termékek emésztéséhez a következő restrikciós enzimeket használtuk: a 16S rDNS szakaszok vizsgálata *RsaI* (GT↓AC) enzimmel (Thermo Fisher Scientific Inc.), az I.2.C-típusú C23O génszakaszok vizsgálata *AluI* (AG↓CT) enzimmel (Thermo Fisher Scientific Inc.), az *alkB* génszakaszok vizsgálata *HPyCH4V* (TG↓CA) enzimmel (New England BioLabs Ltd.) történt. A C23O és *alkB* funkciógének T-RFLP elektroferogramjain megjelenő T-RF-ek azonosításához, vagyis a közösségi PCR termékek unikális egységekre történő szétválasztásához klónkönyvtárakat hoztunk létre. Paleontological Statistics szoftver segítségével elkészítettük (Hammer et al. 2001)



a 16S rDNS és funkciógén alapú fák dendrogramjait, melyekhez Bray-Curtis, illetve Jaccard hasonlósági indexeket alkalmaztunk.

## 2.2. Tenyésztési előkísérlet körülményei

A dolgozatomban tárgyalt dúsítási kísérleteket megelőzően különféle táptalajok alkalmazására tettünk próbálkozást annak érdekében, hogy a lehető legtöbb fajt tudjuk majd a dúsítókból tenyésztésbe vonni. Az előkísérlet során vizsgált talajvízminták egy korábban részletesen feltárt (Táncsics et al. 2012, Táncsics et al. 2013, Táncsics et al. 2018), délnyugat magyarországi, kőolajszármazékokkal szennyezett kárhelyről származtak. A tenyésztéshez agar-aggarral vagy gellán gumival szilárdított táplemezeket használtunk, plusz szénforrásként acetátot vagy almasavat adtunk a táptalajokhoz, azonban tapasztalatunk szerint ezek nem növelték meg a lemezeken kifejlődött telepek diverzitását. Legmegfelelőbbnek a hagyományos, agar-aggarral szilárdított R2A táplemezek bizonyultak, így később ezt a táptalajt használtuk a dúsítókból történő tenyésztéshez. A vizsgálatok egyik fontos eredménye volt, hogy sikerült egy, a tudomány számára addig ismeretlen, Alfa-Proteobaktériumokhoz, azon belül pedig a *Sphingobium* nemzetséghez tartozó törzset azonosítani, melyet a továbbiakban *Sphingobium aquiterrae* néven írtunk le (Révész et al. 2018).

## 2.3. Új baktériumfaj leírásához elvégzett vizsgálatok

A kutatások során mindvégig célunk volt olyan fajok izolálása, amelyek képesek egyes szénhidrogénvegyületek lebontására. Ez lehetővé teszi metabolikus képességeik alapos vizsgálatát, így később akár potenciálisan alkalmazhatóak bioremediációs célokra is. Ahhoz, hogy igazolni tudjuk, hogy az általunk izolált törzs valóban új fajhoz tartozik, számos vizsgálatot kellett elvégezni. Szükség volt a fenotípusos bélyegek meghatározására, valamint molekuláris biológiai és kemotaxonómiai vizsgálatokra. Ezek elvégzéséhez J. B. Tindall és munkatársai (2010) előírásait vettük alapul.

### 3. Eredmények

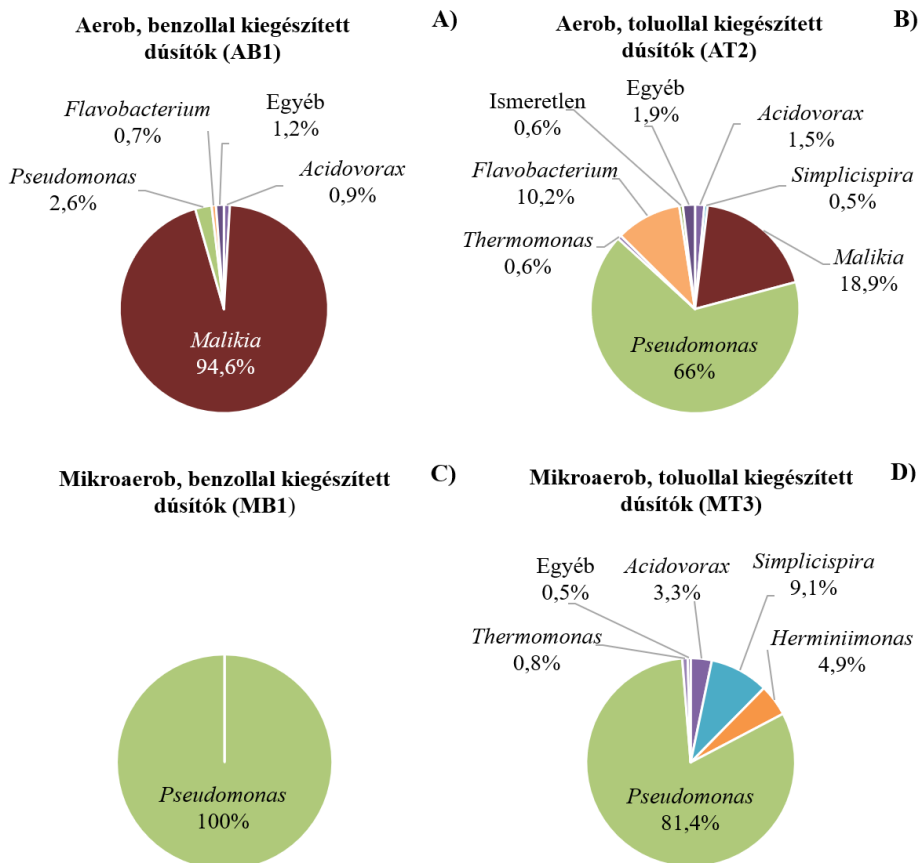
#### 3.1. Oxigénlimitáció hatása benzollal és toluollal kiegészített dúsító tenyészetek mikrobaközösségeire

Első dúsítási kísérletünkben megvizsgáltuk, hogy benzol és toluol lebontás mellett milyen baktériumközösségek alakulnak ki aerob és mikroaerob körülmények között, illetve azt, hogy mely I.2.C típusú C23O gének játszanak kulcsszerepet a mikroaerob benzol- és toluol-lebontásban. A 16S rDNS amplikon szekvenálás eredményei alapján megállapítottuk, hogy a kiindulási biofilm minta mikrobaközösségét döntően a Gamma-proteobaktériumok uralták, az amplikonok 47%-a volt idesorolható. Ezen belül a Betaproteobacteriales rendbe tartozó nemzetségek voltak uralkodóak, melyek közül számos nemzetségben találhatóak olyan fajok, melyek jól ismert lebontói az aromás szénhidrogéneknek (Prince et al. 2018), egy részüket pedig gyakran kimutatják szénhidrogénnel szennyezett felszín alatti környezetben (Sperfeld et al. 2018). Mindezek fényében a biofilmből előállított inokulum megfelelőnek bizonyult a benzol- és toluol-lebontó dúsító tenyészetek létrehozásához.

Az ötödik heti átoltást követően a dúsítók gázterében egy héten keresztül monitoroztuk a szénforrás mennyiségét. Az aerob dúsítóknál mind a benzol-, mind a toluol-lebontó tenyészetek esetében gyors fogyást tapasztaltunk. Mikroaerob lebontást ezzel szemben csak a toluollal kiegészített dúsítóknál tudtunk megfigyelni, habár az aerob körülményekhez képest a lebontás itt jóval lassabban zajlott. A mikroaerob, benzollal kiegészített dúsítóknál nem történt jelentős mértékű lebontás.

Az aerob, benzol-lebontó dúsítótenyészetben (AB1, 3./A ábra) azonosított 16S rDNS szekvenciák 94%-a a *Malikia* nemzetséghez volt köthető. E csoporton kívül 0,5%-nál magasabb abundanciával mindössze a *Pseudomonas*, az *Acidovorax* és a *Flavobacterium* nemzetségek voltak jelen. Habár *Malikia* a nemzetséget gyakran kimutatják BTEX-vegyületekkel szennyezett felszín alatti

közegekben (Aburto – Ball 2009, Táncsics et al. 2010), izolálni ez idáig egyetlen törzsét sem sikerült szennyezett kárhelyről, így pontos szerepük a szénhidrogének lebontásában ismeretlen volt. Az aerob, toluol-lebontó dúsító tenyészetek (AT2, 3./B ábra) mikrobaközösségét döntően a *Pseudomonas* nemzetség (66%) uralta, mellette nagy számban voltak kimutathatóak a *Malikia* (18,9%), a *Flavobacterium* (10,2%) és az *Acidovorax* (1,5%) nemzetségek. A *Pseudomonas* fajok szerepe az aerob toluol-lebontásban jól ismert. A *Malikia* nemzetséghez köthető szekvenciák nagy száma arra enged következtetni, hogy ezeknek a baktériumoknak szintén szerepük lehet a toluol aerob körülmények közötti lebontásában.



**3. ábra:** Ötödik heti, végponti minták (AB1, AT2, MB1, MT3) mikrobaközösségeinek összetétele Illumina paired-end 16S rDNS amplikon szekvenálás eredményei alapján. Az „Egyéb” kategóriába a 0,5% alatti abundanciával rendelkező taxonok kerültek.

A mikroaerob, benzollal kiegészített dúsító tenyészetek (MB1, 3./C ábra) 16S rDNS szekvenciái szinte kizárólag egyetlen filotípushoz tartoztak, amely a *Pseudomonas* nemzetséghez volt köthető. Mivel a dúsítóokban a benzol fogyasztását nem lehetett kimutatni, feltételezhető, hogy ezek a baktériumok csupán a kismennyiségű sejtörmelékek és másodlagos anyagcsere termékek lebontásával maradhattak fenn. A mikroaerob, toluol-lebontó dúsítók (MT3, 3./D ábra) mikrobaközössége némileg diverzebb képet mutatott, habár túlnyomó többségben itt is a *Pseudomonas* nemzetség volt az uralkodó (81%), melyet a *Simplicispira* (9,1%), a *Herminiimonas* (4,9%) és az *Acidovorax* (3,3%) nemzetségek követték.

### ***3.1.1. A benzollal és toluollal kiegészített dúsító tenyészetekből kimutatott, I.2.C alszaládba tartozó klónszekvenciák diverzitása***

Az aerob benzol-lebontó dúsító tenyészetek (AB1) esetében a klónkönyvtár segítségével azonosított I.2.C típusú C23O génszekvenciák egyetlen operatív (aminosav-szekvencia alapú) filogenetikai egységbe (Operational Protein Unit – OPU) voltak sorolhatók. Egy ezzel 100%-os hasonlóságot mutató szekvenciát korábban Benedek és munkatársai (2018) BTEX-lebontó dúsítási kísérleteik során azonosítottak és feltételelesen a *Malikia* nemzetséghez kötötték. Meglepő módon ugyanez a szekvencia volt megfigyelhető az aerob toluol-lebontó dúsító (AT2) mikrobaközösségében is.

Annak ellenére, hogy a mikroaerob benzollal kiegészített dúsító tenyészetben (MB1) nem volt megfigyelhető szignifikáns mértékű benzol-lebontás és a diverzitás is itt volt a legkisebb, mégis ebben a mintában volt a legdiverzebb az I.2.C típusú C23O gének jelenléte; a szekvenciák öt különböző OPU-t alkottak, melyek ismeretlen baktériumfajokhoz, illetve a *Simplicispira* és *Acidovorax* nemzetségekhöz voltak köthetők. Feltételezhető tehát, hogy a *Pseudomonas* nemzetségen kívül igen kis mennyiségben, de más baktériumok is jelen voltak a dúsítóokban. A mikroaerob toluol-lebontó dúsítóban (MT3) az I.2.C típusú C23O klónszekvenciáknak három csoportját tudtuk megfigyelni, melyek

nagy része átfedésben volt a benzollal kiegészített mikroaerob dúsítókból is kimutatott szekvenciákkal.

### **3.1.2. A benzollal és toluollal kiegészített dúsító tenyészetekből izolált baktériumtörzsek ismertetése**

Az Illumina 16S rDNS amplicon szekvenálással vizsgált végponti mintákból hagyományos tenyésztési módszerekkel törzseket izoláltunk. Mindössze négy nemzetség nyolc fajához tartozott az a 22 darab törzs, amelyet azonosítani sikerült. Az aerob, benzol-lebontó dúsítókból (AB1) a *Pseudomonas*, az *Acidovorax* és a *Malikia* nemzetséghez tartozó fajokat tudtunk azonosítani. Sikerült két, *Malikia spinosa* 83<sup>T</sup> típusú törzsszel 99,7% és 99,9%-os hasonlóságot mutató baktériumot izolálni, melyeket megvizsgálva kiderült, hogy rendelkeznek az I.2.C típusú C23O génnel is. Megvizsgáltuk, hogy az AB6-os jelölésű, *Malikia spinosa*-val közeli rokon törzs mely aromás vegyületek aerob lebontására képes és azt találtuk, hogy hatékonyan bontja a benzolt, a toluolt és az etilbenzolt, míg a xilolok izomerjeit nem képes lebontani. A szakirodalomban ez idáig nem volt található olyan eset, melyben bizonyítást nyert volna, hogy egy *Malikia spinosa* fajhoz tartozó törzs képes egyes aromás szénhidrogének lebontására. Jelen volt a dúsítóban az *Acidovorax delafieldii*-ként azonosított AB5-ös törzs, mely szintén rendelkezik az I.2.C típusú C23O génnel. Vizsgálataink szerint a hat aromás vegyület közül a törzs a benzol hasznosítására képes. Az aerob, toluol-lebontó dúsítókból a *Pseudomonas* és *Flavobacterium* nemzetséghez tartozó törzseket tudtunk izolálni, melyek közül egyik sem rendelkezett az I.2.C típusú C23O génnel. A mikroaerob dúsítókból kizárólag a *Pseudomonas veronii* és *P. extremaustralis* fajokhoz köthető törzseket sikerült izolálnunk. Annak ellenére, hogy nem rendelkeztek az I.2.C típusú C23O génnel, úgy tűnik sikeresen adaptálódtak az oxigénlimitált körülményekhez. A *P. veronii*-hoz igen közeli rokonságban álló *P. extremaustralis* például bizonyítottan képes az alkánok mikroaerob körülmények közötti lebontására (Tribelli et al. 2018).

### 3.1.3. *Malikia spinosa* AB6-os törzs teljes genomjának feltárása

Mivel ez idáig nem született egyetlen olyan kutatásról szóló publikáció sem, amiben a *Malikia* nemzetséghez tartozó törzset sikerült volna szénhidrogénekkal szennyezett területről izolálni, érdemesnek tartottuk alaposan megvizsgálni az általunk izolált *Malikia spinosa* AB6-os törzsének teljes genomját. Mivel a faj típustörzsének (*Malikia spinosa* 83<sup>T</sup>) teljes genomja szabadon hozzáférhető, lehetőségünk nyílt arra, hogy összevegyessük azt az általunk izolált *M. spinosa* AB6-os törzssel. Legalább 148 olyan fehérjét tudtunk azonosítani, amellyel kizárólag az AB6-os törzs rendelkezik, ezen fehérjék jelentős része az aromás vegyületek lebontó folyamataihoz kapcsolható. Az AB6-os törzs részletes elemzése során kiderült, hogy az I.2.C típusú C23O gén egy olyan klaszter része, amely a fenol lebontásában játszik szerepet. Figyelemre méltó, hogy a klasztert transzpozonok, azaz mozgékony genetikai elemek határolják, melyből arra következtethetünk, hogy az általunk izolált AB6-os törzsbe horizontális géntranszfer (HGT) útján kerülhetett. A genomban ezen kívül nem találtunk benzol- vagy toluol-lebontásban szerepet játszó mono- és dioxigenázokat, tehát nagy valószínűséggel az általunk azonosított génklaszter felelős e két vegyület lebontásáért. Annak ellenére, hogy AB6-os törzs kitűnően bontja az etilbenzolt, a genomjában nem találtuk meg az erre utaló etilbenzol dioxigenáz géneket. A vegyület lebontása végbemehet azonban az etilcsoport oxidációjával is, melyben a naftalin dioxigenázok vesznek részt (Lee – Gibson 1996, Lee et al. 2019). Átkutatva a genomot, egy teljes génklasztert (*nag* operon) találtunk, amely a naftalin dioxigenázok mellett a szalicilát-5-hidroxiláz és gentizát 1,2-dioxigenáz enzimeket kódoló régiókat is tartalmazza. Utóbbiakat a *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2 és *Ralstonia* sp. U2 törzsekben, mint a naftalin-lebontás kulcsenzimeit írták le (Park et al. 2007; Pumphrey – Madsen 2007, Zhou et al. 2001). Mindezek alapján feltételezzük, hogy az AB6-os törzs a *nag* operonnak köszönhetően képes az etilbenzol lebontására, továbbá rendelkezhet a naftalin-lebontás képességével is.

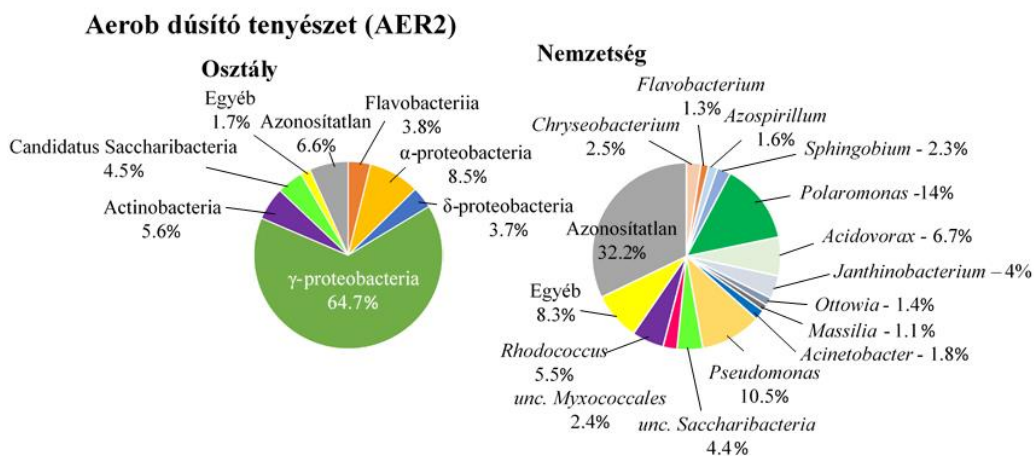
**Új tudományos eredmény (I. tézis):** Először sikerült szénhidrogénekkal szennyezett területről a *Malikia* nemzetséghez tartozó törzset izolálni. A *Malikia spinosa* AB6-os törzsről kimutattuk, hogy I.2.C-típusú C23O génnel rendelkezik, és képes a benzolt, a toluolt és az etilbenzolt egyedüli szén-, és energiaforrásként hasznosítani tisztán aerob körülmények között. Megerősítést nyert, hogy e baktériumok, annak ellenére, hogy I.2.C-típusú extradiol dioxigenáz enzimet kódolnak, csak tisztán aerob körülmények között válnak domináns szervezetekké aromás szénhidrogént lebontó dúsító tényészetekben.

### **3.2. Oxigénlimitáció hatása kőolaj/gázolaj keverékkel kiegészített dúsítótenyészetek mikrobaközösségére**

Második dúsítási kísérletünkben az alifás szénhidrogének lebontásában résztvevő baktériumközösségeket vizsgáltuk aerob és mikroaerob körülmények között, illetve megvizsgáltuk az alkánok lebontásában kulcsszerepet játszó *alkB* gén diverzitását is a dúsítókbán. Illumina 16S rDNS amplikon szekvenálás segítségével feltártuk a kárhelyről származó, újonnan mintavételezett kiindulási biofilm mikrobaközösségét, melyet továbbra is a Gamma-proteobaktériumok körébe tartozó Betaproteobacteriales rend uralt. A legnagyobb számban azonosított 16S rDNS szekvenciák a *Sulfuritalea* (16%), az *Azoarcus* (4,8%), az *Acidovorax* (2,6%), a *Simplicispira* (0,9%), a *Thiobacillus* (0,9%), a *Hydrogenophaga* (0,7%), a *Thauera* (0,6%), a *Zoogloea* (0,6%) és a *Rhodoferrax* (0,5%) nemzetségek voltak.

A 16S rDNS amplikon szekvenálási eredmények alapján elmondható, hogy a vizsgálatra kiválasztott, kőolaj/gázolaj keverékkel kiegészített, aerob dúsító (AER2) mikrobaközösségét a Betaproteobacteriales rendhez tartozó baktériumok uralták, a leolvasott szekvenciák 36,5%-a sorolható ide (4. ábra). A leggyakoribb nemzetség a Betaproteobacteriales rendbe tartozó *Polaromonas* (14%) volt, a renden belül jelen voltak még az *Acidovorax* (6,7%) és a

*Janthinobacterium* (4%) nemzetségek. A *Polaromonas* nemzetségnek több olyan tagját ismerjük, amely képes a szénhidrogének, például a benzol és a toluol lebontására (Sun et al. 2010, Xie et al. 2011). Hasonlóan, az *Acidovorax* nemzetség is gyakran domináns tagja a szénhidrogén-lebontó baktériumközösségeknek (Popp et al. 2006, Daghighio et al. 2015). Nemzetség szinten a dúsítóban a második leggyakoribb (10,5%) nemzetség a *Pseudomonas* volt, melynek szerepét a szénhidrogének lebontásában már jól ismerjük. Az Alfa-proteobaktériumok közül a *Sphingobium* nemzetséget (2,3%) érdemes kiemelni, mivel több olyan tagját ismerjük, amelynek szerepe van a szénhidrogének aerob körülmények közötti lebontásában (Lloyd-Jones – Lau 1997, Pinyakong et al. 2003, Liang – Lloyd-Jones 2010, Révész et al. 2018). A leolvasott 16S rDNS szekvenciák 5,5%-át tette ki a *Rhodococcus* nemzetség (Aktinobaktériumok osztálya), melynek alkán-lebontásban is résztvevő tagjait jól ismerjük. A nemzetségnek szinte minden tagja rendelkezik *alkB* génekkel, az úgynevezett “*erythropolis*” klád tagjai pedig aerob környezetben igen hatékony alkán-lebontó baktériumok (Táncsics et al. 2015).



**4. ábra:** Aerob, kőolaj/gázolaj keverékkel kiegészített dúsító tenyészet (AER2) mikrobaközösségének összetétele Illumina paired-end 16S rDNS amplikon szekvenálás eredményei alapján. Az „Egyéb” kategóriába a 0,5% alatti abundanciával rendelkező taxonok kerültek.

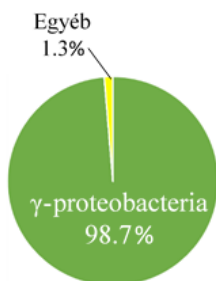


Érdekes módon, az aerob dúsítókból viszonylag nagy abundanciával (4,5%) voltak jelen a *Candidatus Saccharibacteria* törzshöz tartozó 16S rDNS szekvenciák. Korábban egy bizonyos csoportjukat (3. szubdivízió) nagy számban mutatták ki szénhidrogénnel szennyezett talajban (Winsley et al. 2014), továbbá stabil izotópos kísérletekkel bizonyították szerepüket a toluol és a benzol aerob körülmények közötti bontásában (Luo et al. 2009, Xie et al. 2011).

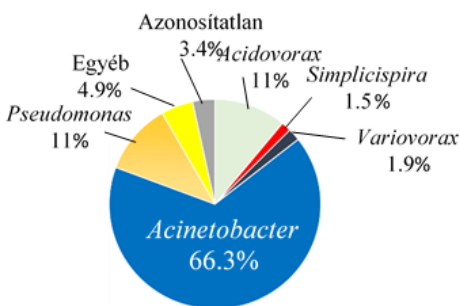
A mikroaerob dúsító tenyészet (MIK1) baktériumközössége nem volt annyira diverz, mint az aerob dúsító tenyészeteké, 98,8%-ban a Gamma-proteobaktériumok uralták (5. ábra). Nemzetség szinten az *Acinetobacter*-hez köthető 16S rDNS szekvenciákat tudtuk legnagyobb számban (66,3%) kimutatni a dúsítóból. A nemzetség tagjai között találhatóak olyan fajok, amelyek aerob körülmények között képesek az alkánok és az aromás vegyületek lebontására (Lal – Khanna 1996, Di Cello et al. 1997, Margesin et al. 2003, Czarny et al. 2019). Az *Acinetobacter* nemzetséghez tartozó fajok igen gyakoriak lehetnek a felszín alatti kőolaj rezervoárookban, mely jelenségről azt feltételezik, hogy a kitermelés során bejuttatott vízzel kerülhetnek ezekbe a közegekbe (Orphan et al. 2000, Zhao et al. 2012).

### Mikroaerob dúsító tenyészet (MIK1)

#### Osztály



#### Nemzetség



**5. ábra:** Mikroaerob, kőolaj/gázolaj keverékkel kiegészített dúsító tenyészet (MIK1) mikrobaközösségének összetétele Illumina paired-end 16S rDNS amplikon szekvenálás eredményei alapján. Az „Egyéb” kategóriába a 0,5% alatti abundanciával rendelkező taxonok kerültek.

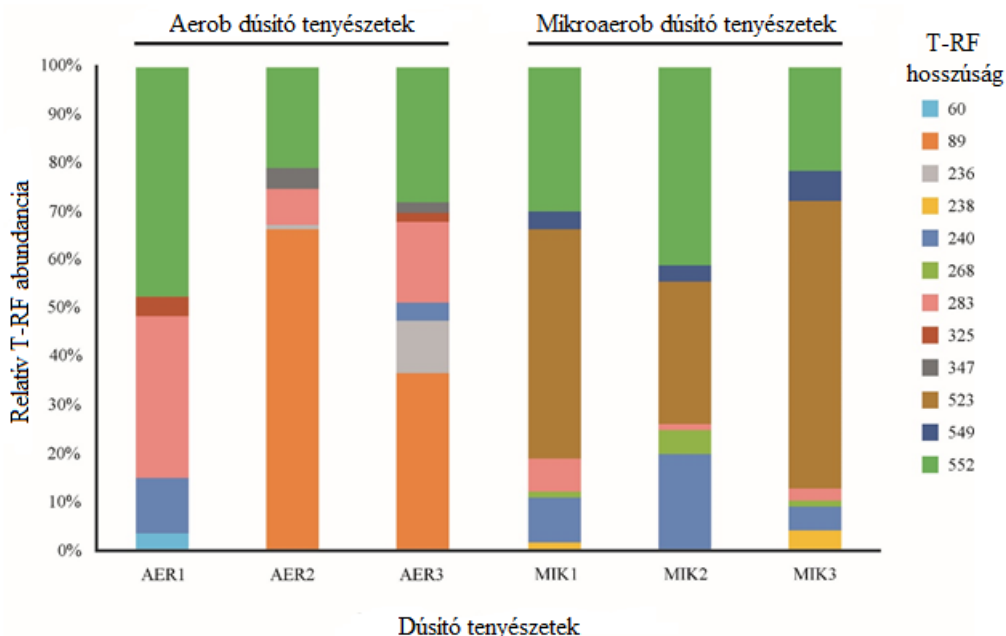
A Gamma-proteobaktériumokhoz tartozó *Pseudomonas* nemzetséget is igen nagy számban (11%) lehetett kimutatni a mikroaerob dúsítókból. Ismert olyan *Pseudomonas* törzs (*P. extremaustralis* 14-3<sup>T</sup>), amely hatékonyan alkalmazkodott az alkánok mikroaerob körülmények közötti lebontásához (Tribelli et al. 2018). A Betaproteobacteriales rendet az *Acidovorax* (11%), a *Variovorax* (1,9%) és a *Simplicispira* (1,5%) nemzetség képviselte a dúsítókbán. Az *Acidovorax* és a *Variovorax* nemzetségnek ismertek olyan tagjai, melyek képesek az aromás szénhidrogének lebontására (Sydow et al. 2016, Posman et al. 2017, Singleton et al. 2018). Benedek és munkatársai (2018) dúsítási kísérletében egy *Acidovorax* nemzetséghez tartozó baktérium jelentősen fel tudott szaporodni BTEX-vegyületekkel kiegészített, mikroaerob dúsítókbán.

### **3.2.1. A kőolaj/gázolaj keverékkel kiegészített dúsító tenyészetekből kimutatott *alkB* gének diverzitása**

A három-három párhuzamos dúsítóban azonosított *alkB* T-RF-ek abundanciáit a 6. ábrán látjuk. A mikroaerob dúsítókbán az 523 bázispár hosszúságú T-RF volt a leggyakoribb, míg az aerob dúsítókbán azt figyelhettük meg, hogy az AER2 és AER3 jelzésű mintában igen domináns 89 bázispár hosszúságú T-RF a harmadik – AER1 jelzésű – mintából teljes egészében hiányzik. Annak érdekében, hogy a kimutatott fragmenteket konkrét szekvenciákhoz tudjuk kötni, az AER2 és MIK1 dúsítókból *alkB* gén klónkönyvtárakat hoztunk létre.

Az aerob dúsítóban (AER2) az *alkB* génszekvenciáknak hat csoportját (OPU) tudtuk elkülöníteni. A klónok 63%-át kitevő és ezzel a legnagyobb klaszter igen kis hasonlóságot mutatott az idáig ismert *alkB* genotípusokkal, így nem sikerült azt ismert, kitenyésztett baktériumfajhoz kötni. Legközelebbi hasonlóságot (76-80%) az *Agitococcus lubricus* DSM 5822<sup>T</sup> törzs *alkB* génjével mutatott, valamint kőolajjal szennyezett, tengeri környezetből származó szekvenciákkal (Powell et al. 2010; Wang et al. 2014). Ezt a klónt a 89 bázispár

hosszúságú, dominánsan kimutatott T-RF-hez lehetett kötni. A többi *alkB* génszekvencia nagy része a *Pseudomonas* (*P. putida* és *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens*) és *Rhodococcus* nemzetségekhez voltak köthetőek.



**6. ábra:** A kőolaj/gázolaj keverékkel kiegészített dúsító tenyészetekből kimutatott *alkB* gén T-RF-ek relatív abundanciája az ötödik heti, végponti dúsító tenyészetek mikrobaközösségeiben.

A mikroaerob dúsító (MIK1) *alkB* génszekvenciáit öt csoportba lehet osztani. A legnagyobb (71%) csoportot az 523 bázispár hosszúságú T-RF-ek alkották, melyek nagy hasonlóságot (98,4%) mutattak *Pseudomonas veronii* törzsek *alkB* szekvenciáival. A *P. veronii* legközelebbi rokona, a *P. extremaustralis* képes az alifás szénhidrogének mikroaerob körülmények közötti lebontására (Tribelli et al. 2018). Annak ellenére, hogy a 16S rDNS szekvenciák alapján a mikroaerob dúsítóban (MIK1) az *Acinetobacter* nemzetséghez köthető baktériumok voltak dominánsak, az ugyanide köthető *alkB* szekvenciák a klónoknak mindössze 10%-át tették ki. Ezek a 376 bázispár hosszúságú T-RF-ek legközelebbi hasonlóságot (97,8%) az *A. calcoaceticus* CA16-os törzs *alkB*

génszekvenciájával mutatták. Meg kell azonban jegyezni, hogy a kutatás során használt PCR primerek nem amplifikálják az *Acinetobacter* fajok által kódolt *alkB* gének minden típusát (Jurelevicius et al. 2013). A klónszekvenciák 16%-a a *Pseudomonas* nemzetséghez volt köthető (548 és 238 bázispár hosszúságú T-RF-ek). A *Rhodococcus* nemzetséghez köthető *alkB* génszekvenciák egy része azonos volt az aerob dúsító tenyészetekben is kimutatott szekvenciákkal.

#### **4.2.3. Az ismeretlen *alkB* genotípus filogenetikai azonosítása metagenom asszociált genom analízis segítségével**

A klónkönyvtár segítségével feltárt *alkB* genotípusok közül az AER-OPU 1 és AER-OPU 5 jelölésű klasztereket nem sikerült baktériumokhoz kötni. Mivel az AER-OPU 1-be tartozó *alkB* gén szekvenciákat tudtuk a legnagyobb számban kimutatni az aerob dúsító tenyészetben (AER2), fontosnak tartottuk a minta további vizsgálatát. Ehhez az úgynevezett metagenom adatok alapján történő genom összeszerelést („genome-resolved metagenomics”) választottuk, melynek során az aerob dúsító tenyészetek metagenomjából sikeresen felépítettük a számunkra ismeretlen *alkB* genotípust hordozó baktérium genomját. A genomnak csaknem a teljes (>99%) összeszerelése sikerült, ami alapján egy ezidáig ismeretlen Gamma-proteobaktériumokhoz tartozó baktérium genomját kaptuk meg, azonban a 16S rRNS génszakaszt nem sikerült hozzárendelnünk a genomhoz. A baktérium filogenetikai helyzetét 16S rRNS gén hiányában a riboszómális fehérjék alapján állapítottuk meg, mely szerint az *Agitococcus lubricus* (Franzmann – Skerman 1981) áll hozzá legközelebbi rokonságban. A baktériumot az NCBI (National Center for Biotechnology Information – Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ) a Firmicutes törzsbe sorolja, azonban a teljes genom alapján az valójában a Gammaproteobacteria osztály Moraxellaceae családjába tartozik.

Az *alkB* gént tartalmazó génklaszter vizsgálata feltárta, hogy az *alkB* géntől upstream helyzetben, ellentétes orientációval megtalálható egy *AraC*

családba tartozó transzkripciós regulátort kódoló gén is. E gént *alkR* néven írták le az *Acinetobacter* sp. ADP1-es törzs esetében, és azt találták, hogy jelenléte esszenciális fontosságú az alkán-lebontás képességéhez. Ez alapján joggal feltételezhetjük, hogy az AER2\_Gammaproteobacteria\_44\_116-jelű baktérium egy jelentős alkán-lebontó baktérium szerepét töltötte be az AER2-es aerob dúsító tenyészetben.

**Új tudományos eredmény (II. tézis):** A kőolaj/gázolaj keveréket tartalmazó dúsító tenyészetekkel folytatott molekuláris genetikai vizsgálatok rámutattak arra, hogy a kiváló alifás szénhidrogén-lebontó képességgel rendelkező *Rhododoccus* nemzetségbe tartozó baktériumok az általunk vizsgált dúsító tenyészetekben kizárólag tisztán aerob körülmények között váltak abundáns közösségalkotókká. Ezzel szemben mikroaerob körülmények között inkább az *Acinetobacter* és a *Pseudomonas* nemzetségbeli mikroszervezetek váltak dominánssá.

**Új tudományos eredmény (III. tézis):** Metagenom szekvenálás és metagenom asszociált genom analízis segítségével sikerült a tudomány számára eddig ismeretlen és kitenyésztetlen, Moraxellaceae családba tartozó baktériumfajt azonosítani, amely rendelkezik az alkánok lebontásában kulcsszerepet játszó alkán-1 monooxygenáz génnel.

### **3.3. Új, aromás szénhidrogének lebontására képes baktériumfaj (*Sphingobium aquiterrae* sp. nov.) leírása**

Általánosságban elmondható, hogy kutatásaink folyamán mindig igyekszünk a kőolajszármazékokkal szennyezett területekről érkező mintákból „megfogni”, azaz laborkörülmények között tenyésztésbe vonni a potenciálisan szénhidrogén-lebontó baktériumtörzseket. Ez lehetővé teszi metabolikus képességeik alaposabb megismerését, valamint egyes törzsek bioremediációs célokra történő felhasználását. Az általunk újonnan leírt baktériumtörzset (SKLS-A10<sup>T</sup>) előkísérleteink során, egy kőolajszármazékokkal – benzollal, xilolokkal, etil-benzollal és egyéb alkilbenzol vegyületekkel – szennyezett, délnyugat magyarországi kárhelyről (Siklós) sikerült izolálnunk. Az SKLS-A10<sup>T</sup> törzs az Alfa-proteobaktériumok osztályába, azon belül pedig a *Sphingobium* nemzetségbe sorolható.

Mivel az SKLS-A10<sup>T</sup> jelű törzset BTEX-vegyületekkel szennyezett talajvízből izoláltuk, megvizsgáltuk, hogy mely monoaromás vegyületek lebontására képes. A vizsgálat során a BTEX komponenseket külön-külön, egyedileg alkalmaztuk egyedüli szénforrásként. Azt találtuk, hogy hatékonyan képes lebontani a toluolt, a *meta*- és *para*-xilolt. A nemzetközi követelményeknek megfelelő vizsgálatok elvégzése után az új fajt *Sphingobium aquiterrae* néven írtuk le.

**Új tudományos eredmény (IV. tézis): Sikerült egy, a tudomány számára új, *Sphingobium* nemzetséghez tartozó baktériumtörzset izolálnunk, melynek leírásához szükséges vizsgálatokat a nemzetközi követelményeknek megfelelően elvégeztük. Gázkromatográffal kapcsolt tömegspektrometria (GC-MS) segítségével igazoltuk, hogy aerob körülmények között a törzs képes a toluol, a *meta*- és *para*-xilol teljes lebontására. Az új fajnak a *Sphingobium aquiterrae* nevet adtuk.**

## 4. Következtetések és a javaslatok

Számos kutatás bizonyította, hogy a szénhidrogénekkal szennyezett közegek mikrobaközösségét jellemzően a Betaproteobacteriales rend tagjai, azon belül is a Comamonadaceae és Rhodocyclaceae család nemzetségei uralják (Alfreider et al. 2002; Fahy et al. 2006; Alfreider – Vogt, 2007; Nestler et al. 2007, Martínez-Lavanchy et al. 2015). A szénhidrogének lebontásában résztvevő funkciógéneket azonban nem sikerült egyértelműen ismert baktériumfajokhoz kötni, illetve kérdéses volt az is, hogy az I.2.C típusú C23O gének megléte a genomban egyértelműen bizonyítja-e, hogy az adott törzs képes a mikroaerob körülmények közötti szénhidrogén-lebontásra. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy faji összetétel, illetve metabolikus képességek terén milyen mértékben térnek el egymástól az aromás és alifás szénhidrogének lebontásában szerepet játszó mikrobaközösségek aerob és a mikroaerob körülmények között.

Dúsítási kísérleteink során jelentős különbségeket tudtunk felfedezni az aerob és a mikroaerob dúsítók mikrobaközösségeinek összetételében és a vizsgált funkciógének diverzitásában. Első kísérletünk során aerob és mikroaerob dúsítókat hoztunk létre, melyekhez egyedüli szén- és energiaforrásként benzolt vagy toluolt adtunk, kiindulási mintaként pedig egy korábban is vizsgált, szénhidrogénekkal szennyezett területről származó biofilm minta szolgált. Az aerob, benzollal kiegészített dúsítókat főként a Betaproteobacteriales rendbe tartozó *Malikia* nemzetség uralta, melynek két, *Malikia spinosa*-hoz köthető törzsét (99,7% és 99,9%-os 16S rDNS szekvencia hasonlóság) izolálni is sikerült a mintákból. Annak ellenére, hogy a nemzetség tagjai igen gyakori képviselői a szénhidrogénekkal szennyezett területek mikrobaközösségeinek, a szakirodalomban nem találtunk olyan adatot, amelyben szennyezett területről sikerült volna tenyésztésbe is vonni őket. Az általunk izolált *M. spinosa* AB6 jelű törzs képes volt a benzol, a toluol és az etilbenzol aerob biodegradációjára. Feltárva a törzs teljes genomját lehetőségünk adódott alaposabban megvizsgálni annak metabolikus képességeit, illetve összevetni tulajdonságait a faj

típustörzsével. A típustörzshöz képest az AB6-os törzs genomja 300 kilobázissal nagyobbak bizonyult, amely elsősorban az aromás szénhidrogének lebontásában szerepet játszó gének feldúsulásának köszönhető. Az általunk izolált törzs rendelkezik az I.2.C típusú C23O génnel is, amely a fenol lebontásában szerepet játszó génklaszterben helyezkedik el. A klasztert mozgékony genetikai elemek határolják, melyből arra következtethetünk, hogy a törzsbe horizontális géntranszfer útján kerülhetett. Bár az AB6-os törzs rendelkezik az I.2.C típusú C23O génnel, a *M. spinosa*-t csak az aerob dúsítóokban tudtuk kimutatni. A törzs nem rendelkezik olyan génnel, amellyel a benzolgyűrűt képes lenne mikroaerob körülmények között hidroxilálni, mely nélkül az aromás vegyületek mikroaerob lebontása sem kezdődhet meg. A kutatás alátámasztotta a korábbi feltételezéseket (Táncsics et al. 2010, Benedek et al. 2018), miszerint a *Malikia* nemzetségbe tartozó baktériumok a szénhidrogénekkal szennyezett területeken részt vesznek a BTEX-vegyületek lebontásában, azonban kizárólag aerob környezetben. Fény derült arra is, hogy az I.2.C típusú C23O gén megléte nem jelenti feltétlenül azt, hogy az adott baktérium képes a monoaromás vegyületek mikroaerob körülmények közötti lebontására. Ráadásul, a *Malikia spinosa* AB6-os törzs teljes genomjának elemzése alapján elmondhatjuk, hogy az I.2.C típusú C23O gének horizontális géntranszfer útján könnyedén terjedhetnek a Betaproteobacteriales rend tagjai között. Mikroaerob körülmények között a benzollal és a toluollal kiegészített dúsítókat is a *Pseudomonas* nemzetséghez köthető baktériumok uralták. A benzollal kiegészített dúsítóokban a közösség nem volt képes a szénforrás lebontására, azonban a toluol fogyasztását sikerült kimutatni. Eredményeink alapján arra következtethettünk, hogy a *Pseudomonas* nemzetségnek egy köre (a *P. veronii/extremaustralis* leszármazási vonal) sikeresen adaptálódott az oxigénlimitált körülményekhez.

Második dúsítási kísérletünkben ismét aerob és mikroaerob dúsító tenyészeteket hoztunk létre, azonban egyedüli szén- és energiaforrásként kőolaj/gázolaj keveréket alkalmaztunk. Megvizsgáltuk, hogy az oxigénlimitáció milyen hatással van a baktériumközösségek kialakulására, illetve az alkánok



lebontásában kulcsszerepet játszó alkán-1 monooxygenáz gének (*alkB*) diverzitására. Az aerob és mikroaerob dúsító tenyészetek mikrobaközösségeinek kutatásunk során feltárt különbségei a jövőben hasznos információval szolgálhatnak a szénhidrogénnel szennyezett közegek bioremediációja során. Láttuk, hogy a *Rhodococcus* nemzetséghez tartozó baktériumok kizárólag aerob környezetben tudtak jelentősen felszaporodni. Ez a megfigyelés azért is fontos, mivel diverz metabolikus képességeik miatt a nemzetség tagjait előszeretettel alkalmazzák szénhidrogénnel szennyezett területek kármentesítésére (Kuyukina – Ivshina 2010, Kis et al. 2017). Ezzel szemben a mikroaerob környezet az *Acinetobacter* és *Pseudomonas* nemzetségek képviselőinek kedvezett. A mikroaerob dúsító tenyészetekben a dominánsan jelenlévő *alkB* gének a *Pseudomonas* nemzetséghez, azon belül is a *P. veronii*-hoz köthetőek. Mivel tudjuk, hogy az igen közeli rokon *P. extremaustralis* az alkánokat mikroaerob körülmények között bontja, feltételezhető, hogy a *Pseudomonas* fajok egy bizonyos csoportja ezekhez az oxigénlimitált körülményekhez adaptálódott, így fontos szerepük lehet az alkánok felszín alatti közegekben történő lebontásában. Az aerob dúsító tenyészetek közül kettőben olyan *alkB* gén vált dominánssá, amelyet nem lehetett ismert baktériumfajhoz kötni. Metagenom szekvenálással és bioinformatikai alkalmazások segítségével sikerült egy Moraxellaceae családba tartozó, ez idáig kitenyésztetlen baktériumfaj genomját felépíteni, így fény derült arra is, hogy az eddig ismeretlen, domináns *alkB* gén ehhez a baktériumfajhoz tartozik. A jelen kutatás rávilágított arra, hogy ismereteink az alkán-lebontó baktériumokról még mindig hiányos.

Kutatásaink során mindig szem előtt tartjuk, hogy lehetőleg minél több olyan baktériumfajt vonjunk tenyésztésbe, amely képes a szénhidrogének lebontására. Tenyésztéses előkísérletünk során sikerült is egy, a tudomány számára új, *Sphingobium* nemzetséghez tartozó baktériumtörzset izolálnunk, melyről igazoltuk, hogy aerob körülmények között a törzs képes a toluol, a *meta*- és *para*-xilol teljes lebontására. Az új fajnak a *Sphingobium aquiterrae* nevet adtuk.

## 5. Irodalomjegyzék

- Aburto, A., Ball, A. S. (2009): Bacterial population dynamics and separation of active degraders by stable isotope probing during benzene degradation in BTEX-impacted aquifer. *Rev Int Contam Ambient* 25: 147–156.
- Alfreider, A., Vogt, C. (2007): Bacterial diversity and aerobic biodegradation potential in a BTEX-contaminated aquifer. *Water Air and Soil Pollution* 183:415–426.
- Alfreider, A., Vogt, C., Babel, W. (2002): Microbial diversity in an in situ reactor system treating monochlorobenzene contaminated groundwater as revealed by 16S ribosomal DNA analysis. *Syst Appl Microbiol* 25:232–40.
- Czarny, J., Staninska-Pięta, J., Piotrowska-Cyplik, A., Juzwa, W., Wolniewicz, A., Marecik, R., Ławniczak, Ł., Chrzanowski, Ł. (2019): *Acinetobacter* sp. as the key player in diesel oil degrading community exposed to PAHs and heavy metals. *J Hazard Mater* 383:121168. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121168>
- Benedek, T., Szentgyörgyi, F., Szabó, I., Kriszt, B., Révész, F., Radó, J., Maróti, G., Tánicsics, A. (2018): Aerobic and oxygen-limited enrichment of BTEX-degrading biofilm bacteria: dominance of *Malikia* versus *Acidovorax* species. *Environ Sci Pollut Res Int* 25: 32178–32195.
- Daghio, M., Tatangelo, V., Franzetti, A., Gandolfi, I., Papacchini, M., Careghini, A., Sezenna, E., Saponaro, S., Bestetti, G. (2015): Hydrocarbon degrading microbial communities in bench scale aerobic biobarriers for gasoline contaminated groundwater treatment. *Chemosphere* 130:34–39.
- Di Cello, F., Pepi, M., Baldi, F., Fani, R. (1997): Molecular characterization of an n-alkane-degrading bacterial community and identification of a new species, *Acinetobacter venetianus*. *Res Microbiol* 148:237–249.
- Fahy, A., McGenity, T. J., Timmis, K. N., Ball, A. S. (2006): Heterogeneous aerobic benzene-degrading communities in oxygen-depleted groundwaters. *FEMS Microbiol Ecol* 58:260–270.
- Franzmann, P. D., Skerman, V. B. D. (1981): *Agitococcus lubricus* gen. nov. sp. nov., a lipolytic, twitching coccus from freshwater. *Int J Syst Bacteriol* 31:177–183.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., Ryan, P. D. (2001): PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron* 4:1–9.
- Jurelevicius, D., Alvarez, V. M., Peixoto, R., Rosado, A. S., Seldin, L. (2013): The use of combination of alkB primers to better characterize the distribution of alkane-degrading bacteria. *PLoS ONE* 8:e66565
- Kis, Á. E., Laczi, K., Zsíros, S., Kós, P., Tengölics, R., Bounedjoum, N., Kovács, T., Rákhely, G., Perei, K. (2017): Characterization of the *Rhodococcus* sp. MK1 strain and its pilot application for bioremediation of diesel oil-contaminated soil. *Acta Microbiol Immunol Hung* 64:463–482.

- Kloos, K., Munch, J. C., Schloter, M. (2006): A new method for the detection of alkane-monooxygenase homologous genes (*alkB*) in soils based on PCR-hybridization. *J Microbiol Methods* 66(3):486–496.
- Kuyukina, M. S., Ivshina, I. B. (2010): Application of *Rhodococcus* in bioremediation of contaminated environments. In: Alvarez, H. M. (ed.) *Biology of Rhodococcus*. Springer, Berlin, pp 231–262.
- Lal, B., Khanna, S. (1996): Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*. *J Appl Microbiol* 81:355-362.
- Lee, K., Gibson, D. T. (1996): Toluene and ethylbenzene oxidation by purified naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816-4. *Appl Environ Microbiol*, 62, 3101-3106. p.
- Lee, Y., Lee, Y., Jeon, C. O. (2019): Biodegradation of naphthalene, BTEX, and aliphatic hydrocarbons by *Paraburkholderia aromaticivorans* BN5 isolated from petroleum-contaminated soil. *Sci Rep* 9:860
- Liang, Q., Lloyd-Jones, G. (2010): *Sphingobium scionense* sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from contaminated sawmill soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:413-416.
- Lloyd-Jones, G., Lau, P. C. (1997): Glutathione S-transferase-encoding gene as a potential probe for environmental bacterial isolates capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* 63:3286-3290.
- Luo, C., Xie, S., Sun, W., Li, X., Cupples, A. M. (2009): Identification of a novel toluene-degrading bacterium from the candidate phylum TM7, as determined by DNA stable isotope probing. *Appl Environ Microbiol* 75:4644-4647.
- Margesin, R., Labbé, D., Schinner, F., Greer, C. W., Whyte, L. G. (2003): Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. *Appl Environ Microbiol* 69:3085-3092.
- Martínez-Lavanchy, P. M., Chen, Z., Lünsmann, V., Marin-Cevada, V., Vilches-Vargas, R., Pieper, D. H., Reiche, N., Kappelmeyer, U., Imparato, V., Junca, H., Nijenhuis, I., Müller, J. A., Kusch, P., Heipieper, H. J. (2015): Microbial toluene removal in hypoxic model constructed wetlands occurs predominantly via the ring monooxygenation pathway. *Appl Environ Microbiol* 81:6241–6252.
- Nestler, H., Kiesel, B., Kaschabek, S. R., Mau, M., Schlömann, M. (2007): Biodegradation of chlorobenzene under hypoxic and mixed hypoxic-denitrifying conditions. *Biodegradation* 18:755-767.
- Orphan, V. J., Taylor, L. T., Hafenbradl, D., Delong, E. F. (2000): Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. *Appl Environ Microbiol* 66:700-711.
- Park, M., Jeon, Y., Jang, H. H., Ro, H. S., Park, W., Madsen, E. L., Jeon, C. O. (2007): Molecular and biochemical characterization of 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase from *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2. *Appl Environ Microbiol* 73:5146–5152.

- Pérez-de-Mora, A., Engel, M., Schloter, M. (2011): Abundance and diversity of n-alkane-degrading bacteria in a forest soil co-contaminated with hydrocarbons and metals: a molecular study on *alkB* homologous genes. *Microb Ecol* 62:959-972.
- Pinyakong, O., Habe, H., Yoshida, T., Nojiri, H., Omori, T. (2003): Identification of three novel salicylate 1-hydroxylases involved in the phenanthrene degradation of *Sphingobium* sp. strain P2. *Biochem Biophys Res Commun* 301:350-357.
- Popp, N., Schlömann, M., Mau, M. (2006): Bacterial diversity in the active stage of a bioremediation system for mineral oil hydrocarbon-contaminated soils. *Microbiology* 152:3291-3304.
- Posman, K. M., DeRito, C. M., Madsen, E. L. (2017): Benzene degradation by a *Variovorax* species within a coal tar-contaminated groundwater microbial community. *Appl Environ Microbiol* 83:e02658–e2716
- Powell, S. M., Bowman, J. P., Ferguson, S. H., Snape, I. (2010): The importance of soil characteristics to the structure of alkane-degrading bacterial communities on sub-Antarctic Macquarie Island. *Soil Biol Biochem* 42:2012-2021.
- Prince, R. C., Amande, T. J., McGenity, T. J. (2018): Prokaryotic hydrocarbon degraders. In: McGenity T (ed) Taxonomy, genomics and ecophysiology of hydrocarbon-degrading microbes. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. *Springer*, Berlin, Heidelberg, 1669 - 1692. p.
- Pumphrey, G. M., Madsen, E. L. (2007): Naphthalene metabolism and growth inhibition by naphthalene in *Polaromonas naphthalenivorans* strain CJ2. *Microbiology* 153:3730–3738.
- Révész, F., Tóth, E. M., Kriszt, B., Bóka, K., Benedek, T., Sárkány, O., Nagy, Z., Tánicsics, A. (2018): *Sphingobium aquiterrae* sp. nov., a toluene, meta- and paraxylene- degrading bacterium isolated from petroleum hydrocarbon-contaminated groundwater. *Int J Syst Evol Microbiol* 68:2807-2812.
- Singleton, D. R., Lee, J., Dickey, A. N., Stroud, A., Scholl, E. H., Wright, F. A., Aitken, M. D. (2018): Polyphasic characterization of four soil-derived phenanthrene-degrading *Acidovorax* strains and proposal of *Acidovorax carolinensis* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 41:460–472.
- Sperfeld, M., Diekert, G., Studenik, S. (2018): Anaerobic aromatic compound degradation in *Sulfuritalea hydrogenivorans* sk43H. *FEMS Microbiol Ecol* 95:fiy199
- Sun, W. M., Xie, S. G., Luo, C. L., Cupples, A. M. (2010): Direct link between toluene degradation in contaminated-site microcosms and a *Polaromonas* strain. *Appl Environ Microbiol* 76:956-959.
- Sydow, M., Owsianiak, M., Szczepaniak, Z., Framski, G., Smets, F. B., Ławniczak, Ł., Lisiecki, P., Szulc, A., Cyplik, P., Chrzanowski, Ł. (2016): Evaluating robustness of a diesel-degrading bacterial consortium isolated from contaminated soil. *New Biotechnol* 33:852-859.
- Tánicsics, A., Benedek, T., Szoboszlay, S., Veres, P. G., Farkas, M., Márialigeti, K., Kukolya, J., Lányi, S., Kriszt, B. (2015): The detection and phylogenetic analysis of the alkane 1-monooxygenase gene of members of the genus *Rhodococcus*. *Syst Appl Microbiol* 38:1-7.

- Táncsics, A., Farkas, M., Szoboszlay, 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. *Syst. Appl. Microbiol.* 36: 339-350.
- 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. *Syst. Appl. Microbiol.* 33: 398 – 406.
- Táncsics A, Szalay AR, Farkas M, Benedek T, Szoboszlay S, Szabó I, Lueders T (2018): Stable isotope probing of hypoxic toluene degradation at the Siklós aquifer reveals prominent role of Rhodocyclaceae. *FEMS Microbiol Ecol* 94:fiy088
- Táncsics, A., Szoboszlay, 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. *Environ Sci Technol* 46:232-240.
- Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H. J., Ludwig, W., Kämpfer, P. (2010): Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:249-266.
- Tribelli, P. M., Rossi, L., Ricardi, M. M., Gomez-Lozano, M., Molin, S., Raiger Iustman, L. J., Lopez, N. I. (2018): Microaerophilic alkane degradation in *Pseudomonas extremaustralis*: a transcriptomic and physiological approach. *J Ind Microbiol Biotechnol* 45:15–23.
- Wang, W., Zhong, R., Shan, D., Shao, Z. (2014): Indigenous oil-degrading bacteria in crude oil-contaminated seawater of the Yellow sea, China. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:7253-7269.
- Winsley, T. J., Snape, I., McKinlay, J., Stark, J., van Dorst, J. M., Ji, M., Ferrari, B. C., Siciliano, S. D. (2014): The ecological controls on the prevalence of candidate division TM7 in polar regions. *Front Microbiol* 5:345.
- Xie, S., Sun, W., Luo, C., Cupples, A. M. (2011): Novel aerobic benzene degrading microorganisms identified in three soils by stable isotope probing. *Biodegradation* 22:71-81.
- Zhao, L., Ma, T., Gao, M., Gao, P., Cao, M., Zhu, X., Li, G. (2012): Characterization of microbial diversity and community in water flooding oil reservoirs in China. *World J Microbiol Biotechnol* 28:3039-3052.
- Zhou, N. Y., Fuenmayor, S. L., Williams, P. A. (2001): *nag* genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. *J Bacteriol* 183:700–708.

## 6. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó publikációk listája

### Tudományos folyóiratokban megjelent, lektorált, teljes szövegű tudományos közlemény:

**Révész, F.**, Farkas, M., Kriszt, B., Szoboszlay, S., Benedek, T., Tánicsics, A. (2020): Effect of oxygen limitation on the enrichment of bacteria degrading either benzene or toluene and the identification of *Malikia spinosa* (Comamonadaceae) as prominent aerobic benzene-, toluene-, and ethylbenzene-degrading bacterium: enrichment, isolation and whole-genome analysis. *Environ Sci Pollut Res Int*, **27**: 31130-31142. (IF: 3,056; Q2)

**Révész, F.**, Figueroa-Gonzalez, P.A., Probst, A.J., Kriszt, B., Banerjee, S., Szoboszlay, S., Maróti, G., Tánicsics, A. (2019): Microaerobic conditions caused the overwhelming dominance of *Acinetobacter* spp. and the marginalization of *Rhodococcus* spp. in diesel fuel/crude oil mixture-amended enrichment cultures. *Arch Microbiol*, **202**: 329-342. (IF: 1,884; Q2)

**Révész, F.**, Tóth, E.M., Kriszt, B., Bóka, K., Benedek, T., Sárkány, O., Nagy, Zs., Tánicsics, A. (2018): *Sphingobium aquiterrae* sp. nov., a toluene-, meta- and para-xylene degrading bacterium isolated from BTEX-contaminated groundwater. *Int J Syst Evol Microbiol*, **68**: 2807-2812. (IF: 2,166; Q1)

Figueroa-Gonzalez, P.A., Bornemann, T.L.V., Adam, P.S., Plewka, J., **Révész, F.**, von Hagen, C.A., Tánicsics, A., Probst, A.J. (2020): Saccharibacteria as organic carbon sinks in hydrocarbon-fueled communities. *Front Microbiol* **11**: 587782. (IF: 4,235; Q1)

### Kongresszusi kiadványokban megjelent közlemény (az ISBN, ISSN vagy más, hitelesített kiadványaira vonatkozóan):

**Révész, F.**, Farkas, M., Benedek, T., Szabó, I., Kriszt, B., Tánicsics, A. (2017): Az oxigénlimitáció hatása benzol- és toluollebontó dúsító enyészetek baktériumközösségeinek összetételére. VII. Ökotoxikológiai Konferencia 2017. Budapest, Magyarország: 2017. november 24. *Magyar Ökotoxikológiai Társaság*, 32-33. p. ISBN 978-963-89452-8-0

**Révész, F.,** Farkas, M., Szabó, I., Kriszt, B., Tácsics, A. (2017): Comparative analysis of bacterial enrichment cultures degrading aromatic hydrocarbons under aerobic or microaerobic conditions. 5<sup>th</sup> Central European Forum for Microbiology 2017. Keszthely, Magyarország: 2016.10.19 -2016.10.21. *Acta Microbiol Immunol Hung*, **64**: 162-163. ISSN 1217-8950.

**Révész, F.,** Farkas, M., Szabó, I., Kriszt, B., Tácsics, A. (2018): Comparative analysis of bacterial enrichment cultures degrading aromatic hydrocarbons under aerobic or microaerobic conditions. 7<sup>th</sup> European Bioremediation Conference and 11<sup>th</sup> International Society for Environmental Biotechnology Conference, 2018. Chania, Kréta, Görögország: 2018.06.25 - 2018.06.28. *e-Book of Abstracts*, pp. 346. ISBN 978-618-81537-6-9.