



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

DOI: 10.54598/006420

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

|                                                                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Jelölések, rövidítések jegyzéke .....</b>                                                                        | <b>1</b>  |
| <b>1. Bevezetés és célkitűzések.....</b>                                                                            | <b>4</b>  |
| <b>2. Irodalmi áttekintés .....</b>                                                                                 | <b>6</b>  |
| 2.1. A szárazföldi olajszennyezések és hatásai .....                                                                | 6         |
| 2.1.1. A kőolaj-szénhidrogének szorpcióját befolyásoló tényezők .....                                               | 7         |
| 2.1.2. Az ökoszisztémák pusztulása és átalakulása az olajszennyezés következtében .....                             | 8         |
| 2.2. A monoaromás szénhidrogének felhasználása és élettani hatásai.....                                             | 10        |
| 2.2.1. A BTEX vegyületek ipari felhasználási területei .....                                                        | 10        |
| 2.2.2. A BTEX vegyületek humán egészségre gyakorolt hatásai .....                                                   | 11        |
| 2.3. A mikroorganizmusok szerepe a kőolajszennyezések eltávolításában .....                                         | 12        |
| 2.3.1. A mikroorganizmusok által termelt felületaktív anyagok szerepe az<br>szénhidrogének biodegradációjában ..... | 12        |
| 2.3.2. Az enzimkatalizált biodegradáció .....                                                                       | 13        |
| 2.3.2.1. A főbb benzol- és aromás szénhidrogén-lebontó baktériumok .....                                            | 14        |
| 2.3.2.2. A BTEX lebontásban szerepet játszó enzimek és útvonalak .....                                              | 15        |
| 2.4. A szénhidrogének lebomlását befolyásoló fizikokémiai paraméterek .....                                         | 17        |
| 2.4.1. A hőmérséklet hatása a biodegradációra .....                                                                 | 18        |
| 2.4.2. A tápanyag-ellátottság, mint limitáló tényező.....                                                           | 18        |
| 2.4.3. A megfelelő nedvességtartalom .....                                                                          | 19        |
| 2.4.4. A magas sótartalom negatív következményei .....                                                              | 19        |
| 2.4.5. A pH hatása a biodegradációra.....                                                                           | 20        |
| 2.4.6. Az elektronakceptorok szerepe és megoszlása a kőolajszennyezett területeken...                               | 20        |
| <b>3. Anyag és módszer .....</b>                                                                                    | <b>22</b> |
| 3.1. A mintavételi helyszín jellemzése és a mintavételezés körülményeinek leírása.....                              | 23        |
| 3.2. A BTEX-bontó dúsítótenyészetek összeállítása.....                                                              | 26        |
| 3.3. Baktériumtörzsek izolálása.....                                                                                | 28        |
| 3.4. DNS izolálás .....                                                                                             | 29        |
| 3.5. 16S rRNS és C23O funkciógén amplifikálása polimeráz láncreakcióval .....                                       | 29        |

|                                                                                                                                                                                                    |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.6. Agaróz gél-elektroforézis .....                                                                                                                                                               | 30        |
| 3.7. 16S rRNS közösségi T-RFLP analízis és kiértékelése .....                                                                                                                                      | 31        |
| 3.8. Szekvenáló reakciók és adatelemzés .....                                                                                                                                                      | 32        |
| 3.8.1. Sanger-szekvenálás és a szekvenciák filogenetikai elemzése .....                                                                                                                            | 32        |
| 3.8.2. Illumina amplikonszekvenálás .....                                                                                                                                                          | 33        |
| 3.8.3. Teljes genom szekvenálás és az adatok elemzése .....                                                                                                                                        | 35        |
| 3.9. BTEX-bontó képesség vizsgálata GC-MS segítségével.....                                                                                                                                        | 36        |
| 3.10. Az új baktériumfajok leírásához szükséges vizsgálatok .....                                                                                                                                  | 37        |
| 3.10.1. Fenotípusos vizsgálatok: morfológiai és élettani jellemzők.....                                                                                                                            | 37        |
| 3.10.2. Kemotaxonómiai vizsgálatok: zsírsavak, poláris lipidek légzési kinonok.....                                                                                                                | 38        |
| 3.10.3. Genotípusos és filogenetikai jellemzők vizsgálata.....                                                                                                                                     | 39        |
| 3.11. A stabil izotópos (SIP) vizsgálat módszertana .....                                                                                                                                          | 39        |
| 3.11.1. A mikrokozmoszok összeállítása és a benzol-fogyás nyomon követése.....                                                                                                                     | 41        |
| 3.11.2. DNS kivonás és mikrokozmoszok T-RFLP analízise .....                                                                                                                                       | 42        |
| 3.11.3. A mikrokozmoszokból izolált DNS gradiens ultracentrifugálása .....                                                                                                                         | 42        |
| 3.11.4. Az egyes frakciók 16S rDNS kópiaszámának meghatározása qPCR<br>segítségével.....                                                                                                           | 43        |
| 3.11.5. 16S rDNS amplikon szekvenálás a frakciókból .....                                                                                                                                          | 44        |
| <b>4. Eredmények és értékelésük .....</b>                                                                                                                                                          | <b>45</b> |
| 4.1. Mikroaerob benzollebontó dúsítótenyészetek benzol biodegradációs hatékonysága és<br>baktériumközösségeinek vizsgálata .....                                                                   | 45        |
| 4.1.1. A mikroaerob benzol biodegradáció hatékonysága a különböző típusú<br>dúsítótenyészetekben.....                                                                                              | 45        |
| 4.1.2. 16S rDNS T-RFLP elektroferogramok klaszteranalízise .....                                                                                                                                   | 47        |
| 4.1.3. A dúsítótenyészetek mikrobaközösségeinek összetétele 16S rDNS amplikon<br>szekvenálás alapján .....                                                                                         | 49        |
| 4.1.4. A dúsítótenyészetekből izolált tenyésztető baktériumközösség összetétele és a<br>C23O funkciógén vizsgálatának eredményei .....                                                             | 54        |
| 4.2. Aerob és mikroaerob benzollebontó mikrobaközösségek elemzése, benzol<br>biodegradációs hatékonysága és a lebontásban szerep játszó tagok azonosítása stabil izotópos<br>(SIP) módszerrel..... | 60        |

|                                                                                                                                        |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.2.1. A benzollebontó aerob és mikroaerob mikrokozmoszok mikrobaközösségeinek összetétele 16S rDNS amplikon szekvenálás alapján ..... | 61         |
| 4.2.2. A mikrobaközösségek alakulása a könnyű és a nehéz DNS frakciókban .....                                                         | 65         |
| 4.3. Új aromás szénhidrogén lebontásra képes baktériumfajok leírása.....                                                               | 71         |
| 4.3.1. <i>Pinisolibacter aquiterrae</i> B13 <sup>T</sup> törzs jellemzése és új fajként történő leírása.....                           | 71         |
| 4.3.1.1. A <i>Pinisolibacter</i> nemzetség jellemzése .....                                                                            | 71         |
| 4.3.1.2. A B13 <sup>T</sup> és MA2-2 törzsek filogenetikai elhelyezkedése és genomelemzése ..                                          | 72         |
| 4.3.1.3. A B13 <sup>T</sup> és az MA2-2 törzsek aromás szénhidrogén bontó képessége .....                                              | 75         |
| 4.3.1.4. Fiziológiai, morfológiai és biokémiai vizsgálatok .....                                                                       | 76         |
| 4.3.1.5. Kemotaxonómiai vizsgálatok .....                                                                                              | 78         |
| 4.3.2. Az <i>Ideonella benzenivorans</i> B7 <sup>T</sup> törzs jellemzése és új fajként történő leírása.....                           | 81         |
| 4.3.2.1. Az <i>Ideonella</i> nemzetség jellemzése.....                                                                                 | 81         |
| 4.3.2.2. A B7 <sup>T</sup> törzs filogenetikai elhelyezkedése és genomelemzése .....                                                   | 81         |
| 4.3.2.3. A B7 <sup>T</sup> törzs aromás szénhidrogén bontó képessége.....                                                              | 86         |
| 4.3.2.4. Fiziológiai, morfológiai és biokémiai vizsgálatok .....                                                                       | 87         |
| 4.3.2.5. Kemotaxonómiai vizsgálatok .....                                                                                              | 90         |
| 4.3.3. Az <i>Acidovorax benzenivorans</i> D2M1 <sup>T</sup> törzs jellemzése és új fajként történő leírása.....                        | 92         |
| 4.3.3.1. Az <i>Acidovorax</i> nemzetség jellemzése.....                                                                                | 92         |
| 4.3.3.2. A D2M1 <sup>T</sup> törzs filogenetikai elhelyezkedése és genomelemzése .....                                                 | 93         |
| 4.3.3.3. A D2M1 <sup>T</sup> törzs aromás szénhidrogén bontóképessége .....                                                            | 98         |
| 4.3.3.4. Fiziológiai, morfológiai és biokémiai vizsgálatok .....                                                                       | 99         |
| 4.3.3.5. Kemotaxonómiai vizsgálatok .....                                                                                              | 102        |
| <b>5. Következtetések és javaslatok .....</b>                                                                                          | <b>105</b> |
| <b>6. Összefoglalás .....</b>                                                                                                          | <b>111</b> |
| <b>7. Summary .....</b>                                                                                                                | <b>113</b> |
| <b>8. Mellékletek .....</b>                                                                                                            | <b>115</b> |
| 8.1. Irodalomjegyzék.....                                                                                                              | 115        |
| 8.2. Táblázatok, ábrák .....                                                                                                           | 143        |
| <b>Köszönetnyilvánítás .....</b>                                                                                                       | <b>148</b> |

## JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

**A:** aerob

**AL:** aminolipid

**ANI:** Average Nucleotide Identity - átlagos nukleotid azonosság

**AMI:** akut mieloid leukémia

**APL:** aminofoszfolipid

**ATSDR:** Agency for Toxic Substances and Disease Registry

**BCCM:** Belgian Coordinated Collections of Microorganisms

**BEN:** benzolbontó dúsítótenyészet

**BENSIP:** benzol tartalmú stabil izotóposan jelölt mikrokozmosz

**BTEX:** benzol, toluol, etil-benzol, xilolok

**C23O:** catechol-2,3-dioxygenase - katekol-2,3-dioxigenáz

**CAS:** Chemical Abstracts Service - Vegyi anyag Nyilvántartási Szolgálat

**CLC:** QIAGEN CLC Genomics Workbench (genomikai, transzkriptomikai, epigenomikai és metagenomikai elemzésekre szolgáló program)

**dddH:** digital DNA-DNA hybridization - digitális DNS-DNS hibridizáció

**DSMZ:** Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

**dNTP:** deoxynucleotide triphosphates - dezoxinukleotid trifoszfátok

**DPG:** diphosphatidylglycerol - difoszfatidilglicerol

**EDTA:** ethylenediaminetetraacetic acid - etilén-diamin-tetraecetsa

**EPS:** extracellular polymeric substances - extracelluláris polimer anyagok

**GC-MS:** Gas Chromatography Mass Spectrometry - gáz kromatográffal kapcsolt tömegspektrométer

**KEGG:** Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (genomokat, biológiai útvonalakat, betegségeket, gyógyszereket és kémiai elemeket magába foglaló adatbázisok gyűjtőhelye)

**KEV:** keverék (BTEX) tartalmú dúsítótenyészet

**LB:** Luria-Bertani táptalaj, amelyet baktériumtenyésztéshez, izoláláshoz használnak

**MA:** mikroaerob

**MaGe:** Magnifying Genomes (mikrobiális genom annotációra és elemzésre szolgáló platform)

**MiSeq SOP:** Standard Operation Procedure (az Illumina MiSeq platformjával generált 16S rRNS génszekvenciák feldolgozására használt standard működési eljárás)

**MiGA:** The Microbial Genomes Atlas (adatbázis teljes genom alapú filogenetikai elemzéshez)

: Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Magyar Nemzeti Gyűjteménye

**mPH:** multicomponent phenol hydroxylase - többkomponensű fenol-hidroxiláz

**MSZ:** Magyar Szabvány

**NCAIM:** National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information - Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ

**NJ:** neighbour joining

**OAT:** Orthologous Average Nucleotide Identity Tool (ortológ átlagos nukleotid azonosság értékek kiszámításánál használt szoftver)

**OTU:** operational taxonomic unit - operatív taxonómiai egység

**OD:** optical density - optikai denzitás

**ORF:** open reading frame - nyitott leolvasási keret

**OrthoANI:** Orthologous Average Nucleotide Identity - átlagos ortológ nukleotid azonosság

**PAH:** polycyclic aromatic hydrocarbons - policiklikus aromás szénhidrogének

**PAST:** Paleontological Statistics Program (statisztikai adatelemző szoftver)

**PC:** phosphatidylcholin - foszfatidilkolin

**PCR:** polymerase chain reaction - polimeráz láncreakció

**PDMS:** polydimethylsiloxane - dimetil-polisziloxán

**PE:** phosphatidylethanolamine - foszfatidil-etanol-amin

**PG:** phosphatidylglycerine - foszfatidil-glicerin

**PGAP:** Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (bakteriális és archeális genom annotáló algoritmus)

**PL:** phospholipid - foszfolipid

**PME:** phosphatidyl-N-methyl-ethanolamine - foszfatidil-N-metil-etanol-amin

**PHB:** polyhydroxybutyrate - polihidroxibutirát

**R2A:** Reasoner's 2A agar, olyan táptalaj, amelyet az általában ivóvízben élő baktériumok vizsgálatára fejlesztettek ki.

**SIP:** stable isotope probing - stabil izotópos módszer

**TBE:** Tris/Borate (bórsav)/EDTA pufferoldat

**TEX:** egyéb aromás szénhidrogének gyűjtőneve

**TGE:** tripton-glükóz-élesztőkivonat tartalmú általános bakteriológiai táptalaj

**TPH:** total petroleum hydrocarbons - összes ásványolaj eredetű szénhidrogén

**T-RFLP:** terminal restriction fragment length polymorphism - terminális restrikciós fragmenthossz polimorfizmus

**TRIS:** tris(hydroxymethyl)aminomethane - [trisz(hidroximetil)-amino-metán]

**UBCG:** up-to-date bacterial core gene (bakteriális teljes genomokból létrehozott 92 mag-gén készlet alapú filogenetikai elemző program)

## 1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az egyik legsúlyosabb károkat a természetes ökoszisztémákban a kőolajszennyezések okozzák, melyeket jól példáz a Deepwater Horizon olajfűró 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.

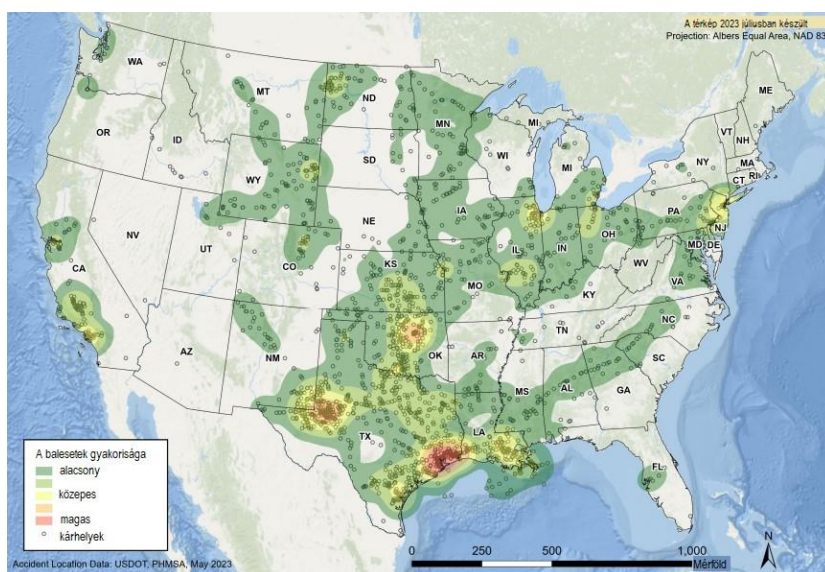
Mindezek fényében kutatásunk elsődleges céljai a következők voltak:

- ❖ 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. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. A szárazföldi olajszennyezések és hatásai

A kőolaj eredetű szénhidrogének a leggyakoribb környezetszennyező anyagok. A gyors iparosodás és a globalizáció miatt a tengeri és a szárazföldi ökoszisztémákban egyaránt megnövekedett az olajszennyezések mértéke, ugyanis világszinten egyre nagyobb a kereslet a kőolaj finomítása és további feldolgozása során létrehozott termékek iránt, mint pl. fűtőgázok, üzemanyagok, kenőanyagok, bitumen, valamint a különböző petrokémiai termékek. Az olajszennyezések általában nem a kőolaj ipari feldolgozása, hanem a termékek szállítása és tárolása során a csővezetékek, tankerek és tartályok meghibásodása és szivárgása következtében kerülnek a talajba, felszín alatti vagy felszíni vizekbe, illetve tengerekbe. Bár világszinten a tengeri olajkatasztrófák, mint pl. a Deepwater Horizon (Mexikói-öböl, 2010) a legkiemelkedőbbek, ugyanakkor napi szinten történnek számos kisebb káresemények a szárazföldön is, melyek nem kerülnek nyilvánosságra (1. kép). Az Amerikai Egyesült Államokban (USA) az olajszennyezések többségét a nyersolaj okozza, ezt követi a finomított termékek és a földgáz, mely területileg főként a délközép államokat érinti. Ez nem meglepő, ugyanis Texas és a környező államok az USA domináns olajkitermelői. A Keystone Pipeline olajszennyezése például (Kansas, 2022) az elmúlt évtized legjelentősebb szárazföldi olajkatasztrófája volt. A csővezeték szivárgása 14 000 hordó olajat bocsátott ki a Mill Creek patakba ([http1](#)). Az Egyesült Államok után világ szinten Oroszország és Szaúd-Arábia járnak élen az olajkitermelésben ([http2](#), [http3](#)).



1. kép: Az Egyesült Államok olajszennyezett kárhelyei 2010-től napjainkig ([http4](#))

Magyarországon jelenleg hatályos jogszabály a 6/2009. (IV. 14.) KvVM-EüM-FVM együttes rendelet a „földtani közeg és a felszín alatti víz szennyezéssel szembeni védelméhez szükséges határértékekről és a szennyezések méréséről”, mely szennyezettségi határértéket (B) állapít meg külön a földtani közegben és a felszín alatti vizekben előforduló szennyezőanyag-csoportokra. A rendelet három kategóriába sorolja a főbb kőolajalkotó vegyületeket: alifás szénhidrogének (TPH), benzol és alkilbenzolok (BTEX), valamint policiklikus aromás szénhidrogének (PAH). Ez alapján az alifás szénhidrogének esetében a szennyezettségi határérték földtani közegre 100 mg/kg, felszín alatti vizekre vonatkozóan pedig 100 µg/L, a PAH vegyületeknél földtani közeg esetében 1 mg/kg, míg felszín alatti vizeknél 2 µg/L, az aromás szénhidrogének földtani közegre vonatkoztatott határértéke 0,5 mg/kg, mely a benzol esetében mindössze 0,2 mg/kg (http5). A szennyezettségi határértékek felszín alatti vizekre vonatkozóan a benzol esetében 1 µg/L, a toluolra, etil-benzolra és xilolokra nézve pedig 20 µg/L (http5).

#### **2.1.1. A kőolaj-szénhidrogének szorpcióját befolyásoló tényezők**

Az olajszennyezés talajba szivárgását és a talajrétegekben történő mozgását a talaj fizikai és kémiai tulajdonságai, pl. az áteresztőképesség és a talajszerkezet, a talajvízszint periodikus ingadozása, valamint a hidrogeológiai adottságot befolyásolják. Ezen kívül a terjedést és a beszivárgás mértékét a kőolajszármazékok fizikai és kémiai tulajdonságai is meghatározzák, ugyanis a kőolajalkotó szénhidrogének a molekulatömeg, a szénlánc hossz és egyéb tulajdonságok alapján eltérő módon lépnek kapcsolatba a környezetükkel. A kis szénatomszámú és egyszerű aromás vegyületek illékonyak, így elpárolognak a légkörbe, amint az olaj szétterjed a felszínen (Truskewycz et al. 2019). Felszín alatti szennyezések esetében, vagy ha a kőolaj a mélyebb talajrétegekbe szivárog, ott az illékony vegyületek egy gőzfelhőt hoznak létre az olajtest körül, illetve szerkezeti tulajdonságaik révén a talajvízbe oldódhatnak (Essaid et al. 2011). Bár a benzol teljesen szimmetrikus vegyület, mégis vízoldhatósága nagyobb (1790 mg/L, 25 °C) (http6), mint egy hasonló méretű alkáné (9,5 mg/L, 25 °C) (http7), ugyanis erősebb a benzol-víz közötti van der Waals kölcsönhatás, mint egy hasonló molekulatömegű alifás szénhidrogén esetében, köszönhetően a benzol nagyobb polarizálhatóságának (Graziano 2006). A viszonylag könnyen oldódó kis szénláncú és aromás szénhidrogének, mint a BTEX vegyületek a talajvíz elszennyezésén keresztül nagy távolságokba eljuthatnak, és veszélyeztethetik akár az ivóvízbázisokat is, mely által igen jelentős e vegyületek környezetkárosító hatása és humán egészségügyi kockázata. A lánc hossz és az aromás gyűrűk számának növekedésével csökken a vegyületek vízben való oldhatósága,

melyet a sótartalom, a hőmérséklet és a talaj szorpciós tulajdonsága is befolyásol. A szénhidrogének talajszorpcióját a vegyület hidrofób tulajdonságain kívül a talaj szerkezeti összetétele, szemcsemérete, szervesanyag-, és agyagásvány-tartalma, pH értéke, nedvességtartalma, kationcserélő képessége és a hőmérséklet is befolyásolja (Lundegard és Sweeney 2004, Landmeyer és Effinger 2016, Truskewycz et al. 2019). A BTEX komponensek szorpciós kapacitását leginkább a talaj pórus-, és szemcsemérete, a talajszemcsék felülete és a szervesanyag tartalom befolyásolja. Általánosságban a magasabb szervesanyag-, és agyagtartalom kedvezően hat a szorpcióra (Zhang et al. 2015). A benzol szorpciójának mértékét is jelentősen növeli a talaj szervesanyagtartalma, illetve az agyagásvány-tartalom is jelentősen hat rá, ugyanis a magas kalcium tartalmú agyag minimális, míg az alumíniummal telített talajok jelentős mennyiségű benzol megkötésére lehetnek képesek (Rogers et al. 1980).

A kőolaj-szénhidrogének képesek a talaj nanopórusaiba diffundálni, melyek 100 nm-nél is kisebb méretűek így semmilyen élő szervezet, még a nanobaktériumok (Vainshtein 2000) számára sem hozzáférhetők, ezáltal növelve a szennyezőanyag környezetben töltött idejét és ezáltal a toxicitását (Nam et al. 1998). A szénhidrogének deszorpciója fokozódik a megnövekedett hőmérséklet, nedvesség-, és homoktartalom által, valamint a növények és mikroorganizmusok által termelt bioaktív anyagok segítségével. Ezen kívül a növények gyökerei is képesek lehetnek a talajaggregátumok szétDarabolására és a szénhidrogének kiszabadítására a nanopórusokból (Providenti et al. 1993, Khan et al. 2013).

A talaj típusának és szerkezeti összetételének meghatározása és a terület hidrogeológiai viszonyainak ismerete mellett a megfelelő kármentesítési technológia megválasztásához és a biodegradációs folyamatok hatékonyságának növeléséhez elengedhetetlenül szükséges a szénhidrogének talajszorpciós tulajdonságainak ismerete. A talajszemcsék felületén adszorbeálódott szennyezőanyagok oldatba juttatásával és a deszorpció mértékének fokozásával a toxikus vegyi anyagok biológiai hozzáférhetősége jelentősen megnövelhető, mely szükséges feltétele az őshonos bakteriális közösség általi lebontás beindulásának, valamint ezen ismeretek segítségével csökkenthető a kármentesítési idő és a beavatkozás költsége.

### **2.1.2. Az ökoszisztémák pusztulása és átalakulása az olajszennyezés következtében**

A környezetbe kerülő kőolaj azonnal megváltoztatja az érintett terület ökoszisztémáját, ugyanis kezdetben a sok elpusztult mikroorganizmus és talajlakó élőlény, valamint a tápanyag-, és vízfelvételben korlátozott növények következtében a biogeokémiai körforgalmak és táplálékhálózatok funkcionalitása is sérül. Az elsődleges termelők és a talajlakó

mikroszervezetek által a toxikus és sok esetben karcinogén szénhidrogének a magasabb trofikus szintekre is eljuthatnak és kifejthetik káros hatásukat a táplálékláncban történő akkumuláció révén (Truskewycz et al. 2019).

Az olajszennyezés a kémiai vegyületek közvetlen toxicitásával, a citoplazmamembrán károsításával vagy a tápanyagok és a vízfelvétel korlátozásán keresztül a szaporodáshoz szükséges kulcsfontosságú elemek bevitelének megakadályozásával károsítja az ott élő mikroszervezeteket, csökkentve ezzel a mikrobiális diverzitást. A szénhidrogén szennyezők toxicitását a szénlánc hossza is befolyásolja, ugyanis kisebb molekulatömegű frakciók a jobb biológiai hozzáférhetőség miatt közvetlenül toxikusabbak, ugyanakkor a hosszabb, telített szénláncú vegyületek mutagenitási potenciálja magasabb. Ugyanakkor a mikroorganizmusok létfontosságú szerepet játszanak az ökoszisztémák regenerálódó képességében, ugyanis idővel a mikrobiális közösség adaptálódik az új szénforráshoz és megkezdik a szennyezőanyag lebontását különböző mechanizmusokkal, mely által a szennyezett területeken megnövekszik az össz-mikrobiális aktivitás (Mukherjee et al. 2014, Truskewycz et al. 2019). A biofilmképző baktériumok mellett, hogy a termelt extracelluláris polimer anyagok (EPS) segítségével ellenállóbbak a szélsőséges környezeti hatásoknak, mint amilyenek a toxikus vegyi anyagok is, egymással kölcsönhatásban vannak és kémiai jelek útján (*quorum sensing*) képesek információcserére a közösségen belül, mely sejt és populáció szinten is megkönnyíti a mikroorganizmusok adaptálódását a környezeti kihívásokhoz (Lade et al. 2014).

A talajt érintő kőolajszennyezések a felszíni- és felszín alatti vizek által messzire eljuthatnak és veszélyeztethetik a természetes vizek élővilágát. Az olaj a vízi mikroszervezetek felszínére tapadva fizikai és kémiai úton is azok pusztulását okozza. Közvetlen toxikus hatást gyakorol a gerinctelen vízi élőlényekre, puhatestűekre, halakra és rákokra, így az azokkal táplálkozó, azaz a madarak, emlősök és akár az ember is érintetté válnak. Az olaj a madarak tollára és a vízi emlősök bundájára rátapadva rontja a kültakaró hőszigetelését. Az olajszennyezésnek való hosszú távú kitettség pedig kedvezőtlenül hat a gerinces állatok szaporodóképességére és csökkenti az immunrendszer ellenállóképességét (Harwell és Gentile 2014, Franci et al. 2014, Bergeon Burns et al. 2014).

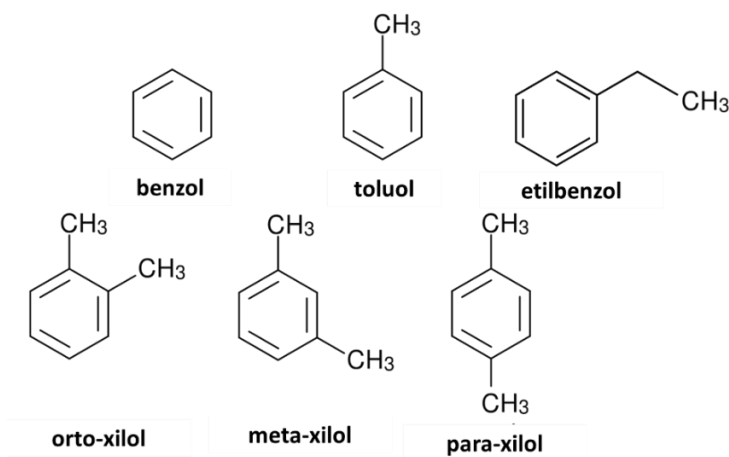
Összességében elmondható, hogy a szénhidrogén vegyületek a földtani közeg és a felszíni vizek élővilágában is visszafordíthatatlan károkat okoznak közvetlen vagy a táplálékláncon keresztül történő közvetett toxikus hatásaik révén.

## 2.2. A monoaromás szénhidrogének felhasználása és élettani hatásai

A petrokémiai termékeket leggyakrabban földgázból vagy kőolajból állítják elő. Az aromás vegyületek jelentik az egyik legfőbb alapanyagot az ipar számára. A benzol igen erős mérgező, így felhasználását korlátozzák, azonban ennek ellenére a vegyület iránt való kereslet 2020-ban 52,94 millió tonna volt globálisan, mely 2030-ra a becslések szerint elérheti a közel 78 millió tonnát (http8).

### 2.2.1. A BTEX vegyületek ipari felhasználási területei

A BTEX (benzol, toluol, etil-benzol és xilol) vegyületek szintelen, szobahőmérsékleten folyékony és illékony anyagok (1. ábra). Egy aromás gyűrűt tartalmaznak, vízzel kevéssé oldódnak, alacsony, főként apoláris oldószerben oldódnak jól.



1. ábra: A BTEX vegyületek kémiai szerkezeti képletei (Montero-Montoya 2018)

A benzol egyéb petrokémiai vegyületek, mint a fenol, kumol, ciklohexán, etil-benzol kiindulási anyaga és egyéb vegyületek köztiterméke, ezen kívül oldószerként is alkalmazzák a vegyiparban és a gyógyszeriparban. Az autógyártásban a szintetikus gumik előállításához használják fel a benzolt, mely világpiaci kereslete a gépjárművek iránti megnövekedett igény miatt növekvő tendenciát mutat (http8). Ezen kívül kenőanyagok, színezékek, mosószerek, növényvédő szerek előállítása során is gyakran alkalmazzák (Williams et al. 2008, Pellegrino 2000). A benzolból előállított etil-benzol a sztírol gyártás során kerül felhasználásra, pl. poliszttírol, valamint az egyszer használatos orvosi eszközök alapjául szolgáló akrilonitril-butadién-sztíren formájában (http8). A toluolt főként oldószerként és az üzemanyag oktánszámának javítása érdekében adalékanyagként használják. A vegyiparban a benzoészav

előállításának alapanyaga, melyet tartósítószerként alkalmaznak élelmiszerekben, italokban és kozmetikumokban. Ezen kívül a toluol a robbanásveszélyes TNT, azaz a trinitrotoluol előállításához is szükséges, valamint festékhígítók, illatszerek, színezékek, fagyállók, műanyag-, és nejlonalkotó polimerek gyártása során is felhasznált alapanyag (http9, Pellegrino 2000). A xilolok olajbázisú festékek, lakkok, epoxi, ragasztók, rozsdagátló, és szintetikus zománcfestékek hígításához használható vegyület. A xilolt bizonyos ragasztóanyagok eltávolítására és általános oldószerként, valamint műanyagpalackok és poliészter ruházat gyártása során használják (Pellegrino 2000).

### **2.2.2. A BTEX vegyületek humán egészségre gyakorolt hatásai**

Az összes BTEX vegyület közül a benzol emelendő ki, mely mind közül humán egészségügyi és környezetvédelmi szempontból is a legártalmasabb, oxigénszegény környezetben perzisztens vegyület. A benzollal, akárcsak a többi aromás vegyülettel történő expozíció napi szinten bekövetkezik és általában a levegőben lévő szennyezőanyagokon keresztül megy végbe, a dohányfüst, a töltőállomások, a gépjárművek kipufogógázai és az ipari kibocsátás által. Az ipari termékekből, például ragasztókból, festékekből, bútortisztítókból és mosószerekből felszabaduló gőzök szintén expozíciós forrást jelenthetnek (ATSDR 2015).

A benzol humán egészségre gyakorolt hatásai közül legtöbbször azt emelik ki, hogy karcinogén, ugyanakkor hematotoxikus, neurotoxikus és genotoxikus tulajdonságai révén is mérgezi az élő szervezeteket (Arnold et al. 2013). Többek között károsítja a csontvelőt, a hajszálerek falát és véralvadási zavarokat okoz. Apoláris tulajdonsága révén lipidgazdag szövetekben halmozódhat fel, mint a csontvelő, mellékvese, idegrendszer. Neurotoxikus hatása főként fejfájás, hányinger, eszméletvesztés formájában nyilvánul meg, ugyanakkor a benzol mérgezés általában légzésbénulás miatti halálhoz vezet, azonban, ha azonnali halál nem is következik be, akár évek múlva is kialakulhatnak rosszindulatú nyirokszervi daganatok vagy leukémia, melynek egyik formája az akut mieloid leukémia (AML), mely a benzollal való tartós expozíció következtében jöhet létre. Emellett a tartós kitettség a reprodukív rendszert és a magzatot is károsítja (Breuer 1995, Dési 2001, Láng 2002, ATSDR 2015).

A toluolnak való hosszútávú kitettség károsíthatja a légzőrendszert és a központi idegrendszert, azonban a benzollal ellentétben nem okoz problémát a vérképző szervekben. A toluol főként a központi idegrendszeri aktivitást gátolja, mely a memória elvesztésével járhat, valamint az agy és az idegek progresszív károsodását okozhatja mind akut, mind krónikus expozíció esetén (Bank 1992, Dabney 1994, Breuer 1995). Az Egészségügyi Világszervezet (WHO 1986) szerint a toluol nem genotoxikus vagy rákkeltő az állatokra és az emberekre nézve. Más vizsgálatok azonban

bizonyították a toluol karcinogén hatását patkányokban (Maltoni et al. 1997). Ezen kívül reprotoxikus potenciállal is rendelkezik (Ono et al. 1996).

Az etil-benzol bőr, szem és torokirritációt okoz rövidtávon, azonban hosszú távú következményei ennél jóval súlyosabbak. Patkánykísérletek alapján a belső fül károsításának következtében hallásromláshoz vezethet az etil-benzollal történő tartós expozíció, valamint vesekárosodást és akár rákot is okozhat (ATSDR 2010).

Az xilol izomerek közül főleg a *para*-xilol fejt ki hatást az idegrendszerre és irritatívan hat a bőrre (Dési 2001). Azonban valamennyi xilol izomerről feltételezhető, hogy neurotoxikus, amely kognitív diszfunkció, emlékezetkiesés, hiperaktivitás és görcsrohamok formájában jelentkezhet (Niaz et al. 2015). Az Egészségügyi Világszervezet (WHO, 1997) szerint azonban a xilolnak nincs genotoxikus vagy rákkeltő hatása az emberekre és a laboratóriumi állatokra. A xilol túlzott expozíciója azonban tüdőödémához vezet, mely akár halálos végkimenetelű is lehet. A xilol vegyületek közül főként az *orto*-, és *meta*-xilol esetében figyeltek meg légzőrendszeri hatásokat (Korsak et al. 1990).

### **2.3. A mikroorganizmusok szerepe a kőolajszennyezések eltávolításában**

Az olajszennyezésnek kitett ökoszisztémák baktériumai közösség szinten adaptálódnak az új szénforráshoz és megkezdődik a szénhidrogének lebontása. A mikroorganizmusok különböző mechanizmusokkal rendelkeznek a szénhidrogének, mint szennyezőanyagok hasznosítására. A közösség egyes tagjai enzimkatalizált folyamatok révén képesek lehetnek bizonyos vegyületek metabolizálására, azonban az, hogy egy mikroorganizmus képes túlélni az extrém, toxikus vegyi anyaggal szennyezett környezetet, még nem jelenti azt, hogy rendelkezik a kőolaj-lebontás genetikai hátterével. Ettől függetlenül viszont aktív résztvevőivé válhatnak a biodegradációs folyamatnak akár biofelületaktív anyagok termelésével, mely által kedvező feltételeket teremthetnek a bontásban aktívan résztvevő baktériumoknak.

#### **2.3.1. A mikroorganizmusok által termelt felületaktív anyagok szerepe az szénhidrogének biodegradációban**

Egyes mikroorganizmusok képesek olyan biofelületaktív anyagokat termelni, mely emulgeálószerként működve javítják a szennyezőanyagok biológiai hozzáférhetőségét és serkentik a viszkozus olajok mineralizációját (Bak et al. 2015). A biofelületaktív anyagok általában különböző szerkezetű amfipatikus molekulák, melyeket sokféle baktériumcsoport képes termelni, azonban a biodegradációban betöltött szerepük kevés figyelmet kap (Van Hamme et al. 2006). Emellett ezek a vegyületek hozzásegítik a baktériumsejtet a közvetlen

kontaktushoz a hidrofób szennyezőanyaggal azáltal, hogy növelik a sejtfelszínük hidrofóbicitását, így akár biofilmképzésre is képesek lesznek ezáltal az erősen apoláros környezetben (Perfumo et al. 2010). A biofelületaktív anyagok ezen kívül ellensúlyozzák a talaj szerkezeti tulajdonságaiból adódó lokális oldott-mikrotápanyag hiányt magas nedvességmegtartó képességük révén, így a tápanyagokat megkötik és hozzáférhetővé teszik a mikroorganizmusok számára, valamint hosszútávon biztosítják azok biológiai hozzáférhetőségét, mivel a sókoncentráció-, a pH-, a nyomás-, és a hőmérsékletváltozással szemben is ellenállóak. Emellett közülük számos vegyület növekedésgátló hatása révén antimikrobiális hatású, így a baktériumok védekezését is segíti más mikroorganizmusokkal szemben (Fenibo et al. 2019). A termelt felületaktív anyagok képesek a talajszemcsék által megkötött fémek deszorpciójára kelátképzés révén, így elérhetővé válnak a mikroorganizmusok számára új elektron akceptorok (Fenibo et al. 2019, Castro et al. 2022). Ezen kívül a mikroorganizmusok számára toxikus nehézfémekkel történő kelátképzésre is képesek, mely javítja a terület biodegradációs hatékonyságát a szénhidrogénekre nézve (Zukauskaite et al. 2008).

A mikroorganizmusok által kiválasztott anyagok nem csak a baktériumközösség kőolajszennyezéshez történő adaptációját segíthetik, hanem gyorsíthatja a terület ökoszisztémájának teljes regenerációját azáltal, hogy pozitívan hat a szennyezésnek kitett növények környezeti stresszel szembeni toleranciájára és fokozza a fitoremediáció hatékonyságát (Bonfante és Anca 2009, Liao et al. 2016).

### **2.3.2. Az enzimkatalizált biodegradáció**

A mikroorganizmusok képesek lehetnek a szénhidrogének lebontására specifikus enzimkészletük révén. A kőolajszennyezések általában összetettek, alifás és aromás vegyületek keverékét tartalmazzák, melynek hasznosítása különböző lebontási útvonalakon keresztül valósul meg és nem minden baktérium rendelkezik valamennyi komponens metabolizációjához szükséges genetikai háttérrel. A baktériumközösségek együttműködése révén azonban a mikroorganizmusok képesek egymás bontási spektrumának kiegészítésére diverz enzimkészletük révén (Goldschneider et al. 2006). Kevert BTEX szennyezés esetén például megfigyelhető, hogy a lebontás hatékonysága nagyobb, ugyanis a mikrobaközösség több tagja is részt vesz a folyamatban (Tsao et al. 1998). A kevert szennyezések esetében a kometabolizmus is gyakori jelenség, mely a BTEX vegyületek szerkezeti hasonlósága miatt fontos szerepet játszik a biodegradációban, valamint az egyes szubsztrátok egymás lebontási hatékonyságát növelhetik, vagy éppen gátolhatják is (Littlejohns és Daugulis 2008, Dou et al.

2008b, Chang et al. 1993, Oh et al. 1994). A mikroorganizmusok közösségszintű adaptációjának másik fontos mechanizmusa a horizontális géntranszfer, melynek segítségével képesek géneket vagy akár lebontási-útvonalakat kódoló génklasztereket is átadni egymásnak a baktériumok. A horizontális géntranszfer létrejöhet különböző mechanizmusok révén, mint a transzformáció, transzdukción és konjugáción, valamint bakteriofágok és plazmidok közvetítésével, mely folyamatok közös célja a genetikai sokféleség létrehozása, mely által növelhető a mikroorganizmusok túlélése és alkalmazkodása az új környezetben (Villa et al. 2019).

#### **2.3.2.1. A főbb benzol- és aromás szénhidrogén-lebontó baktériumok**

A főbb szénhidrogén-lebontó baktériumok az *Actinomycetota* (szinonima: *Actinobacteria*), a *Bacteroidota* (szinonima: *Bacteroidetes*), a *Bacillota* (szinonima: *Firmicutes*) és a *Pseudomonadota* (szinonima: *Proteobacteria*) törzsekből kerülnek ki, melyek közül az utóbbiban, a proteobaktériumok csoportjában találjuk a legtöbb szénhidrogén-lebontót (Prince et al. 2019). A főbb benzol- és aromás szénhidrogénbontó izolátumok a *Proteobacteria* és az *Actionobacteria* törzsekbe tartoznak (Xie et al. 2011). A *Proteobacteria* törzsben a teljesség igénye nélkül olyan kiváló bontóképességű fajokat magukba foglaló rendeket és családokat találunk, mint a *Pseudomonadales* rendbe tartozó *Pseudomonadaceae* és *Moraxellaceae* család, a *Burkholderiales* rendbeli *Burkholderiaceae*, *Alcaligenaceae* vagy a *Comamonadaceae* családok. A *Pseudomonadaceae* családba tartozó *Pseudomonas* vagy az *Azotobacter* nemzetségek egyes tagjai képesek a benzolt és egyéb aromás szénhidrogéneket szén- és energiaforrásként hasznosítani (Thakur et al. 2019, Zylstra et al. 1988), akárcsak a *Moraxellaceae* családbeli *Acinetobacter* (Kim és Jeon 2009) vagy a *Burkholderiaceae* családba tartozó *Burkholderia* és a *Ralstonia* nemzetségek egyes képviselői (Leahy et al. 2003, Johnson et al. 1997, Bucheli-Witschel et al. 2009), valamint az *Achromobacter* nemzetség (*Alcaligenaceae*) (Yeom és Yoo 1999). Ezen kívül a *Lysobacterales*, *Sphingomonadales*, *Rhodocyclales* és *Rhizobiales* rend egyes képviselői, mint a *Pseudoxanthomonas*, a *Sphingomonas*, a *Sphingobium*, a *Zoogloea*, a *Thauera* és az *Azoarcus*, vagy *Rhizobium* nemzetségbe tartozó egyes fajok, illetve a *Xanthobacter* szintén képesek aromás szénhidrogének lebontására (Kim et al. 2008, Cho et al. 2009, Révész et al. 2018, Farkas et al. 2015, Mechichi et al. 2002, Yang et al. 2022, Nagamani et al. 2009). Azonban a legtöbb BTEX bontó nemzetséget magába foglaló család a *Comamonadaceae*, melybe sok más nemzetség mellett a *Hydrogenophaga*, az *Acidovorax*, az *Alicyclophilus*, a *Malikia*, a *Rhodoferax*, a *Variovorax* és az *Extensimonas* is tartoznak, melyek jelentősége bizonyított az aromás

szénhidrogénnel szennyezett felszín alatti környezetek baktériumközösségeiben (Banerjee et al. 2022a, Benedek et al. 2018, Weelink et al. 2008, Révész et al. 2020a, Tancsics et al. 2013, Benedek et al. 2021, Szentgyörgyi et al. 2022, Zhang et al. 2013a). Az anaerob lebontásban főként a *Rhodocyclales* rendből az *Azoarcus*, a *Thaurea*, az *Aromatoluem* és a *Dechloromonas* nemzetségek, valamint a *Desulfuromonadales* rendbeli *Geobacter* játszanak jelentős szerepet (Mechichi et al. 2002, Abu-Laban et al. 2010, Coates et al. 2001, Zhang et al. 2012, 2013b). Emellett a *Firmicutes* törzsben is főként az aromás vegyületek anaerob lebontásáért felelős baktériumokat találunk (Abu-Laban et al. 2010, Da Silva és Alvarez, 2022). Az *Actinobacteria* törzsbeli benzol- és aromás szénhidrogénbontó mikroorganizmusok közé soroljuk a *Rhodococcus* és az *Arthrobacter*, valamint a *Nocardia* nemzetség egyes tagjait (Na et al. 2005, Jung és Park 2004, Fahy et al. 2008, Hocinat et al. 2019).

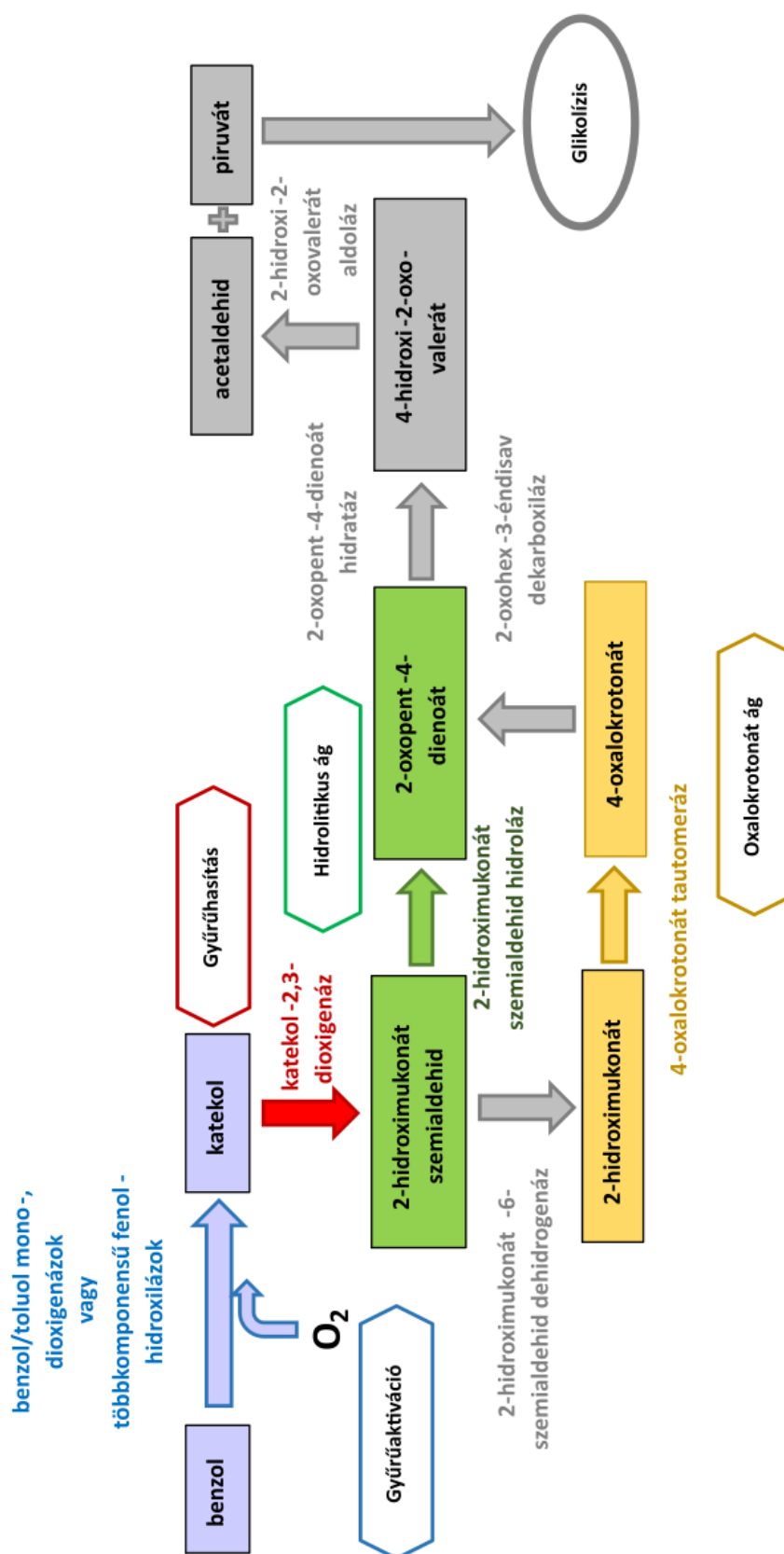
#### **2.3.2.2. A BTEX lebontásban szerepet játszó enzimek és útvonalak**

A monoaromás szénhidrogének lebontása többféle útvonalon keresztül mehet végbe attól függően, hogy aerob, vagy anaerob körülmények között zajlik. Az aerob biodegradáció legfontosabb enzimjei általában olyan mono- és dioxigenázok, melyek az aromás gyűrű aktivációját, majd hasítását végzik, végül további átalakítási lépéseket követően a reakciótermékek a központi anyagcsereútvonalak révén hasznosulnak. A folyamathoz elengedhetetlen a molekuláris oxigén jelenléte, mely az aktiváció során beépül az aromás gyűrűbe (Pérez-Pantoja et al. 2010). A gyűrűaktiváció végbemehet benzol/toluol mono- vagy dioxigenázok közreműködésével, valamint fenol hidroxiláz aktivitással rendelkező enzimek, pl. többkomponensű fenol-hidroxilázok segítségével is, melyeknek elsődleges szubsztrátjai a fenolok, azonban kisebb affinitással képesek benzolt és toluolt is elfogadni (Cafarao et al. 2004). Az ezt követő dehidrogenációs lépés után képződött katekol, mely a szubsztráttól függően lehet szubsztituált vagy szubsztituálatlan, készen áll arra, hogy a katekol-dioxigenáz enzimek elvégezzék a gyűrűhasítást. Ez kétféle fő útvonalon keresztül valósulhat meg attól függően, hogy intradiol (hidroxil-csoportok közötti) vagy extradiol (hidroxil-csoportok melletti) hasításról van szó.

Az intradiol, vagy más néven *orto*-gyűrűhasítási útvonalon belül pedig további két ág különböztethető meg. A katekol-1,2-dioxigenáz enzim által végzett hasítás után a katekol ágon, míg a protokatekuát-3,4-dioxigenáz enzim általi gyűrűhasítást követően a protokatekuát ágon keresztül megy végbe a bontási folyamat (Pérez-Pantoja et al. 2010). Az I. típusú katekol-2,3-dioxigenázok az extradiol, vagy más néven *meta*-gyűrűhasítási útvonal (2. ábra) kulcsenzimeit (Pérez-Pantoja et al. 2010). Az I-es típusú extradiol dioxigenázok három családra (I.1., I.2., I.3.)

és azon belül több alcsaládra oszthatók, melyek közül a bontásban az I.2.A, I.2.B és I.2.C alcsaládok vesznek részt. Az I.2.A alcsalád C23O enzimjei főként *Pseudomonas* fajokhoz köthetők, az I.2.B-típusú C23O enzimek pedig kizárólag az alfa-proteobaktériumokra jellemzők, mint pl. a *Sphingomonas* és a *Sphingobium*. Az I.2.-es család C alcsaládjának enzimeai főként a béta-proteobaktériumok körében fordulnak elő és nagy affinitást mutatnak a katekol és az oxigén, mint szubsztrátok iránt, így azok kis koncentrációja mellett, hipoxikus körülmények között is aktívak maradnak, mely által mikroaerob körülmények között is képesek lehetnek az aromás vegyületek aerob lebontását katalizálni (Eltis és Bolin 1996, Kukor és Olsen 1996). Az extradiol hasítást követően szintén két különböző ágat különböztetünk meg, a hidrolitikus és az oxalokrotonát ágat, ugyanakkor megfigyelhető, hogy a *meta*-hasítási útvonalat kódoló génklaszterek mindkét ághoz tartozó enzimek expresszáldásáért felelős géneket tartalmazzák, hogy a szubsztituálatlan és a metil-szubsztituált katekolból keletkező termékek lebontása is végbe mehessen (Harayama et al. 1987, Powlowski és Shingler 1994). Az *orto*-gyűrűhasítási útvonal a metilszubsztituált vegyületek átalakítására, mint a toluol és xilolok, nem alkalmas, ezek a vegyületek a *meta*-gyűrűhasítási útvonalon keresztül degradálódnak, melyen keresztül a szubsztituált és a szubsztituálatlan vegyületek is, mint a benzol, egyaránt lebontódhatnak (Pérez-Pantoja et al. 2010).

A BTEX vegyületek anaerob lebontásának két lehetséges útja a fumarát-addíció és a karboxiláció révén valósul meg. Az előbbin át a metil-szubsztituált vegyületek, mint a toluol, az utóbbin a benzol és a fenol anaerob lebontása zajlik (Gibson és Harwood 2002, Tierney és Young 2010). A fumarát-addíció során a szubsztituált vegyület metil-csoportjához a benzilszukcinát-szintáz enzim közreműködésével egy fumarát molekula kapcsolódik, majd a keletkező benzilszukcinát termék a  $\beta$ -oxidációs útvonalon keresztül bomlik le (Gibson és Harwood 2002). A másik lehetséges anaerob útvonalon a benzol hidroxilációja során fenol keletkezik, mint köztitermék, majd ennek karboxilációja révén zajlik tovább a lebontás (Coates et al. 2001, Chakraborty és Coates 2005). Emellett a benzol direkt karboxilációja is lejátszódhat, valamint egy metilációs lépést követően a fumarát-addíciós útvonalon keresztül is végbe mehet a folyamat (Foght 2008).



2. ábra: A *meta*-típusú gyűrűhasítási útvonal és az ebben szerepet játszó enzimek bemutatása a benzol biodegradációján keresztül (Nešvera et al. 2015 alapján).

## **2.4. A szénhidrogének lebomlását befolyásoló fizikokémiai paraméterek**

A kőolajalkotó szénhidrogénekkel szennyezett talaj természetes remediációját nem csak biotikus tényezők befolyásolják, hanem olyan abiotikus tényezők is, mint a hőmérséklet, a tápanyagok hozzáférhetősége, a nedvesség, a sótartalom, a pH, az elérhető elektronakceptorok típusa és aránya az elektrondonorokhoz képest, valamint a talaj kémiai jellemzői. Ezek az abiotikus tényezők jelentősen befolyásolják a mikrobaközösség szennyezőanyag-lebontó képességét.

### **2.4.1. A hőmérséklet hatása a biodegradációra**

A hőmérséklet az egyik legfontosabb tényező, amely a szennyezőanyagok fizikai és kémiai tulajdonságaira hatva befolyásolja azok biológiai lebonthatóságát. Az alacsony hőmérséklet csökkent enzimaktivitást von maga után általában, mely csökkenti a szennyezőanyag lebontásának hatékonyságát, valamint a kőolajvegyületek viszkozitásának növekedésével a mikrobák számára egyre kevésbé válik hozzáférhetővé a szennyezőanyag. Ezen kívül az illékony komponensek is kevésbé párolognak alacsony hőmérsékleten, mely visszamaradó alkotók toxikus hatással lehetnek a mikroorganizmusokra (Atlas és Bartha 1972, Leahy és Colwell 1990). A mikrobák szénhidrogénbontó képessége a hőmérséklet emelésével növelhető a baktériumok metabolikus aktivitásának növekedése miatt. A biodegradáció szempontjából Dibble és Bartha szerint (1979) a 20°C -os hőmérséklet volt optimálisnak mondható. Ez nem jelenti azt, hogy az alacsonyabb hőmérsékletű felszín alatti környezetekben nem bomlik le természetes módon a kőolajszennyező, azonban ez is egy tényező, amely adott esetben lassíthatja a bontási hatékonyságot.

### **2.4.2. A tápanyag-ellátottság, mint limitáló tényező**

Az kőolaj komponensek mikrobák általi hasznosításához szükség van elérhető tápanyagokra, melyek gyakran pont a szennyezés miatt válnak hozzáférhetetlenné a mikroorganizmusok számára. A megfelelő tápanyagellátottság elengedhetetlen a sejtszétváláshoz és az anyagcsere folyamatok kiegyensúlyozott működéséhez. Ezen túlmenően a szénhidrogén-lebontás során bizonyos tápanyagok terminális elektronakceptorokként hasznosulhatnak a katabolikus reakciók során (Truskewycz et al. 2019). A biostimulációs eljárások során tápanyagok hozzáadásával fokozzák a közeg természetes baktériumközösségének szénhidrogén-lebontó képességét. Azonban nem mindegy, hogy milyen a közeghez adott tápanyag összetétele, ugyanis egy alacsony szervesanyag tartalmú

közeghez adott magas szerves széntartalmú tápoldat eltolhatja a baktériumközösség fajösszetételét és olyan kompetítor baktériumfajok szelektálódásához vezethet, amelyek csökkentik más szénhidrogénbontók növekedését (Truskewycz et al. 2019). Komplex szerves szubsztrátumok, például érett komposzt hozzáadása a szennyezett közeghez annak magas humusztartalma miatt az olaj deszorpcióját okozhatja a talajból, mely a kőolajvegyületek megnövekedett biológiai hozzáférhetőségéhez és így magasabb bioremediációs rátához vezet (Plaza et al. 2009). Azonban a szervesanyagok aránya is lényeges, ugyanis a szénforrás túlsúlya csökkentheti a bioremediáció hatékonyságát, melyet hozzáadott foszforral és nitrogénnel ellensúlyoznak (Leahy és Colwell 1990).

#### **2.4.3. A megfelelő nedvességtartalom**

A víz a tápanyagok felvételéhez elengedhetetlenül szükséges, emellett gyakorlatilag minden sejten belüli reakcióban részt vesz. A vízmolekulák elősegítik a fehérjék, a DNS és lipid komponensek stabilizálódását, valamint a mikrobiális sejtek szerkezeti integritásának megőrzését. Ezenkívül vízre van szükség a mikrobiális eredetű makromolekulák extracelluláris szállításához (Truskewycz et al. 2019). A víz vivőközegként szolgál a genetikai anyag plazmidokon keresztül történő továbbítása során is, mely hiányában a közösség alkalmazkodóképessége és diverzitása csökken (Lorenz et al. 1994). A vízhiány negatívan befolyásolja a talaj baktériumközösségének növekedését és diverzitását azáltal, hogy akadályozza a mikroorganizmusok egymással és a környezettel való kölcsönhatásait (Sheik et al. 2011).

#### **2.4.4. A magas sótartalom negatív következményei**

A talaj magas sókoncentrációja szelektív nyomást gyakorol a baktériumközösségre, ugyanis a talaj ozmotikus viszonyainak megváltozása befolyásolja a tápanyagok áramlását és elérhetőségét, illetve a magas sókoncentráció csökkenti a hidrofób szerves vegyületek oldhatóságát és hozzáférhetőségét, mely számos mikroorganizmus számára kedvezőtlen feltételeket teremt (Truskewycz et al. 2019). Az olaj-, és a földgáztermelés során keletkező brakkvíz igen nagy problémát jelent az olajmezőkön, ugyanis magas sótartalma mellett nehézfémeket, radioaktív anyagokat és mérgező vegyi anyagokat is tartalmaz (Fathepure 2014). Egyes halofil mikroorganizmusok képesek adaptálódni ugyan a magas sókoncentrációhoz a klorid és kálium koncentrációjának sejten belüli felhalmozásával, mely által az ozmotikus egyensúlyt képesek helyreállítani a közeg és a citoplazmájuk között, azonban a magas szennyezőanyag és sókoncentráció együttesen nagy kihívás elé állítja a mikrobaközösséget, így a bioremediáció hatékonysága is jelentősen romlik (Oren 2008). Ennek ellenére több halofil

szénhidrogén-lebontó baktériumfaj is ismert (Al-Awadhi et al. 2007, Nicholson és Fathepure 2004).

#### **2.4.5. A pH hatása a biodegradációra**

A baktériumok a környezet pH értékének széles skálájához képesek adaptálódni. Ismerünk olyan acidofil és alkalofil mikroorganizmusokat egyaránt, melyek képesek a nyersolaj lebontására (Ivanova és Borzenkov 2018, Muthukumar et al. 2022, Al-Awadhi et al. 2007, Kanekar et al. 1999). Azonban akárcsak a többi környezeti tényező, a pH is szelektív nyomást gyakorol a közösségre és nagyfokú alkalmazkodó-képességet kíván az endemikus baktériumfajoktól, emiatt nem meglepő, hogy a szakirodalom alapján a biodegradáció leghatékonyabban közel neutrális körülmények között, 7,0-7,8 pH értéken volt a leghatékonyabb (Dibble és Bartha 1979, Pawar 2015), azonban ennél alacsonyabb vagy magasabb pH kedvezőtlenül befolyásolta a lebontás hatékonyságát (Verstraete et al. 1976).

#### **2.4.6. Az elektronakceptorok szerepe és megoszlása a kőolajszennyezett területeken**

Az oxigén a kőolaj biodegradációjának egyik kulcseleme, ugyanis a szénhidrogén vegyületek kezdeti lebontási lépésének aktív résztvevője (Leahy és Colwell, 1990). A lebontás legteljesebben és leghatékonyabban aerob körülmények között mehet végbe, annak ellenére, hogy anaerob viszonyok mellett is megfigyelhető biodegradációs tevékenység (Macaulay 2015). Nagy mennyiségű olajszennyezés esetén az elektronodonorként szolgáló szénhidrogének mennyisége meghaladja az elektronakceptorként jelenlévő oxigén szintjét a környezetben. A talaj oxigéntartalma gyorsan kimerül, így szükségessé válik az alternatív elektron akceptorok igénybevétele, melyek közül a mikroorganizmusok azokat használják el elsőként, amelynek használatával a legtöbb energiát képesek nyerni. Az alternatív elektronakceptorok felhasználása így egyfelől azok redoxpotenciál értéke alapján történik (redox zonáció elmélet) kisebb mértékű szennyezések esetén, azonban erősen szennyezett területeken az elektronakceptorok elérhetősége erősebb limitálótényező, mint azok termodinamikai előnyössége (Meckenstock et al. 2015). A környezetben jelenlévő elektronakceptorok típusától (pl. nitrát, szulfát, vas, szén-dioxid) és koncentrációjától, a pH-viszonyoktól és az oxidációs/redukciós potenciáltól függően az anaerob biológiai lebomlás denitrifikáló, vasredukáló, szulfátredukáló vagy metanogén körülmények között történhet, ezen kívül a mangán redukciója révén is megvalósulhat anaerob lebontási mechanizmus. Az alternatívaként használt elektronakceptorokból nyerhető energiahozam azonban kisebb, mint az oxigénfelhasználás esetén, így az anaerob biodegradáció lassabban zajlik, mint aerob viszonyok között (Villatoro-Monzón et al. 2003, Thapa et al. 2012).

A nitrát az egyik legelőnyösebb alternatívája az oxigénnek, ugyanis közel azonos energiamennyiség nyerhető a felhasználásával, mint az oxigén esetében, ezen kívül jó vízdoldhatóságú, kevésbé ártalmas és olcsó vegyület (Wilson et al. 1997). A szulfát a nitráthoz képest kevésbé preferált elektronakceptor, ugyanakkor energiahozam szempontjából ez a vegyület is viszonylag hamar felhasználásra kerül az oxigén és a nitrát mennyiségének csökkenését követően (Dou et al. 2008a). Az erősen szennyezett területeken (100 mg/L szénhidrogén-koncentráció) az elektronakceptorok könnyen kimerülnek. A csóvaperem elmélet alapján a mikroorganizmusok már az olajszennyezés forrásánál felhasználják a nitrátot és a szulfátot, mely vegyületek az olaj áramlásának irányában nem válnak újra elérhetővé, kivéve az olajszennyezés peremén, ahol az elektronakceptorok utánpótlása a környező talajvízből megtörténhet diszperzióval vagy diffúzióval. A csóvaperemeken emiatt jóval aktívabb biodegradációs tevékenység figyelhető meg. A szennyezés magjánál ezzel szemben az oldott elektronakceptorok kimerülése következtében vas-, és mangánredukció, valamint metanogenezis zajlik, melyek révén lassú szénhidrogén-lebomlás ezeken a területeken is megfigyelhető (Meckenstock et al. 2015).

### 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

A bevezetésben (1. fejezet) említett kutatási kérdések megválaszolása érdekében kísérleteinket két fő irány mentén végeztük el a doktori tanulmányaim ideje alatt. 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 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 különbségeket. A doktori munkám folyamán nagy hangsúlyt fektettünk arra, hogy az első kísérlet során alkalmazott dúsítótenyészetekből klasszikus mikrobiológiai módszerekkel olyan baktériumtörzseket izoláljunk, amelyek rendelkeznek az aromás szénhidrogének, kiváltképp a benzol mikroaerob lebontásáért felelős enzimekkel, hogy az izolátumok teljes genomjának vizsgálatával mélyrehatóan tanulmányozhassuk a BTEX vegyületek, kiváltképp a benzol mikroaerob lebontásában szerepet játszó kulcsenzimeket és genetikai útvonalatokat.

Az alábbi ábra (3. ábra) a könnyebb megértést szolgálja az elvégzett kísérletek során általánosságban használt módszerek egyszerűsített, sematikus ábrázolásával. Az ábrán szintén látszik a két kísérleti irányvonal, az öt hetes dúsítótenyészetek, valamint a stabil izotópos mikrokozmosz kísérlet, melyekből T-RFLP analízissel következtettünk a baktériumközösség sokszínűségére, majd ezt követően a közösség tagjainak azonosítását Illumina amplikon szekvenálással végeztük el. A BTEX vegyületek fogyását minden esetben GC-MS segítségével követtük nyomon. A dúsítótenyészetekből izolált baktériumtörzsek faji szintű azonosítását követően az egyes új fajjelölteként kiválasztott izolátumok BTEX-bontó képességét szintén GC-MS-el követtük nyomon, majd elvégeztük a teljes genom szekvenálást és az új fajjelöltek leírásához szükséges vizsgálatokat.



### 3.1. A mintavételi helyszín jellemzése és a mintavételezés körülményeinek leírása

A dúsítótenyészetek és a stabil izotópos vizsgálatok alapjául szolgáló talajvíz és üledék minták egy kőolajszármazékokkal szennyezett délnyugat-magyarországi, Siklós városban (45° 51' 25.8"N, 18° 17' 32.3"E) található kárhelyről származtak. A korábban Tancsics és munkatársai (2012, 2013) által részletesen feltárt, siklósi kárhelyen a szennyezés forrása egy ma már felszámolt benzinkút földalatti tároló tartályának szivárgása következtében a környező talajba és talajvízkészletbe jutó kőolajszennyezés volt. A kárhelyen az évek során történt különböző fizikai-kémiai és biostimulált bioaugmentációs kármentesítési eljárások ellenére az aromás szénhidrogének koncentrációja ugyan csökkent, azonban még mindig meghaladja a 6/2009. (IV. 14.) KvVM-EüM-FVM rendeletben foglalt B szennyezettségi határértékeket (a B érték a kárhely esetében megegyezett a D, azaz célállapot határértékkel), mely így a talajtani közeg és a felszín alatti vizek elszennyezésén keresztül az ivóvízbázisokat is veszélyeztetheti. A kárhelyen a mintázások kezdete óta főként a xilol vegyületek és az etil-benzol koncentrációja kiemelkedő, azonban az általunk mintázott időpontokban a benzol mennyisége is jelentősnek bizonyult. A talajvíz kémhatása és hőmérséklete közel állandónak tekinthető, a kárhelyet jellemző oldott-oxigén koncentráció és redoxpotenciál értékek alapján a területen hipoxikus (0,2-0,4 mg/L) körülmények uralkodnak, az oxigén csak nyomnyi mennyiségben van jelen, mely főként a fakultatív anaerob, nitrát-redukáló mikroszervezetek elszaporodásának kedvez. A dúsítótenyészetek felállításához 2019 októberéből, a stabil izotópos vizsgálatokhoz pedig 2022 májusából származó mintákat használtunk, melyeket a szennyezési csóva közepén elhelyezkedő ST2-es kútból vettünk, hozzávetőleg 2,5-4 m-es mélységből. A mintavételezés az MSZ ISO 5667-11:2009/1-2 szabványok szerint történt. Az SK-V jelzésű kút a szennyezési csóván kívül helyezkedik el, szennyezőanyag tartalma a kimutathatósági határérték alá esik, így a mintázása során nyert adatok háttérinformációként szolgálnak a vizsgálataink során.

A kutakból minden esetben szivattyúzással eltávolításra került a pangóvíz, majd a friss talajvízzel megtelő kútból steril 1 L-es üvegekbe gyűjtöttük az üledékes talajvíz mintát (2. kép; A, B), melyeket a további feldolgozásig 4°C-on, sötétben tároltunk. Az oldott-oxigén koncentráció, redoxpotenciál, kémhatás és hőmérséklet értékeket a helyszíni mérések során a WTW Handheld Meter Multi 350i terepi mérőműszer segítségével határoztuk meg (2. kép; C).



2. kép: Mintavétel a kőolajszennyezett kárhelyről. A- az SK-V háttérkút szivattyúzása; B- talajvíz mintavétel az ST2-es kútból; C- helyszíni mérések (saját készítésű felvétel).

A szennyezett talajvíz általános vízkémiai paramétereinek és BTEX-koncentrációjának meghatározását a Eurofins Analytical Services Hungary Kft. (Budapest) végezte a vonatkozó MSZ szabványok szerint. Az egyes időpontokban mért talajvíz minták fizikai-kémiai paramétereit az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat: A vizsgált siklói talajvízminták fizikai-kémiai és szennyezettségi paramétereit. \* - Anyagcsoportonként (B) szennyezettségi határértékek felszín alatti vizekre a 6/2009. (IV. 14.) KvVM-EüM-FVM együttes rendelet alapján.

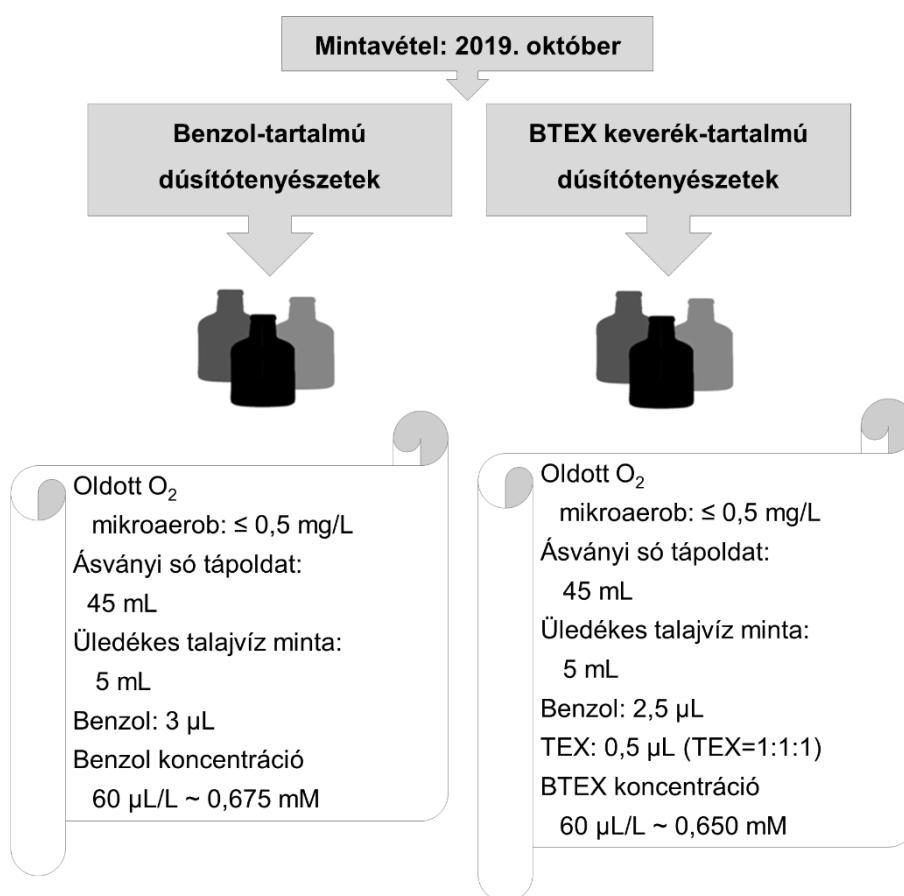
| Év        | BTEX koncentráció (ug/L) |        |                   |        |                    |             |                    |       | Fizikai-kémiai paraméterek |                                     |                         |                                      |                        |                                   |      |                  |
|-----------|--------------------------|--------|-------------------|--------|--------------------|-------------|--------------------|-------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|------------------------|-----------------------------------|------|------------------|
|           | Minta jele (kút)         | Benzol |                   | Toluol |                    | Etil-benzol |                    | Xilol | DO (mg/L)                  | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L) | Fe <sup>2+</sup> (mg/L) | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg/L) | CH <sub>4</sub> (mg/L) | Redox-potenciál (mV) <sup>†</sup> | pH   | Hőmérséklet (°C) |
| 2019 okt. | SK-V                     | <0,2   | (B)*<br>1<br>μg/L | <1     | (B)*<br>20<br>μg/L | <1          | (B)*<br>20<br>μg/L | <5    | 4,4                        | 44                                  | <0,03                   | 60                                   | <0,04                  | 171                               | 6,93 | 18               |
|           | ST2                      | 49,9   |                   | 2      |                    | 4           |                    | 992   | 2,3                        | <0,5                                | 10,5                    | <30                                  | 1,32                   | -42                               | 6,91 | 17,4             |
| 2022 máj. | SK-V                     | <0,2   |                   | <1     |                    | <1          |                    | <2    | 3,2                        | 49                                  | <0,3                    | 70                                   | <0,04                  | 171                               | 7,51 | 16,8             |
|           | ST2                      | 133    |                   | 7      |                    | 14          |                    | 3140  | 0,8                        | <5                                  | <9                      | <30                                  | 2,71                   | -108                              | 7,43 | 15,3             |

Továbbá megfigyelhető az is, hogy a mintázott kárhelyen 2022-re májusában többszörösénőtt a BTEX komponensek koncentrációja a 2019 októberében mért adatokhoz képest. Az Országos Meteorológiai Szolgálat jelentései szerint a 2019-es évben összességében átlagos mennyiségű csapadék érkezett, míg a 2022 májusa a 14. legszárazabb volt az azt megelőző 122 évben ([http10](http://10)). Az aszályok és a csapadékmennyiség szezonális ingadozása befolyásolhatja a felszín alatti vizek szintjét, így feltételezhetően a 2022-es évben tapasztalt nagyfokú szárazság okozhatta a BTEX komponensek koncentrációjának növekedését. A siklói kárhely mikroba közösségére akárcsak a szárazföldi ökoszisztémák többségére nagy hatással van a szezonális ingadozás és reagálnak a környezeti

tényezők ingadozására, így az elérhető szénforrás mennyiségének, jelen esetben a BTEX vegyületek koncentrációjának növekedése befolyásolhatta a baktériumközösség összetételét is.

### 3.2. A BTEX-bontó dúsítótenyészetek összeállítása

A benzol mikroaerob bontásában szerepet játszó baktériumközösség feltárása érdekében olyan dúsítótenyészeteket hoztunk létre a 2019. októberében vett üledékes talajvíz minták felhasználásával, melyekhez a benzolt egyedüli szén-, és energiaforrásként adtuk hozzá. A mikroaerob benzolbontás során szerepet játszó serkentő, gátló és kometabolikus folyamatokat pedig olyan dúsítótenyészetek felállításával vizsgáltuk, melyekben a benzol mellett egyéb BTEX vegyületek is jelen voltak (4. ábra).



4. ábra: A dúsítótenyészetek összeállításának sematikus ábrája.

A dúsítótenyészetek létrehozásához 100 mL űrtartalmú butil-gumidugóval és alumínium zárókupakkal légmentes zárható szérumüvegeket használtunk. Minden üvegbe 45 mL ásványi sókat tartalmazó mesterséges talajvíz tápoldat (Fahy et al. 2006) került (2. táblázat), melyeket 1 mg/L B1 vitaminnal, 15 µg/L biotinnal, és 20 µg/L B12 vitaminnal egészítettünk ki (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Ezen kívül valamennyi dúsítótenyészet tartalmazott 5 mL siklósi üledékes talajvíz mintát és 3 µL benzolt (CAS 71-43-2, tisztaság >99%, Sigma-Aldich Ltd., Németország)

vagy BTEX-vegyületek keverékét (toluol: CAS 108-88-3; p-xilol: CAS 106-42-3, m-xilol: CAS 108-38-3; o-xilol: CAS 95-47-6; etil-benzol: CAS 100-41-4, tisztaság >99%, Sigma-Aldich Ltd., Németország), mely 5:1 arányban tartalmazott benzolt és egyéb monoaromás szénhidrogéneket (2,5 µL benzol és 0,5 µL egyéb TEX vegyület). A TEX keverékben 1:1:1 arányban voltak jelen az aromás szénhidrogének.

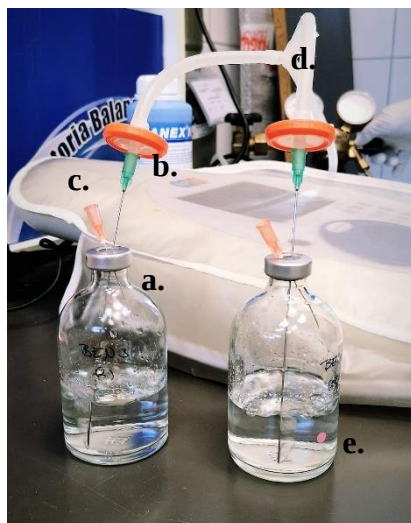
Mindkét esetben három párhuzamos dúsítótényezettel dolgoztunk. Az üvegekben mikroaerob ( $\leq 0,5$  mg/L oldott  $O_2$ ) körülményeket tartottunk fent, mely létrehozásához elsőként az oxigént kihajtottuk az üvegekből 0,2 µm pórusátmérőjű fecskendőszűrőn átáramló  $N_2/CO_2$  80:20 térfogat arányú gázkeverékkel, steril injekciós tűk segítségével. Ezt követően a kívánt oldott oxigén koncentrációt ( $\leq 0,5$  mg/L) szintén 0,2 µm-es fecskendőszűrővel sterilizált levegővel állítottuk be, melyet 5 mL-es fecskendővel és steril egyszer használatos injekcióstűvel juttattunk az üvegekbe a szeptumot átszúrva.

2. táblázat: Ásványi só tápoldat összetétele és összeállítása Fahy és munkatársai (2006) alapján.

| Ásványi só tápoldat összetétele (Fahy et al. 2006) |                                                                                   |                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Oldat                                              | A oldat                                                                           | B oldat                                                                              | C oldat                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Össztérfogat                                       | 100 mL                                                                            | 900 mL                                                                               | 1 mL                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Összetétel                                         | 5 g $MgSO_4 \times 7H_2O$<br>1 g $CaCl_2 \times 2H_2O$<br>1000 mL desztillált víz | 11,1 g $Na_2HPO_4$<br>2,5 g $KH_2PO_4$<br>10 g $NH_4NO_3$<br>1000 mL desztillált víz | 10 g $FeSO_4 \times 7H_2O$<br>0,64 g $Na_2EDTA \times 3H_2O$<br>0,1 g $ZnCl_2$<br>0,015 g $H_3BO_3$<br>0,175 g $CoCl_2 \times 6H_2O$<br>0,15 g $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$<br>0,02 g $MnCl_2 \times 4 H_2O$<br>0,01 g $NiCl_2 \times 6H_2O$<br>1000 mL desztillált víz |
| Sterilezés                                         | 0,2 µm-es pórusátmérőjű fecskendőszűrővel                                         | Autoklávban                                                                          | 0,2 µm-es pórusátmérőjű fecskendőszűrővel                                                                                                                                                                                                                           |

A mikroaerob állapot fenntartása érdekében az oldott oxigén koncentrációt rendszeresen ellenőriztük az üvegekben non-invazív módon Fibox 3 trace v3 (PreSens, Németország) típusú száloptikás oxigén szenzorral, az üvegek belső oldalára ragasztott SP-PSt3-NAU-D5-YOP szpot (PreSens, Németország) felhasználásával (3. kép). A mikroorganizmusok működése révén elhasznált oxigént folyamatosan pótoltuk az üvegekben steril levegő beinjektálásával. A

dúsítótenyészeteket egy hétig inkubáltuk rázó termosztátban 28°C-on, 150 rpm-en, majd minden dúsítóból 5 mL-t beoltottunk friss ásványi só tápoldatba. A folyamatot öt héten keresztül minden héten megismételtük, 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 a 3.9. fejezben leírt paraméterek alapján.



3. kép: A dúsítótenyészetek oldott oxigén koncentrációjának beállítása és a folyamat során használt eszközök – **a**- 100 mL-es szérumüveg gumidugóval és alumíniumkupakkal lezárva; **b**- 0,2  $\mu\text{m}$  pórusméretű fecskendőszűrő a beáramló levegő sterilizálásához; **c**- különböző méretű egyszer használatos steril tűk a levegő be- és kiáramlásához; **d**-  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  80:20 v/v gázkeverék az oxigén kihajtásához; **e**- szpot az oxigén koncentráció követéséhez (*saját készítésű felvétel*).

### 3.3. Baktériumtörzsek izolálása

A tenyészthető baktériumtörzsek izolálását hagyományos módszerrel végeztük az ötödik heti dúsítótenyészetekből. A párhuzamos tenyészetekből 1-1 mL mintát elegyítettünk, majd fiziológiás sóoldat (0,9% NaCl) felhasználásával 8 tagú hígítási sort készítettünk. Valamennyi hígítási tagból 0,1 mL-t R2A agarlemezre (DSM táptalaj No. 830) szélesztettünk, mely összetétele a következő volt: 0,5 g élesztő kivonat, 0,5 g proteózpepton, 0,5 g kazein hidrolizátum, 0,5 g glükóz, 0,5 g keményítő, 0,3 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,05 g  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 g nátrium-piruvát, 20 g agar, 1 liter desztillált víz, pH 7,0. A lemezeket egy héten keresztül 28°C-on inkubáltuk, majd a különböző morfológiájú telepeket tisztító szélesztéssel új R2A lemezre oltottuk és tartottuk fent. A törzsek faji szintű azonosításához a tiszta tenyészetekből DNS-t izoláltunk, majd ezt követően polimeráz láncreakció segítségével amplifikáltuk a 16S rRNS-t és más funkciógéneket kódoló génszakaszt, melyet Sanger-szekvenálás segítségével azonosítottunk, mely folyamatok a 3.4 -3.6. fejezetben leírtak szerint zajlottak.

### 3.4.DNS izolálás

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 biomasszát a dúsítótenyészetek 4°C-on 2360 g-n 10 percen át tartó centrifugálásával nyertük ki (Rotanta 460 R, Hettich, Németország). Ezt követően NucleoSpin Soil Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Németország) segítségével a gyártó utasításai szerint elvégeztük a közösségi DNS kivonást a pelletből. Az R2A agaron tenyésztett tiszta tenyészetek DNS-ét UltraClean Microbial DNA Kit (Qiagen, Németország) felhasználásával vontuk ki a gyártó utasításai szerint. A kivont DNS koncentrációját és minőségét NanoDrop One Microvolume UV-Vis spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), valamint agaróz gél-elektroforézis segítségével ellenőriztük.

### 3.5. 16S rRNS és C23O funkciógén amplifikálása polimeráz láncreakcióval

A dúsítótenyészetekből izolált baktériumközösségek elemzése és a tiszta tenyészetek azonosítása a 16S rRNS-t kódoló génszakasz alapján történik, mely felszaporítását PCR technika segítségével végeztük a 27f 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' (Lane 1991) és 1492r 5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3' (Polz és Cavanaugh 1998) primerpár felhasználásával. Az izolált baktériumtörzsek esetében vizsgáltuk az I.2.C-típusú katekol-2,3-dioxigenáz (C23O) gének meglétét, hogy a tenyésztett baktériumközösség potenciális BTEX-bontó tagjait azonosítsuk. A PCR-hez ez esetben Táncsics és munkatársai (2013) által kifejlesztett specifikus XYLE3F 5'-TGY TGG GAY GAR TGG GAY AA-3' és XYLE3R 5'-TCA SGT RTA SAC ITC SGT RAA-3' primereket használtuk.

A PCR összeméréséhez a következő reagenseket alkalmaztuk 50 µL végtérfogatban:

|                                                                  |                                 |
|------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Dream Taq buffer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)            | 5 µL                            |
| dNTP (Thermo Fisher Scientific Inc., USA, 0.2 mM)                | 10 µL                           |
| 27F és 1492 primer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA, 0,25 µM) | 0,5 µL                          |
| Taq polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc., USA 1,25 U/µL)    | 0,25 µL                         |
| DNS templát                                                      | 1-3 µL                          |
| MQ víz                                                           | 50 µL végtérfogatra kiegészítve |

A templát mennyisége az adott minta DNS-koncentrációjának függvényében 1-3 µL között változott.

A 16S rDNS PCR során alkalmazott hőprofil 32 ciklus esetében a következő volt:

|                       |       |         |   |           |
|-----------------------|-------|---------|---|-----------|
| ▪ kezdeti denaturáció | 98 °C | 5 perc  | } | 32 ciklus |
| ▪ denaturáció         | 94 °C | 30 mp   |   |           |
| ▪ anneláció           | 52 °C | 30 mp   |   |           |
| ▪ elongáció           | 72 °C | 1 perc  |   |           |
| ▪ extenzió            | 72 °C | 10 perc |   |           |
| ▪ hűtés               | 4 °C  | ∞       |   |           |

Az I.2.C-típusú C23O gén esetében a PCR hőprofilja az alábbiak szerint módosult 40 ciklus esetén:

|                       |       |         |   |           |
|-----------------------|-------|---------|---|-----------|
| ▪ kezdeti denaturáció | 95 °C | 3 perc  | } | 40 ciklus |
| ▪ denaturáció         | 94 °C | 30 mp   |   |           |
| ▪ anneláció           | 50 °C | 30 mp   |   |           |
| ▪ elongáció           | 72 °C | 1 perc  |   |           |
| ▪ extenzió            | 72 °C | 10 perc |   |           |
| ▪ hűtés               | 4 °C  | ∞       |   |           |

A PCR-t a ProFlex PCR System készülék (Life Technologies, USA) segítségével végeztük. A termékek tisztításához a gyártó utasításai szerint alkalmazott NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit-et (Macherey-Nagel GMBH, Németország) használtunk, majd - 20°C-on tároltuk a további felhasználásig.

### 3.6. Agaróz gél-elektroforézis

Az izolált genomi és közösségi DNS-ek, valamint a kapott PCR termékek minőségi és mennyiségi ellenőrzését 1%-os agaróz gélen (1 g agaróz, 100 mL 1x TBE, 0,5 µL/mL etídium-bromid) történő elektroforézissel végeztük. Az 1x TBE puffer összetétele 1 L-re vonatkoztatva a következő volt: 10,8 g Tris, 10,5 g bórsav, 0,93 g EDTA-Na. A gél 1xTBE pufferben futtattuk (110 V, 20 perc), melynek során a gél zsebeibe 5 µL DNS-mintát töltöttünk 3 µL töltőpufferrel (30 v/v % glicerín, 0,25 mM brómfenolkék) összekeverve, valamint minden mintasor mellé 3 µL molekulasúly marker (ThermoScientific™, USA Gene Ruler Mix DNA Ladder, 0,5 µg/µL) került. A PCR-hez használt DreamTaq puffer sűrűség reagenst és nyomkövető festékeket tartalmaz, mely lehetővé teszi a termék közvetlen betöltését a gélbe töltőpuffer alkalmazása nélkül. A mintákat ezt követően UV-fény alatt ellenőriztük.

### 3.7. 16S rRNS közösségi T-RFLP analízis és kiértékelése

A dúsítótenyészetekben lévő mikrobaközösség diverzitását első lépésben egy nukleinsav alapú közösségi ujjlenyomat vizsgáló technika, a T-RFLP (terminális restrikciós fragmenthossz polimorfizmus) segítségével tártuk fel. A módszer lényege, hogy fluoreszcensen jelölt forward primerrel amplifikált, restrikciós enzimmal emésztett PCR termékeket kapilláris gélelektroforézis segítségével analizálunk (Liu et al. 1997). A T-RFLP analízis során a következő lépéseket végeztük el: (1) a vizsgálandó génszakasz megsokszorozása PCR-el, (2) a fluoreszcensen jelölt PCR termék emésztése restrikciós endonukleáz enzimekkel, (3) a fluoreszcensen jelölt terminális restrikciós fragmentek (T-RF-ek) etanolos precipitációja, (4) a T-RF-ek azonosítása kapilláris gélelektroforézissel. Az első lépés során a VIC jelölt (Life Technologies™, USA) forward primert használtunk. A 16S rDNS PCR összetétele és hőprofilja megegyezik a 3.5. fejezetben leírtakkal. A második lépésben a fluoreszcensen jelölt PCR termékek restrikciós emésztéséhez az *AluI* (AG↓CT) (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) enzimet használtuk. A PCR termék emésztéséhez használt reakcióelegy 2 µL enzim puffert (10X Buffer Tango with BSA, Thermo Fisher Scientific Inc., USA), 3 U restrikciós enzimet és 10 µL PCR terméket tartalmazott, melyet MQ vízzel 20 µL végtérfogatra egészítettünk ki, majd az elegyet 60 percig 37°C-on emésztettük ProFlex PCR System készülékkel (Life Technologies™, USA).

A harmadik lépés során a fragmenteket etanolos precipitációval tisztítottuk. A DNS erősen poláris molekula a cukor-foszfát gerincben lévő foszfát ionok miatt. A folyamat lényege, hogy a módszer során alkalmazott só (ebben az esetben a Na-acetát) biztosítja a megfelelően magas kation koncentrációt és pH-t, hogy a negatív töltéseket semlegesítse, ezáltal csökkentve a DNS hidrofíliáját. A tömény etanol pedig megbontja a DNS hidrátburkát, lehetővé téve ezzel, hogy a foszfátmaradékok ionos kötést hozzanak létre az oldatban lévő kationokkal. Amikor az etanol koncentrációja megközelíti a 70%-ot 300 mM Na<sup>+</sup> kation jelenlétében, a polinukleotid láncok közötti taszító erők addig csökkennek, ahol a DNS kicsapódik (Green és Sambrook 2016). Első lépésként az emésztett PCR termékekhez 3 µL 3M Na acetát oldatból, 14,5 µL MQ vízből and 62,5 µL 95% etanolból álló elegyet adtunk és 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezt követően a mintákat 4°C-on, 20 percen keresztül 3300 g-n centrifugáltuk, majd a felülúszó leöntése után 180 µL 70%-os etanolt mértünk rá, melyet újabb centrifugálás követett hasonló paraméterek mellett. A felülúszó és a maradék alkohol szárítással történő teljes eltávolítása után 20 µL vízben oldottuk vissza a DNS-t, melyből 0,5-1,5 µL-t 18 µL Hi-Di formamid (Promega, USA) oldatba mértünk, mely a DNS denaturált formában tartásáért felelős. Ezen kívül 0,4 µL standard meghatározott hosszúságú DNS fragmentet (Genescan LIZ1200, Applied Biosystems, USA) adtunk a mintáinkhoz, melyeket ezt követően 95°C-on 5 percen át denaturáltuk, majd

kapilláris gélelektroforézis segítségével (ABI 310 Genetic Analyzer; Applied Biosystem, USA) választottuk szét.

Az eredmények kiértékeléséhez a GeneMapper 4.0 szoftvert (Applied Biosystems, USA) használtuk. A statisztikai elemzésből az 50 bp-nál rövidebb és az összfluoreszcencia-intenzitáshoz 1%-nál kisebb mértékben hozzájáruló T-RF-eket kizártuk. A minták egymáshoz illesztését a T-Align online program (Smith et al. 2005) segítségével végeztük el, mely az összes mintára vetítve ad információt az egyes T-RF-ek százalékos előfordulásáról. A 16S rRNS gén alapú hasonlósági dendogramokat a PAST (Paleontological Statistics) program felhasználásával készítettük el, melynek során Bray-Curtis hasonlósági indexet alkalmaztunk (Hammer et al. 2001). A 16S rDNS T-RFLP elektroferogramok és a hasonlósági dendogramok alapján választottuk ki azokat a mintákat, melyeket a továbbiakban Illumina ampikon-szekvenálással vizsgáltuk tovább.

### **3.8. Szekvenáló reakciók és adatelemzés**

A tiszta baktériumtenyészetekből izolált 16S rRNS és C23O génszakaszok bázissorendjének meghatározását Sanger-szekvenálás segítségével végeztük, míg a baktériumközösségekben lévő szekvenciák azonosításához Illumina ampikon-szekvenálást használtuk. Ezen kívül néhány kiválasztott baktériumtörzs teljes genomjának meghatározására is sor került. A szekvenálendő törzsek kiválasztásának alapja egyrészt az volt, hogy a 16S rRNS gén alapján új fajjelöltnek bizonyultak és/vagy rendelkeztek C23O gén aktivitással. E módszerek az alábbiakban kerülnek bemutatásra.

#### **3.8.1. Sanger-szekvenálás és a szekvenciák filogenetikai elemzése**

A Sanger-féle láncterminációs módszer során a polimeráz enzim a reakciótérben jelen lévő négy különböző féle fluorokrómmal jelölt didezoxinukleotidokat (ddNTP) is beépít a normál nukleotidok (dNTP) mellett, mely leállítja a további polimerizációt és láncterminációt idéz elő. Ezt követően kapilláris gélelektroforézissel határozzák meg a termék bázissorendjét a beépült ddNTP-k alapján (Madigan et al. 2015).

A szekvenáló reakciót minden esetben 5 µL végtérfogatban végeztük BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) segítségével a következők szerint összemért reakcióelegyben:

|                                                      |         |                              |
|------------------------------------------------------|---------|------------------------------|
| BigDye (Applied Biosystems, USA)                     | 0,5     | µL                           |
| BigDye Buffer (Applied Biosystems, USA)              | 0,75    | µL                           |
| Primer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA, 0,25 µM) | 0,5     | µL                           |
| DNS templát                                          | 0,5-3,5 | µL                           |
| MQ víz                                               | 5       | µL végtérfogatra kiegészítve |

A templát mennyisége az adott minta DNS-koncentrációjának függvényében 0,5-3,5 µL között változott. A 16S rRNS gén bázissorendjének meghatározásához a PCR során használt 27F primert, ezen kívül 338F 5'-ACTCCTRCGGGAGGCAGCAG-3' és 803F 5'-CACCGAAACTGTGCAAGCA-3' primereket alkalmaztunk. A C23O génszakaszt XYLE3F primer segítségével szekvenáltuk meg.

A szekvenáló reakció hőprofilja a 28 ciklus esetén a következő volt:

|               |       |        |             |
|---------------|-------|--------|-------------|
| ▪ denaturáció | 96 °C | 10 mp  | } 28 ciklus |
| ▪ annealáció  | 50 °C | 5 mp   |             |
| ▪ extenzió    | 60 °C | 4 perc |             |
| ▪ hűtés       | 4 °C  | ∞      |             |

A reakció után a terméket etanolos precipitációval tisztítottuk a 3.7. fejezetben leírtak szerint, hogy a be nem épült nukleotidokat eltávolítsuk, majd kiszárított mintákat 20 µL Hi-Di formamidban oldottuk vissza és 4°C-on tartottuk további felhasználásig. A szekvenálási termékeket kapilláris gél-elektroforézissel, ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) géppel analizáltuk.

A kapott szekvenciákat MEGA X szoftverrel (Kumar et al. 2018) elemeztük és korrigáltuk manuálisan az esetleges hibákat. Ezt követően a szekvenálás eredményként kapott 16S rDNS és C23O bázissorendeket a GenBank adatbázisban lévő típus törzsek szekvenciáival vetettük össze a BLAST keresőprogram ([http11](http://11)) segítségével, ezen kívül az EzBioCloud ([http12](http://12)) adatbázist is használtuk a szekvenciáink azonosítására (Yoon et al. 2017).

A filogenetikai fákat MEGA X szoftverrel készítettük, az evolúciós távolságok meghatározására Kimura-féle kétparaméteres modellt alkalmaztunk (Kimura 1980). A filogenetikai törzsfákat maximum-likelihood (ML) (Felsenstein 1981), neighbor-joining (NJ) (Saitou és Nei 1987) és maximum parsimónia (MP) (Kimura 1980) algoritmusok segítségével készítettük. A törzsfák topológiáját és a távolságokat bootstrap elemzéssel értékeltük ki 1000 ismétlés alapján.

### 3.8.2. Illumina amplikonszekvenálás

A dúsítótenyészetek ötödik heti, végponti mintáinak párhuzamosaiból a T-RFLP analízis alapján kiválasztottuk azokat a reprezentatív tagokat, melyekből 16S rDNS amplikon szekvenálást végeztünk. Az Illumina MiSeq amplikonszekvenálás módszer lényege a „híd-amplifikáció”, melynek során egy oligonukleotidokkal (primerekkel) ellátott szekvenálólemezen zajlik a reakció. Ezekhez komplementer Illumina-adapterrel felszerelt DNS-fragmentek kapcsolódnak, melyek szabad végeikkel hidat képezve egy másik, a lemezen lehorgonyozott primerrel hibridizálnak. Az egyszálú DNS-fragmentek híd-amplifikációját követően több millió klaszter képződik a

platformspecifikus adaptereknek köszönhetően. Ezután a fluoreszcensen jelölt ddNTP-k beépülését rögzítő kamera segítségével határozzák meg a bázissorrendeket (McElhoe et al. 2014).

A V3-V4 hipervariábilis régiót lefedő 16S rDNS szakaszok amplifikálásához a Bact 341F\_Overhang 5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG-3 'és Bact 785R\_Overhang 5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA GTA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C-3 'primereket használtuk (Klindworth et al. 2013).

A PCR-t a gyártó utasításainak megfelelően állítottuk össze KAPA HiFi HotStart Ready Mix (KAPA Biosystems, USA) felhasználásával:

|                                             |       |                           |
|---------------------------------------------|-------|---------------------------|
| KAPA HiFi                                   | 12,5  | μL                        |
| Illumina forward és reverse primer (0,3 μM) | 0,5   | μL                        |
| DNS templát                                 | 1 - 3 | μL                        |
| MQ víz                                      | 25 μL | végterfogatra kiegészítve |

A 16S rDNS Illumina-PCR során alkalmazott hőprofil 25 ciklus esetében a következő volt:

|                       |       |        |             |
|-----------------------|-------|--------|-------------|
| ▪ kezdeti denaturáció | 95 °C | 3 perc | } 25 ciklus |
| ▪ denaturáció         | 95 °C | 30 mp  |             |
| ▪ annealáció          | 55 °C | 30 mp  |             |
| ▪ elongáció           | 72 °C | 30 mp  |             |
| ▪ extenzió            | 72 °C | 5 perc |             |
| ▪ hűtés               | 4 °C  | ∞      |             |

A paired-end fragmentek szekvenálását a Seqomics Kft. (Mórahalom) végezte MiSeq Reagent Kit v3 (600 ciklus) segítségével, az elsődleges adatelemzés pedig a Bbcl2fastq^ szoftver felhasználásával történt (v2.17.1.14, Illumina). A kapott szekvenciaadatok minőségi ellenőrzésén és trimmelésén estek át ( $\geq 50$  nukleotid hosszúságú szekvenciák) a CLC Genomics Workbench Tool 9.5.1-es verziójának felhasználásával.

A trimmelt szekvenciák filogenetikai adatelemzését a MOTHUR szoftver (v1.41.1) segítségével végeztük (Schloss et al. 2009) a MiSeq SOP (Standard Operation Procedure) ajánlása alapján (Kozich et al. 2013, [http13](http://13)). A szekvenciák illesztése és taxonómiai azonosítása a SILVA 132 SSURef NR99 adatbázis segítségével történt (Quast et al. 2013). A kiméra szekvenciák detektálása és eltávolítása a “*uchime*” majd “*split.abund*” algoritmussal történt (Edgar et al. 2011, Kunin et al. 2010). Ezt követően 97%-os hasonlóság érték alapján történt a szekvenciák OTU-kba (Operational Taxonomic Unit) rendezése (Tindall et al. 2010). A legnagyobb abundanciával jelen lévő OTU-k faji szintű besorolása az amplikonszekvenálás során kapott hozzávetőleg 400 bp alapján a GenBank ([http11](http://11)) és az EzBioCloud ([http12](http://12)) online adatbázisok segítségével történt.

### 3.8.3. Teljes genom szekvenálás és az adatok elemzése

A benzol-tartalmú dúsítóból izolált *Pinosolibacter* sp. B13 és *Ideonella* sp. B7 új fajjelöltek teljes genom szekvenálását a Seqomics Kft. (Mórahalom) végezte el a *Pinisolibacter* sp. MA2-2 jelölésű törzshöz hasonlóan, mely egy xilol-tartalmú dúsítóból lett izolálva egy 2019-es siklósi mintából. Emellett Banerjee és munkatársai által (2022a) egy aerob *meta*-xilol lebontó dúsítótenyészetből izolált *Acidovorax* sp. D2M1 szintén új fajjelölt teljes genom szekvenálására is sor került. Az MA2-2 és a D2M1 jelű törzsek eredményei a 4.3.1 és 4.3.3. fejezetekben részletezett okoknál fogva a jelen dolgozat keretien belül kerülnek bemutatásra.

A teljes bakteriális genom szekvenáláshoz először a baktériumtörzsekből izolált genomi DNS került felhasználásra egy paired-end könyvtár létrehozásához, mely a NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit (Illumina) segítségével történt a gyártó által biztosított protokoll alapján. A cirkuláris DNS feldarabolását a Covaris S2 ultrahangos készülékkel (Covaris) végezték, mely folyamat során a DNS minőségét a TapeStation 2200 (Agilent) eszköz ellenőrizte. A szekvenálás előtt szükséges megbizonyosodni a DNS megfelelő mennyiségéről, mely a Qubit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) műszer segítségével történt, majd Illumina NextSeq platformon a TG NextSeq® 500/550 High Output Kit v2 (300 ciklus) (SeqOmics Kft., Mórahalom) felhasználásával került sor a szekvenálásra. Az elsődleges adatelemzés (base-calling) a Bbcl2fastq^ szoftverrel (v2.17.1.14, Illumina) történt. A genom *de novo* összeszerelését és a scaffoldok létrehozását az SPAdes 3.13.0 verziójával végeztük (Nurk et al. 2013). A genom automatikus annotációjához az NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAP) v4.5 szoftvert (Tatusova et al. 2016) használtuk.

A teljes genom alapú filogenetikai elemzést a MiGA pipeline (<http14>) segítségével végeztük (Rodriguez et al. 2018b). Ezen kívül az adatok filogenetikai értékelése során egy másik korszerű módszert is alkalmaztunk, mely valamennyi vizsgált bakteriális genomban jelenlévő homológ gének alapján következtet azok taxonómiai hovatartozására. Az UBCG (up-to-date bacterial core gene) filogenetikai törzsfa alapjául egy 1492 faj teljes genomjából kiszámított, 28 törzset lefedő és 92 génből álló mag-gén készlet szolgált. A törzsfaépítést az UBCG pipeline (<http15>) alapján végeztük el (Na et al. 2018).

Az új fajjelöltek és a rokon fajok közötti digitális DNS-DNS (dDDH) hibridizációs értékeinek meghatározásához a Genome-Genome Distance Calculator (GGDC) 2.1-es verzióját használtuk (Meier-Kolthoff et al. 2013, <http16>), melyhez a genomszekvenciák a GenBank adatbázisból származnak (<http17>). Az új fajjelöltek és legközelebbi rokonaik közötti ortológ átlagos nukleotid azonosság (OrthoANI- Orthologous Average Nucleotide Identity) értékek kiszámítását OAT szoftverrel végeztük (Lee et al. 2016).

Annak meghatározására, hogy mely BTEX-vegyületek bontására képesek a genom alapján a vizsgált törzsek, a Genoscope MAGE platformot használtuk (Vallenet et al. 2006, 2009). Az elemzés a MAGE automatizált annotációjával történt, melyet szükség esetén manuálisan korrigáltuk, egészítettünk ki. A bontási potenciálra vonatkozó információkat a MetaCyc (Caspi et al. 2016), a KEGG (Kanehisa és Goto 2000) és az UniProt (Bateman 2019) adatbázisból nyertük. Ezen kívül a CLC Genomics Workbench Tool v21 (Qiagen, Németország) segítségével sor került az aromás szénhidrogének lebontásában részt vevő funkciógének és génklaszterek pontos azonosítására is.

### **3.9. BTEX-bontó képesség vizsgálata GC-MS segítségével**

Az aromás szénhidrogének mennyiségének nyomon követését GC-MS mérőműszer segítségével végeztük a dúsítótényészetek (3.2. fejezet), valamint az új fajjelöltek esetében. Az izolátumok vizsgálatát 100 mL-es szériumüvegekben végeztük, melyekbe a 3.2. fejezet 2. táblázata alapján készített ásványi só tápoldatot mértünk 50 mL mennyiségben, valamint egyedüli szén-és energiaforrásként különböző BTEX-vegyületet.

Az izolátumok BTEX-bontó képességének feltárását 100 mL-es légmentesen zárható szériumüvegekben végeztük három párhuzamos ismétlésben aerob (7-8 mg/L oldott O<sub>2</sub>) és mikroaerob (0,5 mg/L oldott O<sub>2</sub>) körülmények között. A kísérlet összeállítása során egyedüli szén- és energiaforrásként 0,3 µL mennyiségű aromás szénhidrogént adtunk egyenként vagy az összes BTEX komponenst 1:1 arányban keverve 50 mL vitaminokkal kiegészített ásványi só tápoldathoz (2.2. fejezet, 2 táblázat). Az üvegeket 100 µL 0,5-ös optikai denzitású (OD<sub>600</sub>) baktériumszuszpenzióval oltottuk be. Ezután az üvegeket rázótermosztátban inkubáltuk (28 °C, 150 rpm). A kísérletek során abiotikus kontrollokat is alkalmaztunk szintén három párhuzamos példányban.

A BTEX vegyületek koncentrációját 24 óránként gáztér elemzéssel vizsgáltuk szilárd fázisú mikroextrakciót végezve (PDMS – dimetil-polisziloxán szál, 100 µm; Supelco) SLB-5ms típusú szilícium-dioxid kapilláris oszloppal (Supelco) működtetett GC-MS segítségével (Trace 1300 GC – ISQ Single Quadrupole MS; Thermo Fisher Scientific Inc., USA) a következő hőprofilal: 3 perc 40°C, 20°C hőmérséklet emelkedés/ perc 190°C-ig, majd 1 perc 190°C. A tömegspektrométer 250°C-on és „full scan” üzemmódban működött. A PDMS szál, amit a gáztér vizsgálathoz használtunk, kopik, emiatt minden mérésor egyedi kezdeti kalibrációt igényelt, amihez viszonyítottuk a későbbi értékeket. A BTEX vegyületek relatív mennyiségének meghatározását a mikrokozmoszok gázterének megmintázásával végeztük miután azokban kialakult a gázelegy és a folyadék közötti dinamikus egyensúly, mely vizsgálat így reprezentatív a folyadékban

hozzáférhető BTEX vegyületek mennyiségére nézve is. Az oldatban lévő BTEX vegyületek meghatározása az alapján történt, hogy ismert mennyiségű BTEX vegyületet adtunk hozzá az 50 mL összemennyiségű oldathoz és a mért GC-MS kromatogramokon megjelenő csúcsok számértéke volt a viszonyítás, mely alapján a következő napi mérések során a koncentrációcsökkenést nyomonkövettük.

### **3.10. Az új baktériumfajok leírásához szükséges vizsgálatok**

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).

#### **3.10.1. Fenotípusos vizsgálatok: morfológiai és élettani jellemzők**

A baktériumtörzsek telepmorfológiáját szabad szemmel R2A vagy nutrient (DSM táptalaj No.1) táptalajokon vizsgáltuk 24-48 órás telepeken. A nutrient táptalaj összetétele a következő volt: 5,0 g pepton, 3,0 g húskivonat, 15,0 g agar, 1L desztillált víz, pH 7,0. A sejtek alakját és elrendeződését, valamint a sejtfal szerkezetének meghatározását Gram-festéssel vizsgáltuk (Claus 1992) és a felvételeket Leica DM6 B mikroszkóp segítségével készítettük. A sejtek mérete és a csillózat típusa transzmissziós elektronmikroszkóp (H-7100; Hitachi) segítségével került meghatározásra az Eötvös Loránd Tudományegyetem NövénySZervezettani Tanszékének munkatársai által (Ohad et al. 1963), melyhez 1% (w/v) uranil-acetát oldattal negatívan festett preparátumokat alkalmaztak.

A fiziológiai és biokémiai tesztek, mint a kataláz és oxidáz aktivitás mérését, a Hugh-Leifson-, a metilvörös-, és a Voges-Proskauer tesztek elvégzését, a nitrát redukció detektálását, a foszfátáz aktivitás meghatározását, az indoltermelés és a H<sub>2</sub>S képződésének kimutatását Barrow és Feltham (1993) protokollja alapján, az ureáz, DN-áz, kazeáz és zselatináz aktivitást, valamint a keményítő és a Tween 80 hidrolízisét pedig Smibert és Krieg (1994) szerint az Eötvös Loránd Tudományegyetem Mikrobiológiai Tanszékének munkatársai végezték.

A hőmérséklet növekedésre gyakorolt hatásának meghatározásához 4 és 45 °C közötti (4°C, 15°C, 18°C, 20°C, 28°C, 37°C, 40°C, 45°C) hőmérsékleten, rázótermosztátban inkubáltuk a baktériumtörzseket folyékony R2A tápoldatban, egy héten keresztül. A pH tartomány és optimum megállapításához folyékony R2A tápoldatot steril 20%-os (m/V) KOH vagy HCl oldatok segítségével beállítottuk 4,0 és 11,0 közötti (4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0) pH értékekre

és 28°C-on, rázótermosztátban inkubáltuk egy héten keresztül. A sótolerancia megállapításához szintén folyékony R2A tápoldatot használtunk, melyben a 0,1 és 7,0 w/v% közötti (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 %) NaCl koncentrációt állítottunk be. A tesztek során a növekedés mértékét a különböző hőmérsékletű, pH-jú és sókoncentrációjú oldatokban a táptalaj abszorbanciájának rendszeres mérésével (600 nm-en) határoztuk meg.

Egyéb fiziológiai és biokémiai vizsgálatokat API 20NE és API 50CH tesztek (bioMérieux, Franciaország) segítségével végeztük el, valamint az enzimaktivitást az API ZYM testcsík (bioMérieux, Franciaország) felhasználásával határoztuk meg a gyártó utasításai szerint. A baktériumtörzsek BTEX-bontó képességét a 3.9. fejezetben leírtak alapján határoztuk meg.

A baktériumtörzsek anaerob körülmények közötti növekedését folyékony, 0,15 % (w/v) KNO<sub>3</sub>-tal kiegészített R2A oldatot tartalmazó, 100 mL-es légmentesen zárható szérumüvegekben vizsgáltuk. Az üvegeket fecskendőszűrőn átáramló N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20, v/v) gázkeverékkel anaerobbá tettük, így elektronakceptorként az NO<sub>3</sub><sup>-</sup> szolgált a baktériumtörzs anyagcsere folyamatai során. A tenyészeteket 28°C-on 7 napon át inkubáltuk, majd a növekedést spektrofotometriásan határoztuk meg.

### **3.10.2. Kemotaxonómiai vizsgálatok: zsírsavak, poláris lipidek légzési kinonok**

A sejtmembrán zsírsav komponenseinek, poláris lipid, valamint a légzési kinon tartalmának meghatározását a Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Németország) végezte.

A celluláris zsírsavakat hosszú évek óta rutinszerűen alkalmazzák baktériumnemzetségek jellemzésére, fajok azonosítására. A vizsgálathoz a baktériumsejteket R2A táptalajon, 28°C-on felszaporítottuk, majd elküldtük a DSMZ számára. Az elemzéshez 30 mg fagyaszttva szárított biomassza, vagy aerob törzsek esetén 24 óránál nem régebbi tenyészet szükséges, melyből a sejttömeget, azok korának optimalizálása érdekében, a tisztítószélesztéssel ritkított telepek harmadik kvadránsából nyerik. A zsírsavakat elsőként nátrium-hidroxiddal elszappanosítják, majd sósav és metil-alkohol segítségével előidézett pH változás eredményeként megtörténik a metiláció. Az így létrehozott zsírsav metil-észtereket ezt követően hexán és metil-tercbutil éterrel extrahálják és az így szerves fázisba oldott zsírsav komponensek egy tisztítási lépést követően már alkalmasak a gázkromatográfiás vizsgálatra, melyet lángionizációs detektorral felszerelt Agilent GC-MS 7000D eszköz felhasználásával végeznek (Sasser 1990). A zsírsavak elemzése és azonosítása a Sherlock Microbial Identification System 6.4-es verziója (MIDI; MIDI Inc., USA) és a Calculation Method TSBA6 adatbázis segítségével történt.

A poláris lipideket és a légzési kinonok kivonása a Bligh és Dyer (1959) nyomán módosított protokoll alapján történt. Ennek során a vizsgálathoz szükséges 200 mg mennyiségű fagyaszttva

szárított biomasszát kloroform:metanol:0,3%-os NaCl oldat elegyével kezelik. A rendszer két fázisra bomlik: metanolos és kloroformos, melyek közül az utóbbiból nyerjük vissza a lipid komponenseket. A poláris lipidek elválasztása ezt követően kétdimenziós szilikagél vékonyréteg-kromatográfiával történik, mely két különböző oldószer eleggyel (kloroform:metanol:víz és kloroform:metanol:ecetsav:víz) és a réteglap 90°-os elforgatásával oldható meg. A lipidkromatogramok kimutatása foszfor-molibdénsavval történik, illetve a specifikus csoportokat pedig a funkciós csoportokra jellemző reagensekkel mutatják ki (Tindall et al. 2007).

A respiratórikus lipokinonok a membránkapcsolt elektron-transzport folyamatokban résztvevő proton- és elektronszállító vegyületek, mely típusa szintén jellemzi az egyes baktériumcsoportokat. Egy baktériumfaj egy, de maximum három féle kinont tartalmaz nagyobb mennyiségben, ezek az ún. major kinonok, emellett termelhet kisebb mennyiségben minor kinonokat. A kinonanalízishez 50 mg fagyaszttva szárított biomassza szükséges, melyhez metanol:hexán (2:1, v:v) elegyet használnak Tindall et al. (1990 a, 1990 b) által leírt módszer szerint. A kinonok tisztítása szilika-alapú szilárd fázisú extrakcióval, elválasztása pedig reverz fázisú HPLC-vel (LDC Analytical, USA; Thermo Separation Products) történt. A detektálás hullámhossza 270 nm az ubikinonok és 326 nm a menakinonok esetében. Eluálószerként metanol:heptán (9:1, v/v) elegye szolgált.

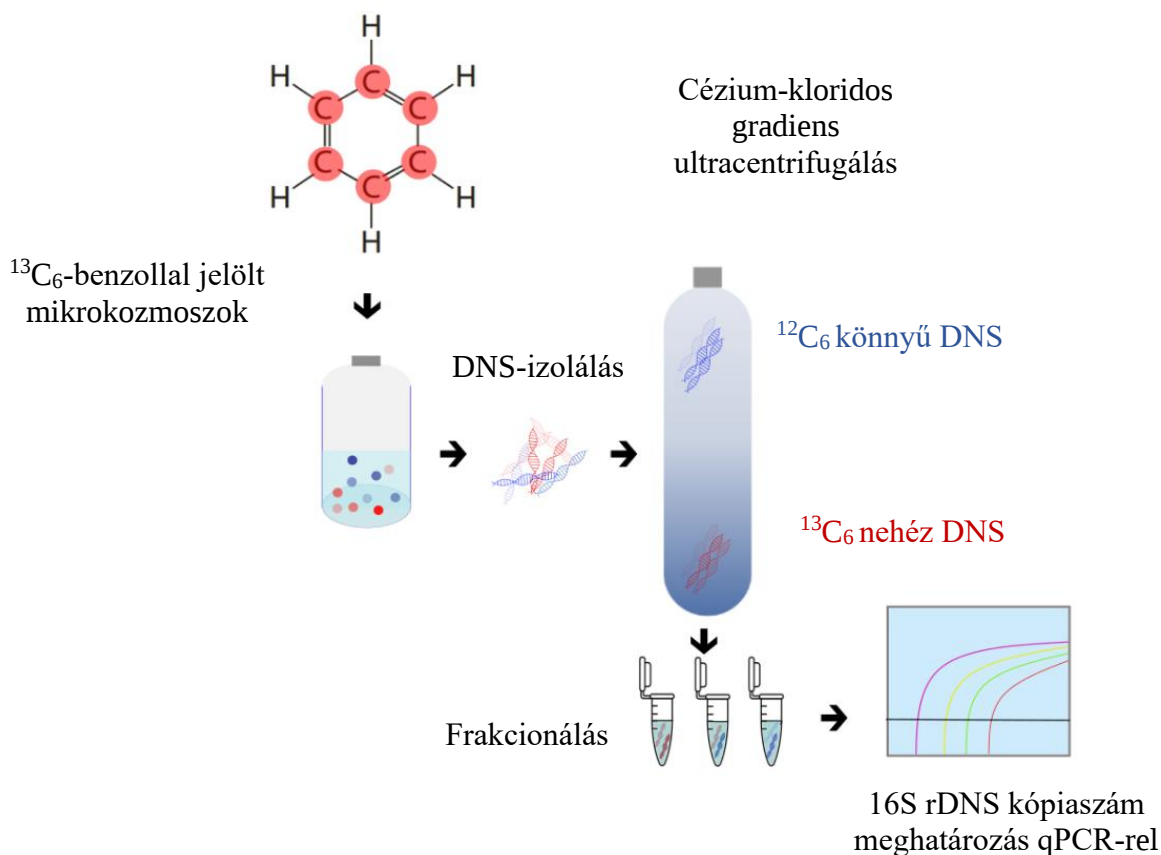
### **3.10.3. Genotípusos és filogenetikai jellemzők vizsgálata**

Ahhoz, hogy a törzseink a nemzetség új fajaként legyenek számontartva, szükség van a pontos filogenetikai helyzetük értékelésére. Elsőként a 3.8.1. fejezetben részletezett módszerek szerint 16S rDNS alapon filogenetikai törzsfákat hoztunk létre a legközelebbi rokontörzsek felhasználásával, melyek szekvenciáit a GenBank adatbázisból nyertük. Két rokontörzs bázissorendjének összevetésekor 98,65%-os 16S rDNS szekvenciahasonlóság alatt beszélünk új fajról. Ez azonban iránymutatásként szolgáló adat, abban az esetben, ha a két rokonfaj közötti hasonlóság meghaladná a 97%-ot, további teljes genom alapú vizsgálatok szükségesek, hogy új fajnak nyilváníthassuk az adott törzset. Ezért abban az esetben, amikor az új fajjelöltjeink legközelebbi rokonainak teljes genomja rendelkezésünkre állt, 92 mag gén felhasználásával filogenetikai törzsfát is készítettünk a fajjelöltjeink pontosabb taxonómiai helyzetének meghatározása céljából. A teljes genom alapú filogenetikai értékelést, a genomadatok elemzését és a BTEX bontásért felelős génklaszterek azonosítását a 3.8.3. fejezetben leírtak szerint végeztük.

### **3.11. A stabil izotópos (SIP) vizsgálat módszertana**

A DNS alapú stabil izotópos módszereket napjainkban legfőképpen arra használják, hogy a mikroorganizmusok egy adott közösségben vagy környezetben betöltött szerepét, funkcióját

meghatározzák. A stabil izotópos vizsgálatok során alkalmazott módszereket összefoglalva az 5. ábrán láthatjuk.



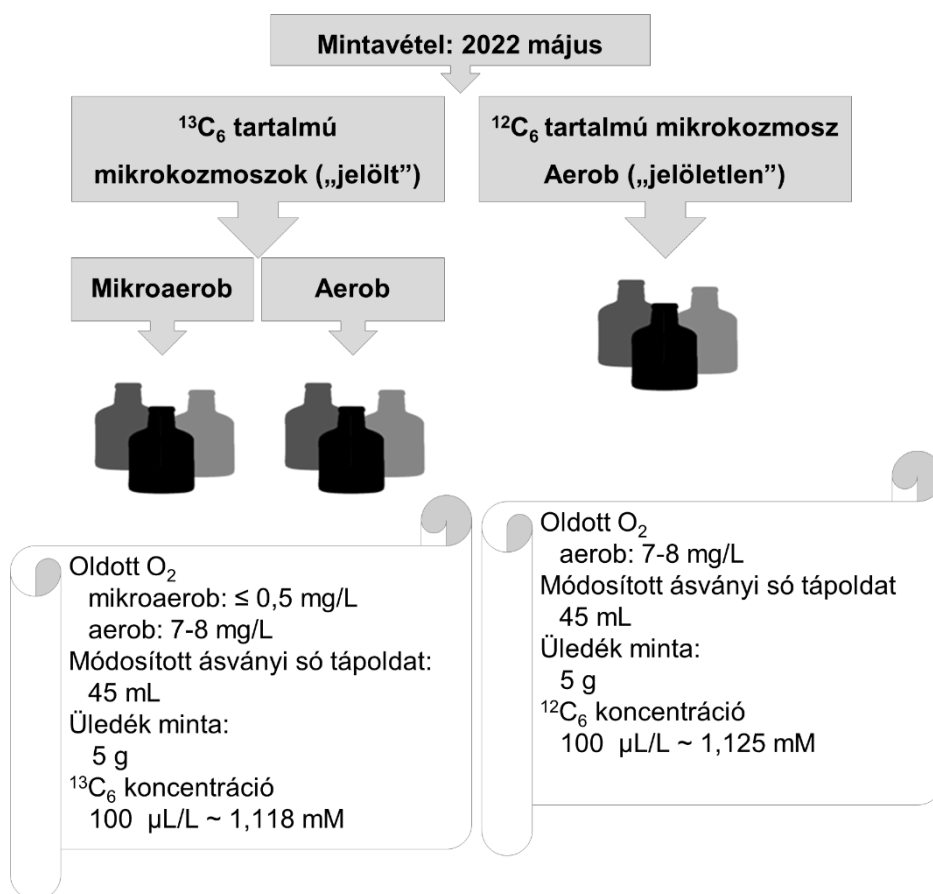
5. ábra: A stabil izotópos (SIP) vizsgálat módszertanának egyszerűsített ábrája.

A módszer elméleti alapja, hogy stabil izotóposan (radioaktívan nem bomló) jelölt, főként  $^{13}C$  alapú molekulákat használnak szubsztrátként a mikroorganizmusok számára. A baktériumok anyagcsere-folyamatai során nagy mennyiségben beépült  $^{13}C$  jelentősen megnöveli a DNS sűrűségét a jelöletlen  $^{12}C$ -et tartalmazó DNS-hez képest. Cézium-klorid oldatban történő gradiens ultracentrifugálással elválasztható egymástól a nehéz ( $^{13}C$  tartalmú) és a könnyű ( $^{12}C$  tartalmú) DNS frakció, melyből a DNS visszaizolálását követően azonosítani lehet azokat a baktériumcsoportokat, melyek képesek voltak az adott szubsztrátot szén-és energiaforrásként hasznosítani (Dumond és Murell 2005).

Az általunk összeállított kísérletben mind a 6 szénatomon stabil izotóposan jelölt benzolt ( $^{13}C_6$ ) alkalmaztunk, hogy azonosítsuk azokat a baktérium nemzetségeket, melyek nem csak jelen vannak a mikroaerob benzol-tartalmú mikrokozmoszokban, hanem aktívan képesek is a benzolt ilyen körülmények között metabolizálni.

### 3.11.1. A mikrokozmoszok összeállítása és a benzol-fogyás nyomon követése

A mikrokozmoszok létrehozását a 6. ábrán szemléltetett módon, a 3.2. fejezetben leírtakhoz hasonlóan végeztük, kisebb módosításokkal.



6. ábra: A mikrokozmoszok összeállításának sematikus ábrája.

A kísérlethez 100 mL ürtartalmú butil-gumidugóval és alumínium zárókupakkal légmentes zárható szérumüvegeket használtunk. Minden üvegbe 45 mL vitaminokkal kiegészített, módosított ásványi só tápoldat került (2. táblázat), melyet úgy alakítottunk át, hogy lehetőség szerint kevés olyan vegyületet tartalmazzon, amely potenciálisan elektron akceptorként szolgálhat az oxigén helyett mikroaerob közegben. A tápoldat eredetileg  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  formában nitrátot tartalmaz 1g mennyiségben, melyet az anyagmennyiség arányt figyelembe véve 0,668g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -ra cseréltünk. Az ásványi-só-tápoldat szulfát tartalmára ilyen formán nem voltunk tekintettel, mivel erősen redukáló körülmények szükségesek a szulfátredukcióhoz és a mikrokozmoszainkban stabil mikroaerob körülményeket tartottunk fent az elfogyott levegő visszapótlásával. Ezen kívül valamennyi mikrokozmosz tartalmazott 5 g sziklói üledékmintát (2022 májusi mintavétel) és 5  $\mu\text{L}$  stabil izotóposan jelölt benzolt (CAS, 32488-44-1, tisztaság >99%, Sigma-Aldich Ltd., Németország), illetve a három párhuzamos kontroll esetében jelöletlen benzolt. Három

párhuzamos üvegben aerob (7-8 mg/L oldott O<sub>2</sub>), másik háromban pedig mikroaerob ( $\leq 0,5$  mg/L oldott O<sub>2</sub>) körülményeket tartottunk fent, mely létrehozásához elsőként az oxigént kihajtottuk az üvegekből N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20) gázkeverékkel, majd a beállítottuk a kívánt oldott oxigén koncentrációt steril levegő beinjektálásával. Az elhasznált levegő folyamatos visszapótlásával az üvegekben stabil mikroaerob állapotot tartottunk fent, melyet rendszeresen ellenőriztünk Fibox 3 trace v3 (PreSens, Németország) típusú száloptikás oxigén szenzorral, az üvegek oldalára ragasztott SP-PSt3-NAU-D5-YOP szpot (PreSens, Németország) felhasználásával. 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 a 3.9. fejezben leírtak szerint.

### **3.11.2. DNS kivonás és mikrokozmoszok T-RFLP analízise**

A benzol koncentrációjának csökkenését GC-MS segítségével követtük nyomon 24 óránként, majd miután a teljes mennyiség elfogyását detektáltuk (aerob minták esetén 4 nap, mikroaerobok esetén egy hét) az összes mikrokozmoszból DNS-t izoláltunk, melyhez a biomasszát a teljes mintamennyiség 4°C-on, 2360 g-n és 10 percen át tartó centrifugálásával nyertük ki (Rotanta 460 R, Hettich, Németország), majd a felülúszó leöntése után NucleoSpin Soil Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co KG, USA) segítségével a gyártó utasításai szerint történt a DNS kivonás a pelletből. A kivont DNS koncentrációját és minőségét NanoDrop One Microvolume UV-Vis spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), valamint agaróz gél-elektroforézis segítségével ellenőriztük. Miután T-RFLP analízissel (a 3.7. fejezetben leírtak alapján) meggyőződünk a mikrokozmoszok párhuzamosságáról, az azonos típusú mikrokozmoszokból izolált DNS minták azonos mennyiségét összekevertük a gradiens ultracentrifugáláshoz szükséges minimum 1 µg mennyiségű DNS biztosítása érdekében, majd a DNS koncentrációját ismét ellenőriztük NanoDrop segítségével. További felhasználásig -80°C-on tartottuk a kivont és összemért DNS-t.

### **3.11.3. A mikrokozmoszokból izolált DNS gradiens ultracentrifugálása**

A cézium-kloridos gradiens ultracentrifugálás elvégzése során Lueders és munkatársai (2004), valamint Winderl és munkatársai (2010) által közölteket vettük alapul. Elsőként összeállítottuk a gradiens puffert a következők szerint: 0,1 M Tris-HCl (pH 8), 0,1 M KCl, 1 mM EDTA. A pufferbe annyi szilárd CsCl-ot (CAS: 7647-17-8, tisztaság:  $\geq 99.995$  %, Calbiochem, Merck, Darmstadt, Németország) mértünk, hogy az oldat átlagos sűrűsége a CsCl-ra vonatkoztatva 1,72 g/mL legyen. Egy adott sűrűségű CsCl-oldat elkészítéséhez a CsCl tömegszázaléka a következőképpen számítható ki:  $t\ddot{o}meg\% = 137,48 - 138,11/\rho$  (Ausubel et al. 1998), ahol a  $\rho$  a kívánt sűrűség, azaz esetünkben 1,72 g/mL. A képlet alapján hozzávetőleg 57 m/m%-os CsCl

oldatot készítettünk (57,18 g CsCl-ot adtunk 42,82 mL pufferhez). Ezt követően mintánként ~1 µg mennyiségű DNS-t mértünk hozzá a CsCl gradiens oldathoz, melyet 20 mL-es ultracentrifuga csövekbe töltöttünk, majd 68 órán keresztül, 180 000 g-n centrifugáltuk vertikális rotor segítségével Sorvall Combi típusú ultracentrifugában. A centrifugált gradienseket alulról felfelé milliliterenként 1,5 mL-es centrifugacsövekbe gyűjtöttük (összesen 18 db frakciót), majd analitikai mérlegen megmértük és kiszámítottuk az egyes frakciók sűrűségét. A DNS-t ezt követően 30%-os polietilén-glikollal (PEG 6000, Merck Life Science Kft., Németország) csaptuk ki a CsCl gradiens oldatból Griffiths és munkatársai (2000) által leírtak szerint. Ehhez 30%-os PEG 6000 és 1,6M NaCl oldatból álló elegyből kétszeres mennyiséget mértünk az egyes frakciókra, majd 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően 18 000 g-n, 4°C-on 10 percen át centrifugáltuk, majd 150 µL 70%-os jéghideg etanollal mostuk (5 perc centrifugálás 10 000 g-n, 4°C-on), majd levegőn szárítottuk a mintákat, melyeket végül 30 µL Tris-EDTA pufferben (0,1M Tris-HCl; 1mM EDTA; pH 7,4) vettünk fel és a DNS-t -80°C-on tároltuk a további felhasználásig. Az egyes frakciók DNS tartalmát Qubit (ThermoFisher Scientific Inc., USA) készülék felhasználásával ellenőriztük a gyártó utasításai szerint, mely alapján az 1-2-es, valamint a 15-18-as frakciókat kizártuk a további vizsgálatokból.

#### **3.11.4. Az egyes frakciók 16S rDNS kópiaszámának meghatározása qPCR segítségével**

Összesen 12 frakció (3-14-ig) esetében állapítottuk meg a 16S rDNS kópiaszámot qPCR segítségével. A real-time PCR során a DNS amplifikációját fluoreszcens jel detektálásával lehet nyomon követni, mely lehetőséget ad arra, hogy a kiindulási DNS templát mennyiségét nagy pontossággal meg tudjuk határozni. Az abszolút kvantifikációhoz szükség van egy kalibrációs görbére, melyhez ismert koncentrációjú *E. coli* közel teljes 16S rDNS szekvenciák szolgáltak sztenderdként  $10^0$ -on és  $10^7$ -en közötti mennyiségben. Ahhoz, hogy megadjuk az *E. coli* 16S rDNS szekvencia pontos koncentrációját, a 16S rDNS-t plazmid vektorba ligáltuk, majd *E. coli* sejtbe transzformáltuk a TOPO® TA Cloning® Kit segítségével a gyártó utasításai szerint, majd High-Speed Plasmid Mini Kit (Sigma-Aldrich, Németország) felhasználásával plazmidot izoláltunk és NanoDrop segítségével megmértük, majd kiszámítottuk a 16S rDNS koncentrációt. A qPCR során interkalálódó Eva Green fluoreszcens festéket tartalmazó HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Észtország) reagenst alkalmaztunk a gyártó által ajánlott protokoll szerint. A 16S rDNS gének amplifikációjához Ba519f (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') és 907r (5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3') primereket (Stubner, 2002) használtunk. A méréseket az Applied Biosystems StepOne™ real-time PCR készülékkel végeztük el az alábbi hőprofil alkalmazva, 40 ciklus esetében (Lueders et al. 2004):

|                       |       |        |             |
|-----------------------|-------|--------|-------------|
| ▪ kezdeti denaturáció | 94 °C | 3 perc |             |
| ▪ denaturáció         | 94 °C | 30 mp  | } 40 ciklus |
| ▪ annealáció          | 52 °C | 30 mp  |             |
| ▪ elongáció           | 72 °C | 60 mp  |             |
| ▪ extenzió            | 72 °C | 5 perc |             |
| ▪ hűtés               | 4 °C  | ∞      |             |

Ezt követően az adatok elemzését a StepOne™ Plus Real-Time PCR System v2.3 szoftver végezte, mely segítségével megkaptuk a minták relatív mennyiségét az ismert koncentrációjú kontroll mintákéhoz viszonyítva. Minden kontroll-, és frakcióból származó DNS minta esetében három párhuzamosban történt a futtatás.

### 3.11.5. 16S rDNS amplikon szekvenálás a frakciókból

Az eredeti, frakcionálás előtti aerob és mikroaerob közösségből kivont DNS mintákból, illetve a qPCR segítségével meghatározott 16S rDNS kópiaszámok alapján sikeresen elkülönített könnyű ( $^{12}\text{C}_6$ ) és nehéz ( $^{13}\text{C}_6$ ) DNS frakciók csúcsaiból, valamint a köztes frakciókból 16S rDNS Illumina amplikon szekvenálás történt a 3.8.2. fejezetben leírtak szerint, hogy végül beazonosítsuk a mikrobaközösség azon tagjait, melyek képesek a benzolt metabolizálni aerob és mikroaerob körülmények között.

## 4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### 4.1. Mikroaerob benzollebontó dúsítótenyészetek benzol biodegradációs hatékonysága és baktériumközösségeinek vizsgálata

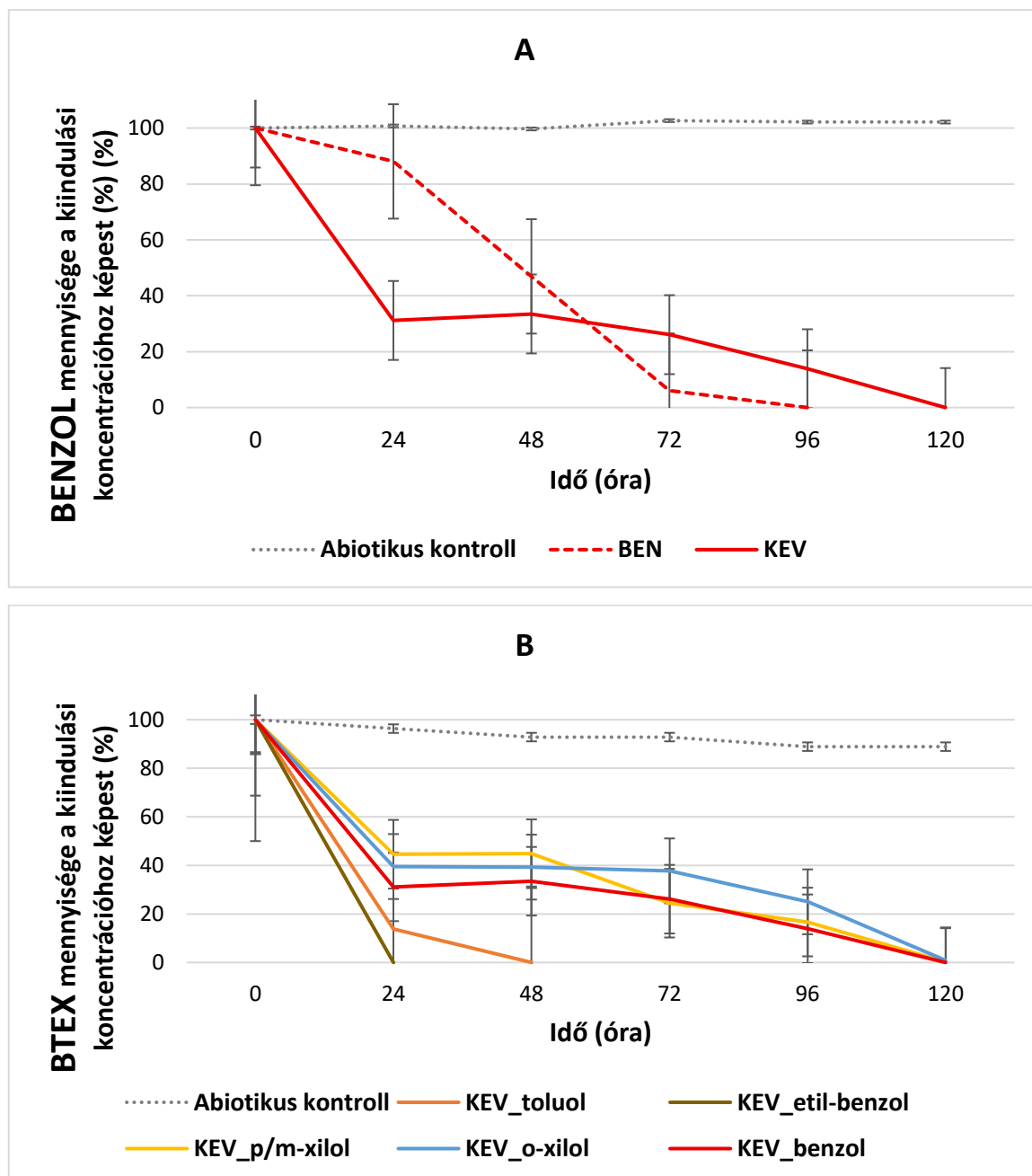
Ahhoz, hogy hatékonyan léphessünk fel a felszí alatti közegeket érintő kőolajszennyezésekkel szemben, fontos az őshonos mikrobaközösségek vizsgálata. Főként az oxigénszegény környezetben perzisztensnek számító benzol esetében kiemelkedően fontos azoknak az autochton törzseknek az azonosítása és izolálása, melyek képesek hatékonyan bontani ezt az aromás vegyületet, lehetővé téve a mikroaerob benzollebontás mélyebb megértését ezen fajok élettani jellemzőinek és genomjának további beható tanulmányozásával. Jelen kísérlet keretein belül szerettük volna megvizsgálni, hogy az oxigénlimitációnak milyen szerepe van a benzollebontó baktériumközösség alakulására, illetve további célunk volt a hatékony benzolbontó képességgel rendelkező új fajok izolálása. Ezen kívül meg szerettük volna vizsgálni, hogy egyéb BTEX vegyületek jelenléte hogyan befolyásolja a benzollebontást és a mikrobaközösség alakulását oxigénszegény környezetben. A kérdéseink megválaszolása érdekében mikroaerob ( $\leq 5$  mg/L oldott oxigén koncentrációjú) benzollebontó, valamint a benzol dominanciája mellett kisebb mennyiségben BTEX vegyületek keverékét tartalmazó dúsítótenyészeteket állítottunk össze a siklósi aromás vegyületekkel szennyezett terület talajvízüledék mintájának (3.1. fejezet) felhasználásával az Anyag és módszer fejezet vonatkozó részeiben ismertetett módon (3.2. fejezet).

#### 4.1.1. A mikroaerob benzol biodegradáció hatékonysága a különböző típusú dúsítótenyészetekben

A siklósi üledékes talajvíz mintából létrehozott, öt héten át fenntartott és átoltott, mikroaerob, benzol és BTEX keverék tartalmú dúsítótenyészetekben az ötödik hétre stabil mikrobaközösség alakult ki. Az utolsó héten a DNS izolálás előtt 24 óránként nyomonkövettük az aromás szénhidrogének fogyását az üvegekben GC-MS segítségével (7. A; B ábra).

A BTEX vegyületek közötti szubsztrát interakciókról aerob körülmények között számos tanulmány szól (Arvin et al. 1989, Chang et al. 1993, Oh et al. 1994, Littlejohns és Daugulis 2008), azonban oxigénlimitált környezetben a többi aromás szénhidrogén vegyület benzol-biodegradációra gyakorolt hatásáról kevés információ áll a rendelkezésünkre. Dou és munkatársai (2008b) tanulmánya alapján a teljesen anaerob körülmények között végzett szubsztrát-interakciós kísérletek eredménye jelentősen eltért az aerob körülmények között tapasztaltaktól. Emiatt érdekes megfigyelni, hogy a BTEX keverék tartalmú dúsítótenyészetekben hogyan zajlott az egyes vegyületek lebontása, esetünkben mikroaerob körülmények között, mely paraméterek mellett nem

áll rendelkezésünkre irodalmi adat a BTEX vegyületek közötti serkentő, gátló és kometabolikus folyamatok tekintetében.



7. 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).

A 7. (A) ábrán a két különböző típusú dúsítótenyészet benzoldegradációjának mértékét hasonlítottuk össze, mely alapján kisebb különbséget tapasztaltunk a csak benzolt tartalmazó dúsítótenyészetek és a BTEX keverék tartalmú dúsítótenyészetek benzolbontó hatékonyságában. Nagyobb mértékben indult meg a benzolbontás 24 órán belül a keverék tartalmú dúsítóban, 48 órán belül mindkét típusú dúsítótenyészetben közel a felére csökkent, majd ezt követően a csak benzolt tartalmazóban 72 óra után, a keverék tartalmúban pedig 120 óra elteltével csökkent le a kiindulási benzolkoncentráció 10% alá.

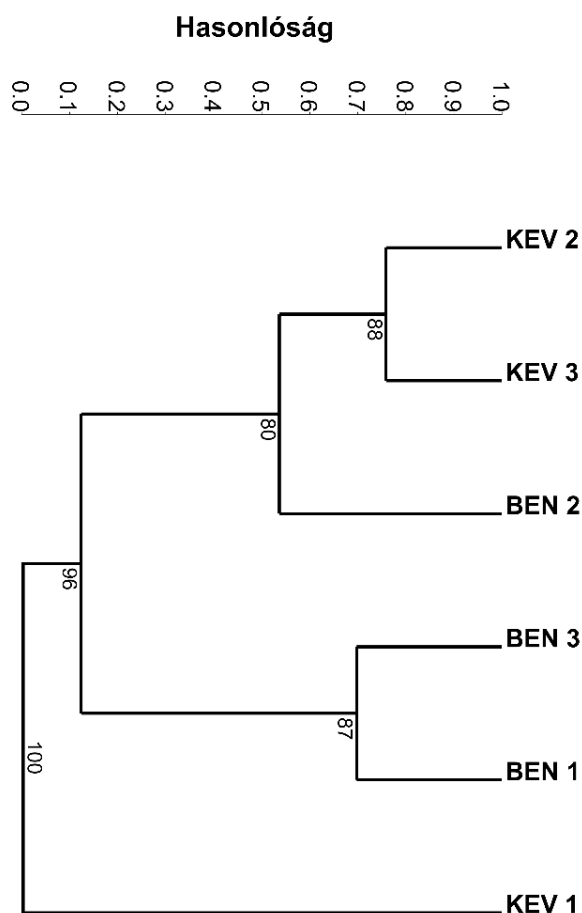
A 7. (B) ábrán a BTEX keverék tartalmú dúsítótenyészetek esetében mért BTEX koncentrációk láthatók. Az ábra alapján megfigyelhető, hogy a vegyületek közül leghamarabb az etil-benzol és a toluol fogyott el teljesen, illetve amíg ez a két vegyület jelen volt a tenyészetben, addig a benzolbontás mértéke is nagyobb volt. Dou és munkatársai (2008b) megfigyelték, hogy oxigénszegény környezetben a toluol és az etil-benzol egymásra, valamint a benzol biodegradációjára is serkentő hatással vannak, ezzel szemben a xilol vegyületek gátló hatást fejtenek ki és csökkentik a benzolbontás hatékonyságát, mely egybe vág az általunk tapasztaltakkal, ugyanis csak xilol vegyületek jelenlétében valóban kisebb mértékű lebontási hatékonyságot tapasztaltunk, mint az első 24 órában. Az első nap a xilol vegyületek is nagyobb ütemben fogytak, melynek hátterében szintén a toluol és etil-benzol jelenléte lehet, melyek 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 és Daugulis 2008), ugyanis a két vegyület hasonlóságából adódóan lebontási útvonalaiuk átfednek egymással (Evans et al. 1992, Tsao et al. 1998). Aerob körülmények között a benzol hatására az *o*-xilol és *p*-xilol vegyületek szintén kometabolizálódtak (Chang et al. 1993, Oh et al. 1994, Littlejohns és Daugulis 2008), ugyanakkor anaerob viszonyok esetében a benzol jelenlétében csökkent mindhárom xilol izomer bontási hatékonysága (Dou et al. 2008b). Az általunk összeállított kísérletben feltételezhetően a benzol és a xilol izomerek kölcsönösen gátolták egymás biodegradációját, mely magyarázza, hogy az első 24 óra után jelentősen csökkenő mennyiségű benzol, *p*-, *m*-, és *o*-xilol vegyületek esetében miért volt szükség további 96 órára, hogy teljesen eltűnjenek az üvegekből.

#### 4.1.2. 16S rDNS T-RFLP elektroferogramok klaszteranalízise

Az ötödik heti végponti minták baktériumközösségeinek összetételét T-RFLP analízis segítségével vizsgáltuk, melynek elsődleges célja az volt, hogy a dúsítások sikerességét ellenőrizzük, fontos szempont volt tehát, hogy egy általános képet kapjunk a baktériumközösségek alakulásáról és diverzitásáról, azonban főként a különböző típusú dúsítók közt látható

különbségekről akartunk meggyőződni, valamint arról, hogy a párhuzamos dúsítók milyen mértékben tekinthetők valóban párhuzamosnak.

Bray-Curtis hasonlósági indexet alkalmaztunk a mikrobaközösségek közötti hasonlóság vagy távolság kiszámításához és a hasonlósági dendogramok elkészítéséhez (8. ábra). A Bray-Curtis hasonlósági index az adott mintákat valaminek a jelenléte vagy hiánya, illetve abundancia adatok alapján, az átfedő komponensek megszámlálásával számítja ki és hasonlítja össze (Bray és Curtis 1957, Su 2021).



8. ábra: Az ötödik heti dúsítótenyészetek párhuzamos mintáiból készített 16S rDNS alapú T-RFLP elektroferogramok klaszteranalízise Bray-Curtis hasonlósági index alapján. **BEN**-benzol tartalmú dúsítótenyészet; **KEV**- BTEX keverék tartalmú dúsítótenyészet.

A klaszteranalízis eredményei alapján a három párhuzamos benzollebontó (BEN1, BEN2, BEN3) és három BTEX-keverék (KEV1, KEV2, KEV3) tartalmú dúsítótenyészet közül a BEN 1 és BEN3, valamint a KEV2 és KEV3 minták mutattak nagyfokú párhuzamosságot egymással, míg

a BEN2-es tenyészet inkább a KEV2 és KEV3 mintákkal klasztereződött, addig a KEV1 baktérium közösségének összetétele valamennyi dúsítótenyésztől eltért a T-RFLP vizsgálatok alapján.

Annak ellenére, hogy a Bray-Curtis index alapján az említett minták eltértek a párhuzamosaitól, érdekes kérdést vetett fel, hogy ellenőrzött mikroaerob körülményeket fenntartva ugyanazzal a kísérleti beállítással milyen egyéb közösségalkotók szaporodhatnak fel, ezért a KEV1 és a BEN2 mintákat nem zártuk ki a további vizsgálatokból, hanem amplikonszekvenálással (4.1.3. fejezet) kerestük tovább a választ a jelenségre.

#### **4.1.3. A dúsítótenyészetek mikrobaközösségeinek összetétele 16S rDNS amplikon szekvenálás alapján**

A dúsítótenyészetek mikroba közösségeit 16S rDNS Illumina amplikon szekvenálással vizsgáltuk tovább, hogy azonosítsuk a domináns közösségalkotó baktériumokat a különböző típusú dúsítótenyészetekben (9. ábra).

Mindkét típusú dúsítótenyészetben a proteobaktériumok (újabban *Pseudomonadota* törzs) domináltak leginkább, ezen belül is a *Betaproteobacteriales* rend (korábban *Betaproteobacteria* osztály) és a *Comamonadaceae* család tagjai voltak jelen a legnagyobb mennyiségben, emellett a *Pseudomonadales* rendbe (*Gammaproteobacteria*) tartozó baktériumok mennyisége volt kiemelkedő, valamint azonosítottuk a *Caulobacterales*, *Lysobacterales*, *Mycobacteriales*, *Holophagales*, *Flavobacteriales*, *Rhodocyclales* és *Hyphomicrobiales* rend képviselőit is. A *Betaproteobacteriales* rend és azon belül is leginkább a *Comamonadaceae* család tagjairól a szakirodalomban közismert, hogy domináns közösségalkotók aromás szénhidrogénnel szennyezett területeken, ugyanis e családba olyan nemzetségek tartoznak, melyek a benzolgyűrű felnyitásához I.2.C-típusú katekol-dioxigenáz enzimeket használnak, így jelentős szerepet töltenek be a BTEX-vegyületekkel szennyezett, felszín alatti, oxigénlimitált környezetek baktériumközösségeiben (Fahy et al. 2006, Nestler et al. 2007, Táncsics et al. 2012, 2013).

Akárcsak a tisztán benzoltartalmú dúsítótenyészetekben, a keverék tartalmúakban is a benzol volt a legfőbb szénforrás és ennek megfelelően szembetűnő a baktériumközösségek összetételének nagy mértékű hasonlósága. Azonban a domináns tagok aránya jelentősen eltért egymástól a két típusú tenyészetben, illetve a párhuzamos tenyészetek esetében is megfigyelhető volt ez a jelenség, ahogy azt a T-RFLP eredmények is előrevetítették már korábban.



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

A dúsítótényészetek baktériumközösségeit nemzetség szinten vizsgálva megállapíthatjuk, hogy a csak benzolt tartalmazó dúsítótényészetekben főleg a *Rhodoferax* nemzetség tagjai dominálták a közösséget (58-63%), emellett az *Acidovorax* nemzetségbe tartozók voltak jelen a legnagyobb mennyiségben, kivéve a BEN1 mintát, melyben a *Pseudomonas*sal (16%) közel azonos arányban detektáltuk a jelenlétüket. A BEN2 dúsítóban az *Acidovorax* nemzetség volt a legdominánsabb (12-79%), ezen kívül mindhárom benzol tartalmú dúsítóban megjelentek kisebb mértékben a *Pseudomonas* nemzetség képviselői is (3-16%). Ezzel szemben a BTEX-keverék

tartalmú dúsítótenyészetekben a *Pseudomonas* nemzetség volt az uralkodó közösségalkotó (49-89%), az *Acidovorax*-ok ebben az esetben is jelentős abundanciával képviseltetettek (7-40%), a *Rhodoferax* nemzetség pedig maximum 10%-os relatív gyakorisággal tűnt fel a KEV2-es dúsítótenyészetben, a KEV1 és KEV3 mintákban pedig elenyésző volt a mennyisége (2 és 0,2%). A legjelentősebb nemzetségek mellett a *Geothrix* és a *Brevundimonas* nemzetségeket is azonosítottuk a keverék tartalmú dúsítókból, illetve az *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*, *Azoarcus*, *Pseudoxanthomonas* és *Xanthobacter* nemzetségek detektálására is sor került a benzollebontó tenyészetekből. Az utóbbi két nemzetség tagjai főként a BEN2-es mintában fordultak elő, a másik két, csak benzolt tartalmazó mintában 1% alatti relatív gyakorisággal voltak jelen. Ezen kívül kizárólag a BEN2-es mintából kerültek elő a *Rhodococcus* nemzetség képviselői is. A *Sediminibacterium* is főként a három benzollebontó tenyészetben volt megtalálható, azonban a KEV2-es mintában is sikerült detektálni a jelenlétét.

A BEN2 és KEV1 mintákban a párhuzamosaiktól eltérően egy kevésbé diverz baktériumközösség alakult ki, melyben egy-egy nemzetség tagjai kiemelkedő növekedést mutattak. A BEN2 mintában a csak benzolt tartalmazó dúsítótenyészetekre jellemző *Acidovorax*, míg a KEV1-es mintában 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, mely nem szokatlan jelenség.

A *Rhodoferax* nemzetség szénhidrogénnel szennyezett felszín alatti területeken betöltött ökológiai szerepéről keveset tudunk, ugyanis a nemzetséghez jelenleg mindössze tíz érvényesen leírt faj tartozik (<http://18>). Korábbi tanulmányok azonban kimutatták a *Rhodoferax* nemzetségbe tartozó baktériumok jelenlétét aromás szénhidrogénekkel szennyezett ökoszisztémákban, különösen a *Rhodoferax ferrireducens* és *R. antarcticus* fajokkal közeli rokonságban állók előfordulása volt gyakori (Alfreider és Vogt 2007, Aburto és Peimbert 2011). A *Rhodoferax* nemzetséget a siklósi kárhely korábbi vizsgálatai során szintén sikerült azonosítani (Táncsics et al. 2012, 2013, Farkas et al. 2017). Ezen kívül Táncsics és munkatársai (2023) mikroaerob xilol-bontó dúsítótenyészetek metagenom adataiból rekonstruálták egy olyan *Rhodoferax* nemzetségbe tartozó baktériumfaj genomját, melyben azonosították a katekol-2,3-dioxigenáz enzimet egy több komponensű fenol-hidroxiláz (mPH) rendszer részeként, illetve több teljes *meta*-hasítási útvonalat kódoló génklasztert, mely kutatási eredmények rávilágítottak arra, hogy a mikroaerob BTEX-szennyezett környezetekben feldúsuló *Rhodoferax*-ok a szennyezőanyagok lebontásának aktív résztvevői lehetnek. A szekvenálás során kapott *Rhodoferax* OTU-k nagy része (39%) a *Rhodoferax saidenbachensis* fajhoz volt köthető, mellyel 98,7%-os 16S rRNS génszekvencia

hasonlóságot mutatott. A *R. saidenbachensis* egy rendkívül lassan növvő, pszichrotoleráns baktérium és korábban nem hozták összefüggésbe aromás szénhidrogének lebontásával (Kaden et al. 2014). A *Rhodoferrax* OTU-k igen kis hányada (0,3%) a *Rhodoferrax antarcticus* fajjal mutatta a legközelebbi rokonságot mindössze 95,5%-os szekvenciahasonlósággal.

A *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó baktériumok kiemelkedő szerepe az aromás szénhidrogének lebontásában ugyanakkor megkérdőjelezhetetlen és széles körben vizsgált modellorganizmusai az aerob BTEX-bontásnak (Abuhamed et al. 2004, Kim et al. 2005), bizonyos törzsek akár mind a hat aromás szénhidrogén lebontására is képesek (Szentgyörgyi et al. 2022). Annak ellenére, hogy a *Pseudomonas* fajok aerob biodegradációs képességéről lehet főként olvasni a szakirodalomban, az általunk vizsgált felszín alatti, oxigénlimitált kárhely korábbi vizsgálatai során sikerült egy mikroaerob xilol-bontó dúsítótenyészetből a *Pseudomonas aromaticivorans* MAP12<sup>T</sup> törzset izolálni, mely bizonyítottan rendelkezett I.2.C C23O génnel és képes volt a benzolt, toluolt, valamint a *meta*-, és *para*-xilolt mikroaerob körülmények között is hatékonyan bontani (Banerjee et al. 2022b), mely eredmény alapján feltételezhető, hogy a siklói kárhelyen lévő *Pseudomonas* fajhoz tartozó domináns baktériumtörzsek adaptálódtak az oxigénszegény környezethez és fontos közösségalkotó tagok ilyen körülmények között is. A *Pseudomonas* nemzetséget képviselő legjelentősebb OTU a *P. fildesensis* fajhoz volt köthető 99,1%-os 16S rRNS génszekvencia hasonlósággal, melynek típus törzse egy Antarktisz talajából izolált pszichrotoleráns baktérium (Pavlov et al. 2020) és a szénhidrogének lebontásában betöltött szerepére ezidáig nem derült fény. A *Pseudomonas*-okhoz hasonlóan az *Acidovorax* nemzetség tagjai is gyakran megfigyelhetők kőolajszármazékokkal szennyezett területeken (Aburto et al. 2009, Singleton et al. 2018), például az *A. delafieldii* és *A. defluvii* fajok jelenlétét lehetett megfigyelni aromás szénhidrogénekkel szennyezett kárhelyeken (Alfreider és Vogt 2007, Révész et al. 2020a, 2020b, Banerjee et al. 2022a). A dúsítótenyészetekben kimutatott, *Acidovorax* nemzetséget képviselő legjelentősebb OTU szintén az *A. delafieldii*-vel állt legközelebbi rokonságban, mellyel 99,4%-os 16S rRNS génszekvencia hasonlóságot mutatott. Emellett a *Pseudomonas* nemzetség tagjaival együtt az *Acidovorax*-ok domináns közösségalkotó szerepéről számoltak be korábban Banerjee és munkatársai (2022a), melyeket a siklói kárhely talajvízmintájából létrehozott xilol-bontó dúsítótenyészetből mutattak ki. Mikroaerob, BTEX-lebontó dúsítótenyészetekben korábban domináns közösségalkotóként írták le Benedek és munkatársai (2018), valamint az I.2.C alcsaládba tartozó C23O klónszekvenciák egyik típusa a legnagyobb hasonlóságot egy *Acidovorax* törzs C23O génjével mutatta (Benedek et al. 2018). Ezen kívül Kiesel és munkatársai (2008) szerint egy, az *Acidovorax facilis* fajba tartozó törzs egy nagy oxigénaffinitású klórkatekol-1,2-dioxigenáz enzim segítségével képes volt hipoxikus körülmények között az aromás benzolgyűrű felnyitására és a klór-benzol lebontására. A

*Rhodofera*, *Acidovorax* és *Pseudomonas* nemzetségbeli baktériumok BTEX-lebontásban betöltött szerepe azonban nem csak regionális jelenség, Aburto és Peimbert (2011) munkássága során szintén minhárom csoport tagját azonosította egy Egyesült Királyságbeli (UK) petrokémiai üzem (SIReN) alatt fekvő talajvízrétegből származó minták felhasználásával létrehozott benzol-toluol keveréket tartalmazó mikrokozmoszból.

A kevésbé uralkodó közösségalkotó tagok közül a *Sediminibacterium* és a *Rhizobium* mindkét típusú dúsítótényészetben jelen volt. Korábban kőolajjal szennyezett környezetekből mutatták ki az említett nemzetségekbe tartozó fajokat (Lindstrom et al. 2003, González-Paredes et al. 2013, Poi et al. 2018, Banerjee et al. 2022a, Chen et al. 2022). A *Xanthobacter* nemzetség tagjai a csak benzolt tartalmazó dúsítókban voltak jelen. A *Xanthobacter* fajokat gyakran használják biodegradációs célokra, mivel szerepet játszhatnak különböző xenobiotikumok lebontásában, mint például a klórozott szénhidrogének, alkének, ciklohexán vagy fenol (van Ginkel és de Bont 1986, Janssen et al. 1989, Trower et al. 1985, Nagamani et al. 2009). Kizárólag a BEN2-es mintából kimutatott *Rhodococcus* nemzetség számos tagja jól ismert alkánlebontó, főként aerob körülmények között vesz részt az alifás szénhidrogének biodegradációjában (Táncsics et al. 2015, Révész et al. 2020b), azonban a nemzetség nagy méretű genomja és széleskörű metabolikus képességei miatt az aromás szénhidrogénvegyületek hasznosítására is alkalmasak, valamint számos egyéb xenobiotikum, vagy akár mikotoxinok esetében is ismert a *Rhodococcus*-ok lebontó képessége (Martinková et al. 2009, Cserhádi et al. 2013). Szintén a BEN2-es benzolbontó dúsítótényészetből a fent említetteken kívül a *Pseudoxanthomonas* nemzetséget mutattuk ki, melynek számos tagja képes a xenobiotikumok széles skáláját hasznosítani, ugyanakkor néhány faj BTEX bontó képessége is ismert (Kim et al. 2008 Patel et al. 2012 Lu et al. 2019). A benzol tartalmú dúsítótényészetekben ugyan csekély relatív gyakorisággal, de sikerült kimutatni az *Azoarcus* nemzetséget is, mely tagjai közismert aromás szénhidrogén és BTEX lebontók (Anders et al. 1995, Song et al. 2001, Mechici et al. 2002, Cavalca et al. 2004, Sperfeld et al. 2018), a siklósi kárhelyen is többször beszámoltak már a jelenlétükről (Táncsics et al. 2013, Farkas et al. 2017).

A keverék tartalmú dúsítótényészetekből kimutatott *Brevundimonas* nemzetségről szintén közismert, hogy közösségalkotó tagja az olajszennyezésnek kitett területek baktériumközösségeinek és bizonyos törzsek hatékonynak bizonyultak a tengeri kőolajszennyezések felszámolásában, illetve a szintetikus kenőolaj biológiai lebontásában vettek részt (Lee et al. 2010, Chaudhary és Kim, 2018, Wang et al. 2016, Basuki 2017). A *Geothrix* nemzetség csak a KEV2-es mintában volt jelen csupán 1%-os gyakorisággal. A nemzetség tagjai főként vasredukáló tulajdonságukról ismertek (Han et al. 2022). Egyik képviselőjüket, a *Geothrix fermentans*-t azonban egy kőolajjal szennyezett üledék vas(III)-redukáló zónájából izolálták és

anaerob toluol lebontásra képes (Coates et al. 1999). A nemzetséget képviselő OTU szintén ezzel a fajjal mutatta a legnagyobb hasonlóságot (97,4%) a 16S rRNS gén alapján. A faj egy obligát anaerob szervezet, így feltételezhető, hogy két oxigénpótlási időszak között átmenetileg anaerob viszonyok is uralkodtak a dúsítótenyészeinkben, mely kedvezett a *G. fermentans* elszaporodásának.

A szakirodalomból vett példák összhangban vannak az általunk kapott eredményekkel és megerősítik a feltevéseinket, miszerint a *Rhodofera* nemzetség domináns közösségalkotó mikroaerob körülmények között az egyféle szén-, és energiaforráson, az általunk végzett kísérletekben csak benzolon dúsított közösség esetében. Ezzel szemben a *Pseudomonas* nemzetség tagjai valamennyi monoaromás szénforrás hasznosítására képesek lehetnek, így a kevert BTEX szennyezések esetén a közösségek domináns tagjaivá válhatnak, ahogy azt az általunk vizsgált dúsítótenyészetek eredményei is mutatták. Az *Acidovorax* nemzetség tagjai pedig a megfelelő szénforrás esetében egyféle BTEX vegyület és kevert monoaromás szénhidrogénnel szennyezett közegben is egyaránt kiemelkedő szerepet játszhatnak a lebontásban. Mindhárom nemzetség esetében sikerült bepillantást nyerni a sziklósi kárhelyről származó példafajokon keresztül a BTEX-lebontás genetikai hátterébe, mely alapján feltételezhető, hogy e nemzetségek tagjai szert tettek a közösségben horizontális géntranszfer útján terjedő katekol-2,3-dioxigenáz génre és a BTEX-lebontási útvonal egyéb génjei által kódolt enzimmészetre.

#### **4.1.4. A dúsítótenyészetekből izolált tenyésztethető baktériumközösség összetétele és a C23O funkciógén vizsgálatának eredményei**

A hagyományos tenyésztési eljárás során összesen 26 db baktériumtörzs izolálására került sor a dúsítótenyészetek típusonként összevont mintáiból, 13 db-ot a kizárólag benzolt tartalmazókból, 13 db-ot pedig a BTEX-keverék tartalmú dúsítótenyészetből vontunk tenyésztésbe, valamint az izolált baktériumtörzsek esetében vizsgáltuk az I.2.C-típusú katekol-2,3-dioxigenáz (C23O) génnek meglétét, hogy a tenyésztett baktériumközösség potenciális BTEX-bontó tagjait azonosítsuk. A faj szinten beazonosított izolált baktériumtörzsek és a funkciógénvizsgálat eredményeit a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat: A dúsítótenyészetekből izolált baktériumtörzsek megnevezése és az I.2.C C23O funkciógén meglétének vizsgálata (-: az I.2.C C23O funkciógén hiánya, +: az I.2.C C23O funkciógén megléte a PCR eredményei alapján).

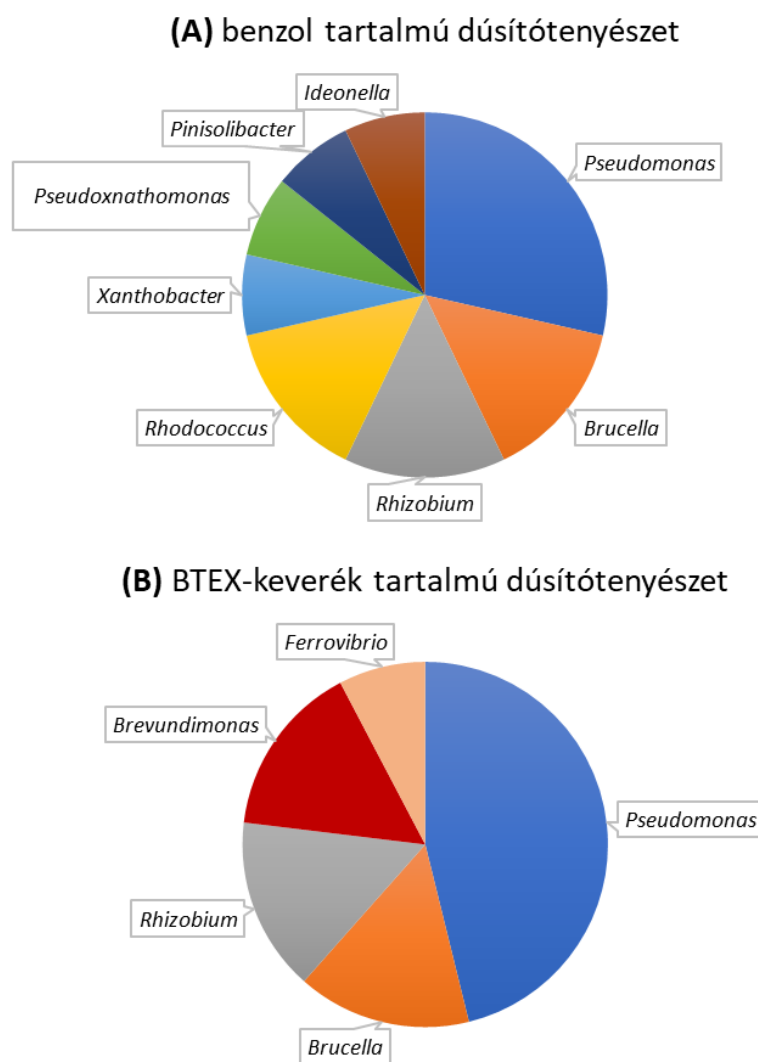
| Törzs kód                                         | Legközelebbi rokon (típus törzs)                                            | 16S rDNS hossza (bp) | Hasonlóság (%) | I.2.C C23O gén |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------|----------------|
| <b>Benzolbontó dúsítótenyészet (BEN)</b>          |                                                                             |                      |                |                |
| B1                                                | <i>Brucella cytisi</i> ESC1 <sup>T</sup> (AY776289)                         | 1367                 | 100            | -              |
| B2                                                | <i>Pseudomonas fildesensis</i> KG01 <sup>T</sup> (MK859934)                 | 1360                 | 99,78          | -              |
| B3                                                | <i>Rhizobium daejeonense</i> KCTC 12121 <sup>T</sup> (AY341343)             | 1298                 | 98,15          | -              |
| B4                                                | <i>Rhodococcus aetherivorans</i> 10bc312 <sup>T</sup> (AF447391)            | 1417                 | 99,85          | -              |
| B5                                                | <i>Pseudomonas moorei</i> RW10 <sup>T</sup> (AM293566)                      | 1438                 | 99,86          | -              |
| B6                                                | <i>Brucella cytisi</i> ESC1 <sup>T</sup> (AY776289)                         | 1363                 | 100            | -              |
| B7                                                | <i>Ideonella benzenivorans</i> B7 <sup>T</sup> (MZ041034)                   | 1413                 | 100            | +              |
| B8                                                | <i>Rhodococcus aetherivorans</i> 10bc312 <sup>T</sup> (AF447391)            | 1405                 | 99,93          | -              |
| B9                                                | <i>Pseudomonas fildesensis</i> KG01 <sup>T</sup> (MK859934)                 | 1414                 | 99,36          | -              |
| B10                                               | <i>Xanthobacter flavus</i> 301 <sup>T</sup> (X94199)                        | 1386                 | 99,78          | -              |
| B11                                               | <i>Pseudoxanthomonas humi</i> THG-MM13 <sup>T</sup> (KM598260)              | 1430                 | 98,51          | -              |
| B12                                               | <i>Rhizobium selenitireducens</i> ATCC BAA-1503 <sup>T</sup> (JAEG01000027) | 1367                 | 99,78          | -              |
| B13                                               | <i>Pinisolibacter aquiterrae</i> B13 <sup>T</sup> (MZ047316)                | 1366                 | 100            | -              |
| <b>BTEX-keverék lebontó dúsítótenyészet (KEV)</b> |                                                                             |                      |                |                |
| K1                                                | <i>Brevundimonas mediterranea</i> V4.BO.10T (AJ227801)                      | 1343                 | 99,78          | -              |
| K2                                                | <i>Pseudomonas moorei</i> RW10 <sup>T</sup> (AM293566)                      | 1412                 | 99,21          | -              |
| K3                                                | <i>Brucella cytisi</i> ESC1 <sup>T</sup> (AY776289)                         | 1356                 | 100            | -              |
| K4                                                | <i>Pseudomonas aromaticivorans</i> MAP12 <sup>T</sup> (OK324373)            | 1402                 | 100            | -              |
| K6                                                | <i>Brevundimonas mediterranea</i> V4.BO.10T (AJ227801)                      | 1338                 | 99,77          | -              |
| K7                                                | <i>Ferrovibrio denitrificans</i> S3 <sup>T</sup> (AF508113)                 | 1365                 | 99,26          | -              |
| K8                                                | <i>Pseudomonas aromaticivorans</i> MAP12 <sup>T</sup> (OK324373)            | 1388                 | 100            | -              |
| K9                                                | <i>Rhizobium selenitireducens</i> ATCC BAA-1503 <sup>T</sup> (JAEG01000027) | 1369                 | 100            | -              |
| K10                                               | <i>Brucella cytisi</i> ESC1 <sup>T</sup> (AY776289)                         | 1349                 | 100            | -              |
| K11                                               | <i>Pseudomonas moorei</i> RW10 <sup>T</sup> (AM293566)                      | 1416                 | 99,86          | -              |
| K12                                               | <i>Pseudomonas aromaticivorans</i> MAP12 <sup>T</sup> (OK324373)            | 1402                 | 99,86          | -              |
| K13                                               | <i>Rhizobium selenitireducens</i> ATCC BAA-1503 <sup>T</sup> (JAEG01000027) | 1375                 | 99,78          | -              |
| K14                                               | <i>Pseudomonas aromaticivorans</i> MAP12 <sup>T</sup> (OK324373)            | 1430                 | 99,86          | -              |

Bár napjainkban a tenyésztési és molekuláris technikák fejlődésével megdőlt Amann és munkatársai (1995) által felállított paradigma miszerint a baktériumok mindössze 1%-a vonható tenyésztésbe (Martiny 2019), ugyanakkor a baktériumok adaptációs képességét figyelembe véve számos, a tudomány számára ismeretlen faj izolálására nyílik lehetőség egy aromás szénhidrogénnel szennyezett felszín alatti kárhelyen, mely erős szelekciós nyomást gyakorol az ott élő endemikus közösségre. Emiatt érdekes megvizsgálni a tenyésztett közösséget, melybe számos olyan faj tartozik, amely az amplikon szekvenálás során nem érte el az 1%-os relatív gyakoriságot, emiatt nem került feltüntetésre az ábráinkon, ugyanakkor aktív résztvevője lehet a mikroaerob benzolbontásnak

Tenyésztéses eljárással a domináns közösségalkotó fajok közül egyedül a *Pseudomonas* nemzetségbe tartozókat sikerült izolálni mindkét típusú dúsítótenyészetből jelentősebb arányban, összesen az izolátumok közel 40%-át tették ki. A *Pseudomonas* fajok dominanciája a tenyésztett közösségben magyarázható azzal, hogy ezek a baktériumok széles pH-, hőmérséklet-, és sótartományban képesek növekedni, diverz metabolikus képességgel rendelkeznek, mely lehetővé teszi számukra, hogy sokféle környezetben és tápanyagforráson fejlődjenek, így a könnyebben tenyészthető fajok közé tartoznak (Pandey et al. 2006, LaBauve és Wargo 2012). A *Pseudomonas* fajok mellett a *Rhodococcus*, *Xanthobacter* és *Rhizobium* nemzetség tagjait sikerült kimutatni tenyésztéses eljárással és amplikonszekvenálással is, ezeket kivéve azonban a tenyésztés eredménye jelentősen eltért az amplikon szekvenálás során kapott fajösszetételtől és meglehetősen diverz, tíz különböző nemzetséget magába foglaló baktériumközösség került izolálásra a dúsítótenyészetekből (10. ábra). Annak feltételezhető magyarázata, hogy miért az amplikonszekvenálás során 1% alatti gyakorisággal rendelkező fajok szerepeltek főként a tenyésztett fajok listáján az lehet, hogy a dúsítótenyészetekben nagy relatív abundanciával jelenlévő három domináns faj a *Pseudomonas* kivéve nehezen tenyészthetőnek bizonyult. A *Rhodospirillum rubrum* nemzetség tagjainak a siklósi kárhelyről történő izolálása tett kísérletek eddig nem jártak sikerrel (Táncsics 2021) ugyanis ez a leszármazási vonal feltehetően obligát mikroaerofil, mely megnehezíti az izolálást, a kis relatív abundanciával jelenlévőket ezzel szemben könnyebb volt tenyésztésbe vonni, ezért láthatjuk viszont ezeket a fajokat főként a tenyésztett közösségben.

A *Pseudomonas* fajok közül a BTEX-keveréket tartalmazó dúsítótenyészetekből a benzol-, toluol-, és xilolbontó *Pseudomonas aromaticivorans* MAP12<sup>T</sup>-vel nagy szekvenciahasonlóságot mutató törzseket sikerült tenyésztésbe vonni (K4, K8, K12, K14), a típustörzset Banerjee és munkatársai (2022b) izolálták és írták le szintén a 2019-es októberi mintavétel során a siklósi kárhelyről gyűjtött talajvízmintából létrehozott mikroaerob xilolbontó dúsítótenyészetből. Az általunk izolált törzsek azonban az I.2.C-típusú C23O gén jelenlétét kimutató PCR során negatív eredményt adtak, így a MAP12<sup>T</sup>-es törzsszel ellentétben nem bizonyított, hogy rendelkeznek az

aromás szénhidrogének mikroaerob lebontásában kulcsszerepet játszó funkciójával. A benzolbontó dúsítótenyészetekből a *Pseudomonas moorei* és *Pseudomonas fildesensis* fajok kerültek elő, akárcsak az amplitikon szekvenálás során. A két faj BTEX-bontó képességéről eddig nem állnak rendelkezésünkre szakirodalmi adatok, a *P. moorei* főként paracetamol és diklofenák bontó tulajdonságáról ismert (Zur et al. 2018, 2020), a *P. fildesensis*-t pedig mindmáig nem hozták összefüggésbe xenobiotikum-, és szénhidrogénlebontással kapcsolatban.



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

Mindkét típusú dúsítótenyészetből előkerültek a *Brucella* és a *Rhizobium* nemzetségbe tartozó fajok, melyeket Zhao és munkatársai (2011) olajjal szennyezett talajok bioremediációja során alkalmaztak egyéb más fajokkal együtt konzorciumban. Ezen kívül számos egyéb tanulmány említi ezeknek a fajoknak a jelenlétét és szerepét a kőolajjal szennyezett területeken (Zhang et al.

2021, Muthukumar et al. 2003, de la Cueva et al. 2016, Steliga et al. 2012). A dúsítótenyészetben faj szinten a *Brucella cytisi*, a *Rhizobium selenitireducens* és *R. daejeonense* fajokkal legnagyobb szekvenciahasonlóságot mutató törzseket izoláltuk, melyeket szénhidrogénnel erősen szennyezett talajmintákból, illetve kőolajjal szennyezett talajban termő növények szárszövegeiből mutattak ki klasszikus mikrobiológiai tenyésztési eljárással (Steliga et al. 2012, Abou-Shanab et al. 2016, Mayer et al. 2019).

A BTEX-keverék tartalmú dúsítótenyészetekből ezen kívül a *Ferrovibrio* nemzetségbe tartozó *Ferrovibrio denitrificans* fajjal legközelebbi rokonságban álló törzset izoláltuk, mely vas(II)-oxidáló tulajdonságáról ismert, fakultatív anaerob mikroorganizmus (Sorokina et al. 2012), így feltehetően jól helytáll egy oxigénszegény, felszín alatti környezetben, mint amilyen az általunk vizsgált kárhely. A *Ferrovibrio* nemzetségbe tartozó összesen négy típus-törzset változatos helyekről izolálták, pl. peszticidekkel kontaminált szennyvízből vagy talajból, azonban egy kőolajszármazékokkal szennyezett talajban lévő szivattyún kialakult biofilmből is kimutatták és feltételezik a nemzetség szerepét a diklofenák lebontásban (Song et al. 2015, Dahal et al. 2018a, Ryu et al. 2020, Pápai et al. 2023). Ezen kívül policiklikus aromás szénhidrogének biodegradációjára képes konzorciumban is jelen voltak a *Ferrovibrio* nemzetség tagjai (Bacosa et al. 2023). A BTEX keverék tartalmú dúsítókból tenyésztésbe vontunk továbbá egy, a *Brevundimonas* nemzetségbe tartozó baktériumtörzset, mely a *B. mediterranea* fajjal áll legközelebbi rokonságban. Ezt a fajt korábban olajszennyezett területről nem mutattak ki, főként sós, mélytengeri környezetből izolálták és írták le (Fritz et al. 2005, Wang et al. 2020).

A kizárólag benzolt tartalmazó dúsítótenyészetekből izolált *Xanthobacter flavus* fajjal rokon törzs a szakirodalom alapján fenol, illetve klórbenzol bontó képessége ismert (Nagamani et al. 2009, Sommer és Görisch 1997), ugyanakkor feltételezik, hogy a *X. flavus* baktériumtörzsek hozzájárulnak a BTEX vegyületek biológiai lebontásához is (Kao et al. 2010). Szintén a benzollebontó dúsítótenyészetekből izoláltuk a *Rhodococcus aetherivorans* törzset, mely a metil-butil-éter bontó tulajdonságáról ismert (Goodfellow et al. 2004), emellett egy kőolajvegyületek keverékét tartalmazó mikrobiális konzorciumban is kimutatták a jelenlétét, habár a BTEX-bontási hatékonysága nem volt jelentős (Auffret et al. 2009). A benzolbontó dúsítótenyészetből ezen kívül a *Pseudoxanthomonas humi* fajt mutattuk ki, melyet a szakirodalom alapján eddig nem hoztak összefüggésbe kőolajszennyezésekkel, ugyanakkor a nemzetség egy másik képviselőjét, a *P. spadix* olajszennyezett talajból izolálták, mely valamennyi monoaromás szénhidrogén biodegradációjára képes volt a kutatások szerint (Young et al. 2007, Kim et al. 2008).

A tenyésztett baktériumközösség két, számunkra legjelentősebb tagját a benzollebontó dúsítótenyészetből izoláltuk. Az egyik a mindössze egy típus-törzset magába foglaló *Pinisolibacter* nemzetségbe tartozott és a 16S rRNS gén alapján 97,4%-os hasonlóságot mutatott a *P. rarus* E9<sup>T</sup>

törzzsel, mely alapján feltételezhető volt, hogy az általunk izolált B13 jelű törzs a *Pinisolibacter* nemzetség egy új fajként leírható tagja lehet, melyet most először sikerült tenyésztésbe vonni aromás szénhidrogénnel szennyezett felszín alatti környezetből. A másik, B7 jelű izolátumunk az *Ideonella dechloratans* CCUG 30977<sup>T</sup> törzzsel állt legközelebbi rokonságban, a 16S rRNS gén hasonlósága 99,15% volt a két törzs között, ugyanakkor az I.2.C. alcsaládba tartozó C23O génekre specifikus PCR eredménye szerint rendelkezik ezzel a funkciógénnel, mely alapján feltételeztük, hogy a törzs az *Ideonella* nemzetség egy potenciálisan új fajjelöltje. A dúsítótenyészetekből végzett amplikon szekvenálás eredményei közül az ábráinkon nem szerepelnek az 1% alatti relatív gyakorisággal jelen lévő taxonok, ugyanakkor a BEN1 és BEN3 mintában sikeresen azonosítottuk a *Pinisolibacter ravus* E9<sup>T</sup> és *Ideonella dechloratans* CCUG 30977<sup>T</sup> 16S rRNS génekkel legnagyobb hasonlóságot mutató OTU-kat hozzávetőleg 460 bp alapján, melyekkel 97,3% és 98,7% volt a szekvenciahasonlóság mértéke. A *Pinisolibacter* sp. a BEN3 mintában, az *Ideonella* sp. pedig a BEN1 mintában fordult elő ~ 0,1%-os gyakorisággal.

A két törzs új fajként történő leírásához szükséges vizsgálatainak az eredményét a 4.3. fejezetben részletezem.

### Új tudományos eredmény a 4.1. fejezet alapján:

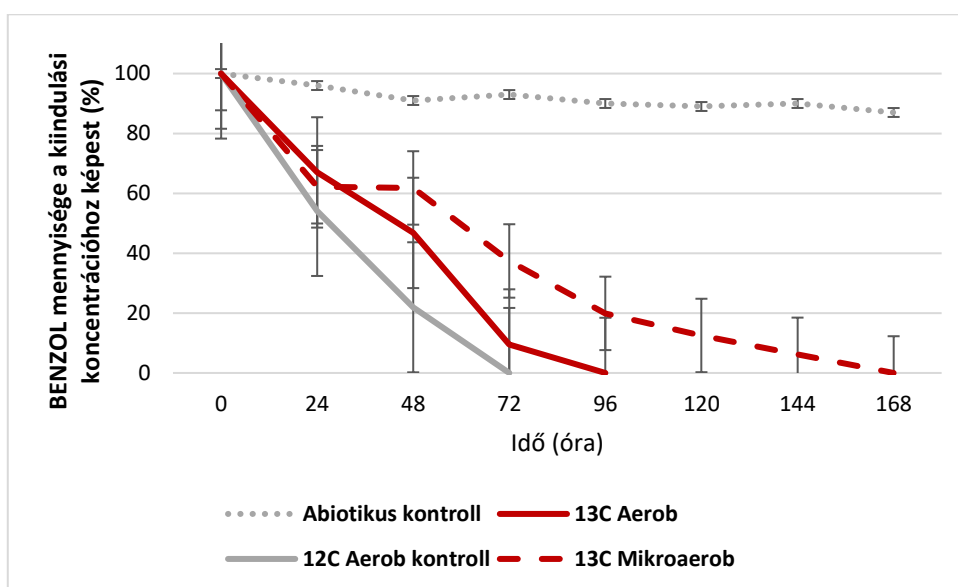
**I. tézis:** A kizárólag benzolt és a benzol dominanciája mellett toluol, etil-benzol és xilolok keverékét is tartalmazó 5 hetes, hetente átoltott mikroaerob dúsítótenyészetek vizsgálata rámutatott arra, hogy a *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó baktériumok a kevert aromás szénhidrogének jelenlétében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

Az eredmények egy részét az alábbi publikációban adtuk közre:

**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.

## 4.2. Aerob és mikroaerob benzollebontó mikrobaközösségek elemzése, benzol biodegradációs hatékonysága és a lebontásban szerep játszó tagok azonosítása stabil izotópos (SIP) módszerrel

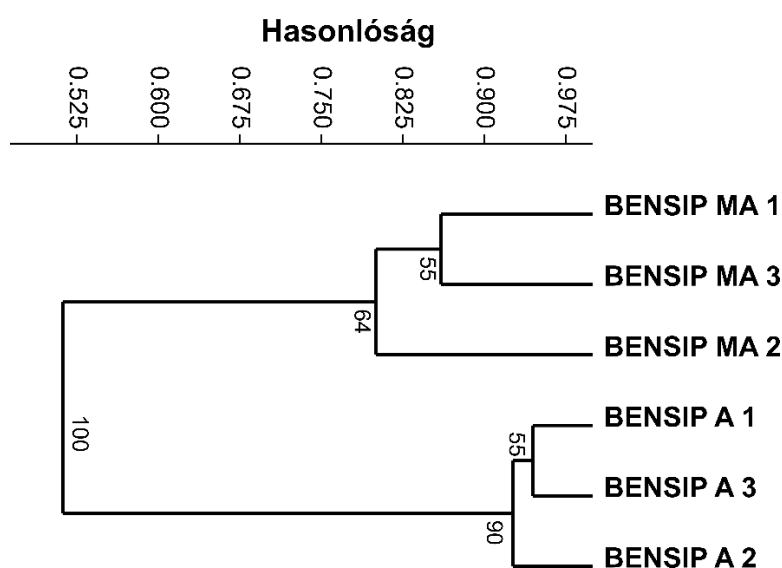
A 4.1. fejezet alapján arról kaphattunk képet, hogy mikroaerob körülmények között a benzol, mint egyedüli szén-és energiaforrás, illetve a benzolhoz kevert egyéb monoaromás szénhidrogének elegye hogyan befolyásolja a közösség alakulását 5 hét dúsítás során. Ezzel szemben a 4.2.-es fejezetben leírt DNS alapú stabil izotópos vizsgálat eredményei arról szolgálnak információval, hogy aerob, illetve mikroaerob körülményeknek kitéve a mikroorganizmusok a benzollebontó mikrokozmoszokban egy hét leforgása alatt milyen szerepet töltenek be és a közösség mely tagjai képesek ténylegesen metabolizálni a benzolt, mint szennyezőt. A kérdéseink megválaszolása érdekében mind a hat szénatomon jelölt benzolt tartalmazó aerob és mikroaerob mikrokozmoszokat állítottunk össze a siklói aromás vegyületekkel szennyezett terület talajvízüledék mintájának (3.1. fejezet) felhasználásával az *Anyag és módszer* fejezet vonatkozó részeiben ismertetett módon (3.11. fejezet). Kontrollként jelöletlen benzolt tartalmazó aerob mikrokozmoszok szolgáltak. A 11. ábrán GC-MS segítségével nyomon követett benzol fogyása látható az egyes mikrokozmoszokban.



11. ábra: GC-MS-el detektált benzol-koncentráció csökkenés a mikrokozmoszokban (a 12C az izotóposan nem jelölt, a 13C minden szénatomon jelölt benzolt jelöl). Abiotikus kontrollként aerob, jelöletlen benzolt tartalmazó mikrokozmoszokat használtunk.

Aerob körülmények között 96 óra eltelte után a hozzáadott teljes mennyiségű (100 µL/L) benzol elfogyott (az aerob kontrollhoz hasonlóan 72 óra után már a kiindulási koncentráció 20% alá csökkent), míg mikroaerob körülmények között egy hét volt a teljes lebontáshoz szükséges idő, mely után a biomasszát a mikrokozmoszok centrifugálásával nyertük ki.

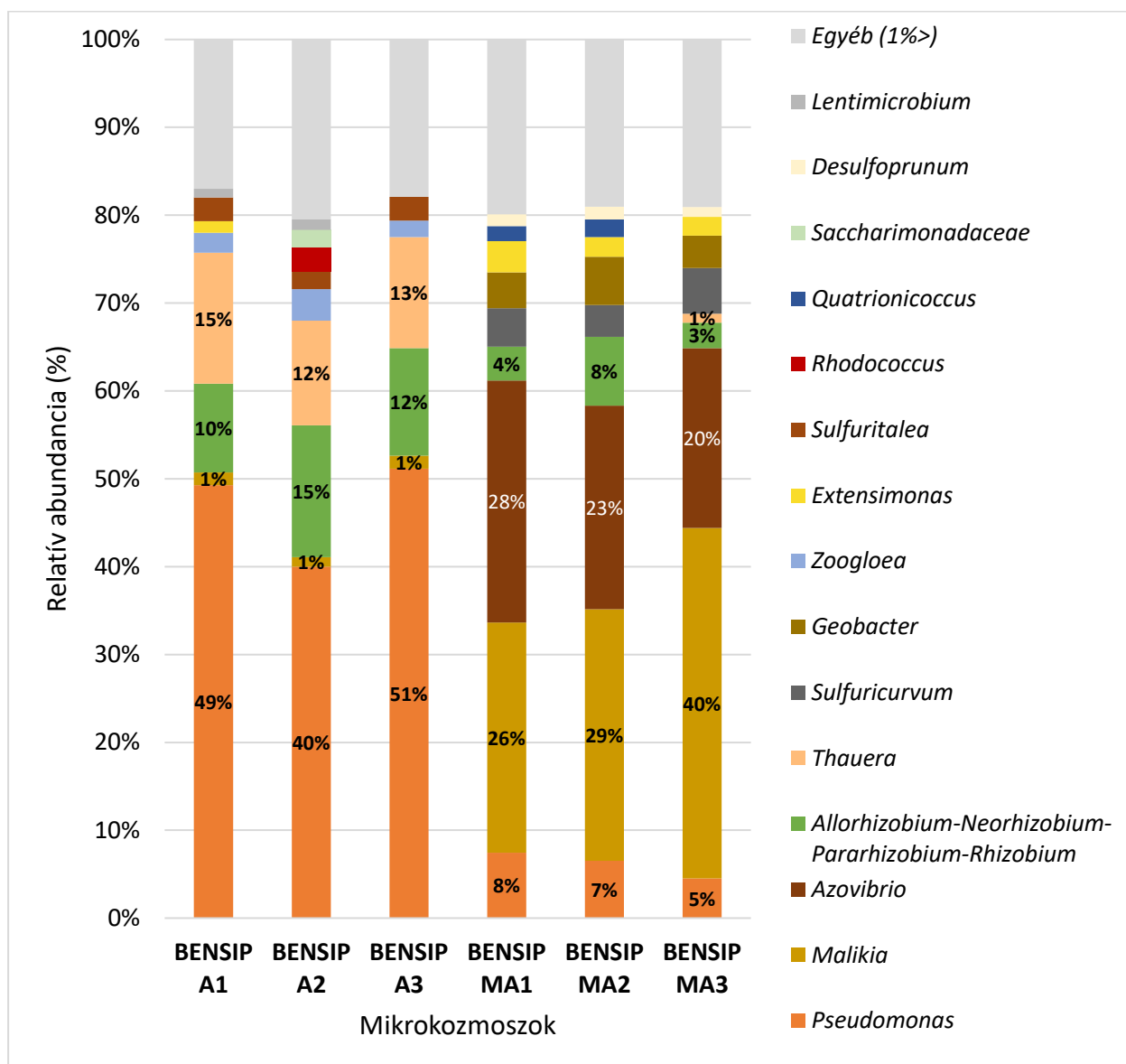
A minták párhuzamosságáról T-RFLP analízissel győződünk meg, majd Bray-Curtis hasonlósági indexet alkalmazva hasonlósági dendogramot készítettünk (12. ábra), mely alapján a mikroaerob és az aerob mikrokozmoszokban felszaporodott közösség összetétele jól elkülönült egymástól és a párhuzamos minták nagy mértékű hasonlóságot mutattak egymással.



12. ábra: A stabilizotóposan jelölt mikrokozmoszok párhuzamos mintáiból készített 16S rDNS alapú T-RFLP klaszteranalízise Bray-Curtis hasonlósági index alapján. Jelölések: **BENSIP**-benzol tartalmú stabil izotóposan jelölt mikrokozmoszok; **MA** – mikroaerob; **A**- aerob.

#### 4.2.1. A benzollebontó aerob és mikroaerob mikrokozmoszok mikrobaközösségeinek összetétele 16S rDNS amplikon szekvenálás alapján

A mintákból kivont DNS-ből még azok sűrűség szerint történő elválasztása előtt amplikonszekvenálást végeztünk (13. ábra). 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. 2022b, Brown et al. 2017, Li et al. 2022).



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

A *Thauera* nemzetség számos tagja képes aromás vegyületek szénforrásként történő hasznosítására aerob és anaerob körülmények között is, a BTEX vegyületek közül főként a toluol, *m*-xilol és etil-benzol oxigénlimitált körülmények között történő lebontására képesek a nemzetség tagjai (Anders et al. 1995, Rabus és Widdel 1995, Song et al. 2001, Mechichi et al. 2002, Mao et al. 2010). Az OTU-k a *Thaurea aminoaromatica* fajjal mutatták a legközelebbi rokonságot (99,4%-os 16S rRNS szekvenciahasonlósággal) az általunk vizsgált mikrokozmoszokban, amelyet

aromás vegyületeket lebontó baktériumként írtak le Mechichi és munkatársai (2002). A tanulmány szerint a baktérium anoxikus körülmények között bontotta a toluolt, azonban a benzol és etil-benzol degradálására nem volt képes.

A *Rhizobium* nemzetséget főként a *R. alarii* és az *R. mesosinicum* törzsekkel legközelebbi rokonságban álló OTU képviselte a mikrokozmoszainkban 98,9% és 99,1%-os 16S rRNS génszekvencia hasonlósággal. A *Rhizobium*-ok viszonylag nagyszámú előfordulása egy benzolbontó közösségben ugyan nem szokványos, azonban a közelmúltban kerül leírásra egy aromás vegyületeket, többek között benzolt is bontó faj, a *R. cremeum* (Yang et al. 2022).

Valamennyi aerob mikrokozmoszban kevésbé jelentős közösségalkotó tagként voltak jelen a *Zoogloea* (2-3%), a *Sulfuritalea* (~2%) és a *Malikia* (~1,5%) nemzetség tagjai. Egy korábbi tanulmányban egy aerob benzolbontó mikrobaközösség stabil izotópos (SIP) elemzése kimutatta, hogy a *Zoogloea* nemzetségbe tartozó baktériumok képesek a benzolt szénforrásként hasznosítani és jelentős közösségalkotó tagok ilyen környezetben (Jechalke et al. 2013). Táncsics és munkatársai (2018) stabil izotópos eredményei alapján pedig a szénhidrogénnel szennyezett talajvízből izolált *Zoogloea oleivorans* jelentős toluol lebontó fajként tartják számon mikroaerob körülmények között, melyet egyéb szakirodalmi források is megerősítettek (Bradford et al. 2018, Farkas et al. 2015). A *Sulfuritalea* nemzetség tagjai szintén gyakoriak a szénhidrogénnel szennyezett helyeken és bizonyítottan képesek benzol és egyéb aromás vegyületek lebontására (Sperfeld et al. 2018, 2019, Keller et al. 2018). Ezen kívül az aerob mikrokozmoszok közül kettőben a *Lentimicrobium* tagjai is megjelentek, melyeket aromás vegyületekkel, illetve olajszennyezésekkel korábban nem hoztak összefüggésbe, azonban domináns nemzetséggént jelent meg egy szennyvíz anaerob lebontását szolgáló iszaptakaróban (Yang et al. 2018). Az egyik aerob mikrokozmoszban emellett a *Rhodococcus* nemzetség jelenlétét is megfigyeltük viszonylag magas (3%) abundanciával.

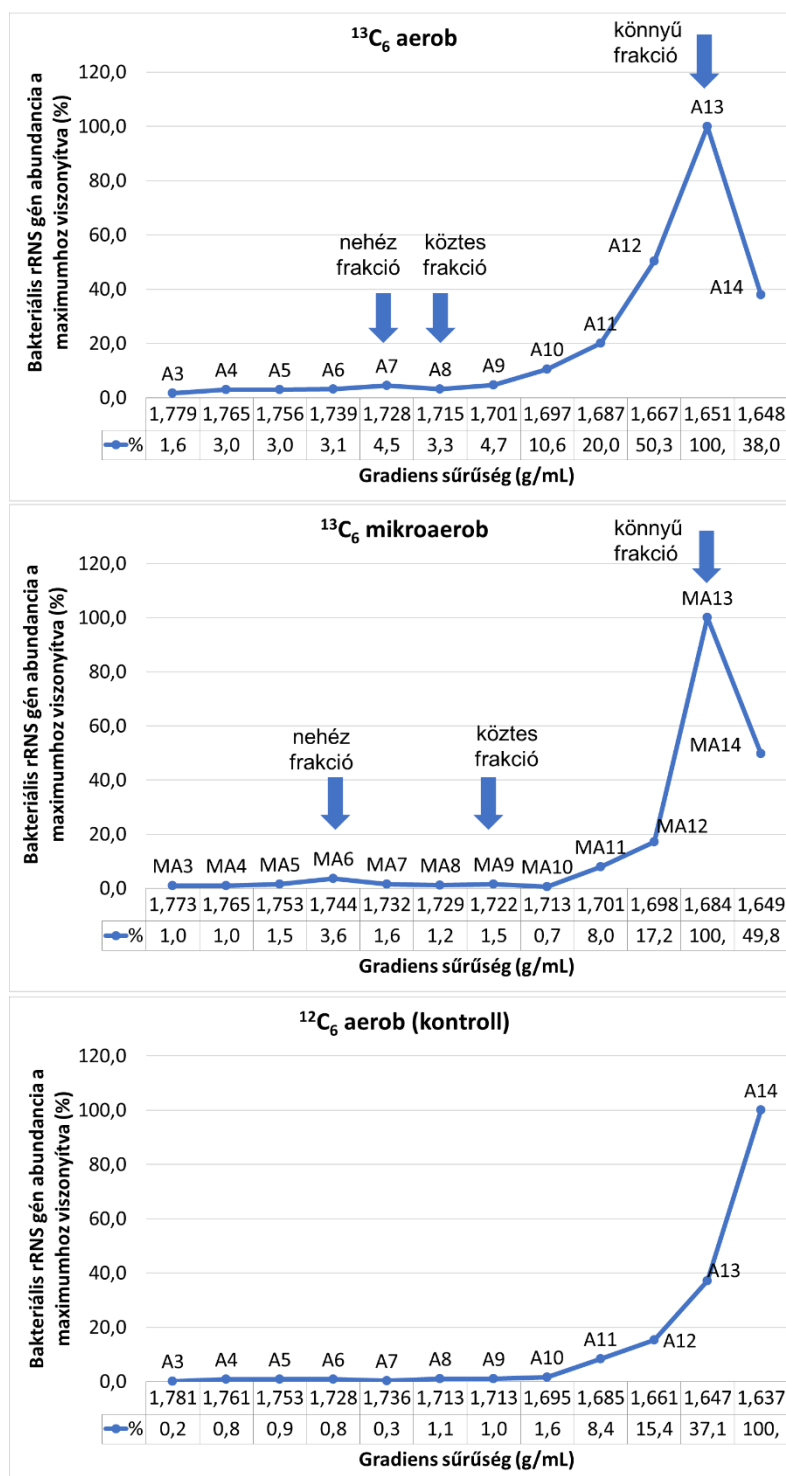
A mikroaerob mikrokozmoszok esetében a *Malikia* (26-40%) és *Azovibrio* (20-28%) nemzetség tagjai uralták a közösséget. A *Malikia* nemzetség képviselői gyakran jelentős mennyiségben mutathatók ki aromás szénhidrogénnel szennyezett környezetben és domináns tagjai a BTEX-tartalmú dúsítótenyészeteknek, valamint jelentős benzolbontók (Aburto és Ball 2009, Táncsics et al. 2010, Benedek et al. 2018). A *Malikia* nemzetséget képviselő OTU a *M. spinosa* törzssel állt legközelebbi rokonságban (99,6%-os 16S rRNS szekvenciahasonlósággal), mely típustörzsét eredetileg édesvízből izolálták (Leifson 1962), azonban már korábban bebizonyosodott, hogy ez a baktérium képes az aromás szénhidrogének lebontására, és kiemelkedő szerepet játszhat az aerob benzolbontásban (Révész et al. 2020a). 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, ugyanis mindössze egy, a tudomány számára ismert, nitrogén fixáló tulajdonságú faj izolálása történt meg eddig egy gomba szkleróciumról és az elmúlt több, mint húsz évben nem került sor újabb fajleírásra (Reinhold-Hurek és Hurek 2000). Egy indiai (guaháti) kőolajfinomító szénhidrogéntartalmú iszapjának baktériumközösségét vizsgálva azonban az *Azovibrio* nemzetség is előkerült, kiváltképp a nitráttal dúsított mikrokozmoszok közösségeit dominálta (Sarkar et al. 2016). Táncsics és munkatársai (2023) pedig sikeresen azonosították az *A. restrictus* fajt egy mikroaerob xilol-bontó dúsítótenyészetben, melyben a *Rhodoferrax* nemzetséggel feltételezhetően hasonló ökológiai niche-t töltöttek be. Az azonosított *Azovibrio* rokon baktérium metaganom elemzése alapján rendelkezett katekol-2,3-dioxigenáz enzimmel egy többkomponensű fenol hidroxiláz (mPH) kódoló génklaszter részeként (Táncsics et al. 2024). 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 (Abbas et al. 2019). 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.

Az is megfigyelhető volt, hogy a *Pseudomonas* nemzetség abundanciája jelentősen csökkent az aerob mikrokozmoszokhoz képest és a mikroaerob közösségek kevésbé jelentős szereplőjévé vált. Az abundancia csökkenés hátterében a *P. aromaticivorans* OTU jelentős redukálódása állhat, mely mindössze 0,5-1% -ot ért el a mikroaerob közegben az aerobban tapasztalt 35-45%-hoz képest. Ezzel szemben a többi, *P. stutzeri* fajkomplexhez tartozó OTU abundanciája 4-6% között maradt. A *Rhizobium*-ok abundanciája is csökkent kis mértékben, a mikroaerob mikrokozmoszokban 3-8%-os relatív gyakorisággal sikerült azonosítani a nemzetséget. A mikroaerob mikrokozmoszok további, kisebb mennyiségben jelenlévő közösségalkotó tagjai a *Geobacter* (4-6%), a *Sulfuricurvum* (4-5%), a *Quatrionicoccus* (2%), az *Extensimonas* (2-3%) és a *Desulfoprimum* (1%) nemzetségek voltak, melyek szintén gyakran fordulnak elő kőolajjal szennyezett területeken, ahol részt vehetnek az aromás vegyületek oxigénszegény környezetben történő lebontásában, azonban az aromás szénhidrogénekkal szennyezett felszín alatti környezetek baktériumközösségeiben betöltött konkrét szerepe nem minden felsorolt nemzetségnek tisztázott (Coates et al. 1996, Sheng et al. 2016, Farkas et al. 2017, Táncsics et al. 2018, Bradford et al. 2018, Wu et al. 2022), például az *Extensimonas* nemzetség esetében csak néhány tanulmány készült a szénhidrogén-lebontásban való részvételükről (Zhang et al. 2013a, Gauchotte-Lindsay et al. 2019, Wang et al. 2021). Az *Extensimonas*-hoz köthető OTU bár az egyik aerob mikrokozmoszban is megjelent, főként a mikroaerob dúsítások közösségében volt számottevő a jelenléte.

#### 4.2.2. A mikrobaközösségek alakulása a könnyű és a nehéz DNS frakciókban

A DNS mintákat ezt követően sűrűség szerint ultracentrifugálással választottuk el, majd az egyes frakciók 16S rDNS kópiaszámát qPCR segítségével határoztuk meg (3.11.4. fejezet), mely alapján következtettünk arra, hogy mely frakciók tartalmazzák a jelölt és a jelöletlen DNS-t (14. ábra). A nehéz frakció tartalmazza a közösség azon tagjainak DNS-ét, melyek a metabolizmus során az izotóposan jelölt benzolt beépítették a DNS-láncba. A 14. ábrán egy jelöletlen benzolt tartalmazó aerob kontroll, illetve az izotóposan jelölt benzol tartalmú aerob és mikroaerob mikrokozmoszokból elválasztott frakciók qPCR eredményei láthatók. Aerob kontrollként a jelöletlen benzolt tartalmazó kísérlet eredménye szolgált, mely esetében jól látszik, hogy minden DNS a könnyű frakciókban oszlik meg (A10-14), míg a jelölt benzolt tartalmazó kísérletek esetében megkülönböztettünk a könnyű (A10-A14, MA11-MA14) mellett nehéz frakciókat (A7, MA6), valamint köztes frakciókat (A8, MA7-MA10) is a 16S rDNS kópiaszáma, illetve a sűrűség értékek alapján. A 14. ábrák grafikonjainak x tengelyén a frakciók elválasztását követően mért gradiens sűrűség értékek (g/mL) láthatók. Ez alapján 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). A frakciók besorolása is a bakteriális 16S rRNS gén frakciókban megjelenő kópiaszáma alapján történt, azaz a nehéz frakció az első megjelenő csúcs volt. Egyértelműen nehéz volt elkülöníteni a köztes frakciókat, azonban mégis azokat soroltuk ide, mely esetében a nehéz frakció csúcsa után csökkent a 16S rRNS gén abundanciája és még nem kezdett újra növekedni. Ez az aerob jelölt benzolt tartalmazó frakciók esetében egyértelműen csak az A8 számú frakció, ugyanis az A9 esetében ismét növekedést tapasztaltunk, de még nem soroltuk a könnyűbe. A mikroaerob jelölt benzolt tartalmazók esetében pedig az MA7-MA10 közöttieket mind köztes frakciónak tekintettük. Az A10-14 (aerob jelölt benzolos) és az MA11-14 (mikroaerob jelölt benzolos) frakciókat a könnyűbe soroltuk, ugyanis a 16S rRNS gén kópiaszáma újból növekedni kezdett ezek esetében. Az 1-2-es, valamint a 15-18-as frakciókat kizártuk a további vizsgálatokból miután ellenőriztük azok DNS tartalmát. Nekünk első sorban a nehéz és a könnyű frakciók csúcsaira volt szükségünk, mely a kizárt frakciókba még nem, vagy már nem tartozott bele egyértelműen. A grafikonokon az egyes frakciókban lévő bakteriális 16S rRNS gén kópiaszámának abundanciáját a maximumhoz, azaz a könnyű frakcióhoz viszonyítottuk, melyet 100%-nak tekintettünk. Ez az ábrázolási forma a frakciók egymáshoz viszonyított arányát jobban tükrözi, mint az össz-bakteriális 16S rRNS gén kópiaszámhoz képest meghatározott csúcsok.

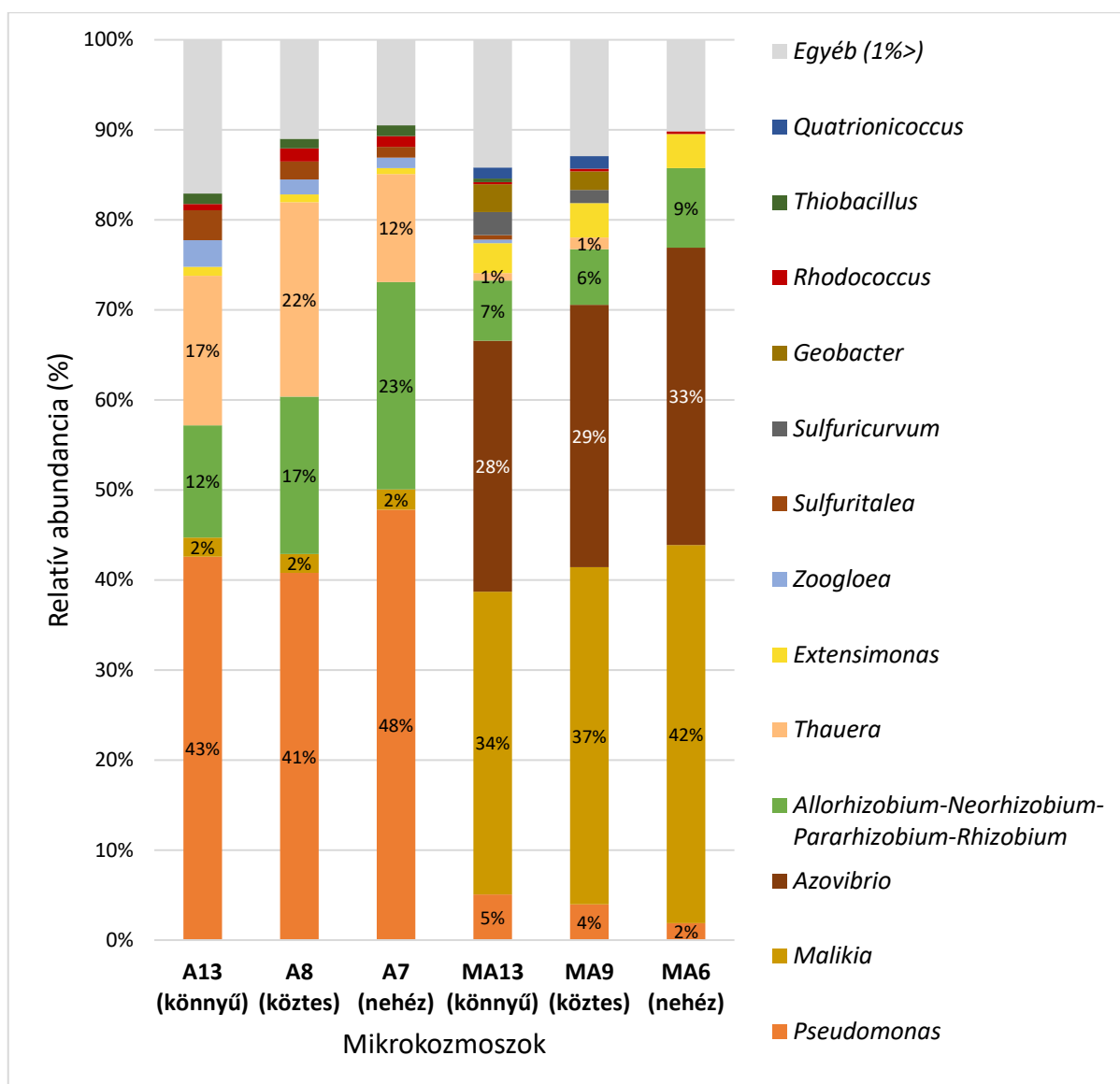


14. ábra: A sűrűség szerint elválasztott frakciók, valamint a könnyű és a nehéz DNS csúcsok elkülönítése a 16S rRNS gén abundanciája alapján. A frakciók (A- aerob frakciók, MA- mikroaerob frakciók) számozása 3-tól 14-ig tart (az 1-2-es, valamint a 15-18-as frakciók ki lettek zárva a további vizsgálatokból). 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 a 15. ábrán látható. 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* nemzetségről, hogy az aerob benzolbontásban fontos szerepet tölt be, e nemzetség esetében érdemes faj szinten is megvizsgálni, hogy melyekre vonatkozik pontosan a mennyiségi gyarapodás. A *P. aromaticivorans* OTU esetében a könnyű frakcióban megfigyelt 36,8%-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 kapott eredmények alapján a *P. aromaticivorans* baktériumfaj egyértelműen kiemelkedő benzolbontóként azonosítható aerob körülmények között. Ugyanakkor azt is megfigyeltük, hogy ez az OTU a mikroaerob mikrokozmoszok nehéz DNS-frakciójában igen csekély mértékben volt csak kimutatható, mindössze 0,15%-os abundanciát ért el, annak ellenére, hogy a *P. aromaticivorans* MAP12<sup>T</sup> törzset mikroaerob benzolbontóként írták le (Banerjee et al. 2022b). Ezek alapján feltételezhető az, hogy ha egy baktérium tiszta kultúrában mikroaerob körülmények között képes is lebontani az aromás vegyületeket, nem jelenti azt, hogy egy baktériumközösség tagjaként is versenyképes mikroaerob lebontóként működik. További érdekes megfigyelés volt, hogy a *Thauera* nemzetséghez tartozó baktériumok mennyisége csökkent az aerob nehéz DNS-frakcióban (12%) a könnyű DNS-frakcióhoz képest (17%), ezzel szemben a köztes frakcióban lényegesen nagyobb volt az abundanciája (22%), akárcsak a *Rhodococcus* nemzetségnek, mely legnagyobb mennyiségben (1,5%) szintén az A8-as köztes frakcióban volt jelen. Hasonló jelenséget figyeltek meg korábban egy mikroaerob, <sup>13</sup>C<sub>7</sub>-toluol lebontó dúsító közösség esetében, ahol egy aromás vegyületeket lebontó *Rhodoferrax* baktérium DNS-e elsősorban köztes DNS-frakciókban volt megtalálható (Táncsics et al. 2018). 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 szén-izotóposan jelölt szénforrást.

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%).



15. 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.

A mikroaerob mikrokozmoszok kevésbé domináns közösségalkotó tagjai közül a *Rhizobium*-ok mennyisége kis mértékben feldúsult a könnyűhöz képest a nehéz DNS-frakcióban (7%-ról 9%-ra), hasonlóan az *Extensimonas* nemzetséget képviselő OTU DNS-éhez (3%-ról 4%-ra). Ezek alapján feltételezhető, hogy a *Rhizobium* nemzetséghez tartozó baktériumok kisebb mértékben ugyan, de szerepet játszhatnak a benzolbontásban mikroaerob körülmények között is. Az *Extensimonas* esetében a feldúsulás nem volt számottevő (1%-os eltérés), így egyértelműen nem igazolódott a benzolbontásban betöltött szerepe.

A *Sulfuricurvum kujiense* fajjal rokon baktérium DNS-ét csak a könnyű DNS-frakcióban mutattuk ki, mely eredmény nem meglepő, ugyanis ezt a fajt fakultatív anaerob, kemolitotróf, kénoxidáló baktériumként írták le, amelyet először egy földalatti kőolajtárolóból izoláltak (Kodama és Watanabe 2004). A *Geobacter* szintén csak a könnyű DNS-frakcióban volt kimutatható. Annak ellenére, hogy *Geobacter* nemzetségbe tartozó obligát anaerob baktériumok némelyike képes anaerob módon lebontani a toluolt és a benzolt (Kunapuli et al. 2010, Zhang et al. 2013b), eredményeink alapján tehát nincs szerepük a benzol mikroaerob lebontásában. A korábbiakhoz hasonlóan a *Quatrionicoccus*, a *Thaurea* és a *Sulfuritalea* nemzetségeket is csak a könnyű frakcióban azonosítottuk 1%-os abundanciával, míg a nehéz DNS-frakcióban nem voltak jelen, emiatt feltételezhető, hogy vagy nem vesznek részt a benzollebontásban, vagy mikroaerob körülmények között marginális a szerepük benne. A *Thauera* nemzetséget képviselő *T. aminoaromatica* faj esetében (99,4%-os 16S rRNS szekvenciahasonlóság) ez nem meglepő eredmény, mivel korábbi vizsgálatok alapján anoxikus körülmények között csak a toluolt bontotta, azonban a benzolt és etil-benzolt nem (Mechichi et al. 2002). A siklósi kárhelyről származó talajvízüledék korábbi stabilizotópos vizsgálata során egy *Quatrionicoccus* nemzetségbeli baktérium, mint jelentős mikroaerob toluol-lebontásra képes mikroszervezet lett azonosítva (Táncsics et al. 2018). Eredményeink alapján azonban a benzol mikroaerob körülmények közötti lebontásában a baktérium feltehetőleg nem vesz részt. A *Sulfuritalea* esetében főként aerob benzollebontásra van példa a szakirodalom alapján (Kim et al. 2020), ugyanakkor aromás vegyületek anaerob lebontására is képesek lehetnek (Keller et al. 2018, Kojima et al. 2011). A jelen kísérletben legnagyobb mennyiségben az aerob mikrokozmoszok könnyű frakciójában mutattuk ki a jelenlétét (3%), mely alapján a nemzetség aerob benzollebontásban betöltött szerepe nem igazolódott be egyértelműen. A mikroaerob mikrokozmoszok esetében a kiválasztott MA9-es köztes frakcióban nem tapasztaltunk egyik taxon esetében sem jelentős feldúsulást, valóban köztes frakcióként működött, a *Malikia* és az *Azovibrio* abundancia értéke a könnyű és a nehéz frakció között helyezkedett el. Egyedül a *Rhizobium* nemzetség mutatott kis mértékű csökkenést a könnyű frakcióhoz képest, majd növekedést a nehéz frakcióban, azonban ez az érték 1%-on belüli eltérést jelentett, így lényegében megegyezett a könnyű frakció értékével.

### Új tudományos eredmény a 4.2. fejezet alapján:

**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.

Az eredményeket az alábbi publikációban ismertettük:

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.

### 4.3. Új aromás szénhidrogén lebontásra képes baktériumfajok leírása

Ebben a fejezetben három új baktériumfaj leírásához szükséges vizsgálatok eredményét mutatom be, melyek közül két törzset, az *Ideonella* sp. B7<sup>T</sup> és a *Pinisolibacter* sp. B13<sup>T</sup> törzseket a siklói kárhelyről származó talajvízüledékből létrehozott mikroaerob benzolbontó dúsítótenyészetek ötödik heti egyesített mintáiból izoláltuk. A harmadik törzs, az *Acidovorax* sp. D2M1<sup>T</sup>, melyet Banerjee és munkatársai (2022a) vontak tenyésztésbe egy *meta*-xilolbontó dúsítótenyészetből, melyet szintén a siklói kárhelyről származó mintából állítottak össze.

#### 4.3.1. *Pinisolibacter aquiterrae* B13<sup>T</sup> törzs jellemzése és új fajként történő leírása

A *Pinisolibacter aquiterrae* faj, mivel nemzetségének mindössze második képviselője, ezért nem csak a *Pinisolibacter* sp. B13<sup>T</sup> törzs jellemzésén keresztül kerül leírásra, hanem két azonos fajhoz tartozó izolátumon elvégzett kísérletek által mutatjuk be a fajt. A B13<sup>T</sup> 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 dúsítótenyészetből, melyhez a mintát 2019 októberében gyűjtöttük Siklósról. A dúsítótenyészetet a 3.2. fejezet alapján állítottuk össze azzal az egy különbséggel, hogy ez esetben benzol helyett a *xilol*-vegyületek szolgáltak szén-, és energiaforrásként.

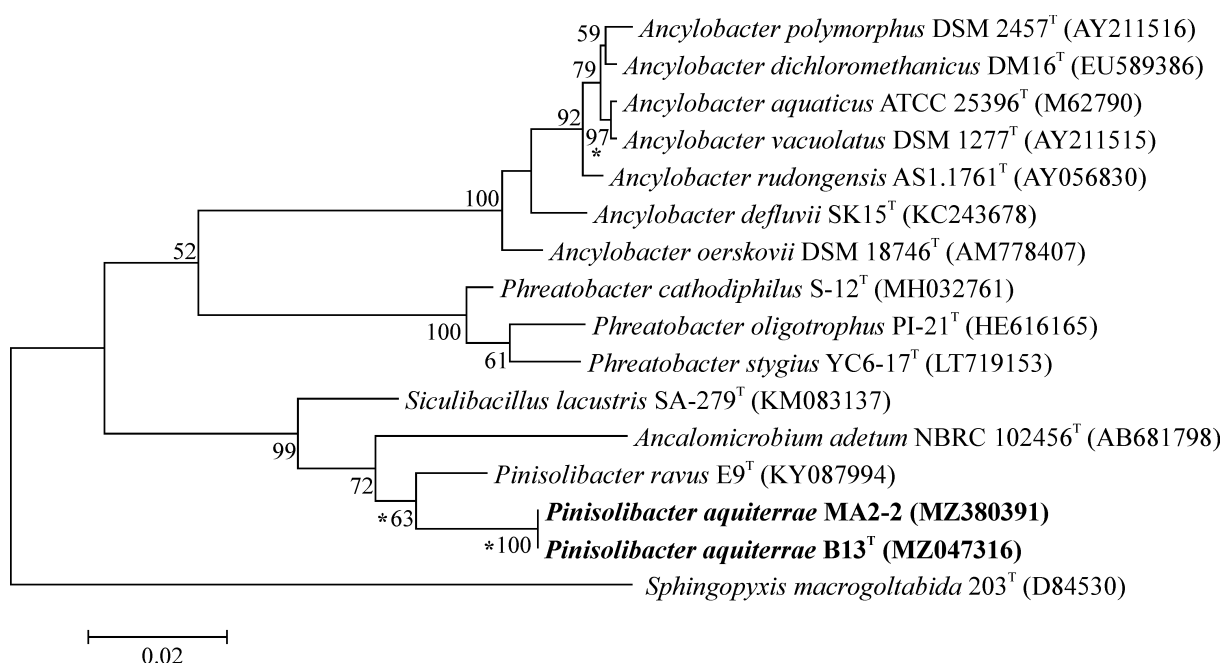
##### 4.3.1.1. A *Pinisolibacter* nemzetség jellemzése

Az *Ancalomicrobiaceae* családba sorolt (*Hyphomicrobiales*; szinonimája: *Rhizobiales*) *Pinisolibacter* nemzetség a közelmúltban került leírásra Dahal és munkatársai által (2018b). A családba jelenleg három nemzetséget sorolunk: a *Pinisolibacter*-t, az *Ancalomicrobium*-ot és a *Siculibacillus*-t, melyekbe tartozó baktériumok korábban többek között fenyőerdő talajából és édesvízi környezetből kerültek izolálásra (Staley 1968, Dahal et al. 2018b, Felföldi et al. 2019). A *Hyphomicrobiales* rend tagjai kozmopolita elterjedésűek, fenotípusosan, ökológiailag és metabolikusan is heterogén, Gram-negatív baktériumok. Közös jellemzőjük a viszonylag magas G+C tartalom (68,4-70,4 mol%), a C<sub>18:1ω7c</sub>/C<sub>18:1ω6c</sub> zsírsav dominanciája és a Q10 fő légzési kinon jelenléte (Staley 1968, Dahal et al. 2018b, Felföldi et al. 2019, Carvalho et al. 2010). A *Hyphomicrobiales* rend tagjai különböző ökológiai fülkéket töltenek be az ökoszisztémákban, ugyanis amellet, hogy számos képviselőjük ismert arról, hogy a hüvelyes növényekkel szimbiózisban élve megkötik a nitrogént (Wiegel et al. 1978, Im et al. 2006, Noh et al. 2019), különböző növényi és állati patogének is előfordulnak közöttük (Kuykendall 2005). Ezen kívül számos faj megtalálható kőolaj-szénhidrogénnel szennyezett területek baktériumközösségeiben, emellett néhányuk potenciális szénhidrogén-lebontó fajként is ismert (Abassian et al. 2016, Subhash et al. 2016, Tirandaz et al. 2015, Ryu et al. 2008). Ezzel szemben az *Ancalomicrobiaceae*

család szerepéről korábban nem számoltak be kőolajszennyezett területek természetes közösségeiben.

#### 4.3.1.2. A B13<sup>T</sup> és MA2-2 törzsek filogenetikai elhelyezkedése és genomelemzése

A B13<sup>T</sup> és az MA2-2 törzsek a16S rRNS génszekvenciák alapján 99,93%-os egyezést mutattak és a két törzs 16S rRNS gén alapú filogenetikai elemzése alapján a *Pinisolibacter* nemzetségen belül különálló filogenetikai leszármazási vonalat alkotnak (16. ábra; mellékletek 8.2.1. és 8.2.2. ábra). A 16S rRNS génszekvenciák összehasonlító elemzése szerint a B13<sup>T</sup> és az MA2-2 törzsek a *Pinisolibacter ravus* E9<sup>T</sup> (97,4%), a *Siculibacillus lacustris* SA-279<sup>T</sup> (96,3%) és az *Ancalomicrobium adetum* NBRC 102456<sup>T</sup> (94,05%) törzsekkel állnak a legközelebbi rokonságban, melyekkel egy leszármazási ágon klasztereződtek.



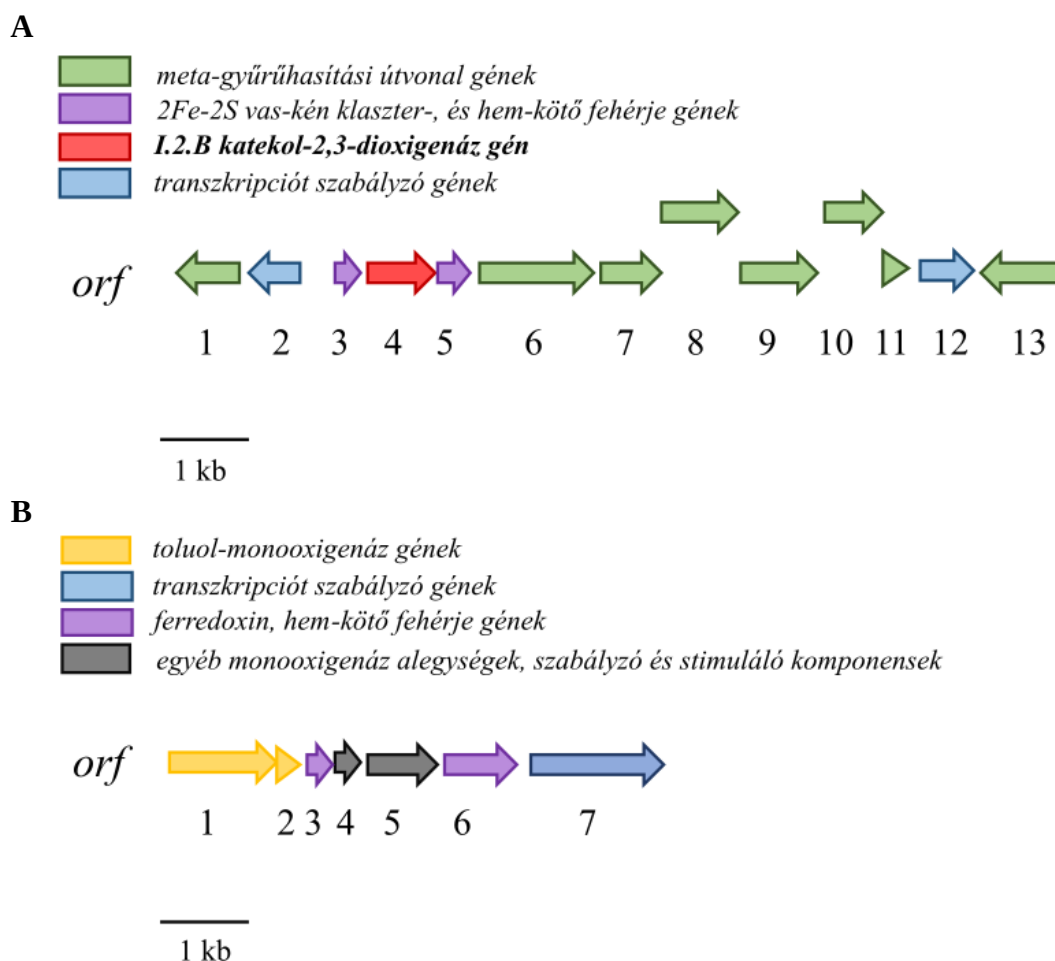
16. ábra: 16S rRNS génszekvenciák alapján létrehozott maximum likelihood filogenetikai fa, amely a B13<sup>T</sup> törzs és legközelebbi rokonai közötti filogenetikai kapcsolatokat mutatja. A Bootstrap értékek százalékos értéke 1000 ismételten alapján kalkuláltak. A csillaggal jelölt ágak minden törzsfalkotó algoritmus (NJ, MP, ML) esetében megegyeztek.

A B13<sup>T</sup> és MA2-2 törzsek teljes genom elemzése során a MiGA pipeline magas teljességi és alacsony kontaminációs értéket mutatott, ami alapján a genom kiváló minőségűnek bizonyult. A B13<sup>T</sup> genomjának teljes hossza 4,91 Mbp, míg az MA2-2 törzsé 4,82 Mbp volt. A magas dDDH és OrthoANI értékek (99,8% illetve 99,5%) a B13<sup>T</sup> és MA2-2 törzsek genomjai között megerősítették, hogy azonos fajhoz tartoznak. A B13<sup>T</sup> törzs genomiális DNS-ének G+C tartalma

68,8 mol% volt. A 16S rRNS gént egyetlen példányban találták meg a B13<sup>T</sup> törzs genomjában. Mivel a *Pinisolibacter ravus* E9<sup>T</sup> teljes genom szekvenciája nem állt rendelkezésünkre, ezért a B13<sup>T</sup> és a *S. lacustris* SA-279<sup>T</sup> törzs teljes genomjának összehasonlító elemzését végeztük el, mely alapján a törzsek közötti dDDH érték 21,6%, az OrthoANI érték pedig 78,5% volt, mely jóval a fajelkülönítés során figyelembe vett küszöbértékek (a dDDH esetében 70%, az OrthoANI esetében 95-96%) alatt volt (Chun et al. 2018). A 16S rRNS génszekvencia hasonlósága a B13<sup>T</sup> törzs és a *Pinisolibacter ravus* E9<sup>T</sup> között 97,4% volt, amely jóval alacsonyabb, mint a teljes genom alapú küszöbértékekkel párba állított és a 16S rRNS gén erős konzerváltsága miatt ajánlott 98,5%-98,7%-os küszöbérték (Kim et al. 2014, Yarza et al. 2014, Rodriguez et al. 2018b). Emiatt feltételezhető, hogy a dDDH és az OrthoANI értékek is a küszöbértékek alatt maradnának a két törzs egy esetleges teljes genom alapú összehasonlítása során.

A B13<sup>T</sup> törzs CLC Genomics Workbench programmal végzett teljes genom analízise alapján rendelkezik a monoaromás szénhidrogének lebontásához szükséges genetikai háttérrel. Egy részleges *meta*-gyűrűhasítási útvonalat kódoló génklaszter részeként sikerült azonosítani az I.2.B-típusú katekol-2,3-dioxigenáz (C23O) gént (17. A ábra), mellyel legnagyobb szekvenciahasonlóságot mutató dioxigenázt (80%) egy *Methylocella tundrae* izolátumban (MTUNDRAET4, fehérjeazonosító: VFU10778) találtuk meg. Ez alapján feltételezhető, hogy a C23O gén jelenléte széles körben elterjedt a *Hyphomicrobiales* rend tagjai között, és nem korlátozódik a *Rhizobiaceae* család tagjaira. 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 génklasztert is találtunk a genomban (17. B ábra), amely potenciálisan kiegészítheti a részleges *meta*-gyűrűhasítási útvonalat kódoló génklasztert, és aromás szénhidrogén-lebontó képességet biztosít a B13<sup>T</sup> törzs számára. Érdekes módon ebben a klaszterben a gének a legnagyobb nukleotid szekvencia hasonlóságot (~77–81%-os) a *Burkholderiales* rend baktériumai által kódolt génekkel mutatták, például a *Thauera*, *Burkholderia*, *Hydrogenophaga* és *Ralstonia* nemzetségek tagjaival. A katekol-2,3-dioxigenázt, illetve a toluol-monooxigenázt kódoló génklasztert az MA2-2 törzsben is megtaláltuk, mely teljes mértékben megegyezett a B13<sup>T</sup> törzsben azonosítottal. Ezen kívül a B13<sup>T</sup> és az MA2-2 törzs genomjában is fellelhető az etil-benzol metabolizmus egyik lehetséges kezdeti enzimét kódoló gén, az etil-benzol-dehidrogenáz, mely az etil-benzolt (S)-1-fenil-etanollá oxidálja. Az enzimet egy denitrifikáló *Azoarcus* nemzetségbe tartozó törzsből vonta ki Kniemeyer és Heider (2001), valamint a B13<sup>T</sup> törzsben található enzimet kódoló gén egy *Siculibacillus* sp. (MDK9695398.1) izolátumban található etil-benzol-dehidrogenázzal mutatott viszonylag nagy szekvencia

hasonlóságot (89,27%), mely alapján feltételezhető, hogy a gén széles körben elterjedt az alfa-proteobaktériumok és az *Ancalomicrobiaceae* család tagjai között.

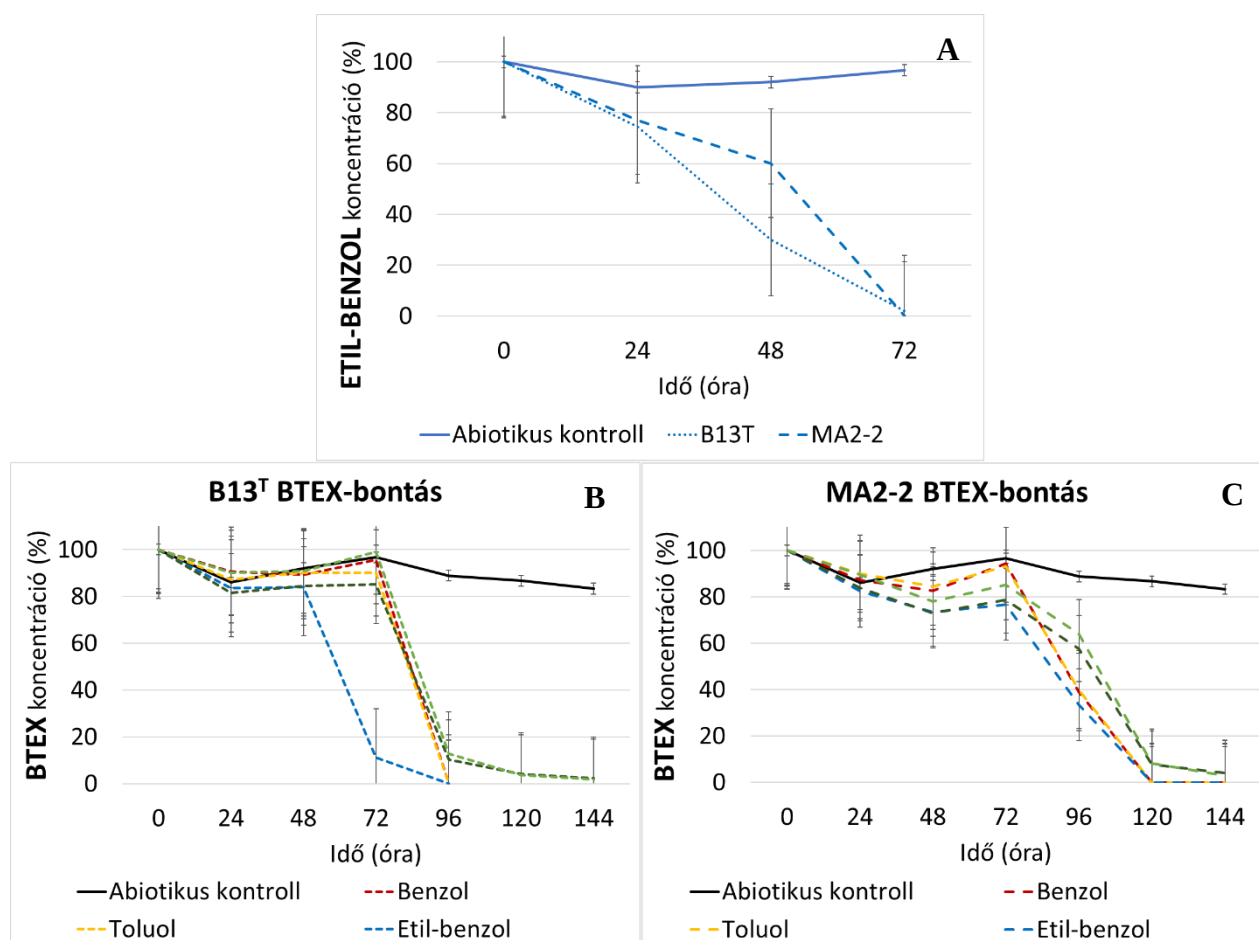


17. ábra: A B13<sup>T</sup> törzs aromás szénhidrogén lebontásban szerepet játszó génjei – **A**: a részleges meta-gyűrűhasítási útvonalat kódoló génklaszter; **B**: toluol-monooxygenáz kódoló génklaszter. A

nyilak a nyitott leolvasási kereteket jelölik (ORF=open reading frame), az irányuk a transzkripció irányát jelzi. A színek pedig az aromás szénhidrogének lebontásában szerepet játszó gének különböző funkcionális csoportjait jelölik. **A ábra** - orf1: alfa/béta hidroláz; orf2: FCD domén-tartalmú DNS-kötő fehérje; orf3: 2Fe-2S vas-kén klaszterkötő domént tartalmazó fehérje; orf4: I.2.B katekol-2,3-dioxigenáz; orf5: hem-kötő fehérje; orf6: 2-hidroximukonsav-félaldehid dehidrogenáz; orf7: fumaril-acetoacetát hidroláz ok családjába tartozó fehérje; orf8: acetaldehid-dehidrogenáz; orf9: 4-hidroxi-2-oxovalerát aldoláz; orf10: fumaril-acetoacetát hidrolázok családjába tartozó fehérje; orf11: 2-hidroximukonsav tautomeráz; orf12: HTH (helix-turn-helix) tartalmú DNS-kötő fehérje; orf13: 3-karboxi-cisz,cisz-mukonsav cikloizomeráz. **B ábra** - orf1: toluol-monooxygenáz; orf2: B családba tartozó toluol-4-monooxygenáz; orf3: ferredoxin; orf4: MmoB/DmpM családba tartozó fehérje; orf5: aromás/alkén monooxygenáz hidroxiláz béta alegység; orf6: 2Fe-2S vas-kén klaszterkötő domént tartalmazó fehérje; orf7: sigma-54 dependens transzkripciók regulátor.

#### 4.3.1.3. A B13<sup>T</sup> és az MA2-2 törzsek aromás szénhidrogén bontó képessége

A genom alapján a törzsek potenciálisan képesek a BTEX vegyületek lebontására, azonban GC-MS-el a B13<sup>T</sup> és MA2-2 törzsek tényleges aromás szénhidrogén bontó képességéről is megbizonyosodtunk. A hat aromás szénhidrogén közül a B13<sup>T</sup> és MA2-2 törzs egyedüli szénforrásként kizárólag az etil-benzolt volt képes hasznosítani (18. A ábra), mely hozzávetőleg 72 óra alatt fogyott el teljesen az üvegekből mindkét törzs esetében. Azonban az összes BTEX vegyület jelenlétében végzett kísérletekben azt tapasztaltuk, hogy valamennyi aromás szénhidrogén bontására képes volt (18. B, C ábra), melynek során feltehetően az aromás vegyületek egymás lebontási hatékonyságát serkentik, illetve közben kometabolikus folyamatok aktiválódtak.

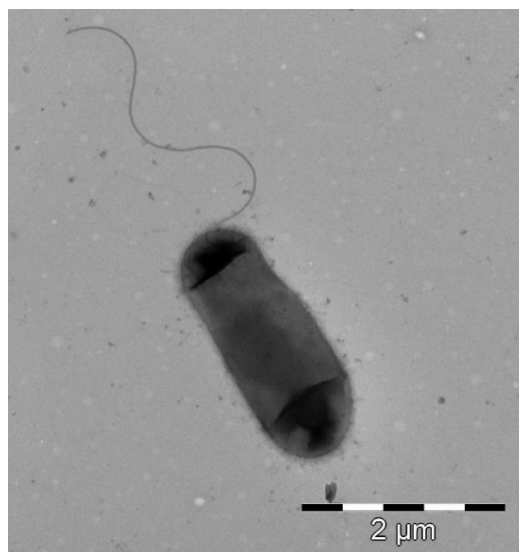


18. ábra: A *Pinisolibacter* sp. B13<sup>T</sup> és MA2-2 törzsek aromás szénhidrogén-bontó képessége a GC-MS vizsgálatok eredménye alapján - **A**: a B13<sup>T</sup> és MA2-2 törzsek etil-benzol bontó képessége; **B**: A B13<sup>T</sup> törzs BTEX-bontó képessége az összes aromás szénhidrogén jelenlétében; **C**: Az MA2-2 törzs BTEX-bontó képessége az összes aromás szénhidrogén jelenlétében.

A B13<sup>T</sup> bontási hatékonysága ebben a kísérletben nagyobbak bizonyult, mint az MA2-2 törzssé, ugyanis az etil-benzolt 72, a benzolt és a toluolt pedig 96 órán belül teljesen felhasználta, melyhez az MA2-2-nek 120 órára volt szüksége. A toluol, benzol és etil-benzol mennyiségének közel azonos ütemben történő csökkenését magyarázza, hogy a toluol és etil-benzol kölcsönösen serkentően hat egymás bontási hatékonyságára, illetve mindkét vegyület fokozza a benzolbontás mértékét is (Dou et al. 2008). A 120 órás mérések idejére valamennyi vegyület koncentrációja minimálisra csökkent, azonban a benzol és a toluol teljes mennyiségének eltűnése után a xilol vegyületek mennyisége nem csökkent tovább, ugyanis a benzol és a toluol jelenlétében tudták csak a törzsek a xilol vegyületeket kometabolikus úton degradálni (Chang et al. 1993, Oh et al. 1994, Littlejohns és Daugulis 2008), ezek hiányában azonban jelentősen lelassult a lebontás és végül meg is állt.

#### **4.3.1.4. Fiziológiai, morfológiai és biokémiai vizsgálatok**

A B13<sup>T</sup> és MA2-2 törzsek Gram-negatív, fehér, kicsi, kerek telepeket hoztak létre 48-72 óra inkubáció után R2A agaron 28°C-on. A 0,8–1,0 µm széles, 2,0–2,5 µm hosszúságú sejtek egyetlen poláris flagellumukkal mozgásra képesnek bizonyultak (19. ábra).



19. ábra: A B13<sup>T</sup> törzs traszmissziós elektronmikroszkópos képe 24 óra inkubáció után R2A táptalajon, 28°C-on (Készítette: Dr. Bóka Károly, Növényyszervezettani Tanszék, ELTE).

A B13<sup>T</sup> és MA2-2 törzsek kemotaxonómiai, biokémiai és fiziológiai tulajdonságainak összehasonlító értékelése a *Pinisolibacter ravus* NBRC 112686<sup>T</sup> referenciatörzsszel nagy hasonlóságot eredményezett. A vizsgálatokat összegző eredményeket a 4. táblázatban látjuk összesítve.

4. táblázat: Az 1. törzs (B13<sup>T</sup>), a 2. törzs (MA2-2), a 3. törzs (*P. ravus* NBRC 112686<sup>T</sup>) főbb fenotípusos és biokémiai jellemzői; +, pozitív; -, negatív; W, gyenge pozitív. Minden adat a jelen tanulmányból származik, kivéve a \*-gal jelölteket. Szürke színnel jelöltük a *Pinisolibacter* sp. B13<sup>T</sup> azon tulajdonságait, melyek alapján elkülöníthető az MA2-2 izolátumtól vagy a *Pinisolibacter ravus* NBRC 112686<sup>T</sup> típustörzstől.

| Tulajdonságok                            | 1     | 2     | 3            |
|------------------------------------------|-------|-------|--------------|
| Telep színe                              | fehér | fehér | halványságra |
| Hőmérsékleti tartomány (Celsius)         | 15-37 | 15-37 | max. 45*     |
| pH tartomány                             | 6-9   | 6-9   | 5-10*        |
| NaCl tolerancia (% w/v)                  | 1     | 1     | 0.2*         |
| Oxidáz                                   | +     | +     | +            |
| Kataláz                                  | +     | +     | +            |
| MR teszt                                 | +     | +     | +            |
| <b>Szubsztráthasznosítás (API 20NE)</b>  |       |       |              |
| Urea                                     | +     | +     | +            |
| Eszkulin-vas-citrát                      | +     | +     | +            |
| D-glükóz fermentáció                     | +     | +     | +            |
| Nitrát redukció nitritté                 | +     | +     | +            |
| <b>Enzimaktivitás (API ZYM)</b>          |       |       |              |
| Alkalikus-foszfát                        | +     | w     | w            |
| Észteráz (C4)                            | +     | +     | +            |
| Észteráz-lipáz (C14)                     | +     | w     | +            |
| Leucine arilamidáz                       | +     | +     | +            |
| Valin arilamidáz                         | +     | +     | +            |
| Cisztin arilamidáz                       | w     | w     | w            |
| Tripszin                                 | +     | +     | w            |
| α-kimotripszin                           | -     | -     | +            |
| Savas foszfátáz                          | -     | -     | +            |
| Naftol-AS-BI-foszfohidroláz              | +     | +     | +            |
| α-glükózidáz                             | +     | w     | +            |
| β-glükózidáz                             | -     | -     | +            |
| <b>Szénhidrát hasznosítás (API 50CH)</b> |       |       |              |
| D-glükóz                                 | +     | +     | +            |
| D-fruktóz                                | +     | +     | +            |
| Eszkulin-vas-citrát                      | +     | +     | +            |
| Szukróz                                  | -     | -     | +            |

A B13<sup>T</sup> és MA2-2 törzsek esetében 15-37°C hőmérséklet között figyeltünk meg növekedést, az optimum 25–28°C körül alakult. A sejtek növekedési pH-tartománya pH 6 és 9 között volt, pH 7-en tapasztaltuk a legintenzívebb növekedést. A törzsek maximum 1% NaCl-ot tartalmazó tápközegben voltak képesek szaporodni, az e feletti sókoncentrációt nem tolerálták. Mindkét törzs képes volt a glükóz oxidatív és fermentatív hasznosítására, a nitrát nitritté történő redukciójára, valamint pozitív eredményt tapasztaltunk az oxidáz, kataláz és ureáz aktivitásra. Ezen túlmenően az API 20NE és az API 50 CH eredmények alapján mindkét törzs hasznosítja az eszkulin-vas-citrátot, a D-glükózt és a D-fruktózt. Az API ZYM enzimaktivitást mérő tesztek során a B13<sup>T</sup> és MA2-2 törzsek a referenciatörzshöz hasonló eredményt adtak és diverz enzimmérettel rendelkeztek. Pozitív reakciókat figyeltünk meg az alkalikus-foszfátáz, észteráz (C4), észteráz-lipáz (C8), leucin-arilamidáz, valin-arilamidáz, cisztin-arilamidáz, tripszin, naftol-AS-BI-foszfohidroláz és  $\alpha$ -glükozidáz esetében. A B13<sup>T</sup> és MA2-2 törzsek anaerob körülmények között is képesek voltak növekedni a KNO<sub>3</sub> tartalmú anaerob R2A táplevesben, így fakultatív anaerob szervezetnek bizonyultak. Ezen kívül a törzsek fermentatív növekedése is megfigyelhető volt a KNO<sub>3</sub>-at nem tartalmazó anaerob R2A tápközegekben (4. kép).



4. kép: Az anaerob növekedési teszt eredményei a B13<sup>T</sup> törzs esetében. Balról az üvegek sorrendje: KNO<sub>3</sub> tartalmú anaerob R2A tápoldat; abiotikus negatív kontroll R2A oldat; KNO<sub>3</sub>-at nem tartalmazó anaerob R2A tápoldat; pozitív kontroll aerob R2A tápoldat (*saját készítésű felvétel*)

#### 4.3.1.5. Kemotaxonómiai vizsgálatok

A kemotaxonómiai vizsgálatok során a törzseken a zsírsavprofil és a légzési kinonok analízise, illetve poláris lipidek elemzése került elvégzésre a DSMZ közreműködésével. A B13<sup>T</sup> törzs és a legközelebbi rokonainak zsírsav profilját az 5. táblázat mutatja be. A sejtmembrán fő zsírsav komponenseit a nem elváló zsírsavak 3-as (C<sub>19:1</sub>  $\omega$ 6c vagy C<sub>19:0</sub> *cyclo*  $\omega$ 10c) és 8-as csoportjai (C<sub>18:1</sub>  $\omega$ 7c vagy C<sub>18:1</sub>  $\omega$ 6c) alkotják mindhárom vizsgált törzsben.

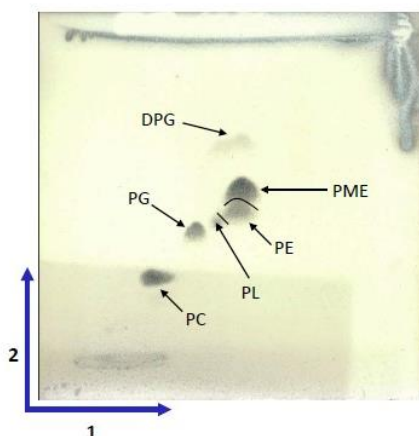
5. táblázat: Az 1. törzs (B13<sup>T</sup>), a 2. törzs (MA2-2), a 3. törzs (*P. ravus* NBRC 112686<sup>T</sup>) sejtmembránjának zsírsavösszetétele. Az adatok az összes zsírsav százalékban kifejezett részeként lettek feltüntetve. -, Nem található. Össz-arány (öa) <0,05.

| Zsírsavak                              | 1    | 2    | 3    |
|----------------------------------------|------|------|------|
| <b>Telített zsírsavak</b>              |      |      |      |
| C <sub>14:0</sub>                      | 0.1  | 0.1  | 0.2  |
| C <sub>16:0</sub>                      | 5.2  | 5.2  | 7.5  |
| C <sub>17:0</sub>                      | -    | -    | 0.4  |
| C <sub>18:0</sub>                      | 2.6  | 2.7  | 1.6  |
| C <sub>19:0</sub>                      | -    | -    | öa   |
| C <sub>20:0</sub>                      | 0.4  | 0.4  | 0.2  |
| <b>Telítetlen zsírsavak</b>            |      |      |      |
| C <sub>16:1</sub> ω5c                  | -    | -    | 0.1  |
| C <sub>17:1</sub> ω8c                  | -    | -    | 0.1  |
| C <sub>20:1</sub> ω7c                  | 2.6  | 2.6  | 1.9  |
| <b>Metil-szubsztituált zsírsavak</b>   |      |      |      |
| C <sub>18:1</sub> ω7c 11-methyl        | 0.1  | 0.2  | 0.1  |
| C <sub>19:0</sub> 10-methyl            | 0.2  | 0.2  | 0.1  |
| <b>Hidroxi-szubsztituált zsírsavak</b> |      |      |      |
| C <sub>16:0</sub> 3-OH                 | -    | -    | 0.1  |
| C <sub>18:0</sub> 3-OH                 | 0.7  | 0.7  | 0.9  |
| <b>Ciklikus zsírsavak</b>              |      |      |      |
| C <sub>19:0</sub> cyclo ω8c            | 0.2  | 0.2  | -    |
| <b>Nem elváló zsírsavak*</b>           |      |      |      |
| 2                                      | 2.7  | 2.7  | 2.6  |
| 3                                      | 10.6 | 10.6 | 19.3 |
| 7                                      | -    | -    | 0.1  |
| 8                                      | 74.7 | 74.5 | 65.2 |

\*A nem elváló (*summed feature*) zsírsavak két vagy három zsírsavkomponens együttese, amelyek a gázkromatográfiás analízis során nem különültek el egymástól a kromatogramon. Nem elváló zsírsavak csoportjai: 2, iso-C<sub>16:1</sub> and vagy C<sub>14:0</sub> 3-OH; 3, C<sub>16:1</sub> ω7c vagy C<sub>16:1</sub> ω6c; 7, C<sub>19:1</sub> ω6c vagy C<sub>19:0</sub> cyclo ω10c; 8, C<sub>18:1</sub> ω7c vagy C<sub>18:1</sub> ω6c.

A kisebb mennyiségben jelenlévő zsírsavak közül a nem elváló zsírsavak 2-es csoportja (iso- $C_{16:1}$  and vagy  $C_{14:0}$  3-OH) és a  $C_{20:1}$   $\omega 7c$  telítetlen zsírsav a *Pinisolibacter* nemzetségre jellemző, elkülöníti az *Ancalomicrobiaceae* család többi nemzetségétől, mivel ezekről a komponensekről nem számoltak be a *Siculibacillus lacustris* SA-279<sup>T</sup> és az *Ancalomicrobium adetum* DSM 4722<sup>T</sup> esetében (Staley et al. 1968, Felföldi et al. 2019). Ezen kívül a  $C_{17:0}$ ,  $C_{19:0}$ ,  $C_{16:1}$   $\omega 5c$ ,  $C_{17:1}$   $\omega 8c$ ,  $C_{16:0}$  3-OH és a nem elváló zsírsavak 7-es csoportjának ( $C_{19:1}$   $\omega 6c$  vagy  $C_{19:0}$  cyclo  $\omega 10c$ ) hiánya, illetve a  $C_{19:0}$  cyclo  $\omega 8c$  megléte egyértelműen elkülöníti a B13<sup>T</sup> és MA2-2 törzset a *Pinisolibacter ravus* NBRC 112686<sup>T</sup> típustörzstől. A B13<sup>T</sup> és MA2-2 törzsek zsírsavprofilja lényegében megegyezik.

A légzési kinonok vizsgálata során az ubikinon-10 (Q10) (95,4%) bizonyult a legjelentősebb komponensnek a B13<sup>T</sup> törzs esetében, emellett az ubikinon-9 (Q9) jelenléte is kimutatható volt kisebb mennyiségben (4,6%), azonban a *Pinisolibacter ravus* NBRC 112686<sup>T</sup> törzsre jellemző ubikinon-8 (Q8) egyáltalán nem volt detektálható (Dahal et al. 2018b). A sejtmembránban előforduló fő poláris lipidek a 20. ábrán láthatók. A legjelentősebb poláris lipidek a B13<sup>T</sup> törzsben a foszfatidil-N-metil-etanol-amin (PME), foszfatidilkolin (PC), foszfatidil-etanol-amin (PE), foszfatidil-glicerin (PG), difoszfatidilglicerin (DPG) és a foszfolipid (PL) voltak. Ez utóbbi poláris lipidről a *Pinisolibacter ravus* E9<sup>T</sup> esetében nem számoltak be, ezzel szemben Dahal és munkatársai (2018) három egyéb azonosítatlan lipidet detektáltak a *P. ravus* E9<sup>T</sup> esetében, amelyeket viszont a B13<sup>T</sup> törzsben nem mutattak ki.



20. ábra: A B13<sup>T</sup> törzs sejtmembránjában előforduló fő poláris lipidek. DPG= difoszfatidilglicerin; PE= foszfatidil-etanol-amin; PME= foszfatidil-N-metil-etanol-amin; PG= foszfatidil-glicerin; PC= foszfatidilkolint; PL= foszfolipid.

A filogenetikai és kemotaxonómiai vizsgálatok eredményei alapján jól látszik, hogy a B13<sup>T</sup> jelű törzs a *Pinisolibacter* nemzetségen belül egy új fajt képvisel, melynek a *Pinisolibacter aquiterrae* nevet adtuk. A törzs képes egyedüli szén-és energiaforrásként hasznosítani az etil-

benzolt, illetve kevert BTEX szennyezés esetén valamennyi aromás vegyület lebontására képes. A B13<sup>T</sup> törzset a Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)/ LMG Bacteria Collection és a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Magyar Nemzeti Gyűjteménye (MIMG) ("National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms (NCAIM) törzsgyűjteményeknél helyeztük letétbe a következő azonosítókkal: LMG 32346<sup>T</sup>, NCAIM B.02665<sup>T</sup>.

#### **4.3.2. Az *Ideonella benzenivorans* B7<sup>T</sup> törzs jellemzése és új fajként történő leírása**

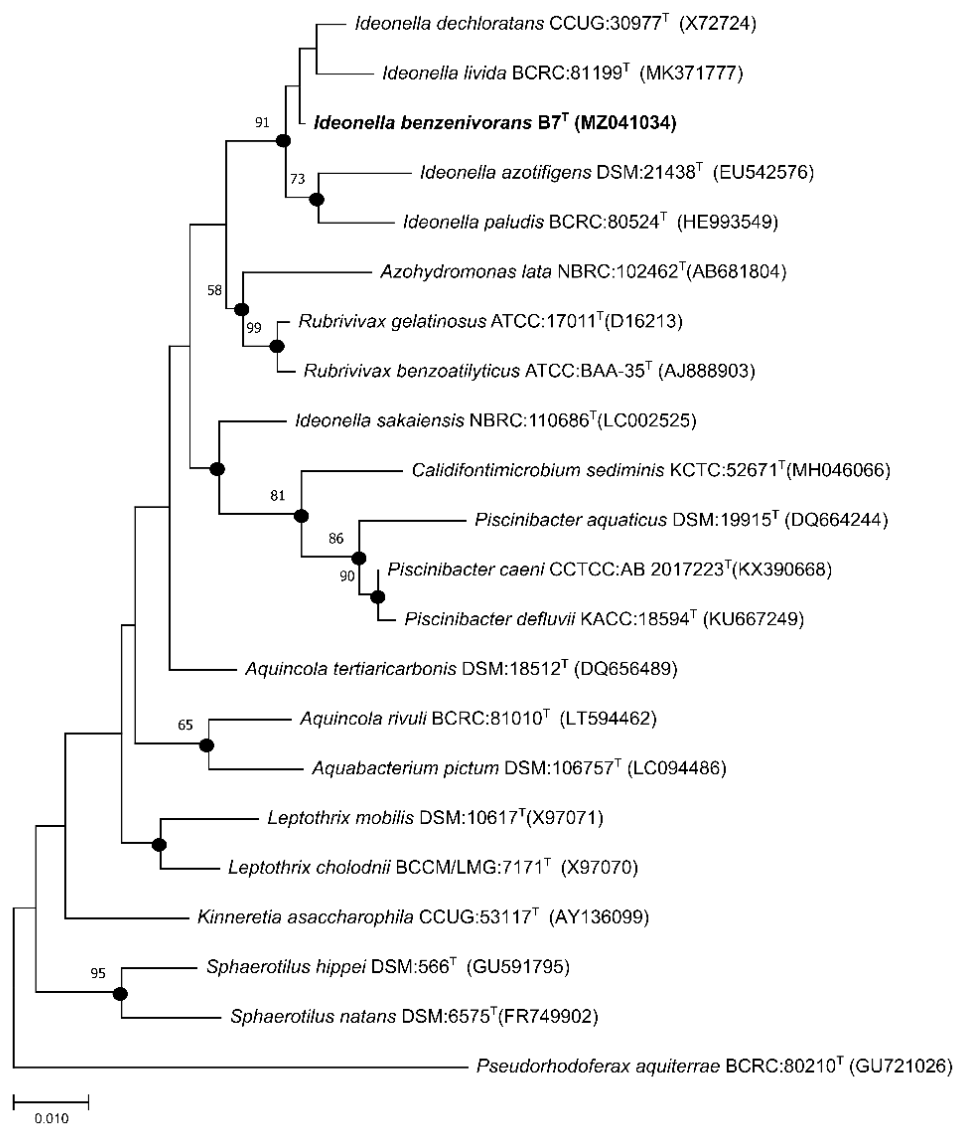
Ebben a fejezetben az *Ideonella dechloratans* B7<sup>T</sup> törzset a polifázikus taxonómia szemléletét követve jellemeztem. Ezen kívül a törzs genomjának elemzésén keresztül a mikroaerob benzolbontás genetikai háttere is bemutatásra kerül.

##### **4.3.2.1. Az *Ideonella* nemzetség jellemzése**

Az *Ideonella* nemzetséget Malmqvist és munkatársai (1994) írták le az *Ideonella dechloratans* jellemzésén keresztül, amelyet egy település szennyvíztisztító telepének eleveniszapjából izoláltak. A nemzetség jellemzői jelentősen bővültek az *Ideonella azotifigens* leírásával (Noar és Buckley 2009). Jelenleg a nemzetségbe öt, érvényes névvel ellátott, publikált faj tartozik (http19). Az *Ideonella* nemzetség a *Burkholderiales* rend *Rubrivivax–Roseateles–Leptothrix–Azohydromonas–Aquicola–Ideonella* ágához tartozó *Comamonadaceae* család tagja (Garrity et al. 2005). Az *Ideonella* nemzetség tagjai Gram-negatív, pálcika alakú baktériumok, amelyek domináns izoprenoid kinonként ubikinon-8-at (Q-8) tartalmaznak. A membrán fő zsírsavkomponenseit a C<sub>16:0</sub> és a nem elváló (*summed feature*) zsírsavak 3-as csoportja (iso-C<sub>15:0</sub> 2-OH/C<sub>16:1</sub>ω7c) alkotja, a genomiális DNS G+C tartalma pedig 67,4 és 70,4 mol% között alakul a csoport tagjai között (Malmqvist et al. 1994, Noar és Buckley 2009, Sheu et al. 2016, Tanasupawat et al. 2016, Chen et al. 2020).

##### **4.3.2.2. A B7<sup>T</sup> törzs filogenetikai elhelyezkedése és genomelemzése**

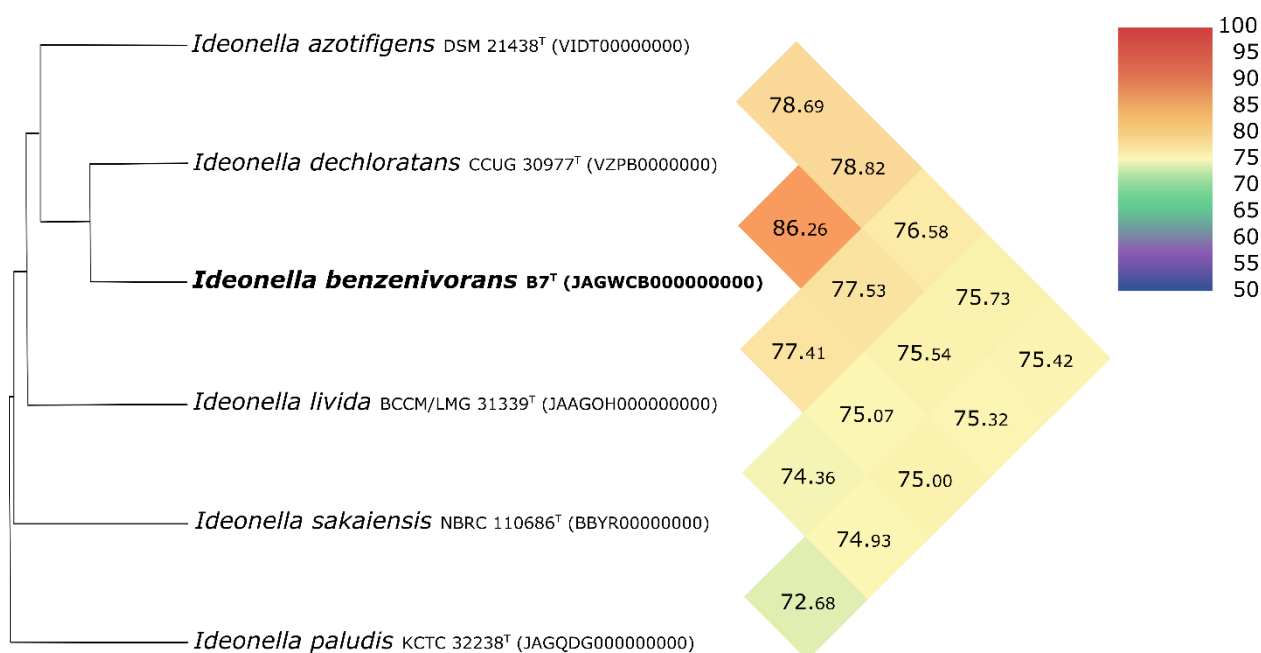
A 16S rRNS génszekvencia összehasonlító analízise rámutatott arra, hogy a B7<sup>T</sup> törzs 1413 bp alapján az *Ideonella dechloratans* CCUG 30898<sup>T</sup> törzzsel (99,15%) volt a legszorosabb rokonságban, ezt követi az *I. livida* TBM-1<sup>T</sup> (98,51%), az *I. azotifigens* 1a22<sup>T</sup> (98,28%), az *I. paludis* KBP31<sup>T</sup> (98,08%), végül az *I. sakaiensis* 201-F6<sup>T</sup> (98,02%). A B7<sup>T</sup> törzs a *Comamonadaceae* családon belül az *Ideonella* nemzetség tagjaival csoportosult és mindhárom algoritmus (NJ, ML és MP) szerint létrehozott filogenetikai fán az *I. dechloratans* és az *I. livida* típus törzseivel klasztereződött, valamint ezen belül is külön leszármazási ágat alkotott a ML és MP fákban, mely alátámasztotta a feltételezést, miszerint a B7<sup>T</sup> törzs az *Ideonella* nemzetség egy lehetséges új képviselője (21., mellékletek 8.2.3., 8.2.4. ábra).



21. ábra: 16S rRNS génszekvenciák alapján létrehozott maximum likelihood filogenetikai fa, amely a B7<sup>T</sup> törzs és legközelebbi rokonai közötti filogenetikai kapcsolatokat mutatja. A Bootstrap értékek százalékos értéke 1000 ismételten alapján lett kalkulálva. A körrel jelölt ágak minden törzsfalkotó algoritmus (NJ, MP, ML) esetében megegyeztek.

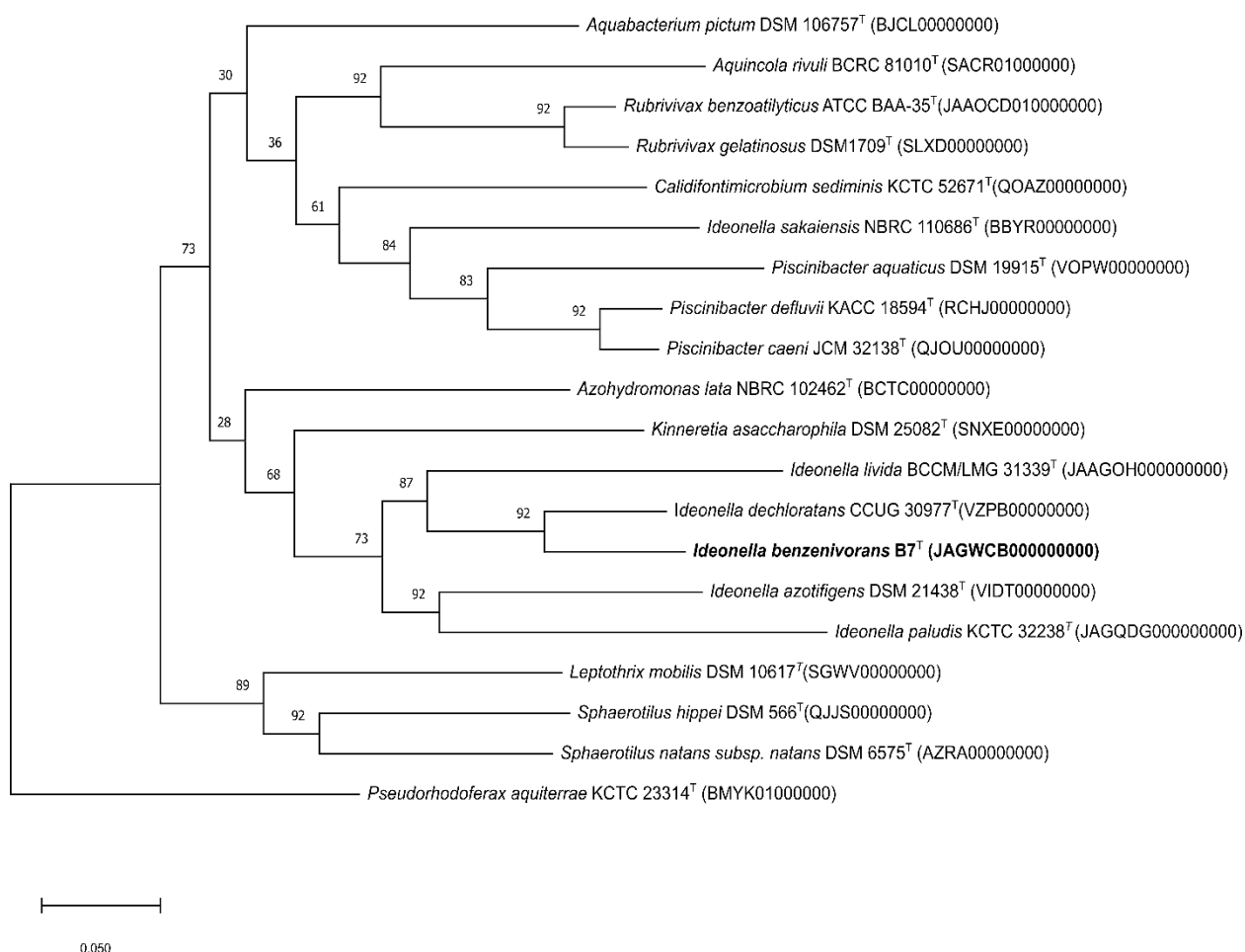
A B7<sup>T</sup> törzs teljes genom elemzése során a MiGA pipeline magas teljességi (100%) és alacsony kontaminációs (0,9%) értéke alapján a 4,49 Mbp hosszúságú genom kiváló minőségűnek bizonyult. A B7<sup>T</sup> törzs genomiális DNS-ének G+C tartalma 68,8% volt, ami megfelel az *Ideonella* fajok esetében a szakirodalomban közzétett adatoknak. A dDDH értékek jóval alacsonyabbak voltak a fajelkülönítés során figyelembe vett 70%-os küszöbértéknél (Chun et al. 2018), A B7<sup>T</sup> törzs és az *Ideonella dechloratans* közötti hasonlóság értéke 30,2% volt, a B7<sup>T</sup> és az *Ideonella*

*azotifigens* közötti 22,7%, a B7<sup>T</sup> és az *Ideonella livida* pedig mindössze 22,0%-os genomhasonlóságot mutatott egymással. A többi *Ideonella* faj esetében a dDDH érték 22% alatt volt. Megvizsgálva az OrthoANI értékeket a B7<sup>T</sup> és a legközelebbi rokonok között (22. ábra) szintén azt tapasztaltuk, hogy a fajelkülönítési küszöbértékek (95-96%) alatt voltak (Chun et al. 2018). Ezek az eredmények mind alátámasztják, hogy a B7<sup>T</sup> törzs az *Ideonella* nemzetségen belül egy külön fajt alkot.



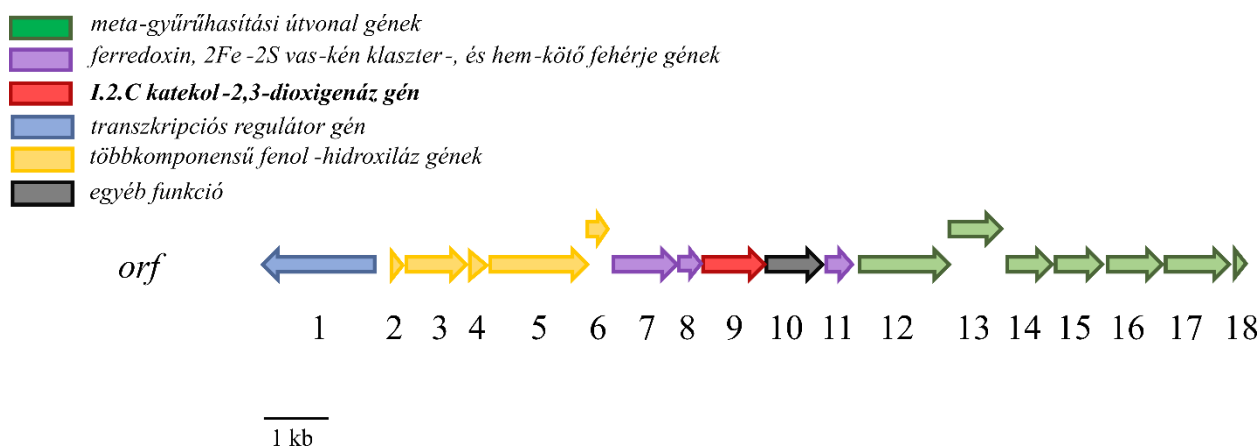
22. ábra: Az OAT szoftverrel kiszámított OrthoANI értékek alapján készített hő térkép a B7<sup>T</sup> törzs és a közeli rokon *Ideonella* fajok között. A színek a legközelebbi rokonságban álló fajt pirossal a legtávolabbit zölddel jelzi.

A B7<sup>T</sup> törzs pontos filogenetikai helyzetének meghatározásához nem csak 16S rRNS alapon, hanem a teljes genom alapján is rekonstruáltunk egy filogenetikai fát az UBCG szoftverrel (23. ábra). A 92 mag-gén alapú filogenetikai fa szintén megerősítette a B7<sup>T</sup> törzs taxonómiai hovatartozását és azt a feltevést, miszerint a törzs az *Ideonella* nemzetségen belül külön leszármazási vonalat képez.



23. ábra: A B7<sup>T</sup> törzs taxonómiai helyzetét bemutató teljes genom alapján létrehozott UBCG filogenetikai törzsfa.

A B7<sup>T</sup> törzs teljes genom analízise során megvizsgáltuk, hogy rendelkezik-e a monoaromás szénhidrogének lebontásához szükséges genetikai háttérrel. A CLC Genomics Workbench programmal végzett genomelemzés 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 (24. ábra) kódolt. Az I.2.C-típusú katekol-2,3-dioxigenáz gént (körülbelül 800 bp) szintén sikeresen detektáltuk Sanger-szekvenálással (3. táblázat), mely génszekvenciáját összehasonlítottuk a teljes genomból származó C23O génszekvenciával, és azzal 100%-os hasonlóságot mutatott.

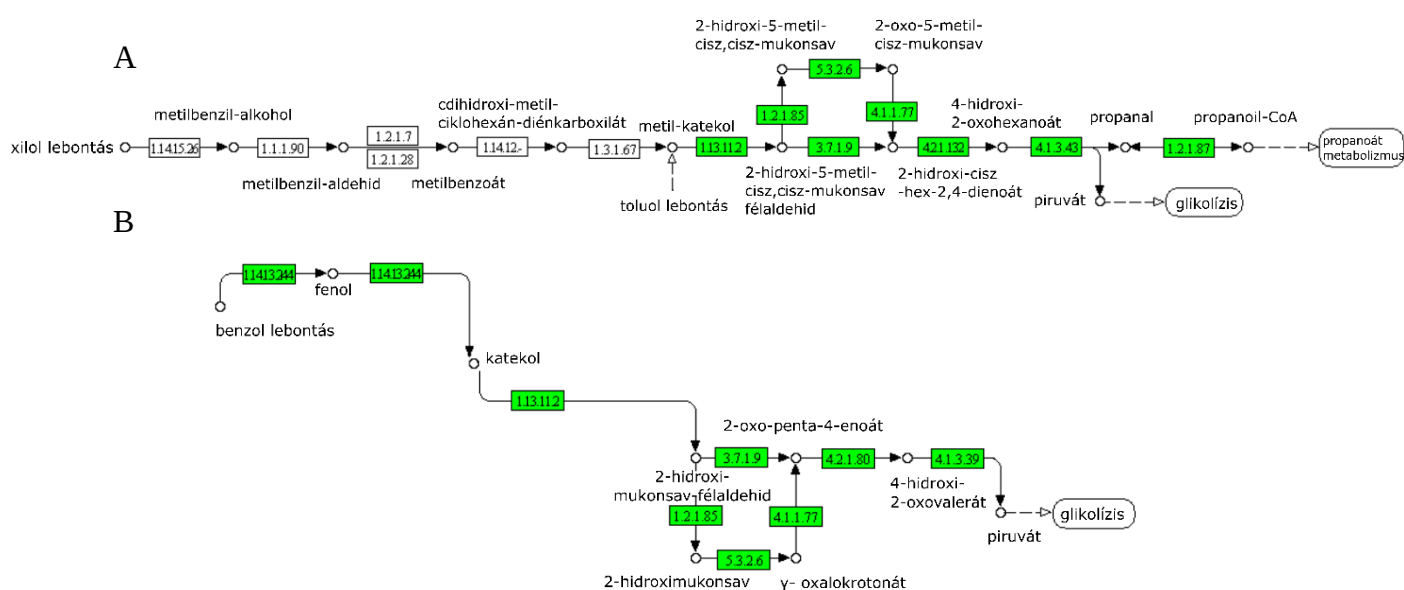


24. ábra: A B7<sup>T</sup> törzs aromás szénhidrogén-lebontásban szerepet játszó génjei. A nyilak a nyitott leolvasási kereteket jelölik (ORF=open reading frame), az irányuk a transzkripció irányát jelzi. A

színek pedig az aromás szénhidrogének lebontásában szerepet játszó gének különböző funkcionális csoportjait jelölik. orf1: *sigma-54 dependens transzkripció regulátor*; orf2-6: *fenol-hidroxiláz komponensek*; orf7: *2Fe-2S vas-kén klaszterkötő domént tartalmazó fehérje*; orf8: *ferredoxin*; orf9: *I.2.C katekol-2,3-dioxigenáz*; orf10: *transzporter fehérje*; orf11: *hem-kötő fehérje*; orf12: *2-hidroximukonsav félaldehid dehidrogenáz*; orf13: *alfa/béta fold hidroláz*; orf14: *2-oxopenta-4-enoát hidratáz*; orf15: *2-oxo-hex-3-éndisav dekarboxiláz*; orf16: *acetaldehid-dehidrogenáz*; orf17: *4-hidroxi-2-oxovalerát aldoláz*; orf18: *4-oxalokrotonát tautomeráz*.

Az aromás gyűrű aktivációját gyakran benzol/toluol monooxygenázok vagy dioxigenázok végzik, azonban abban az esetben, ha ezek nem állnak rendelkezésre, a többkomponensű fenol-hidroxiláz rendszer ugyanúgy elvégzi ezt a feladatot. Habár elsődleges szubsztrátja a fenol, képes a benzol és a toluol metil-katekollá történő átalakulását is katalizálni (Cafaro et al. 2004). Az enzim aktivitásához a *dmpKLMNOP* gének összehangolt működésére van szükség, melyek a P0, P1, P2, P3, P4 és P5 termékek expresszáldásáért felelősek. A *dmpK* segéd, vagy járulékos fehérjék kódolásában vesz részt, melyeknek az aktív hidroxiláz enzim összeállításában és expressziójának szabályozásában játszanak szerepet (Powlowski et al. 1997). A reduktáz komponens a *dmpP*, az oxigenáz komponens  $\alpha$ ,  $\beta$ , és  $\gamma$  alegységeit a *dmpLNO*, az aktivátor fehérjét pedig a *dmpM* kódolja, melynek az oxigenáz komponens aktív formájának kialakításában van szerepe. A reduktáz komponensben lévő flavin (FAD) elektronokat fogad el a NAD(P)H-tól, majd továbbítja azokat az oxigenáz komponens aktív helyére a vas-kén [2Fe-2S] centrumot tartalmazó ferredoxinon keresztül. Az aktív helyen a redukált Fe(II)-hoz kötött O<sub>2</sub> és szubsztrát további elektron transzfer folyamatok által kölcsönösen aktiválják egymást és megtörténik az aromás gyűrű hidroxilációja (Powlowski és Shingler 1990, Powlowski et al. 1994, 1997, Lipscomb 2008), majd a C23O gén általi gyűrűhasítást követően az útvonal alsóbb génjeinek termékei elvégzik a szénhidrogén lebontását szén-dioxiddá és vízzé.

A BTEX lebontási útvonalakat a MAGE Genoscope platform segítségével is annotáltuk (25. A, B ábra), mely esetben a *meta*-gyűrűhasítási útvonal alsóbb lépéseit katalizáló enzimek génjeit sikerült mind azonosítani, illetve találtunk a benzol és a toluol gyűrűaktivációját biztosító géneket is. Ezen kívül azonosítottuk az etil-benzol dioxigenáz egyik alegységének kódolásáért felelős gént (Iwasaki et al. 2006), így feltételeztük, hogy a B7<sup>T</sup> törzs részt vehet ennek az aromás szénhidrogénnek a metabolizációjában is. Azonban a xilolok metil-benzil-alkohollá történő átalakítását katalizáló xilol-monooxygenáz gének hiányoztak (Suzuki et al. 1991), így a törzs xilol-bontáshoz szükséges genetikai háttere hiányosnak bizonyult (25. „A” ábra).

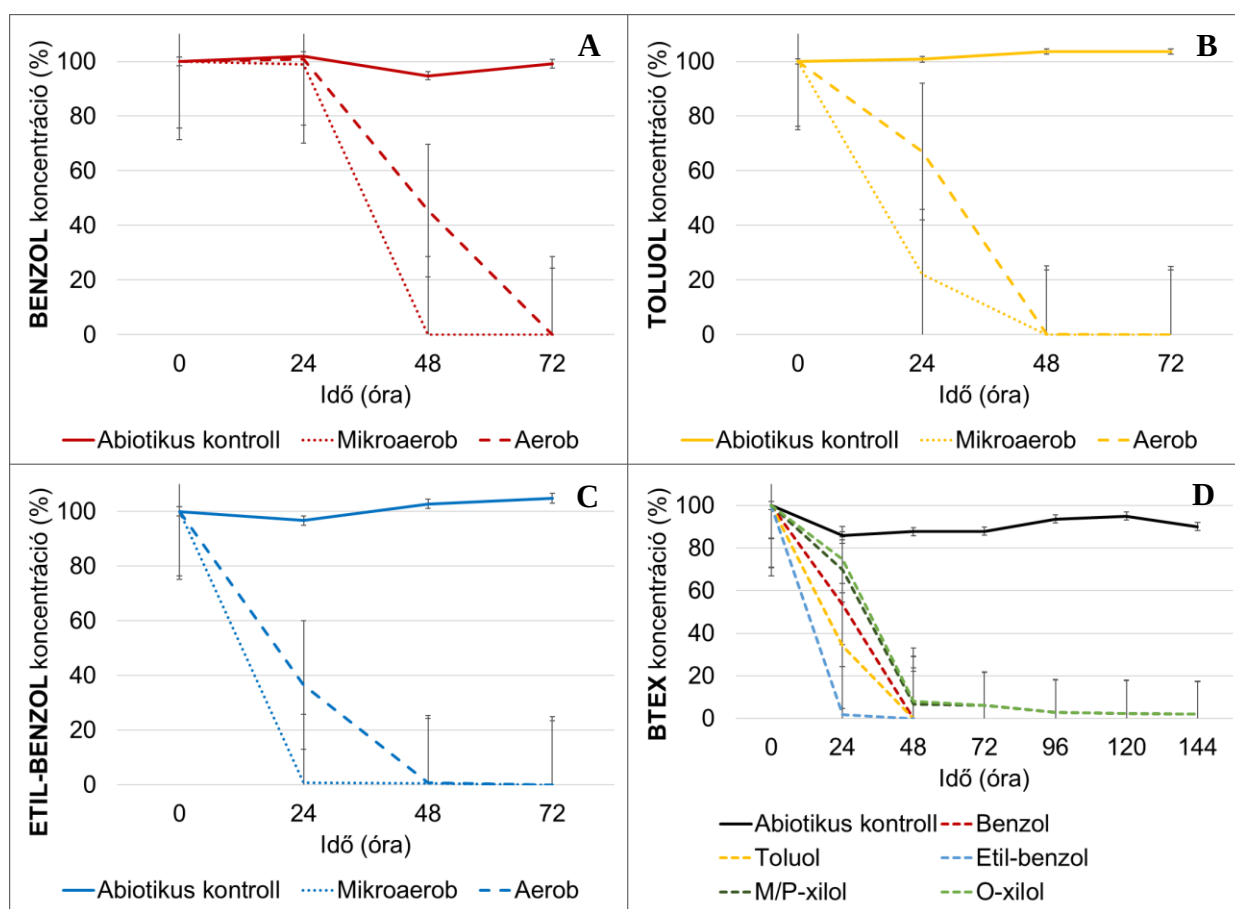


25. ábra: A B7<sup>T</sup> törzs benzol és xilollebontási útvonalai, mely a MaGe Genoscope platform segítségével a KEGG adatbázis alapján került annotálásra. Az „A” ábrán a xilol, a „B” ábrán a benzol metabolizmusban szerepet játszó enzimek (négyzet) és közti termékek (üres körök) láthatók. A négyzetekben az enzimek EC számai láthatók, melyek alapján a KEGG adatbázisból visszakereshetők. A zöld szín az automatikusan annotált, a fehér a nem azonosított enzimeket jelöli.

#### 4.3.2.3. A B7<sup>T</sup> törzs aromás szénhidrogén bontó képessége

A B7<sup>T</sup> törzs aromás szénhidrogén bontó képességéről GC-MS mérések segítségével is meggyőződünk, melynek során megfigyeltük, hogy a B7<sup>T</sup> törzs képes volt aerob és mikroaerob módon egyaránt lebontani a benzolt, a toluolt és az etil-benzolt, mint egyedüli szén- és energiaforrást (26. ábra). A toluol és az etil-benzol aerob viszonyok között történő lebontása 48 órán belül végbement, míg azonos koncentrációjú benzol aerob lebontására körülbelül 72 órára volt szükség. A mikroaerob biodegradáció azonban valamivel hatékonyabbnak bizonyult az aerobnál, ugyanis a toluol és az etil-benzol 24 órán belül, a benzol pedig 48 órán belül elfogyott

az üvegekből. A B7<sup>T</sup> törzs nem volt képes a xilokat egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítani, azonban amikor az összes BTEX komponens keveréke egyszerre volt jelen, valamennyi xilol-izomer mennyisége jelentősen csökkent 48 órán belül, viszont miután a benzol, toluol és etil-benzol teljesen lebomlott a környezetükből, a xilolok koncentrációja nem csökkent tovább. Aerob viszonyok között a benzol és a toluol jelenlétében a xilol vegyületek kometabolizálódhatnak (Chang et al. 1993, Oh et al. 1994, Littlejohns és Daugulis 2008), viszont ezek hiányában egyedüli szénforrásként nem volt képes a xilol vegyületek teljes lebontására a törzs.

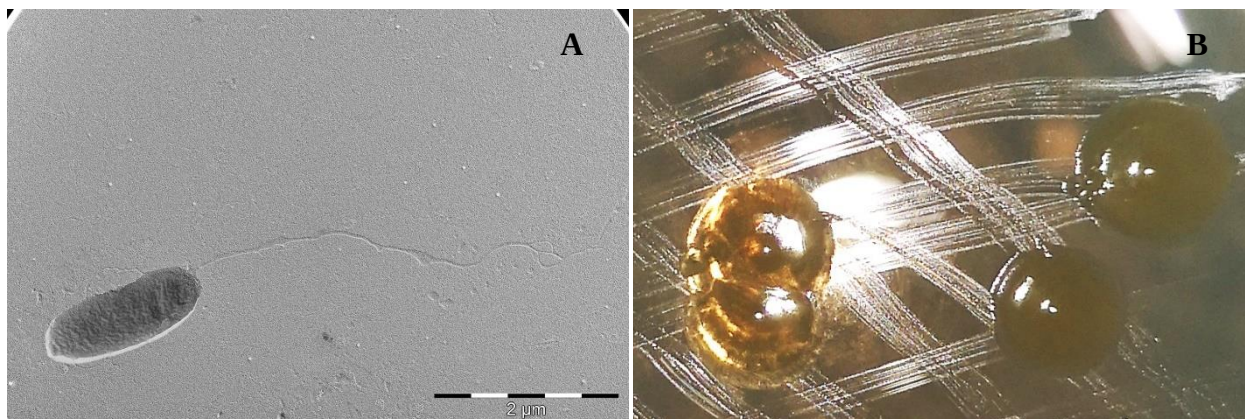


26. ábra: Az *Ideonella* sp. B7<sup>T</sup> törzs aromás szénhidrogén-bontó képessége a GC-MS vizsgálatok eredménye alapján - **A:** B7<sup>T</sup> törzs benzollebontó képessége; **B:** B7<sup>T</sup> törzs toluol lebontó képessége; **C:** B7<sup>T</sup> törzs etil-benzollebontó képessége; **D:** A B7<sup>T</sup> BTEX-bontó képessége az összes aromás szénhidrogén jelenlétében.

#### 4.3.2.4. Fiziológiai, morfológiai és biokémiai vizsgálatok

A B7<sup>T</sup> törzs által képzett Gram-negatív, pálcika alakú sejtek 1,8–2,0 µm hosszúak és 0,6–0,7 µm szélesek, egyetlen poláris flagellummal rendelkeznek, mely által mozgásra képesek (27. A

ábra). Az R2A táptalajon kis és közepes méretű, halvány borostyánsárga, kör alakú, fényes, közepén kicsúcsosodó telepeket képez 28°C-on 2–3 napos inkubáció során (27. B ábra).



27. ábra: **A-** A B7<sup>T</sup> törzs transzmissziós elektronmikroszkópos képe 24 óra inkubáció után R2A táptalajon, 28°C-on (Készítette: Dr. Bóka Károly, Növény-szervezettani Tanszék, ELTE); **B-** A B7<sup>T</sup> törzs által képzett telepek 28°C-on 2–3 napos inkubáció után (saját készítésű kép).

Az összehasonlító fenotípusos és kemotaxonómiai vizsgálatok során az *Ideonella dechloratans* CCUG 30898<sup>T</sup> és *Ideonella azotifigens* 1a22<sup>T</sup> DSM 21438<sup>T</sup> törzseket használtuk referencia törzsként a 4.3.2.2. fejezetben bemutatott filogenetikai elemzések eredményei alapján. A B7<sup>T</sup> törzs és a referenciatörzsek jellemzőinek összehasonlítása a 6. táblázatban kerül bemutatásra. A biokémiai vizsgálatok alapján a B7<sup>T</sup> törzs képes volt hidrolizálni a Tweens 80-at, a karbamidot, az eszculint és a zselatint, valamint erős oxidáz és kazeáz, illetve gyenge kataláz aktivitással is rendelkezett. A B7<sup>T</sup> törzs jól növekedett 15 és 45 °C közötti hőmérsékleten, intenzívebben szaporodott a magasabb 20-45°C közötti hőmérsékleten, optimumát tekintve 35 °C-on mutatta a legerőteljesebb növekedést R2A táptalajon 24 óra inkubáció alatt, mely tulajdonságai alapján mezofil szervezetnek tekinthető. A referencia törzsek is magasabb hőmérsékletet tudtak elviselni, mint az átlag talajbaktériumok, azonban 45°C-on már nem mutattak növekedést. A B7<sup>T</sup> sejtek pH 6 és 9 közötti pH tartományban jól szaporodtak, azonban pH 7-en tapasztaltuk a legintenzívebb növekedést. A törzs maximum 2% NaCl-ot tartalmazó tápközegben volt képesek szaporodni, az e feletti sókoncentrációt nem tolerálta, hasonlóan a legközelebbi rokonaihoz.

6. táblázat: Az 1. törzs (B7<sup>T</sup>), a 2. törzs (*Ideonella dechloratans* CCUG 30898<sup>T</sup>), a 3. törzs (*Ideonella azotifigens* 1a22<sup>T</sup>) főbb fenotípusos és biokémiai jellemzői; +, pozitív; -, negatív; W, gyenge pozitív. Minden adat a jelen tanulmányból származik, kivéve a \*-gal jelölteket.

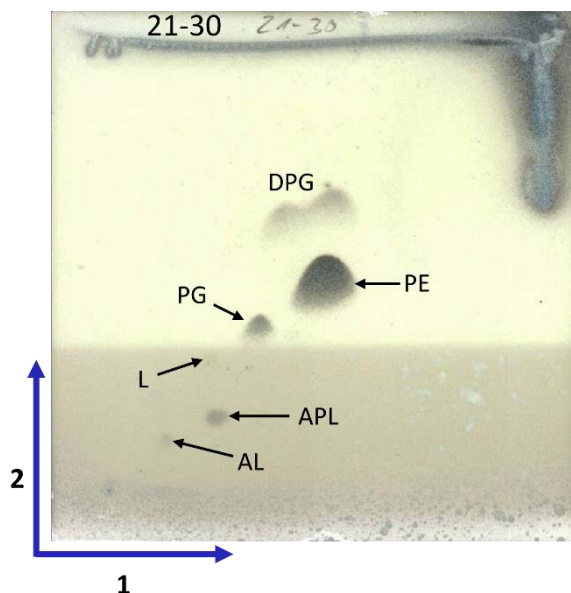
| <b>Tulajdonságok</b>                     | <b>1</b>          | <b>2</b> | <b>3</b> |
|------------------------------------------|-------------------|----------|----------|
| Telep színe                              | halvány borostyán | fehér    | fehér    |
| Hőmérsékleti tartomány (Celsius)         | 15-45             | 12-42*   | 4-35*    |
| pH tartomány                             | 6-9               | 5-9*     | 6-8*     |
| NaCl tolerancia (% w/v)                  | 2                 | 3>*      | 0.5>*    |
| Kataláz                                  | w                 | +        | +        |
| Foszfatáz                                | -                 | w        | +        |
| H <sub>2</sub> S képzés                  | -                 | +        | -        |
| Keményítő hidrolízis                     | -                 | +        | -        |
| <b>Szubsztráthasznosítás (API 20NE)</b>  |                   |          |          |
| D-glükóz                                 | -                 | +        | -        |
| <b>Enzimaktivitás (API ZYM)</b>          |                   |          |          |
| Alkalikus-foszfatáz                      | w                 | -        | +        |
| Lipáz (C14)                              | w                 | -        | -        |
| Cisztin arilamidáz                       | -                 | w        | w        |
| Tripszin                                 | w                 | -        | -        |
| Savas foszfatáz                          | -                 | w        | +        |
| $\alpha$ -glükozidáz                     | +                 | +        | w        |
| N-acetil- $\beta$ -glükózaminidáz        | w                 | -        | -        |
| <b>Szénhidrát hasznosítás (API 50CH)</b> |                   |          |          |
| Glicerol                                 | -                 | -        | +        |
| D-arabinóz                               | -                 | -        | +        |
| L-arabinóz                               | -                 | -        | +        |
| D-ribóz                                  | -                 | -        | +        |
| D-galactóz                               | -                 | -        | +        |
| D-glükóz                                 | -                 | -        | +        |
| D-fruktóz                                | -                 | -        | +        |
| D-mannóz                                 | -                 | -        | +        |
| L-rhamóz                                 | -                 | -        | +        |
| Inozitol                                 | -                 | -        | +        |
| D-mannitol                               | -                 | -        | +        |
| D-szorbitol                              | -                 | -        | +        |
| Eszkulin-vas-citrát                      | -                 | -        | +        |
| D-cellobióz                              | -                 | -        | +        |
| D-maltóz                                 | -                 | -        | +        |
| D-fukóz                                  | -                 | -        | +        |
| L-fukóz                                  | -                 | -        | +        |

Az API ZYM tesztekben a B7<sup>T</sup> törzs hasonlóan a referencia törzsekhez változatos enzimaktivitást mutatott: alkalikus-foszfátáz, lipáz, tripszin,  $\alpha$ -glükózidáz, és N-acetil-  $\beta$ -glükózaminidáz reakciók esetében tapasztaltunk általában gyenge pozitív reakciót. Ezzel szemben az API 20NE és 50CH tesztek alapján a B7<sup>T</sup> törzs nem volt képes a vizsgált szénhidrátok asszimilációjára és fermentálására, mely tulajdonságában az *Ideonella dechloratans* típustörzsre hasonlít. A B7<sup>T</sup> törzs obligát aerobnak bizonyult, mivel a KNO<sub>3</sub> tartalmú anaerob R2A tápoldatban nem mutatott növekedést.

#### 4.3.2.5. Kemotaxonómiai vizsgálatok

A B7<sup>T</sup> törzs fő zsírsav komponensei a C<sub>16:0</sub>, a nem elváló zsírsavak 3 -as csoportja (C<sub>16:1</sub>  $\omega$ 7c/iso-C<sub>15:0</sub> 2-OH), valamint a C<sub>18:1</sub>  $\omega$ 7c voltak, hasonlóan a referencia törzsekhez (7. táblázat). A DSMZ által végzett további GC-MS analízis kimutatta, hogy a nem elváló zsírsavak 3-as csoportját a B7<sup>T</sup> törzs esetében kizárólag a C<sub>16:1</sub>  $\omega$ 7c zsírsav alkotja. A C<sub>15:0</sub> és C<sub>16:1</sub> 2-OH zsírsavak jelenléte csak a B7<sup>T</sup> törzsre volt jellemző, mely alapján elkülöníthető a legközelebbi rokon fajoktól.

A B7<sup>T</sup> törzsben egyetlen légzési kinont, az ubikinon-8-at (Q-8) sikerült azonosítani. A vékonyréteg kromatográfiával kimutatott fő poláris lipidek pedig a következők voltak: foszfatidil-etanol-amin (PE), difoszfatidil-glicerín (DPG) és foszfatidil-glicerín (PG). Ezen kívül egy azonosítatlan aminofoszfolipidet (APL), egy aminolipidet (AL) és egy poláris lipidet (L) is igazoltunk (28. ábra).



28. ábra: A B7<sup>T</sup> törzs sejtmembránjában előforduló fő poláris lipidek. DPG= difoszfatidilglicerín; PE= foszfatidil-etanol-amin; PG= foszfatidil-glicerín; APL= aminofoszfolipid; AL= aminolipid; L= azonosítatlan poláris lipid.

7. táblázat: Az 1. törzs (B7<sup>T</sup>), a 2. törzs (*Ideonella dechloratans* CCUG 30898<sup>T</sup>), a 3. törzs (*Ideonella azotifigens* 1a22<sup>T</sup>) sejtmembránjának zsírsavösszetétele. Az adatok az összes zsírsav százalékban kifejezett részeként lettek feltüntetve. -, Nem található.

| Zsírsavak               | 1    | 2    | 3    |
|-------------------------|------|------|------|
| <b>Telített</b>         |      |      |      |
| C <sub>12:0</sub>       | 0.7  | 1.1  | 8.0  |
| C <sub>14:0</sub>       | 2.6  | 1.7  | 1.2  |
| C <sub>15:0</sub>       | 1.4  | -    | -    |
| C <sub>16:0</sub>       | 28.9 | 31.5 | 26.5 |
| <b>Telítetlen</b>       |      |      |      |
| C <sub>18:1</sub> ω7c   | 7.7  | 10.3 | 13.0 |
| <b>Hidroxi</b>          |      |      |      |
| C <sub>10:0</sub> 3-OH  | 2.7  | 2.6  | 2.9  |
| C <sub>12:0</sub> 2-OH  | 1.9  | 2.3  | -    |
| C <sub>12:0</sub> 3-OH  | 4.2  | 3.7  | 4.6  |
| C <sub>14:0</sub> 2-OH  | 5.1  | 2.5  | -    |
| C <sub>16:1</sub> 2-OH  | 3.1  | -    | -    |
| <b>Ciklikus</b>         |      |      |      |
| C <sub>17:0</sub> cyclo | 2.6  | 1.5  | 3.7  |
| <b>Nem elváló *</b>     |      |      |      |
| 3                       | 36.5 | 38.3 | 38.8 |

\*A nem elváló (*summed feature*) zsírsavak két vagy három zsírsavkomponens együttese, amelyek a gázkromatográfiás analízis során nem különültek el egymástól a kromatogramon. Nem elváló zsírsavak csoportja: 3, C<sub>16:1</sub> ω7c/iso-C<sub>15:0</sub> 2-OH.

A filogenetikai és kemotaxonómiai vizsgálatok eredményei alapján jól látszik, hogy a B7<sup>T</sup> jelű törzs az *Ideonella* nemzetségen belül egy új fajt képvisel, melynek az *Ideonella benzenivorans* nevet adtuk. A törzs képes egyedüli szén-és energiaforrásként hasznosítani aerob és mikroaerob körülmények között a benzolt, a toluolt és az etil-benolt, illetve kevert BTEX szennyezés esetén valamennyi aromás vegyület lebontására képes. A B7<sup>T</sup> törzset a Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)/ LMG Bacteria Collection és a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Magyar Nemzeti Gyűjteménye (MIMG) ("National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms (NCAIM) törzsgyűjteményeknél helyeztük letétbe a következő azonosítókkal: LMG 32345<sup>T</sup>, NCAIM B.02664<sup>T</sup>.

#### **4.3.3. Az *Acidovorax benzenivorans* D2M1<sup>T</sup> törzs jellemzése és új fajként történő leírása**

Ebben a fejezetben a Banerjee és munkatársai (2022a) által egy *meta*-xilol lebontó dúsítótenyészetből izolált *Acidovorax* sp. törzs jellemzésére kerül sor. A törzs az *Acidovorax delafieldii* DSM64<sup>T</sup> törzssel áll legközelebbi rokonságban a 16S rRNS gén alapján, 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.

##### **4.3.3.1. Az *Acidovorax* nemzetség jellemzése**

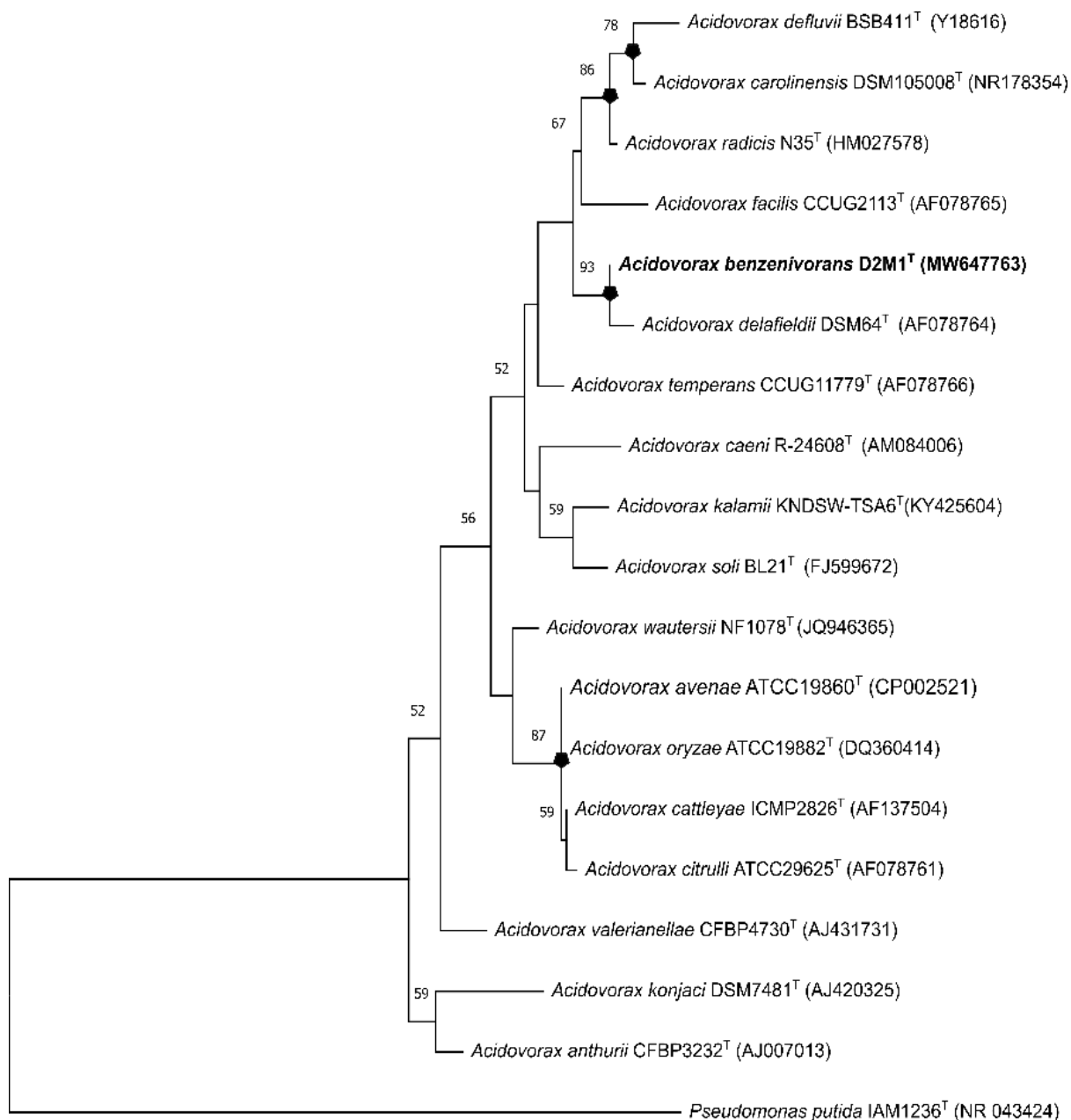
Az *Burkholderiales* rendbe tartozó *Comamonadaceae* családból származó *Acidovorax* nemzetséget Willems és munkatársai írták le (Willems et al. 1990, 2005). Az *Acidovorax* nemzetségbe jelenleg 20 tudományosan elismert faj tartozik (http20). Az *Acidovorax* nemzetség, akárcsak a *Comamonadaceae* család többi tagja részt vesz különféle típusú kőolajszármazékok, például klórbenzolok, fenantrén és BTEX vegyületek biológiai lebontásában (Monferrán et al. 2005, Singleton et al. 2018, Abutro et al. 2011), valamint a nemzetség tagjai domináns közösségalkotóként vannak jelen a kőolajjal szennyezett felszín alatti környezetben is (Bedics et al. 2022, Benedek et al. 2018, Révész et al. 2020a, Banerjee et al. 2022a). Az *Acidovorax* fajokat, mivel igen diverz nemzetségről van szó, változatos élőhelyekről izolálták, többek között különböző xenobiotikumokkal szennyezett területekről, mint például eleveniszap, PHB-val (poli-β-hidroxibutirát) dúsított talaj és PAH-vegyületekkel szennyezett víztározó (Willems et al. 1990, Monferrán et al. 2005, Singleton et al. 2018, Schulze et al. 1999, Heylen et al. 2008). A nemzetség tagjai közül különösen az *Acidovorax delafieldii* törzsek egyes izolátumai kaptak figyelmet környezetvédelmi szempontból a PAH és a BTEX bioremediációjában betöltött szerepük miatt (Banerjee et al. 2022a, Samanta et al. 1999, Aburto et al. 2009, Shuttleworth et al. 1996). A

*Comamonadaceae* család tagjairól ismert, hogy diverz C23O génekkel rendelkeznek aromás szénhidrogénekkal szennyezett, oxigénlimitált, felszín alatti környezetben, mely C23O génszekvenciák közül sokat az *Acidovorax* nemzetséggel társították (Táncsics et al. 2010, 2012, 2013). Az *Acidovorax*-ok jellemzően Gram-negatív, pálcika alakú, aerob baktériumok, néhány közülük mozgásra is képes a poláris flagellumuk révén. Kemotaxonómiai jellemzőik, hogy a fő zsírsav komponensek általában a nem elváló zsírsavak 3-as csoportja (C<sub>16:1</sub>ω7c/C<sub>16:1</sub>ω6c), a C<sub>16:0</sub> és a C<sub>18:1</sub>ω7c. A DNS G+C tartalma a nemzetségen belül pedig 60,9 és 66% között alakul (Willems et al. 1990, Monferrán et al. 2005, Singleton et al. 2018, Schulze et al. 1999, Heylen et al. 2008, Choi et al. 2010, Pal et al. 2018, Li et al. 2011).

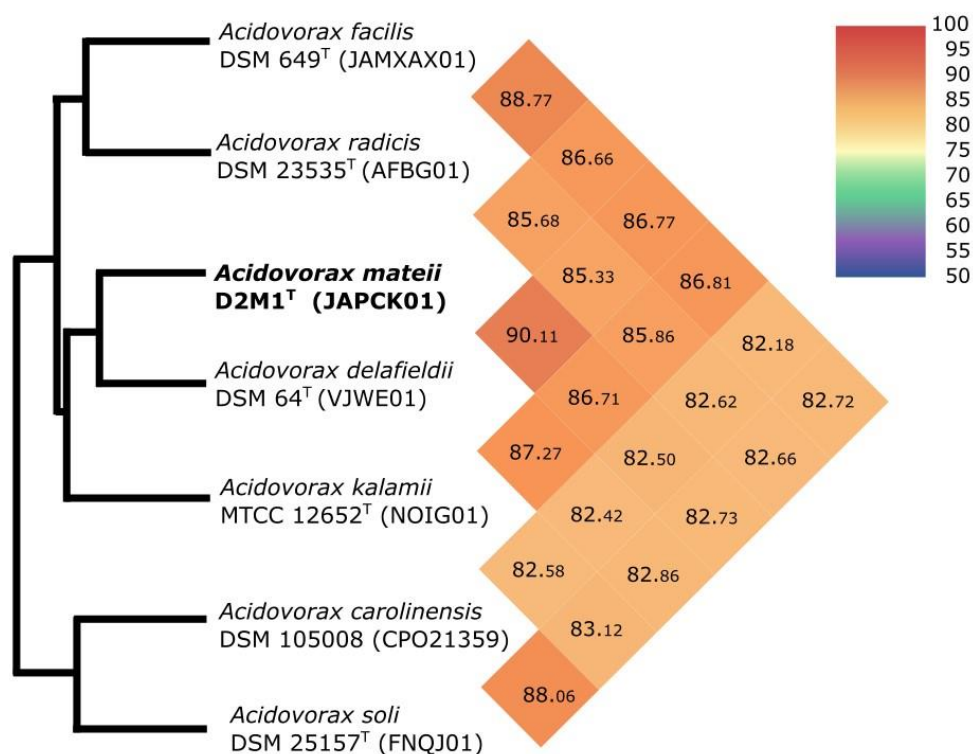
#### 4.3.3.2. A D2M1<sup>T</sup> törzs filogenetikai elhelyezkedése és genomelemzése

A 16S rRNS génszekvencia összehasonlító elemzése alapján megállapítható, hogy a D2M1<sup>T</sup> törzs az *Acidovorax* nemzetségen belül az *Acidovorax delafieldii* DSM64<sup>T</sup> törzssel áll legközelebbi rokonságban (99,93% 16S rRNS génszekvencia egyezés), majd ezt követte az *A. radialis* DSM 23535<sup>T</sup> (98,765%) és az *A. kalamii* KND SW-TSA6<sup>T</sup> (98,761%). A D2M1<sup>T</sup> és az *A. delafieldii* törzs közötti filogenetikai kapcsolatot mindhárom törzsfá megerősítette, melyek mindegyikén a D2M1<sup>T</sup> törzs az *A. delafieldii*-vel alkotott külön leszármazási ágat (29., mellékletek 8.2.5., 8.2.6. ábra).

A D2M1<sup>T</sup> törzs teljes genom elemzése során a MiGA pipeline eredményei magas teljességi (100%) és alacsony szennyezettségi értéket mutattak (0,9%), mely alapján a közel 5,5 Mbp méretű genom kiváló minőségűnek bizonyult. A genom 64,2%-os G + C tartalommal rendelkezik, ami megfelel az *Acidovorax* fajokra általánosan jellemző értékeknek. A D2M1<sup>T</sup> törzs és legközelebbi rokonai közötti OrthoANI értékek 82,50-90,11% között mozogtak (30. ábra), míg az *in silico* dDDH eredményei szerint a D2M1<sup>T</sup> és az *Acidovorax delafieldii* törzs közötti hasonlóság mindössze 38,9%-os volt, mely százalékos eredmények a fajelkülönítés során használt küszöbértékek alatt maradtak.

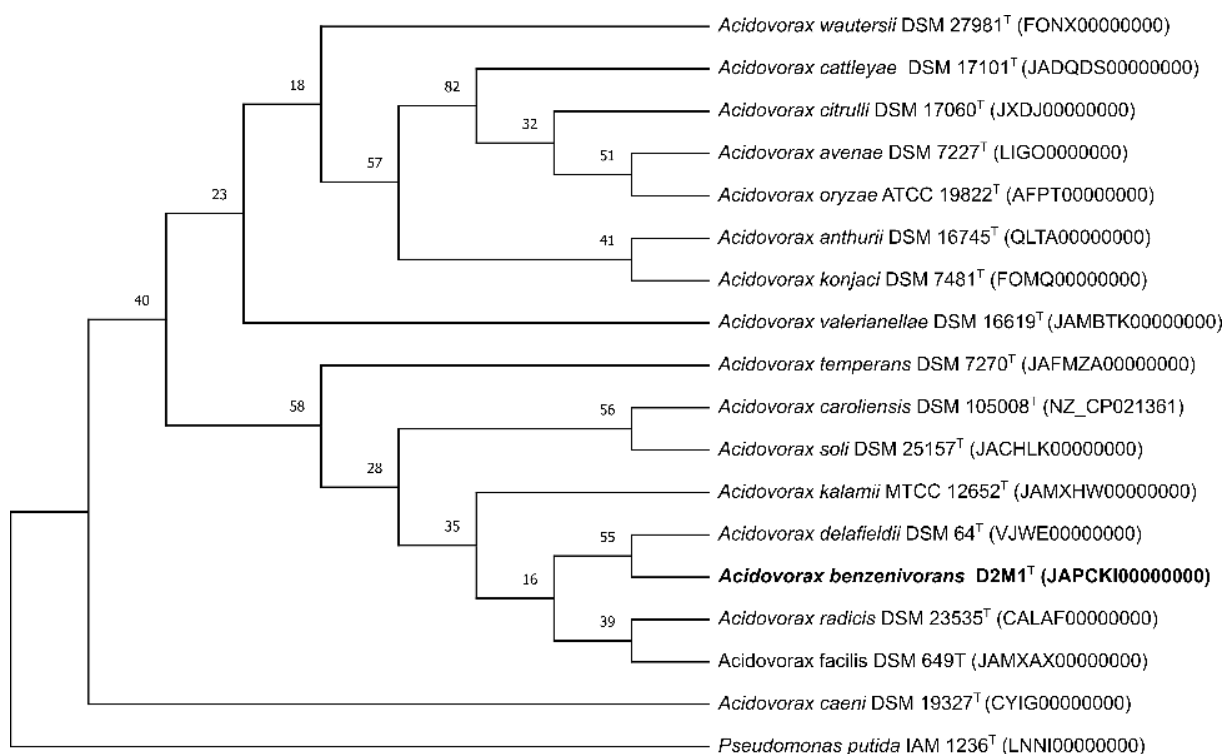


29. ábra 16S rNS génszekvenciák alapján létrehozott maximum likelihood filogenetikai fa, amely a D2M1<sup>T</sup> törzs és legközelebbi rokonai közötti filogenetikai kapcsolatokat mutatja. A Bootstrap értékek százalékos értéke 1000 ismétlés alapján lett kalkulálva. A körrel jelölt ágak minden törzsfaalkot  algoritmus (ML, NJ, MP) esetében megegyeztek.



30. ábra: Az OAT szoftverrel kiszámított OrthoANI értékek alapján készített hőtérkép a D2M1<sup>T</sup> törzs és a közeli rokon *Acidovorax* fajok között. A színek a legközelebbi rokonságban álló fajt pirossal a legtávolabbi zölddel jelzi.

Továbbá a D2M1<sup>T</sup> és a legközelebbi rokontörzsek felhasználásával egy teljes genom alapú filogenetikai fát is rekonstruáltunk az UBCG szoftverrel (31. ábra). A UBCG törzsfán a D2M1<sup>T</sup> törzs az *Acidovorax delafieldii* DSM64<sup>T</sup>, *Acidovorax radialis* DSM23535<sup>T</sup>, *Acidovorax facilis* DSM649<sup>T</sup> és *Acidovorax kalamii* DSM 649<sup>T</sup> törzsekkel klasztereződött, mely összhangban van az OrthoANI és dDDH eredményeivel. A kapott OrthoANI és dDDH értékek, valamint a teljes genom alapú filogenetikai vizsgálatok alapján az D2M1<sup>T</sup> törzs az *Acidovorax* nemzetségen belül új fajként írható le.

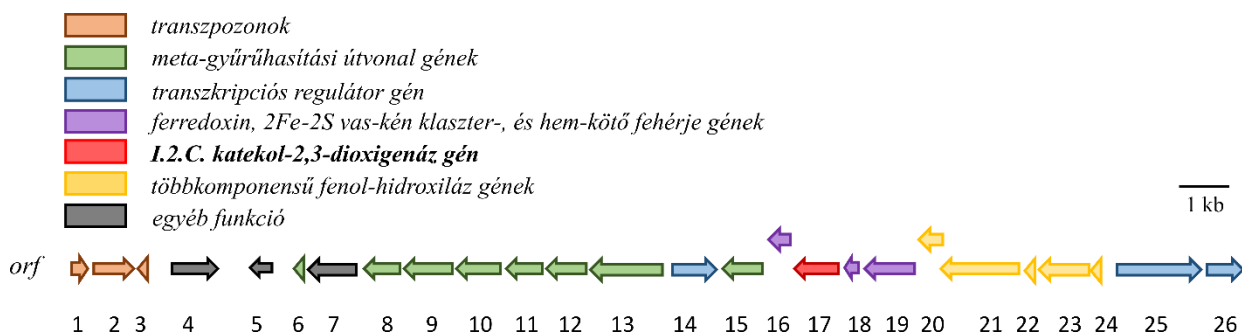


31. ábra: A D2M1<sup>T</sup> törzs taxonómiai helyzetét bemutató teljes genom alapján létrehozott UBCG filogenetikai törzsfa.

A genomelemzés a CLC Genomics Workbench Tool segítségével végeztük, melynek 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 (32. ábra). Három, a klasztert határoló IS3 és IS5 családba tartozó, transzpozonokat kódoló ORF-et is azonosítottunk „downstream” helyzetben. Az aromás vegyületek katabolizmusát kódoló génklaszterek terjedésében általában mobilis genetikai elemek, például transzpozonok és plazmidok játszanak szerepet, amelyek elősegítik a horizontális géntranszfer, és ezáltal biztosítják a mikroorganizmusok gyors alkalmazkodását az új szennyezőanyagokhoz, emellett a horizontális géntranszfer megnöveli a C23O gének diverzitását (Díaz 2004). A transzpozonok jelenléte a fenol-bontó génklaszter közelében feltehetően azt jelzi, hogy a D2M1<sup>T</sup> törzs horizontális géntranszfer révén tett szert a génklaszterre.

A *Betaproteobacteriales* rend egyes tagjainak többféle, olyan dioxigenáz-alapú aerob útja van az aromás szénhidrogének lebontásához, amely alkalmazkodik az oxigén-limitált körülményekhez. Így például az *Acidovorax* nemzetség tagjai egyrészt rendelkezhetnek katekol 2,3-dioxigenázzal, ugyanakkor egy nagy oxigén-affinitású (klór)katekol 1,2-dioxigenáz (C12O) enzimet is használhatnak a benzol aromás gyűrűjének *orto*-típusú (intradiol) hasításához (Kiesel

et al. 2008). 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.



32. ábra: A D2M1<sup>T</sup> törzs aromás szénhidrogén lebontásban szerepet játszó génjei. A nyilak a nyitott leolvasási kereteket jelölik (ORF=open reading frame), az irányuk a transzkripció irányát jelzi. A színek pedig az aromás szénhidrogének lebontásában szerepet játszó gének különböző

funkcionális csoportjait jelölik. *orf1*: IS5 családba tartozó transzpozon; *orf2*: IS3 családba tartozó transzpozon; *orf3*: IS3 családba tartozó transzpozon; *orf4*: háromrészes trikarboxilát transzporter szubsztrátkötő fehérje; *orf5*: DUF3363 domént tartalmazó fehérje, relaxáz/mobilizációs nukleáz és DUF3363 domént tartalmazó fehérje; *orf6*: 4-oxalokrotonát tautomeráz; *orf7*: háromrészes trikarboxilát transzporter szubsztrátkötő fehérje; *orf8*: 2-oxo-hex-3-éndisav dekarboxiláz; *orf9*: 4-hidroxi-2-oxovalerát aldoláz; *orf10*: acetaldehid dehidrogenáz; *orf11*: SDR családba tartozó oxidoreduktáz; *orf12*: 2-oxopenta-4-enoát hidratáz; *orf13*: 2-hidroximukonsav félaldehid dehidrogenáz; *orf14*: LysR szubsztrátkötő domént tartalmazó fehérje; *orf15*: alfa/béta hidroláz; *orf16*: hem-kötő fehérje; *orf17*: katekol-2,3-dioxigenáz; *orf18*: ferredoxin; *orf19*: 2Fe-2S vas-kén klaszterkötő domént tartalmazó fehérje; *orf20-24*: fenol-hidroxiláz komponensek; *orf25*: : sigma-54 dependens transzkripció regulátor; *orf26*: GntR családba tartozó transzkripció regulátor.

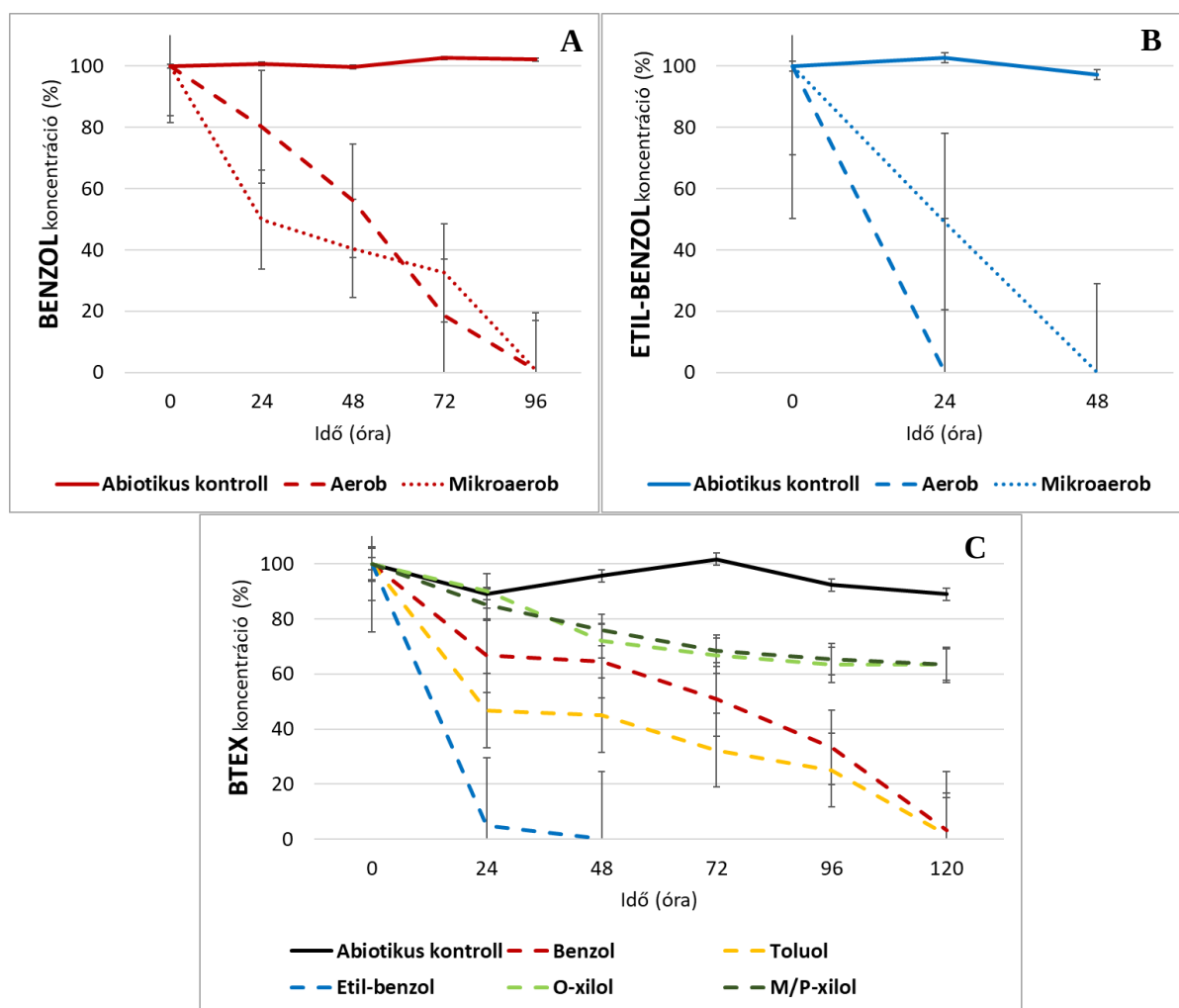
Etil-benzol dioxigenázt nem sikerült azonosítanunk az automatikus annotáció segítségével. Az etil-benzol lebontás egy másik lehetséges útja a naftalin-dioxigenáz enzim közreműködésével az etil-csoport oxidációján keresztül megy végbe (Lee és Gibson 1996, Lee et al. 2019). A GenBank adatbázisában számos *Acidovorax* faj genomjában került azonosításra korábban a naftalin 1,2-dioxigenáz enzim, mint például az *Acidovorax carolinensis* (ART53508) és az *Acidovorax kalamii* (OYD47947) törzsekben. Valamint Benedek és munkatársai (2020) által izolált *Acidovorax* sp. R1.1\_5 törzs, mely legnagyobb szekvencia hasonlóságot az *Acidovorax delfieldii*-vel mutatta, szintén képes volt a naftalin lebontására és rendelkezett a naftalin-dioxigenáz reduktáz komponensét (2Fe-2S) kódoló génnel. Az aromás-gyűrű-hidroxiláló dioxigenázok családjába

tartozó géneket sikerült azonosítanunk a D2M1<sup>T</sup> genomjában, melyhez többek között a naftalindioxigenáz is tartozik. A kódolt fehérjeszekvenciát a BLAST keresőprogram segítségével (<http://11>) összehasonlítottunk a GenBank adatbázisban fellelhető szekvenciákkal, mely esetben az *Acidovorax* sp. 94 fajhoz tartozó szalicilát-5-hidroxiláz enzimmel (RKR67561.1) 100%-os egyezést találtunk. A szalicilát-5-hidroxiláz kulcsszerepet játszik a naftalin biodegradációjában és a szalicilát genzizáttá történő átalakulását katalizálja (Park et al. 2007). Ezek alapján feltételezhető volt, hogy a D2M1<sup>T</sup> törzs a naftalin lebontásához szükséges enzimek segítségével az etil-benzol bontására is képes lehet.

#### **4.3.3.3. A D2M1<sup>T</sup> törzs aromás szénhidrogén bontóképessége**

A GC-MS mérések eredményei alapján a D2M1<sup>T</sup> törzs képes volt aerob és mikroaerob módon a benzolt és az etil-benzolt egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítani (33. A, B ábra). Az etil-benzol aerob lebontása 24 órán belül ment végbe, míg a benzol 72 óra elteltével mutatott jelentős csökkenést az aerob üvegekben, teljes lebontásához 96 órára volt szükség. Az etil-benzol mikroaerob lebontása hatékonyabbnak bizonyult a benzolénál, az előbbi a D2M1<sup>T</sup> törzs 48 óra alatt, az utóbbit szintén 96 óra alatt hasznosította. A D2M1<sup>T</sup> törzs nem volt képes a xilolokat egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítani.

Más monoaromás szénhidrogének jelenlétében egy nagyon lassú folyamat eredményeként a toluol is lebomlott 5 napon belül (33. C ábra). A BTEX vegyületek keverékét tartalmazó kísérlet esetében hatékony BTEX-bontásról egyedül az etil-benzol esetében beszélhetünk, melyet hozzávetőleg 24 óra alatt képes volt lebontani, azonban a benzol kezdeti mennyiségének 20% alá történő csökkenéséhez, hasonlóan toluolhoz, szintén 5 napra volt szükség. Egyedüli szénforrásként ennél jóval hatékonyabban működött a benzollebontás aerob körülmények között. Ennek hátterében a toluolnak és az etil-benzolnak a benzol aerob biodegradációt gátló hatása állhat. 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.

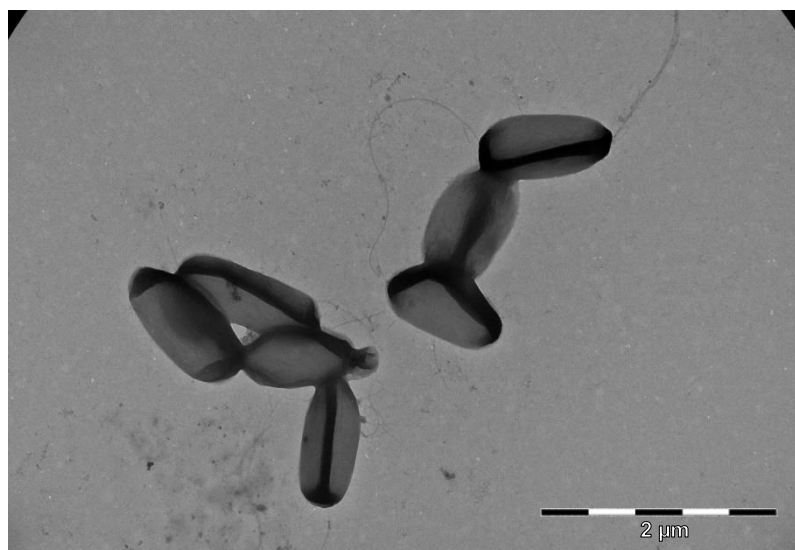


33. ábra: Az *Acidovorax* sp. D2M1<sup>T</sup> törzs aromás szénhidrogén-bontó képessége a GC-MS vizsgálatok eredménye alapján - **A:** D2M1<sup>T</sup> törzs benzollebontó képessége; **B:** D2M1<sup>T</sup> törzs etilbenzollebontó képessége; **C:** A D2M1<sup>T</sup> törzs BTEX-bontó képessége az összes aromás szénhidrogén jelenlétébe.

#### 4.3.3.4. Fiziológiai, morfológiai és biokémiai vizsgálatok

A D2M1<sup>T</sup> törzs Gram-negatív, fakultatív anaerob, pálcika alakú, 1,2-1,3 µm hosszú és 0,5-0,6 µm széles sejteket képez, melyek mozgásra képesek egy monotrich poláris flagellum révén (34. ábra). Átlátszó, halványsárga, közepes méretű telepeket formál 1-2 napos inkubáció után 28°C-on R2A agaron.

A D2M1<sup>T</sup> törzs minden típusú táptalajon képes volt növekedni, de előnyben részesítette a magas tápanyagtartalmú, alacsony sótartalmú táptalajokat, mint a TGE és a sómentes nutrient. A nutrient, TGE és LB táptalajokon a telepek sárgás színe erőteljesebb volt, mint az R2A táptalajon (35. ábra).



34. ábra: A D2M1<sup>T</sup> törzs transzmissziós elektronmikroszkópos képe 24 óra inkubáció után R2A táptalajon, 28°C-on (Készítette: Dr. Bóka Károly, Növény szervezettani Tanszék, ELTE).



35. ábra: A D2M1<sup>T</sup> törzs növekedési képessége különböző táptalajokon (saját készítésű kép).

A törzs jól nőtt 10-28°C hőmérsékleti és 6-10 közötti pH-tartományban, de 1 % (w/v) feletti NaCl tartalmú tápközeget nem tolerálta. A biokémiai és fiziológiai jellemzők összehasonlító elemzésének eredményeként nagy hasonlóságot tapasztaltunk a D2M1<sup>T</sup> törzs, az *Acidovorax delfieldii* DSM64<sup>T</sup> és az *Acidovorax radialis* DSM 23535<sup>T</sup> referencia törzsek között. Az API ZYM tesztekben a referencia törzsekkel megegyező enzimaktivitást észleltünk. Pozitív reakciókat figyeltünk meg az észteráz (C4), észteráz lipáz (C8), leucin arilamidáz, valin arilamidáz, naftol-AS-BI-foszfohidroláz esetében. A D2M1<sup>T</sup> törzs képes volt a Tween 80, a karbamid, a kazein és a zselatin hidrolízisére, illetve oxidáz és foszfatáz aktivitást mutatott. Emellett a törzs képes volt a nitrátot nitrogénné redukálni, és peptonból H<sub>2</sub>S-t termelt. Az API 20NE és API 50 CH eredményei alapján a D2M1<sup>T</sup> a vizsgált szénhidrátok széles skáláját tudta asszimilálni és fermentálni, mint például a D-glükózt, L-arabinozt, D-mannózt és D-mannitot. A törzs ezek mellett képes volt kálium-glükonát, adipinsav, malátasav, glicerin, D-galaktóz, D-fruktóz, D-szorbit, esculin vas-

citrát, D-fukóz és D-arabitol hasznosítására is. A D2M1<sup>T</sup> törzs anaerob körülmények között is képes volt növekedni a KNO<sub>3</sub> tartalmú R2A táplevesben, így fakultatív anaerob szervezetnek bizonyult. Az 8. táblázat tartalmazza a D2M1<sup>T</sup> törzs biokémiai és fiziológiai jellemzői közül azokat, melyek alapján elkülöníthető a referencia törzsektől.

8. táblázat: Az 1. törzs (D2M1<sup>T</sup>), a 2. törzs (*Acidovorax delafieldii* DSM64<sup>T</sup>), a 3. törzs (*Acidovorax radialis* DSM23535<sup>T</sup>) főbb fenotípusos és biokémiai jellemzői; +, pozitív; -, negatív; W, gyenge pozitív.

| <b>Tulajdonságok</b>                    | <b>1</b>     | <b>2</b>  | <b>3</b>  |
|-----------------------------------------|--------------|-----------|-----------|
| Telepek színe                           | halványsárga | krémszínű | krémszínű |
| Hőmérséklet tartomány (Celsius)         | 10-28        | 18-37     | 18-28     |
| pH tartomány                            | 6-10         | 6-10      | 6-10      |
| NaCl tolerancia (% w/v)                 | 1            | 1         | 1         |
| Kataláz                                 | -            | +         | -         |
| Ureáz                                   | +            | +         | -         |
| Denitrifikáció                          | +            | -         | +         |
| Nitrát redukció nitráttá                | -            | +         | -         |
| <b>Szubsztráthasznosítás (API 20NE)</b> |              |           |           |
| Eszkulin                                | -            | w         | +         |
| Adipinsav                               | w            | -         | -         |
| <b>Szénhidráthasznosítás (API 50CH)</b> |              |           |           |
| Glicerol                                | w            | -         | w         |
| L-arabinóz                              | +            | -         | +         |
| D-galaktóz                              | w            | -         | +         |
| D-glükóz                                | +            | -         | +         |
| D-mannóz                                | w            | -         | w         |
| D-szorbitol                             | +            | w         | +         |
| D-fukóz                                 | w            | -         | +         |
| L-fukóz                                 | -            | -         | +         |

#### 4.3.3.5. Kemotaxonómiai vizsgálatok

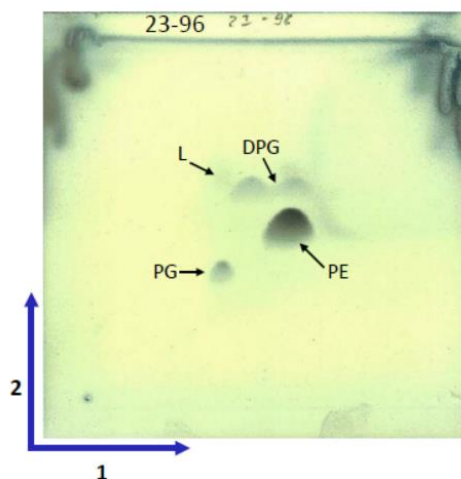
A D2M1<sup>T</sup> törzs főbb zsírsav komponensei közül a nem elváló (summed feature) zsírsavak 3-as (C<sub>16:1</sub> ω7c vagy C<sub>16:1</sub> ω6c) és 8- as (C<sub>18:1</sub> ω7c vagy C<sub>18:1</sub> ω6c) csoportja, valamint a C<sub>16:0</sub> voltak nagy mennyiségben jelen, hasonlóan az *Acidovorax delfieldii* DSM 64<sup>T</sup> és *Acidovorax radialis* DSM 23535<sup>T</sup> referenciatörzsekhez. A fő zsírsav-összetétel megerősítette a D2M1<sup>T</sup> taxonómiai helyzetét az *Acidovorax* nemzetségben, bár néhány mennyiségi eltérést figyeltünk meg a főbb komponensek esetében a referencia törzsekhez képest (9. táblázat).

9. táblázat: Az 1. törzs (D2M1<sup>T</sup>), a 2. törzs (*Acidovorax delfieldii* DSM64<sup>T</sup>), a 3. törzs (*Acidovorax radialis* DSM23535<sup>T</sup>) sejtmembránjának zsírsavösszetétele. Az adatok az összes zsírsav százalékban kifejezett részeként lettek feltüntetve.

| Zsírsavak                    | 1    | 2    | 3    |
|------------------------------|------|------|------|
| <b>Telített</b>              |      |      |      |
| C <sub>12:0</sub>            | 3.1  | 2.6  | 2.9  |
| C <sub>14:0</sub>            | 4.1  | 3.6  | 3.9  |
| C <sub>16:0</sub>            | 26.2 | 25.1 | 28.7 |
| <b>Hidroxi</b>               |      |      |      |
| C <sub>10:0</sub> 3-OH       | 3.2  | 2.9  | 2.6  |
| <b>Cyclic</b>                |      |      |      |
| C <sub>17:0</sub> cyclo      | 2.0  | 1.7  | 2.9  |
| <b>Nem elváló zsírsavak*</b> |      |      |      |
| 3                            | 43.6 | 39.4 | 44.2 |
| 8                            | 16.1 | 23.3 | 13.6 |

\*A nem elváló (summed feature) zsírsavak két vagy három zsírsavkomponens együttese, amelyek a gázkromatográfiás analízis során nem különültek el egymástól a kromatogramon. Nem elváló zsírsavak csoportjai: 3- C<sub>16:1</sub> ω7c vagy C<sub>16:1</sub> ω6c; 8- C<sub>18:1</sub> ω7c vagy C<sub>18:1</sub> ω6c.

A D2M1<sup>T</sup> törzsben a fő respiratorikus kinon az ubikinon-8 (Q-8) (94,8%) volt, míg az ubikinon-9 (Q-9) (2,5%) és az ubikinon-7 (Q-7) (2,7%) kisebb százalékos arányban volt jelen. A fő poláris lipidek a difoszfátidilglicerin (DPG), foszfátidilglicerin (PG), foszfátidil-etanolamin (PE) voltak. Ezenkívül egy azonosítatlan poláris lipid (L) detektálásra került sor a vizsgálatok során (36. ábra).



36. ábra: A D2M1<sup>T</sup> törzs sejtmembránjában előforduló fő poláris lipidek. DPG= difoszfátidilglicerin; PE= foszfátidil-etanol-amin; PG= foszfátidil-glicerint; L= lipid.

A filogenetikai és kemotaxonómiai vizsgálatok eredményei alapján megállapítható, hogy a D2M1<sup>T</sup> jelű törzs az *Acidovorax* nemzetségen belül egy új fajt képvisel, melynek az *Acidovorax benzenivorans* nevet adtuk. A törzs képes egyedüli szén-és energiaforrásként hasznosítani az aerob és mikroaerob körülmények között a benzolt és az etil-benzolt, illetve kevert BTEX szennyezés esetén a toluol lebontására is képes lehet. A D2M1<sup>T</sup> törzset a Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures és a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Magyar Nemzeti Gyűjteménye (MIMG) ("National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms (NCAIM) törzsgyűjteményeknél helyeztük letétbe a következő azonosítókkal: DSM 115238<sup>T</sup>, NCAIM B.02679<sup>T</sup>.

#### Új tudományos eredmény a 4.3. fejezet alapján:

**III. tézis:** A mikroaerob benzollebontó dúsítótényezsetből sikeresen izoláltunk egy, a *Pinisolibacter* nemzetséghez tartozó baktériumtörzset, mely teljes genom analízise alapján I.2.B-típusú katekol-2,3-dioxigenáz enzimmal 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.

Az eredményeket az alábbi publikációban ismertettük:

**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.

**IV: tézis:** Sikerült izolálnunk a mikroaerob benzollebontó dúsítótenyészetekből 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.

Az eredményeket az alábbi publikációban ismertettük:

**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.

**V. tézis:** Molekuláris genetikai vizsgálatok alapján igazoltuk, hogy a benzolbontó dúsítótenyészetek 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.

Az eredményeket az alábbi publikációban ismertettük:

**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.

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS 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 benzol és a többi monoaromás vegyület kis szénatomszáma révén illékony vegyületek, valamint szerkezeti tulajdonságaiknak köszönhetően a talajvizekbe oldódhatnak, veszélyeztetve ezzel az ivóvízbázisokat is (Truskewycz et al. 2019). A mikroorganizmusok az ökoszisztémák regenerációjában kulcsszerepet játszanak, ugyanis idővel a mikrobiális öközösség adaptálódik az új szénforráshoz és megkezdik a szennyezőanyag lebontását enzimekatalizált folyamatok által. Egy diverz enzimekészlettel 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 anyagsereútvonalak 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 a gének diverzitása a baktériumközösségben (Eltis és Bolin 1996, Kukor és Olsen 1996, Táncsics 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. Az oxigénlimitáció és a benzol, mint egyedüli szén-, és energiaforrás jelenléte olyan szélsőséges környezeti paramétereket teremtenek, melyeket csak a baktériumok szűk közössége képes tolerálni, így a mikroaerob benzolbontó baktériumközösségek dinamikájának és összetételének, valamint a törzsek teljes genomjának vizsgálata és metabolikus képességeinek feltárása fontos információval szolgálhat a kiterjedt felszín alatti olajszennyezések gyors és hatékony felszámolásához.

Valamennyi elvégzett kísérletünkhöz a talajvíz és üledék mintákat a Táncsics és munkatársai (2012, 2013) által részletesen jellemzett siklósi kárhelyről vettük észlelő kutakon keresztül. Jelen

dolgozat keretein belül benzollebontó mikroaerob dúsítótenyészeteket hoztunk létre annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogyan változik a baktériumközösség oxigénszegény, kizárólag benzolt tartalmazó közegben összehasonlítva azokkal a dúsítótenyészetekkel, melyek egyéb BTEX vegyületeket is tartalmaztak kis mennyiségben a benzol mellett. Ezen kívül a többi aromás szénhidrogén vegyületnek a benzol-biodegradációra gyakorolt hatását is vizsgáltuk mikroaerob környezetben.

- ❖ Megállapítottuk, hogy a benzollebontás hatékonyabb volt abban az esetben, amikor a benzol, mint egyedüli szén-és energiaforrás volt jelen a dúsítótenyészetekben. A benzol-biodegradációra a BTEX keverék tartalmú tenyészetekben főként a xilol izomerek jelenléte volt nagy hatással, melyek feltehetően gátolták a benzollebontást, míg az etil-benzol és a toluol valamennyi aromás vegyület bontási hatékonyságát növelte.
- ❖ A benzol és más BTEX keverék tartalmú dúsítótenyészetek baktériumközössége összetételében hasonló volt egymáshoz, azonban a domináns fajok arányában jelentős eltéréseket tapasztaltunk. 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.

Eredményeink alapján az, hogy mely baktériumközösség tagjai válnak dominánssá, nagyban függ a szénforrás típusától, illetve attól, hogy a többségben jelenlévő aromás szénhidrogén önmagában vagy egyéb BTEX vegyületekkel együtt van jelen a baktériumok környezetében. Mivel a természetes ökoszisztémákban többségében kevert szennyezésekről beszélhetünk, ezért fontos megvizsgálni, hogy hogyan hatnak egymásra és a közösség alakulására az egyes szénhidrogénvegyületek. Emellett nem szabad figyelmen kívül hagyni az aromás vegyületek közti szubsztrát interakciók biodegradációra gyakorolt hatását kevert BTEX szennyezés esetén.

A dúsítótenyészeteken kívül olyan aerob és mikroaerob mikrokozmoszokat is létrehoztunk, melyekben az egyedüli szénforrásként stabilizotóposan jelölt benzol volt jelen. Elsőként ampliton szekvenálással képet kaptunk a mikrokozmoszok teljes baktériumközösségéről, majd a jelölt és a jelöletlen DNS-t sűrűség szerint cézium-klorid oldat segítségével, ultracentrifugálással választottuk el, ezt követően pedig a nehéz és a könnyű frakciók 16S rDNS profilját összehasonlítottuk egymással.

- ❖ Összességében megállapítottuk, hogy a közel egy hetes kísérleti időszakban nagyon eltérő benzolbontó mikrobaközösségek alakultak ki aerob és mikroaerob körülmények között.

- ❖ Az aerob dúsítótenyészetekben a *Pseudomonas*, *Rhizobium* és *Thauera* nemzetségek domináltak, míg mikroaerob körülmények között főként a *Malikia* és az *Azovibrio* nemzetség képviselői voltak jelen nagy arányban. Aerob körülmények tekintetében a *Pseudomonas* és a *Rhizobium*, mikroaerob körülmények esetén pedig az *Azovibrio* és a *Malikia* nemzetségek benzollebontásban betöltött kiemelkedő szerepe nyert megerősítést a frakcionálást követően a nehéz DNS frakcióban mutatott jelentős feldúsulásuk miatt.
- ❖ Az aerob mikrokozmoszokban a *Pseudomonas* nemzetséghez tartozó legjelentősebb OTU ezen belül egyértelműen egy, a dúsítótenyészetekből szintén kitenyésztett, Banerjee és munkatársai (2022b) által a siklósi kárhelyről izolált *P. aromaticivorans* fajhoz volt köthető, mely a kapott eredmények alapján egyértelműen kiemelkedő benzolbontóként azonosítottunk aerob körülmények között.
- ❖ Emellett a kevés ismert, leírt fajt magába foglaló *Azovibrio* nemzetség ökológiai szerepe és BTEX lebontásban betöltött kiemelkedő jelentősége is beigazolódott a stabilizotópos vizsgálat során.

Eredményeink alapján egyértelmű megerősítést nyert, hogy az aromás szénvegyület típusa mellett az oxigén jelenléte is nagy hatást gyakorol a baktériumközösségre, ugyanis markánsan más mikroszervezetek vesznek 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 2019 októberében készült benzol tartalmú dúsítótenyészetek adataival összevetve a 2022 májusában végzett mikrokozmosz kísérletek amplikonszekvenálásának eredményeit azt lehet megfigyelni, hogy a *Pseudomonas* és a *Rhizobium* nemzetségek kivételével a közösség összetételét tekintve különböznek egymástól. A két kísérlet bár alapbeállítást tekintve hasonló, azonban a bemért benzol mennyisége, az inkubációs idő és a kiindulási minta sem egyezett meg a két kísérlettípus összeállítására és elvégzése során, mely eredményezhette a végeredményül kapott baktériumközösség eltérőségét. A dúsítótenyészeteket 5 héten keresztül hetente átolttva, míg a mikrokozmoszokat mindössze egy héten keresztül inkubáltuk. 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. Példaként említeném a *Malikia* nemzetséget, mely esetében eddig az aerob benzolbontásban tulajdonítottak neki kiemelkedő szerepet, a 2022-es stabil izotópos kísérlet azonban igazolta, hogy

mikroaerob módon is képes a hasznosítani a benzolt. Azonban egy öt hetes dúsítófolyamat során az elérhető szénforrásért folytatott kompetíció révén egyéb, gyorsabban szaporodó nemzetségek nagyobb teret nyerhetnek, így fordulhatott elő, hogy a *Malikia* nemzetség a 2019-es kísérleti felállásban 1% alatti abundanciával rendelkezett. További példaként szolgál a fajok közötti versenyre a *Rhodoferrax* és az *Azovibrio* nemzetségek, melyek hasonló ökológiai niche-t töltenek be és valószínűsíthető, hogy hol az egyik, hol a másik nemzetségbe tartozó fajok válnak dominánssá. Emellett figyelemre méltó a 2019-es és 2022-es mintavételi év időjárási paraméterei, mely befolyásolhatta a talajvíz BTEX koncentrációjának mennyiségét. A 2022-es évben tapasztalt rendkívüli aszály hatására ugyanis magasabb volt az aromás szénhidrogének mennyisége a bemért kiindulási minta esetében, mely szintén hatással lehetett az üledékben lévő baktériumközösség összetételére.

A dúsítótenyészetek esetében tenyésztési módszerrel is vizsgáltuk a baktériumközösségeket, melynek során három, a tudomány számára új baktériumfajt sikerült izolálnunk. A csak benzolt tartalmazó dúsítótenyészetekből izoláltuk a *Pinisolibacter* illetve az *Ideonella* nemzetséghez tartozó baktériumtörzseinket, melyek teljes genomanalízisét elvégezve bizonyítást nyert, hogy a két törzs rendelkezik az aromás szénhidrogének lebontásához szükséges génkészlettel. Mindkét törzs új fajként történő leírásához szükséges vizsgálatokat a nemzetközi követelményeknek megfelelően végeztük el, valamint GC-MS segítségével igazoltuk az aromás szénhidrogén bontó képességüket.

- ❖ A *Pinisolibacter aquiterrae* B13<sup>T</sup> törzs genomjában azonosítottunk egy I.2.B-típusú katekol-2,3-dioxigenáz enzimet kódoló gént, mely egy részleges *meta*-hasítási útvonalat kódoló génklaszter részeként volt jelen. Ezen kívül egy toluol-monooxygenázt kódoló génklasztert is találtunk a genomban, amely kiegészítette a részleges *meta*-gyűrűhasító génklasztert. A B13<sup>T</sup> törzs aerob körülmények között képes volt az etil-benzol teljes lebontására. Abban az esetben azonban, amikor az összes BTEX vegyület jelen volt, valamennyi aromás szénhidrogén vegyület koncentrációját minimálisra csökkentette.
- ❖ Az *Ideonella benzenivorans* B7<sup>T</sup> törzs ezzel szemben rendelkezett egy olyan fenol-degradációs génklaszterrel, melyben kódolva van az I.2.C-típusú katekol-2,3-dioxigenáz gén egy teljes *meta*-gyűrűhasítási útvonal részeként. A B7<sup>T</sup> törzs a GC-MS vizsgálatok alapján az aromás vegyületek szélesebb skáláját tudta egyedüli szén-és energiaforrásként hasznosítani, ugyanis aerob és mikroaerob körülmények között is lebontotta a benzolt, az etil-benzolt és a toluolt is. Az összes BTEX vegyületet

tartalmazó bontási kísérletben a törzs aktivitásának hatására pedig valamennyi aromás szénvegyület degradálódott.

Egy harmadik, *Acidovorax* nemzetségbe tartozó baktériumtörzs új fajként történő leírására is sor került a jelen dolgozat keretén belül, melyet korábban szintén az általunk vizsgált kárhely kísérletei során egy *meta*-xilol-bontó dúsítótényészetből izoláltak (Banerjee et al. 2022a). A dúsítótényészeinkben jelenlévő *Acidovorax* nemzetséghez tartozó OTU az *A. delafieldii* fajjal mutatta a legnagyobb 16S rRNS szekvencia hasonlóságot, akárcsak a vizsgált és a nemzetközi követelményeknek megfelelően új fajként leírt *Acidovorax benzenivorans* D2M1<sup>T</sup> törzs.

- ❖ A teljes genom analízis alapján A D2M1<sup>T</sup> törzs rendelkezik az I.2.C-típusú katekol-2,3-dioxigenáz génnel és egy teljes *meta*-gyűrűhasítási útvonalat kódoló fenol-degradációs génklaszterrel. A törzs BTEX-bontó képességét GC-MS segítségével megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy képes volt aerob és mikroaerob körülmények között is lebontani a benzolt és az etil-benzolt, valamennyi BTEX vegyület jelenlétében pedig ezek mellett a toluolt is egy igen lassú bontási folyamat során.

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<sup>T</sup> és az *Acidovorax benzenivorans* D2M1<sup>T</sup> esetében pedig kiváltképp a benzolt hasznosítani, ugyanis a természetes környezetben, akárcsak 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<sup>T</sup>, 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, akár csak a tenyésztéses 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.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Világszerte egyre nagyobb a kereslet a kőolajvegyületek iránt, mely a szárazföldi és vízi kőolajszennyezések mértékét is jelentősen megnövelte napjainkban. Az egyik legkiemelkedőbb petrolkémiai alapanyag a benzol, így évente több, mint 50 millió tonnára becsülik az ipari felhasználását, azonban valamennyi BTEX vegyület közül legkártékonyabbnak a benzol mondható humán egészségügyi és környezetvédelmi szempontból is. A szárazföldi olajszennyezések kiterjedését és a környezet károsításának mértékét nagyban befolyásolja a talaj és a szennyezőanyag fizikai és kémiai tulajdonságai, valamint a terület hidrogeológiai adottságai. Az olajszennyezés jelentős mértékben átalakítja és károsítja az érintett terület ökoszisztémáját közvetlen vagy közvetett toxikus hatása révén a táplálékláncon keresztül akkumulálódva. A benzol és a többi aromás szénhidrogén vegyület környezetkárosító hatását fokozza, hogy viszonylag könnyen oldódnak a talajvízben, mely által nagy távolságokra eljuthatnak és az ivóvízbázisokat is veszélyeztethetik, emellett oxigénlimitált felszín alatti környezetben a benzol perzisztens vegyület.

A környezet regenerálódóképességében nagy szerepet játszanak azok az őshonos mikroorganizmusok, melyek a szennyezőanyaghoz adaptálódva megkezdik annak lebontását speciális enzimműködésük segítségével. A BTEX vegyületek lebontása felszín alatti oxigénlimitált körülmények között az alacsony oxigénkoncentráció mellett is aktív I.2.C-típusú katekol-2,3-dioxigenáz enzim közreműködésével valósul meg alapvetően, melyet kódoló gén horizontális géntranszfer útján terjedhet a baktériumközösségben. A főbb szénhidrogén-lebontó fajok általában a *Proteobacteria* törzsből kerülnek ki, ezen belül is a legtöbb BTEX bontó a *Comamonadaceae* családba tartozik, melyek jelentős katekol-2,3-dioxigenáz gén diverzitással rendelkeznek az aromás vegyületekkel szennyezett felszín alatti területeken. A bioremediáció hatékonyságát a mikroorganizmusok metabolikus potenciálja mellett számos abiotikus tényező is befolyásolja, mint a hőmérséklet, nedvességtartalom, sótartalom, pH, tápanyagellátottság és az alternatív elektronakceptorok elérhetősége.

A hatékony kármentesítési folyamatok megtervezéséhez elengedhetetlen a terület adottságainak, a szennyezett talaj fizikai-kémiai paramétereinek és az őshonos baktériumközösségek összetételének együttes ismerete. Ezért célul tűztük ki az olyan benzollebontó mikrobaközösségek és baktériumtörzsek vizsgálatát, melyek a felszín alatti oxigénszegény környezetben is mutatnak biodegradációs aktivitást. Nagy hangsúlyt fektettünk a tudomány számára ismeretlen, kiváló benzolbontó potenciállal rendelkező új fajok izolálására, melyek teljes genom analízisével feltárhatjuk a mikroaerob benzollebontás genetikai hátterét.

Valamennyi elvégzett kísérletünkhöz a talajvízüledék mintákat a Tánicsics és munkatársai (2012, 2013) által részletesen jellemzett siklói kárhelyről vettük észlelő kutakon keresztül.

Elsőként mikroaerob benzol-, és BTEX vegyületek keverékét tartalmazó dúsítótenyészeteket hoztunk létre, melyek baktériumközösségeit amplitonszekvenálás segítségével tártuk fel. A benzol tartalmú dúsítótenyészetekben a *Rhodoferrax* nemzetség tagjai voltak dominánsok, a keverék tartalmúakat pedig leginkább a *Pseudomonas* nemzetség uralta. Ezen kívül az *Acidovorax* nemzetség is számottevő volt és hasonló abundanciával volt jelen mindkét típusú dúsítótenyészetben. Emellett megállapítottuk, hogy a benzol-biodegradációra a BTEX keverék tartalmú tenyészetekben főként a xilol izomerek jelenléte volt nagy hatással, melyek feltehetően gátolták a benzollebontást, míg az etil-benzol és a toluol valamennyi aromás vegyület bontási hatékonyságát növelte.

Ezt követően stabil izotóposan jelölt benzol tartalmazó aerob és mikroaerob mikrokozmoszokat hoztunk létre, hogy azonosítsuk a benzollebontás aktív résztvevőit a közösségből. Eredményeink alapján aerob körülmények között a *Pseudomonas* és a *Rhizobium*, mikroaerob körülmények esetén pedig az *Azovibrio* és a *Malikia* nemzetségek benzollebontásban betöltött kiemelkedő szerepe nyert megerősítést. Emellett a tapasztalt eredmények alapján kiemelkedő benzolbontóként azonosítottuk aerob körülmények között a *Pseudomonas aromaticivorans* fajt, valamint a korábban ismeretlen ökológiai szerepet betöltött *Azovibrio* nemzetség jelentősége is beigazolódott az aromás szénhidrogének lebontásának kapcsán.

A dúsítótenyészetekből izoláltuk, majd új fajként írtuk le a *Pinisolibacter aquiterrae* B13<sup>T</sup> törzset, mely rendelkezik I.2.B-típusú C23O enzimmel és képes aerob körülmények között etil-benzol lebontásra. Emellett az *Ideonella benzenivorans* B7<sup>T</sup> izolálására és fajleírására is sor került. A törzs rendelkezett egy fenol-degradációs génklaszterben kódolt teljes *meta*-gyűrűhasítási útvonallal és egy I.2.C-típusú C23O génnel, mely által aerob és mikroaerob körülmények között is képes volt bontani a benzolt, az etil-benzolt és a toluolt. Végül egy korábban *meta*-xilol dúsítótenyészetből izolált *Acidovorax* fajleírása is megtörtént, mely nagy szekvencia hasonlóságot mutatott a dúsítótenyészeinkben feldúsult *Acidovorax* nemzetséget képviselő OTU-val. Az *Acidovorax* sp. D2M1<sup>T</sup> törzs képes volt aerob és mikroaerob körülmények között is lebontani a benzolt és az etil-benzolt, így az *Acidovorax benzenivorans* nevet adtuk neki.

Az olajszennyezések megnövekedett mértéke miatt annak felszámolására is egyre nagyobb hangsúlyt fektet a világ, így a tudományban is gyakran központi szerepet kapnak az ezzel foglalkozó tanulmányok. Jelen kutatási eredmények hozzájárulnak az aromás szénhidrogénekkel szennyezett felszín alatti közegekben zajló mikrobiális folyamatok mélyebb megértéséhez, mely hatékonyabbá teheti a jövőbeli bioremediációs és ezen belül a bioaugmentációs tevékenységeket.

## 7. SUMMARY

Worldwide, demand for petroleum compounds is increasing, which has led to a significant increase in the level of oil pollution on land and in water. Benzene is one of the most prominent petrochemical feedstocks, with an estimated industrial use of more than 50 million tonnes per year, but benzene is the most harmful of all BTEX compounds in terms of human health and the environment. The extent of terrestrial oil spills and the severity of the damage to the environment is considerably determined by the physical and chemical properties of the soil and contaminant, as well as the hydrogeological characteristics of the area. Oil pollution significantly restructures and damages the ecosystem of the affected area through direct or indirect toxic effects accumulating through the food chain. The environmental impact of benzene and other aromatic hydrocarbon compounds is intensified by their relatively high solubility in groundwater, which can transport them over long distances and potentially threaten drinking water sources, and by the persistence of benzene in oxygen-limited subsurface environments.

Endemic microorganisms that adapt to the pollutant and start to degrade it with the use of their special enzyme set play a major role in the regenerative capacity of the environment. The degradation of BTEX compounds under oxygen-limited subsurface is usually mediated by the I.2.C. type catechol-2,3-dioxygenase enzyme, which is active under oxygen limited conditions and the gene encoding this enzyme can spread through the bacterial community by horizontal gene transfer. The main hydrocarbon-degrading species are generally found in the *Proteobacteria* phylum, within this group most of the BTEX degraders belong to the *Comamonadaceae* family, which have a high diversity of catechol-2,3-dioxygenase genes in the subsurface contaminated with aromatic compounds. In addition to the metabolic potential of microorganisms, the efficiency of bioremediation is influenced by several abiotic factors such as temperature, humidity, salinity, pH, and the availability nutrient and alternative electron acceptors.

To plan an effective remediation process, it is essential to have a comprehensive knowledge of the site conditions, the physico-chemical parameters of the contaminated soil and the composition of the endemic bacterial communities. Therefore, we aimed to investigate benzene-degrading microbial communities and bacterial strains that possess biodegradation activity in oxygen limited subsurface environments. A major focus was on isolating new species with excellent benzene-degrading potential, which are previously unknown to science, and through analysing their whole genome, the genetic background of microaerobic benzene degradation can be revealed.

For all of our experiments, groundwater and sediment samples were collected via monitoring wells from the Siklós site described in detail by Táncsics et al. (2012, 2013). First of all, microaerobic enrichment cultures containing a mixture of benzene and BTEX compounds were

established, and the bacterial communities were revealed by amplicon sequencing. Members of the genus *Rhodoferrax* were dominant in the benzene-containing enrichment cultures, while the genus *Pseudomonas* was the most dominant in the mixture-containing cultures. In addition, the genus *Acidovorax* was also abundant and was present in similar abundance in both types of enrichment cultures. In addition, it was observed that efficiency of benzene biodegradation in the BTEX mixture-containing cultures was mainly influenced by the presence of xylene isomers, which presumably inhibited the degradation of benzene, in contrast ethylbenzene and toluene increased the efficiency of biodegradation of all aromatic compounds.

Aerobic and microaerobic microcosms containing stable isotopically labelled benzene were then established to identify active participants of benzene degradation from the community. Our results confirmed the prominent role of *Pseudomonas* and *Rhizobium* in benzene degradation under aerobic conditions as well as the *Azovibrio* and *Malikia* under microaerobic conditions. In addition, the *Pseudomonas* aromaticivorans was identified as a prominent benzene degrader under aerobic conditions and the importance of the genus *Azovibrio* in aromatic hydrocarbon degradation was confirmed, as the genus had an unknown ecological role previously.

*Pinisolibacter aquiterrae* strain B13<sup>T</sup> was isolated from the enrichment cultures and described as a new species, possessing the enzyme I.2.B-type C23O and has the ability to degrade ethylbenzene under aerobic conditions. In addition, *Ideonella benzenivorans* B7<sup>T</sup> was also isolated from benzene-containing enrichment cultures and described as a new species. The strain had a full *meta*-ring cleavage pathway encoded in a phenol degradation gene cluster and an I.2.C-type C23O gene, by this genetic background the strain was able to degrade benzene, ethylbenzene and toluene under aerobic and microaerobic conditions. Finally, the description of an *Acidovorax* species previously isolated from a *meta*-xylene enrichment culture was performed. The strain was shown high sequence similarity with that OTU representing the genus *Acidovorax*, which was present in our enrichment cultures. The *Acidovorax* sp. strain D2M1<sup>T</sup> was able to degrade benzene and ethylbenzene under aerobic and microaerobic conditions, thus the strain was named *Acidovorax benzenivorans*.

The increasing extent of oil pollution has also led to a growing global focus on its elimination, and studies on oil pollution are often at the centre of science. The present results contribute to a deeper understanding of microbial processes in aromatic hydrocarbon-contaminated subsurface, which may improve the efficiency of bioremediation activities in future.

## 8. MELLÉKLETEK

### 8.1. Irodalomjegyzék

- Abbas, S. Z., Rafatullah, M., Khan, M. A., & Siddiqui, M. R. (2019). Bioremediation and electricity generation by using open and closed sediment microbial fuel cells. *Frontiers in microbiology*, 9, 3348.
- Abbasian, F., Palanisami, T., Megharaj, M., Naidu, R., Lockington, R., & Ramadass, K. (2016). Microbial diversity and hydrocarbon degrading gene capacity of a crude oil field soil as determined by metagenomics analysis. *Biotechnology Progress*, 32 (3), 638-648.
- Abou-Shanab, R. A., Eraky, M., Haddad, A. M., Abdel-Gaffar, A. R. B., & Salem, A. M. (2016). Characterization of crude oil degrading bacteria isolated from contaminated soils surrounding gas stations. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 97 684-688.
- Abu Laban, N., Selesi, D., Rattei, T., Tischler, P., & Meckenstock, R. U. (2010). Identification of enzymes involved in anaerobic benzene degradation by a strictly anaerobic iron-reducing enrichment culture. *Environmental microbiology*, 12 (10), 2783-2796.
- Aburto, A., & Ball, A. S. (2009). Bacterial population dynamics and separation of active degraders by stable isotope probing during benzene degradation in a BTEX-impacted aquifer. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 25 (3), 147-156.
- Aburto, A., Fahy, A., Coulon, F., Lethbridge, G., Timmis, K. N., Ball, A. S., & McGenity, T. J. (2009). Mixed aerobic and anaerobic microbial communities in benzene-contaminated groundwater. *Journal of applied microbiology*, 106 (1), 317-328.
- Aburto, A., & Peimbert, M. (2011). Degradation of a benzene–toluene mixture by hydrocarbon-adapted bacterial communities. *Annals of microbiology*, 61 (3), 553-562.
- Abuhamed, T., Bayraktar, E., Mehmetoğlu, T., & Mehmetoğlu, Ü. (2004). Kinetics model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. *Process Biochemistry*, 39 (8) 983-988.
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59 (1), 143-169.
- Anders, H. J., Kaetzke, A., KÄMPFER, P., Ludwig, W., & Fuchs, G. (1995). Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonad strains K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the

- Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45 (2), 327-333.
- Al-Awadhi, H., Sulaiman, R. H., Mahmoud, H. M., & Radwan, S. S. (2007). Alkaliphilic and halophilic hydrocarbon-utilizing bacteria from Kuwaiti coasts of the Arabian Gulf. *Applied microbiology and biotechnology*, 77, 183-186.
- Alfreider, A., & Vogt, C. (2007). Bacterial diversity and aerobic biodegradation potential in a BTEX-contaminated aquifer. *Water, air, and soil pollution*, 183, 415-426.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2010. Toxicological profile for Ethylbenzene. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. <https://wwwn.cdc.gov/TSP/PHS/PHS.aspx?phsid=381&toxid=66>
- 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](https://www.atsdr.cdc.gov/sites/toxzine/benzene_toxzine.html)
- Auffret, M., Labbé, D., Thouand, G., Greer, C. W., & Fayolle-Guichard, F. (2009). Degradation of a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives by *Rhodococcus aetherivorans* and *Rhodococcus wratislaviensis*. *Applied and environmental microbiology*, 75 (24), 7774-7782.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E. (1998) Preparing DNA from small-scale liquid lysates. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, Inc. p 1.13.8.
- 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.
- Arvin, E., Jensen, B. K., & Gundersen, A. T. (1989). Substrate interactions during aerobic biodegradation of benzene. *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (12), 3221-3225.
- Atlas, R. M., Bartha, R. (1972): Biodegradation and Mineralization of Petroleum in Seawater at Low Temperature. *Canadian Journal of Microbiology*, 18 (12), 1851-1855.
- Bacosa, H. P., Cayabo, G. D. B., & Inoue, C. (2023). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortium from paddy rice soil. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 58 (6), 617-622.
- Bak, F., Bonnichsen, L., Jørgensen, N. O., Nicolaisen, M. H., & Nybroe, O. (2015). The biosurfactant viscosin transiently stimulates n-hexadecane mineralization by a bacterial consortium. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 1475-1483.
- Banerjee, S., Bedics, A., Harkai, P., Kriszt, B., Alpula, N., & Táncsics, A. (2022, a). 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.
- Banerjee, S., Bedics, A., Tóth, E., Kriszt, B., Soares, A. R., Bóka, K., & Tánácsics, A. (2022, b). 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.
- Bank, H. S. D. (1992). National Library of Medicine, Bethesda, MD (CD-ROM version). Micromedex. Inc., Denver, CO (edition expires 11/31/94), HSDB-1994.
- Barrow, G. I., Feltham, R. K. A. (2004): Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, 3rd ed. Cambridge: *Cambridge University Press*
- Basuki, W. (2017). Biodegradation of used synthetic lubricating oil by *Brevundimonas diminuta* AKL 1.6. *Makara Journal of Science*, 136-142.
- Bateman, A. (2019) 'UniProt: A worldwide hub of protein knowledge', *Nucleic Acids Research*, 47, 506-515.
- Bedics, A., Tánácsics, A., Tóth, E., Banerjee, S., Harkai, P., Kovács, B., Bóka, K. & 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.
- Benedek, T., Szentgyörgyi, F., Szabó, I., Kriszt, B., Révész, F., Radó, J., Maróti, G., & Tánácsics, A. (2018). Aerobic and oxygen-limited enrichment of BTEX-degrading biofilm bacteria: dominance of *Malikia* versus *Acidovorax* species. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 32178-32195.
- Benedek, T., Szentgyörgyi, F., Szabó, I., Farkas, M., Duran, R., Kriszt, B., & Tánácsics, A. (2020). Aerobic and oxygen-limited naphthalene-amended enrichments induced the dominance of *Pseudomonas* spp. from a groundwater bacterial biofilm. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 6023-6043.
- Benedek, T., Szentgyörgyi, F., Gergócs, V., Menashe, O., Gonzalez, P. A. F., Probst, A. J., Kriszt, B. & Tánácsics, A. (2021). Potential of *Variovorax paradoxus* isolate BFB1\_13 for bioremediation of BTEX contaminated sites. *AMB Express*, 11, 1-17.
- Bergeon Burns, C. M., Olin, J. A., Woltmann, S., Stouffer, P. C., & Taylor, S. S. (2014). Effects of oil on terrestrial vertebrates: predicting impacts of the Macondo blowout. *BioScience*, 64 (9), 820-828.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917

- Bonfante, P., & Anca, I. A. (2009). Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annual review of microbiology*, 63, 363-383.
- Bradford, L. M., Vestergaard, G., Táncsics, A., Zhu, B., Schlöter, M., & Lueders, T. (2018). Transcriptome-stable isotope probing provides targeted functional and taxonomic insights into microaerobic pollutant-degrading aquifer microbiota. *Frontiers in microbiology*, 9, 2696.
- Breuer, H. (Szerk.) (1995): SH Atlasz, Kémia, Springer Hungarica Kiadó, Budapest, 298-329.
- Bray, J. R., & Curtis, J. T. (1957). An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological monographs*, 27 (4), 326-349.
- 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.
- Bucheli-Witschel, M., Hafner, T., Rüegg, I., & Egli, T. (2009). Benzene degradation by *Ralstonia pickettii* PKO1 in the presence of the alternative substrate succinate. *Biodegradation*, 20, 419-431.
- Cafaro, V., Izzo, V., Scognamiglio, R., Notomista, E., Capasso, P., Casbarra, A., Pucci, P., & Di Donato, A. (2004). Phenol hydroxylase and toluene/o-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1: interplay between two enzymes. *Applied and environmental microbiology*, 70 (4), 2211-2219.
- Carvalho, F. M., Souza, R. C., Barcellos, F. G., Hungria, M., & Vasconcelos, A. T. R. (2010). Genomic and evolutionary comparisons of diazotrophic and pathogenic bacteria of the order Rhizobiales. *BMC microbiology*, 10 (1), 1-15.
- Caspi, R., Billington, R., Ferrer, L., Foerster, H., Fulcher, C. A., Keseler, I. M., Kothari, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Mueller, L. A., Ong, Q., Paley, S., Subhraveti, P., D. S., & Karp, P. D. (2016). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. *Nucleic Acids Research*, 42 (1), 459–471.
- Castro, A. R., Martins, G., Salvador, A. F., & Cavaleiro, A. J. (2022). Iron Compounds in anaerobic degradation of petroleum hydrocarbons: A review. *Microorganisms*, 10 (11), 2142.
- Cavalca, L., Dell’Amico, E., & Andreoni, V. (2004). Intrinsic bioremediability of an aromatic hydrocarbon-polluted groundwater: diversity of bacterial population and toluene monooxygenase genes. *Applied microbiology and biotechnology*, 64, 576-587.

- Chakraborty, R., & Coates, J. D. (2005). Hydroxylation and carboxylation - two crucial steps of anaerobic benzene degradation by *Dechloromonas* strain RCB. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (9), 5427-5432.
- 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.
- Chaudhary, D. K., & Kim, J. (2018). *Brevundimonas mongoliensis* sp. nov., a novel psychrotolerant bacterium isolated from oil-contaminated soil. *Current microbiology*, 75, 1530-1536.
- Chen, W. M., Chen, L. C., Sheu, D. S., Tsai, J. M., & Sheu, S. Y. (2020). *Ideonella livida* sp. nov., isolated from a freshwater lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70 (9), 4942-4950.
- Chen, S., Yang, C., Zhu, G., Zhang, H., Yan, N., Zhang, Y., & Rittmann, B. E. (2022). Selective acceleration of 2-hydroxyl pyridine mono-oxygenation using specially acclimated biomass. *Journal of Environmental Management*, 301, 113887.
- Cho, E., Galera, M. M., Lorenzana, A., & Chung, W. J. (2009). Ethylbenzene, o-xylene, and BTEX removal by *Sphingomonas* sp. D3K1 in rock wool-compost biofilters. *Environmental Engineering Science*, 26 (1), 45-52.
- Choi, J. H., Kim, M. S., Roh, S. W., & Bae, J. W. (2010). *Acidovorax soli* sp. nov., isolated from landfill soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60 (12), 2715-2718.
- Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., da Costa, M. S., Rooney, P. A., Yi, H., Xu, X-W., De Meyer, S., & Trujillo, M. E. (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68 (1), 461-466.
- Coates, J. D., Phillips, E. J., Lonergan, D. J., Jenter, H., & Lovley, D. R. (1996). Isolation of *Geobacter* species from diverse sedimentary environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (5), 1531-1536.
- Coates, J. D., Ellis, D. J., Gaw, C. V., & Lovley, D. R. (1999). *Geothrix fermentans* gen. nov., sp. nov., a novel Fe (III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 49 (4), 1615-1622.
- Coates, J. D., Chakraborty, R., Lack, J. G., O'Connor, S. M., Cole, K. A., Bender, K. S., & Achenbach, L. A. (2001). Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*. *Nature*, 411 (6841), 1039-1043.

- Claus, D. (1992): A standardized Gram staining procedure. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8, 451-452.
- Cserhádi, M., Kriszt, B., Krifaton, C., Szoboszlay, S., Háhn, J., Tóth, S., Nagy, I., & Kukolya, J. (2013). Mycotoxin-degradation profile of *Rhodococcus* strains. *International journal of food microbiology*, 166 (1), 176-185.
- Dabney, B. (1994). REPROTEXT data base, Vol.22, Denver: Micromedex Inc.
- Dahal, R. H., & Kim, J. (2018a). *Ferrovibrio soli* sp. nov., a novel cellulolytic bacterium isolated from stream bank soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68 (1), 427-431.
- 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.
- Da Silva, M. L., & Alvarez, P. J. (2002). Effects of ethanol versus MTBE on benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene natural attenuation in aquifer columns. *Journal of Environmental Engineering*, 128 (9), 862-867.
- de la Cueva, S. C., Rodríguez, C. H., Cruz, N. O. S., Contreras, J. A. R., & Miranda, J. L. (2016). Changes in bacterial populations during bioremediation of soil contaminated with petroleum hydrocarbons. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227, 1-12.
- 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
- Dibble, J., Bartha, R. (1979): Effect of environmental parameters on the biodegradation of oilsludge, *Applied and Environmental Microbiology*, 37 (4), 729–739. p.
- Dou, J., Liu, X., Hu, Z., & Deng, D. (2008a). Anaerobic BTEX biodegradation linked to nitrate and sulfate reduction. *Journal of Hazardous Materials*, 151 (2-3), 720-729.
- 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.
- Dumont M. G., Murrell J. C. (2005) Stable isotope probing - linking microbial identity to function. *Nature Reviews Microbiology*, 3 (6), 499-504
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27 (16), 2194-2200.

- Eltis, L. D., & Bolin, J. T. (1996). Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases. *Journal of Bacteriology*, 178 (20), 5930-5937.
- Essaid, H. I., Bekins, B. A., Herkelrath, W. N., & Delin, G. N. (2011). Crude oil at the Bemidji site: 25 years of monitoring, modeling, and understanding. *Groundwater*, 49 (5), 706-726.
- 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.
- Fahy, A., Ball, A. S., Lethbridge, G., Timmis, K. N., & McGenity, T. J. (2008). Isolation of alkali-tolerant benzene-degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Letters in Applied Microbiology*, 47 (1), 60-66.
- Farkas, M., Tancsics, A., Kriszt, B., Benedek, T., Toth, E. M., Keki, Z., Veres, P. G. & Szoboszlay, S. (2015). *Zoogloea oleivorans* sp. nov., a floc-forming, petroleum hydrocarbon-degrading bacterium isolated from biofilm. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65 (1), 274-279.
- Fathepure, B. Z. (2014). Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. *Frontiers in microbiology*, 5, 173.
- Farkas, M., Szoboszlay, S., Benedek, T., Révész, F., Veres, P. G., Kriszt, B., & Tancsics, A. (2017). Enrichment of dissimilatory Fe (III)-reducing bacteria from groundwater of the Siklós BTEX-contaminated site (Hungary). *Folia microbiologica*, 62, 63-71.
- Felföldi, T., Márton, Z., Szabó, A., Mentés, A., Bóka, K., Márialigeti, K., Máthé, I., Koncz, M., Schumann, P. & Tóth, E. (2019). *Siculibacillus lacustris* gen. nov., sp. nov., a new rosette-forming bacterium isolated from a freshwater crater lake (Lake St. Ana, Romania). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69 (6), 1731-1736.
- Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17, 368–376.
- Fenibo, E. O., Ijoma, G. N., Selvarajan, R., & Chikere, C. B. (2019). Microbial surfactants: The next generation multifunctional biomolecules for applications in the petroleum industry and its associated environmental remediation. *Microorganisms*, 7 (11), 581.
- Foght, J. (2008). Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: pathways and prospects. *Microbial Physiology*, 15 (2-3), 93-120.

- Franci C. D., Guillemette M., Pelletier É., Chastel O., Bonnefoi S., Verreault J. (2014). Endocrine status of a migratory bird potentially exposed to the Deepwater Horizon oil spill: a case study of northern gannets breeding on Bonaventure Island, Eastern Canada. *Science of the total environment*, 473, 110-116.
- Fritz, I., Strömpl, C., Nikitin, D. I., Lysenko, A. M., & Abraham, W. R. (2005). *Brevundimonas mediterranea* sp. nov., a non-stalked species from the Mediterranean Sea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55 (1), 479-486.
- Garrrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. (2005). Class V. Epsilonproteobacteria class. nov. p. 1145. In: Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, T. J. (Szerk.): *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Boston: Springer, MA. p. 1145-1194.
- Gauchotte-Lindsay, C., Aspray, T. J., Knapp, M., & Ijaz, U. Z. (2019). Systems biology approach to elucidation of contaminant biodegradation in complex samples—integration of high-resolution analytical and molecular tools. *Faraday discussions*, 218, 481-504.
- Gibson, J., & S. Harwood, C. (2002). Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annual Reviews in Microbiology*, 56 (1), 345-369.
- Goldschneider, N., Hunkeler, D., & Rossi, P. (2006). Review: Microbial biocenoses in pristine aquifers and an assessment of investigative methods. *Hydrogeology Journal*, 14, 926-941.
- Goodfellow, M., Jones, A. L., Maldonado, L. A., & Salanitro, J. (2004). *Rhodococcus aetherivorans* sp. nov., a new species that contains methyl t-butyl ether-degrading actinomycetes. *Systematic and applied microbiology*, 27 (1), 61-65.
- González-Paredes, Y., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz, J. J., Martínez-Romero, E., Cruz-Sánchez, J. S., Mendoza-López, M., Ormeño-Orrillo E. R. (2013). Tolerance, growth and degradation of phenanthrene and benzo[a]pyrene by *Rhizobium tropici* CIAT 899 in liquid culture medium. *Applied Soil Ecology*, 63, 105-111.
- Graziano, G. (2006). Benzene solubility in water: a reassessment. *Chemical physics letters*, 429 (1-3), 114-118.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2016). Precipitation of DNA with ethanol. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016 (12)
- Griffiths, R. I., Whiteley, A. S., O'Donnell, A. G., & Bailey, M. J. (2000). Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Applied and environmental microbiology*, 66 (12), 5488-5491.
- Han, S., Tang, R., Yang, S., Xie, C. J., Narsing Rao, M. P., Liu, G. H., & Zhou, S. G. (2022). Two ferric-reducing bacteria *Geothrix terrae* sp. nov. and *Geothrix alkalitolerans* sp. nov., isolated from paddy soil. *Archives of Microbiology*, 204 (12), 699.

- 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.
- Harayama, S., Mermod, N., Rekik, M., Lehrbach, P. R., & Timmis, K. N. (1987). Roles of the divergent branches of the meta-cleavage pathway in the degradation of benzoate and substituted benzoates. *Journal of bacteriology*, 169 (2), 558-564.
- Harwell M. A., Gentile J. H. (2014). Assessing risks to sea otters and the Exxon Valdez oil spill: New scenarios, attributable risk, and recovery. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*. 20 (4), 889-916.
- Heylen, K., Lebbe, L., & De Vos, P. (2008). *Acidovorax caeni* sp. nov., a denitrifying species with genetically diverse isolates from activated sludge. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58 (1), 73-77.
- Hocinat, A., Ali-Khodja, H., & Boudemagh, A. (2019). Capability of *Nocardia nova* found in activated sludge to use synthetic BTEX as sole source of carbon and energy. *International Journal of Environmental Studies*, 76 (4), 582-593.
- Im, W. T., Kim, S. H., Kim, M. K., Ten, L. N., & Lee, S. T. (2006). *Pleomorphomonas koreensis* sp. nov., a nitrogen-fixing species in the order Rhizobiales. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56 (7), 1663-1666.
- Ivanova, A. E., & Borzenkov, I. A. (2018). Aerobic biodegradation of crude oil components by acidophilic mycobacteria. *Microbiology*, 87, 453-462.
- Iwasaki, T., Miyauchi, K., Masai, E., & Fukuda, M. (2006). Multiple-subunit genes of the aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase play an active role in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (8), 5396-5402.
- Janssen, D. B., Pries, F., van der Ploeg, J., Kazemier, B., Terpstra, P., & Witholt, B. (1989). Cloning of 1, 2-dichloroethane degradation genes of *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 and expression and sequencing of the *dhlA* gene. *Journal of bacteriology*, 171 (12), 6791-6799.
- Jechalke, S., Franchini, A. G., Bastida, F., Bombach, P., Rosell, M., Seifert, J., Bergen von, M., Vogt, C., & Richnow, H. H. (2013). Analysis of structure, function, and activity of a benzene-degrading microbial community. *FEMS Microbiology Ecology*, 85 (1), 14-26.
- Johnson, G. R., & Olsen, R. H. (1997). Multiple pathways for toluene degradation in *Burkholderia* sp. strain JS150. *Applied and environmental microbiology*, 63 (10), 4047-4052.
- Jung, I. G., & Park, C. H. (2004). Characteristics of *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1 for the biodegradation of benzene, toluene, m-xylene (BTX), and their mixtures. *Journal of bioscience and bioengineering*, 97 (6), 429-431.

- Kaden, R., Spröer, C., Beyer, D., & Krolla-Sidenstein, P. (2014). *Rhodoferax saidenbachensis* sp. nov., a psychrotolerant, very slowly growing bacterium within the family Comamonadaceae, proposal of appropriate taxonomic position of *Albidiferax ferrireducens* strain T118T in the genus *Rhodoferax* and emended description of the genus *Rhodoferax*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64 (4), 1186-1193.
- Kanehisa, M., Goto, S. (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28, 27–30.
- Kanekar, P. P., Sarnaik, S. S., Kelkar, A. S. (1999): Bioremediation of phenol by alkaliphilic bacteria isolated from alkaline lake of Lonar, India. *Journal of Applied Microbiology* 85, 128S–133S
- Kao, C. M., Chien, H. Y., Surampalli, R. Y., Chien, C. C., & Chen, C. Y. (2010). Assessing of natural attenuation and intrinsic bioremediation rates at a petroleum-hydrocarbon spill site: Laboratory and field studies. *Journal of Environmental Engineering*, 136 (1), 54-67.
- Khan, S., Afzal, M., Iqbal, S., & Khan, Q. M. (2013). Plant–bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils. *Chemosphere*, 90 (4), 1317-1332.
- Keller, A. H., Kleinstuber, S., & Vogt, C. (2018). Anaerobic benzene mineralization by nitrate-reducing and sulfate-reducing microbial consortia enriched from the same site: comparison of community composition and degradation characteristics. *Microbial ecology*, 75, 941-953.
- Kiesel, B., Balcke, G. U., Dietrich, J., Vogt, C., & Geyer, R. (2008). Microbial community shifts as a response to efficient degradation of chlorobenzene under hypoxic conditions. *Biodegradation*, 19, 435-446.
- Kim, D. J., Choi, J. W., Choi, N. C., Mahendran, B., & Lee, C. E. (2005). Modeling of growth kinetics for *Pseudomonas* spp. during benzene degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, 456-462.
- Kim, J. M., Le, N. T., Chung, B. S., Park, J. H., Bae, J. W., Madsen, E. L., & Jeon, C. O. (2008). Influence of soil components on the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-, m-, and p-xylenes by the newly isolated bacterium *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59. *Applied and environmental microbiology*, 74 (23), 7313-7320.
- Kim, J. M., & Jeon, C. O. (2009). Isolation and characterization of a new benzene, toluene, and ethylbenzene degrading bacterium, *Acinetobacter* sp. B113. *Current microbiology*, 58, 70-75.
- Kim, M., Oh, H. S., Park, S. C., & Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64 (2), 346-351.

- Kim, E., Yulisa, A., Kim, S., & Hwang, S. (2020). Monitoring microbial community structure and variations in a full-scale petroleum refinery wastewater treatment plant. *Bioresource technology*, 306, 123178.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111–120.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41 (1).
- Kniemeyer, O., & Heider, J. (2001). Ethylbenzene dehydrogenase, a novel hydrocarbon-oxidizing molybdenum/iron-sulfur/heme enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (24), 21381-21386.
- Kodama, Y., & Watanabe, K. (2004). *Sulfuricurvum kujiense* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from an underground crude-oil storage cavity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54 (6), 2297-2300.
- Kojima, H., & Fukui, M. (2011). *Sulfuritalea hydrogenivorans* gen. nov., sp. nov., a facultative autotroph isolated from a freshwater lake. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61 (7), 1651-1655.
- Korsak, Z. O. F. I. A., Sikal, J. A., Wasiela, T. O. M. A. S. Z., & Swiercz, R. (1990). Toxic effects of acute exposure to particular xylene isomers in animals. *Polish Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 3 (2), 221-226.
- 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.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35, 1547.
- Kunapuli, U., Jahn, M. K., Lueders, T., Geyer, R., Heipieper, H. J., & Meckenstock, R. U. (2010). *Desulfitobacterium aromaticivorans* sp. nov. and *Geobacter toluenoxydans* sp. nov., iron-reducing bacteria capable of anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60 (3), 686-695.

- Kunin, V., Engelbrektson, A., Ochman, H., & Hugenholtz, P. (2010). Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental microbiology*, 12 (1), 118-123.
- Kuykendall, L. D. (2005). Order VI. Rhizobiales ord. nov. In: Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, T. J. (Szerk.): *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Boston: Springer, MA. p. 324-568.
- LaBauve, A. E., & Wargo, M. J. (2012). Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current protocols in microbiology*, 25 (1), 6-1.
- Lade, H., Paul, D., & Kweon, J. H. (2014). N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing with special reference to use of quorum quenching bacteria in membrane biofouling control. *BioMed Research International*, 25.
- Lane, D. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Szerk.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, Chichester, UK. p. 115–175.
- Landmeyer, J. E., & Effinger, T. N. (2016). Effect of phytoremediation on concentrations of benzene, toluene, naphthalene, and dissolved oxygen in groundwater at a former manufactured gas plant site, Charleston, South Carolina, USA, 1998–2014. *Environmental Earth Sciences*, 75, 1-13.
- Láng, I. (szerk.) (2002): Környezet- és természetvédelmi lexikon, Akadémiai kiadó, Budapest, p. 125-126, 138, 163, 182-183, 259, 523, 539, 656.
- Leahy, J. G., Colwell, R. R. (1990): Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, 54, 305-315.
- 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, 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, M., Srinivasan, S., & Kim, M. K. (2010). New taxa in Alphaproteobacteria: *Brevundimonas olei* sp. nov., an esterase-producing bacterium. *The Journal of Microbiology*, 48, 616-622.
- 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.
- Leifson, E. (1962). *Pseudomonas spinosa* n. sp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 12 (3), 89-92.

- Liao, C., Xu, W., Lu, G., Deng, F., Liang, X., Guo, C., & Dang, Z. (2016). Biosurfactant-enhanced phytoremediation of soils contaminated by crude oil using maize (*Zea mays* L.). *Ecological Engineering*, 92, 10-17.
- Li, D., Rothballer, M., Schmid, M., Esperschütz, J., & Hartmann, A. (2011). *Acidovorax radialis* sp. nov., a rhizosphere bacterium isolated from wheat roots. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 2589-2594.
- 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.
- Lindström, K., Jussila, M. M., Hintsala, H., Kaksonen, A., Mäkelä, L., Mäkeläinen, K., Pitkälä, J., & Suominen, L. (2003). Potential of the *Galega-Rhizobium galegae* system for bioremediation of oil-contaminated soil. *Food Technology and Biotechnology*, 41 (1), 11-16.
- Lipscomb, J. D. (2008). Mechanism of extradiol aromatic ring-cleaving dioxygenases. *Current Opinion in Structural Biology*, 18 (6), 644-649.
- Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., & Forney, L. J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (11), 4516-4522.
- 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.
- Lorenz, M. G., & Wackernagel, W. (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological Reviews*, 58 (3), 563-602.
- Lu, Z., Sun, W., Li, C., Ao, X., Yang, C., & Li, S. (2019). Bioremoval of non-steroidal anti-inflammatory drugs by *Pseudoxanthomonas* sp. DIN-3 isolated from biological activated carbon process. *Water Research*, 161, 459-472.
- 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.
- Lundegard, P. D., & Sweeney, R. E. (2004). Total petroleum hydrocarbons in groundwater - evaluation of nondissolved and nonhydrocarbon fractions. *Environmental Forensics*, 5 (2), 85-95.
- Macaulay, B. M. (2015). Understanding the behaviour of oil-degrading micro-organisms to enhance the microbial remediation of spilled petroleum. *Applied Ecology and Environmental Research*, 13 (1), 247-262.

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, S. K., Buckley, H. D., Stahl, D. A. (2015). Chapter 6. - Microbial Genomics, In: *Brock biology of microorganisms* (Vol. 14). Pearson, London, p. 183-187
- Malmqvist, Å., Welander, T., Moore, E., Ternström, A., Molin, G., & Stenström, I. M. (1994). *Ideonella dechloratans* gen. nov., sp. nov., a new bacterium capable of growing anaerobically with chlorate as an electron acceptor. *Systematic and Applied Microbiology*, 17 (1), 58-64.
- Maltoni, C., Ciliberti, A., Pinto, C., Soffritti, M., Belpoggi, F., & Menarini, L. (1997). Results of long-term experimental carcinogenicity studies of the effects of gasoline, correlated fuels, and major gasoline aromatics on rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 837 (1), 15-52.
- Mao, Y., Zhang, X., Xia, X., Zhong, H., & Zhao, L. (2010). Versatile aromatic compound-degrading capacity and microdiversity of *Thauera* strains isolated from a coking wastewater treatment bioreactor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37 (9), 927-934.
- Martínková, L., Uhnáková, B., Pátek, M., Nešvera, J., & Křen, V. (2009). Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment International*, 35 (1), 162-177.
- Martiny, A. C. (2019). High proportions of bacteria are culturable across major biomes. *The ISME Journal*, 13 (8), 2125-2128.
- Mayer, E., Dörr de Quadros, P., & Fulthorpe, R. (2019). *Plantibacter flavus*, *Curtobacterium herbarum*, *Paenibacillus taichungensis*, and *Rhizobium selenitireducens* endophytes provide host-specific growth promotion of *Arabidopsis thaliana*, basil, lettuce, and bok choy plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 85 (19), 383-19.
- McElhoe, J. A., Holland, M. M., Makova, K. D., Su, M. S. W., Paul, I. M., Baker, C. H., Faith, A. S., & Young, B. (2014). Development and assessment of an optimized next-generation DNA sequencing approach for the mtgenome using the Illumina MiSeq. *Forensic Science International: Genetics*, 13, 20-29.
- Mechichi, T., Stackebrandt, E., Gad'on, N., & Fuchs, G. (2002). Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromatica* sp. nov., and *Azoarcus buckelii* sp. nov. *Archives of microbiology*, 178, 26-35.
- Meckenstock, R. U., Elsner, M., Griebler, C., Lueders, T., Stumpp, C., Aamand, J., Agathos, N. S., Albrechtsen, H-J., Bastiaens, L., Bjerg, P. L., Boon, N., Dejonghe, W., Huang, E., Schmidt, S. I., Smolders, E., Sørensen, S. E., Springael, D., & van Breukelen, B. M. (2015).

- Biodegradation: updating the concepts of control for microbial cleanup in contaminated aquifers. *Environmental Science & Technology*, 49 (12), 7073-7081.
- 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.
- Monferrán, M. V., Echenique, J. R., & Wunderlin, D. A. (2005). Degradation of chlorobenzenes by a strain of *Acidovorax avenae* isolated from a polluted aquifer. *Chemosphere*, 61 (1), 98-106.
- Montero-Montoya, R., López-Vargas, R., & Arellano-Aguilar, O. (2018). Volatile organic compounds in air: sources, distribution, exposure and associated illnesses in children. *Annals of global health*, 84, 225.
- Mukherjee, S., Juottonen, H., Siivonen, P., Lloret Quesada, C., Tuomi, P., Pulkkinen, P., & Yrjälä, K. (2014). Spatial patterns of microbial diversity and activity in an aged creosote-contaminated site. *The ISME journal*, 8 (10), 2131-2142.
- Muthukumar, N., Mohanan, S., Maruthamuthu, S., Subramanian, P., Palaniswamy, N., & Raghavan, M. (2003). Role of *Brucella* sp. and *Gallionella* sp. in oil degradation and corrosion. *Electrochemistry Communications*, 5 (5), 421-425.
- Muthukumar, B., Al Salhi, M. S., Narenkumar, J., Devanesan, S., Rao, T. N., Kim, W., & Rajasekar, A. (2022). Characterization of two novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* on biodegradation of crude oil and its enzyme activities. *Environmental Pollution*, 304, 119223.
- Na, K. S., Kuroda, A., Takiguchi, N., Ikeda, T., Ohtake, H., & Kato, J. (2005). Isolation and characterization of benzene-tolerant *Rhodococcus opacus* strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99 (4), 378-382.
- Na, S. I., Kim, Y. O., Yoon, S. H., Ha, S. M., Baek, I., & Chun, J. (2018). UBCG: up-to-date bacterial core gene set and pipeline for phylogenomic tree reconstruction. *Journal of Microbiology*, 56, 280-285.
- Nagamani, A., Soligalla, R., & Lowry, M. (2009). Isolation and characterization of phenol degrading *Xanthobacter flavus*. *African Journal of Biotechnology*, 8 (20).
- Nam, K., & Alexander, M. (1998). Role of nanoporosity and hydrophobicity in sequestration and bioavailability: tests with model solids. *Environmental Science & Technology*, 32 (1), 71-74.
- Nestler H, Kiesel B, Kaschabek SR, Mau M, Schlömann M, Balcke GU (2007) Biodegradation of chlorobenzene under hypoxic and mixed hypoxic-denitrifying conditions. *Biodegradation* 18, 755-767.

- Nešvera, J., Rucká, L., & Pátek, M. (2015). Catabolism of phenol and its derivatives in bacteria: genes, their regulation, and use in the biodegradation of toxic pollutants. *Advances in applied microbiology*, 93, 107-160.
- Niaz, K., Bahadar, H., Maqbool, F., & Abdollahi, M. (2015). A review of environmental and occupational exposure to xylene and its health concerns. *EXCLI Journal*, 14, 1167.
- Nicholson, C. A., & Fathepure, B. Z. (2004). Biodegradation of benzene by halophilic and halotolerant bacteria under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (2), 1222-1225.
- Noar, J. D., & Buckley, D. H. (2009). *Ideonella azotifigens* sp. nov., an aerobic diazotroph of the Betaproteobacteria isolated from grass rhizosphere soil, and emended description of the genus *Ideonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59 (8), 1941-1946.
- Noh, H. J., Baek, K., Hwang, C. Y., Shin, S. C., Hong, S. G., & Lee, Y. M. (2019). *Lichenihabitans psoromatis* gen. nov., sp. nov., a member of a novel lineage (Lichenihabitaceae fam. nov.) within the order of Rhizobiales isolated from Antarctic lichen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69 (12), 3837-3842.
- Nurk, S., Bankevich, A., Antipov, D., Gurevich, A., Korobeynikov, A., Lapidus, A., Prjibelsky, A., Pyshkin, A., Sirotkin, A., Sirotkin, Y., Stepanauskas, R., McLean, J., Lasken, R., Clingenpeel, C. R., Woyke, T., Tesler, T., Alekseyev M. A., & Pevzner P. A. (2013) Assembling Genomes and Mini-metagenomes from Highly Chimeric Reads. In: Deng, M., Jiang, R., Sun, F., Zhang, X. (Szerk.) *Research in Computational Molecular Biology*. RECOMB 2013. *Lecture Notes in Computer Science*, vol 7821. Berlin, Heidelberg: Springer. p. 158-170
- Ohad, I., Danon, D., Hestrin, S. (1963): The use of shadow-casting technique for measurement of the width of elongated particles. *Journal of Cell Biology*, 17, 321-326.
- 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.
- Ono, A., Sekita, K., Ogawa, Y., Hirose, A., Suzuki, S., Saito, M. & Kurokawa, Y. (1996). Reproductive and developmental toxicity studies of toluene. II. Effects of inhalation exposure on fertility in rats. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology: official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, 15 (1), 9-20.
- Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline systems*, 4, 1-13.

- Pal, D., Kaur, N., Sudan, S. K., Bisht, B., Krishnamurthi, S., & Mayilraj, S. (2018). *Acidovorax kalamii* sp. nov., isolated from a water sample of the river Ganges. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68 (5), 1719-1724.
- Pandey, A., Trivedi, P., Kumar, B., & Palni, L. M. S. (2006). Characterization of a phosphate solubilizing and antagonistic strain of *Pseudomonas putida* (B0) isolated from a sub-alpine location in the Indian Central Himalaya. *Current Microbiology*, 53, 102-107.
- 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 *Pseudomonas naphthalenivorans* CJ2. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (16), 5146-5152.
- Patel, V., Cheturvedula, S., & Madamwar, D. (2012). Phenanthrene degradation by *Pseudoxanthomonas* sp. DMVP2 isolated from hydrocarbon contaminated sediment of Amlakhadi canal, Gujarat, India. *Journal of Hazardous Materials*, 201, 43-51.
- Pavlov, M. S., Lira, F., Martinez, J. L., Olivares-Pacheco, J., & Marshall, S. H. (2020). *Pseudomonas fildesensis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from Antarctic soil of King George Island, South Shetland Islands. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70 (5), 3255-3263.
- Pawar, R. M. (2015). The effect of soil pH on bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS). *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 6 (3), 291-304.
- Pápai, M., Benedek, T., Táncsics, A., Bornemann, T. L., Plewka, J., Probst, A. J., Husseon, D., Maróti, G., Menashe, O., & Kriszt, B. (2023). Selective enrichment, identification, and isolation of diclofenac, ibuprofen, and carbamazepine degrading bacteria from a groundwater biofilm. *Environmental Science and Pollution Research*, 30 (15), 44518-44535.
- Pellegrino, J. L. (Szerk.) (2000). The Benzene-Toluene-Xylene (BTX) Chain. In: *Energy and Environmental Profile of the Chemicals Industry*. Columbia, MD (USA): Energetics, Inc., p. 105-140.
- Perfumo, A., Smyth, T., Marchant, R., & Banat, I. M. (2010) Production and roles of biosurfactants and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates. In: Timmis, K., N. (Szerk.) *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Berlin, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 1502-1510.
- 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.

- Plaza, C., Xing, B., Fernandez, J. M., Senesi, N., & Polo, A. (2009). Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by humic acids formed during composting. *Environmental Pollution*, 157 (1), 257-263.
- Poi, G., Shahsavari, E., Aburto-Medina, A., Mok, P. C., & Ball, A. S. (2018). Large scale treatment of total petroleum-hydrocarbon contaminated groundwater using bioaugmentation. *Journal of Environmental Management*, 214, 157-163.
- Polz, M. F., Cavanaugh, C. M. (1998): Bias in template to product ratios in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (10), 3724-3730.
- Powlowski J., & Shingler, V. (1990). In vitro analysis of polypeptide requirements of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *Journal of Bacteriology*, 172 (12), 6834-6840.
- Powlowski, J., & Shingler, V. (1994). Genetics and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF600. *Biodegradation*, 5, 219-236.
- Powlowski, J., Sealy, J., Shingler, V., & Cadieux, E. (1997). On the role of DmpK, an auxiliary protein associated with multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (2), 945-951.
- Prince, R. C., Amande, T. J., & McGenity, T. J. (2019). Prokaryotic hydrocarbon degraders. *Taxonomy, genomics and ecophysiology of hydrocarbon-degrading microbes*, 1-39.
- Providenti, M. A., Lee, H., & Trevors, J. T. (1993). Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 12 (6), 379-395.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F. O. (2013): The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41, 590–596
- Rabus, R., & Widdel, F. (1995). Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Archives of microbiology*, 163, 96-103.
- Reinhold-Hurek, B., & Hurek, T. (2000). Reassessment of the taxonomic structure of the diazotrophic genus *Azoarcus sensu lato* and description of three new genera and new species, *Azovibrio restrictus* gen. nov., sp. nov., *Azospira oryzae* gen. nov., sp. nov. and *Azonexus fungiphilus* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 (2), 649-659.
- Révész, F., Tóth, E. M., Kriszt, B., Bóka, K., Benedek, T., Sárkány, O., Nagy, Zs., & Tánácsics, A. (2018). *Sphingobium aquiterrae* sp. nov., a toluene, meta-and para-xylene-degrading

- bacterium isolated from petroleum hydrocarbon-contaminated groundwater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68 (9), 2807-2812.
- Révész, F., Farkas, M., Kriszt, B., Szoboszlay, S., Benedek, T., & Táncsics, A. (2020, a). 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. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 31130-31142.
- Révész, F., Figueroa-Gonzalez, P. A., Probst, A. J., Kriszt, B., Banerjee, S., Szoboszlay, S., Maróti, G., & Táncsics, A. (2020, b). Microaerobic conditions caused the overwhelming dominance of *Acinetobacter* spp. and the marginalization of *Rhodococcus* spp. in diesel fuel/crude oil mixture-amended enrichment cultures. *Archives of microbiology*, 202, 329-342.
- Rodriguez-R, L. M., Gunturu, S., Harvey, W. T., Rosselló-Mora, R., Tiedje, J. M., Cole, J. R., & Konstantinidis, K. T. (2018a). The Microbial Genomes Atlas (MiGA) webserver: taxonomic and gene diversity analysis of Archaea and Bacteria at the whole genome level. *Nucleic Acids Research*, 46, 282-288.
- 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.
- Rogers, R. D., McFarlane, J. C., & Cross, A. J. (1980). Adsorption and desorption of benzene in two soils and montmorillonite clay. *Environmental science & technology*, 14 (4), 457-460.
- Ryu, S. H., Chung, B. S., Le, N. T., Jang, H. H., Yun, P. Y., Park, W., & Jeon, C. O. (2008). *Devosia geojensis* sp. nov., isolated from diesel-contaminated soil in Korea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58 (3), 633-636.
- Ryu, D., Kim, M., Han, B., Lee, K. E., Lee, B. H., Lee, E. Y., Jung, G-Y., S-J., & Park, S. J. (2020). *Ferrovibrio terrae* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70 (2), 1042-1047.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- Samanta, S. K., Chakraborti, A. K., & Jain, R. K. (1999). Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 98-107.
- Sarkar, J., Kazy, S. K., Gupta, A., Dutta, A., Mohapatra, B., Roy, A., Bera, P., Mitra, A., & Sar, P. (2016). Biostimulation of indigenous microbial community for bioremediation of petroleum refinery sludge. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1407.

- Sasser, M. (1990) Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. *MIDI Technical Note* 101. MIDI, Inc., Newark
- 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.
- Schulze, R., Spring, S., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W., Schleifer, K. H., & Kämpfer, P. (1999). Genotypic diversity of *Acidovorax* strains isolated from activated sludge and description of *Acidovorax defluvii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 22 (2), 205-214.
- Sheik, C. S., Beasley, W. H., Elshahed, M. S., Zhou, X., Luo, Y., & Krumholz, L. R. (2011). Effect of warming and drought on grassland microbial communities. *The ISME journal*, 5 (10), 1692-1700.
- Sheng, Y., Tian, X., Wang, G., Hao, C., & Liu, F. (2016). Bacterial diversity and biogeochemical processes of oil-contaminated groundwater, Baoding, North China. *Geomicrobiology Journal*, 33 (6), 537-551.
- Sheu, S. Y., Chen, Z. H., Young, C. C., & Chen, W. M. (2016). *Ideonella paludis* sp. nov., isolated from a marsh. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66 (2), 1052-1057.
- Shuttleworth, K. L., & Cerniglia, C. E. (1996). Bacterial degradation of low concentrations of phenanthrene and inhibition by naphthalene. *Microbial Ecology*, 31, 305-317.
- 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. *Systematic and Applied Microbiology*, 41 (5), 460-472.
- Smibert, R. M, Krieg, N. R. (1994). Phenotypic characterization. In: Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A, Krieg, N. R, (Szerk.) *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington DC: *American Society for Microbiology*, p. 607–654.
- Smith, C. J., Danilowicz, B. S., Clear, A. K., Costello, F. J., Wilson, B., Meijer, W. G. (2005): T-Align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment length polymorphism profiles. *FEMS Microbiology Ecology* 54 (3), 375-380.
- Sommer, C., & Görisch, H. (1997). Enzymology of the degradation of (di) chlorobenzenes by *Xanthobacter flavus* 14p1. *Archives of Microbiology*, 167, 384-391.
- Song, B., Palleroni, N. J., Kerkhof, L. J., & Häggblom, M. M. (2001). Characterization of halobenzoate-degrading, denitrifying *Azoarcus* and *Thauera* isolates and description of

- Thauera chlorobenzoica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51 (2), 589-602.
- Song, M., Zhang, L., Sun, B., Zhang, H., Ding, H., Li, Q., Guo, S. & Huang, X. (2015). *Ferrovibrio xuzhouensis* sp. nov., a cyhalothrin-degrading bacterium isolated from cyhalothrin contaminated wastewater. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108, 377-382.
- Sorokina, A. Y., Chernousova, E. Y., & Dubinina, G. A. (2012). *Ferrovibrio denitrificans* gen. nov., sp. nov., a novel neutrophilic facultative anaerobic Fe (II)-oxidizing bacterium. *FEMS Microbiology Letters*, 335 (1), 19-25.
- Sperfeld, M., Rauschenbach, C., Diekert, G., & Studenik, S. (2018). Microbial community of a gasworks aquifer and identification of nitrate-reducing *Azoarcus* and *Georgfuchsia* as key players in BTEX degradation. *Water Research*, 132, 146-157.
- Sperfeld, M., Diekert, G., & Studenik, S. (2019). Anaerobic aromatic compound degradation in *Sulfuritalea hydrogenivorans* sk43H. *FEMS Microbiology Ecology*, 95 (1), fyy199.
- Staley, J. T. (1968). *Prosthecomicrobium* and *Ancalomicrobium*: new prosthecate freshwater bacteria. *Journal of Bacteriology*, 95 (5), 1921-1942.
- Steliga, T., Jakubowicz, P., & Kapusta, P. (2012). Changes in toxicity during in situ bioremediation of weathered drill wastes contaminated with petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 125, 1-10.
- Stubner, S. (2002). Enumeration of 16S rDNA of *Desulfotomaculum* lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreen™ detection. *Journal of Microbiological Methods*, 50 (2), 155-164.
- Subhash, Y., & Lee, S. S. (2016). *Shinella curvata* sp. nov., isolated from hydrocarbon-contaminated desert sands. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66 (10), 3929-3934.
- Su, X. (2021). Elucidating the beta-diversity of the microbiome: from global alignment to local alignment. *Msystems*, 6 (4), 363-21.
- Suzuki, M., Hayakawa, T., Shaw, J. P., Rekik, M., & Harayama, S. (1991). Primary structure of xylene monooxygenase: similarities to and differences from the alkane hydroxylation system. *Journal of Bacteriology*, 173 (5), 1690-1695.
- Szentgyörgyi, F., Benedek, T., Fekete, D., Tánácsics, A., Harkai, P., & Kriszt, B. (2022). Development of a bacterial consortium from *Variovorax paradoxus* and *Pseudomonas veronii* isolates applicable in the removal of BTEX. *AMB Express*, 12 (1), 1-14.
- Tanasupawat, S., Takehana, T., Yoshida, S., Hiraga, K., & Oda, K. (2016). *Ideonella sakaiensis* sp. nov., isolated from a microbial consortium that degrades poly (ethylene

- terephthalate). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66 (8), 2813-2818.
- Tatusova, T., DiCuccio, M., Badretdin, A., Chetvermin, V., Nawrocki, E. P., Zaslavsky, L., Lomsadze, A., Pruitt, K. D., Borodovsky, M., & Ostell, J. (2016). NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Research*, 44 (14), 6614-6624.
- Táncsics, A., Szabó, I., Baka, E., Szoboszlay, S., Kukolya, J., Kriszt, B., & Márialigeti, K. (2010). Investigation of catechol 2, 3-dioxygenase and 16S rRNA gene diversity in hypoxic, petroleum hydrocarbon contaminated groundwater. *Systematic and applied microbiology*, 33 (7), 398-406.
- 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. *Environmental Science Technology*, 46 (1), 232-240.
- 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. *Systematic and Applied Microbiology*, 36 (5), 339-350.
- Táncsics, A., Benedek, T., Szoboszlay, S., Veres, P. G., Farkas, M., Máthé, I., Márialigeti, S., Kukolya, J., Lányi, Sz., & Kriszt, B. (2015). The detection and phylogenetic analysis of the alkane 1-monooxygenase gene of members of the genus *Rhodococcus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 38 (1), 1-7.
- Táncsics, A., Szalay, A. R., 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 Microbiology Ecology*, 94 (6), 88.
- Táncsics, A. (2021). Kőolajeredetű szénhidrogénekkal szennyezett, oxigén-limitált felszín alatti közegek mikrobiális ökológiája. Akadémiai nagydoktori mű, MATE.
- 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.

- Thakur, J. K., Paul, S., Booragamakalapalli Subbarayappa, M., & Rathi, M. S. (2019). Influence of aromatic hydrocarbons on growth, plant growth promoting activities and survival in soil of *Azotobacter chroococcum* strain JL104. *Bioremediation Journal*, 23 (2), 94-106.
- Thapa, B., Kc, A. K., & Ghimire, A. (2012). A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*, 8 (1), 164-170.
- Tierney, M., & Young, L. Y. (2010). Anaerobic degradation of aromatic hydrocarbons. In: Timmis, K., N. (Szerk.) *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Berlin, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 925-934
- Tindall, B. J. (1990a): A comparative study of the lipid composition of *Halobacterium saccharovorum* from various sources. *Systematic and Applied Microbiology*, 13 (2), 128-130.
- Tindall, B. J. (1990b): Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiol Letts* 66 (1-3), 199-202.
- Tindall, B.J., Sikorski, J., Smibert ,R.M., and Krieg, N.R. (2007) Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. In *Methods for General and Molecular Microbiology* 3rd edn. Pp. 330-393.
- Tindall, B., Sikorski, J., Smibert, R., & Krieg, N. (2007). Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. In: Reddy, C. A., Beveridge, T. J., Breznak, J. A., Marzluf, G., Schmidt, T. M. & L. R. Snyder (Szerk.), *Methods for general and molecular microbiology*, Vol. 3, 3rd ed. Washington, DC: ASM Press, p. 330–393.
- Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H. J., Ludwig, W., Kämpfer, P. (2010): Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Intenational Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60 (1), 249-266.
- Tirandaz, H., Dastgheib, S. M. M., Amoozegar, M. A., Shavandi, M., de la Haba, R. R., & Ventosa, A. (2015). *Pseudorhodoplanes sinuspersici* gen. nov., sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65 (12), 4743-4748.
- Trower, M. K., Buckland, R. M., Higgins, R., & Griffin, M. (1985). Isolation and characterization of a cyclohexane-metabolizing *Xanthobacter* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 49 (5), 1282-1289.
- 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.

- Truskewycz, A., Gundry, T. D., Khudur, L. S., Kolobaric, A., Taha, M., Aburto-Medina, A., Andrew, S. B., & Shahsavari, E. (2019). Petroleum hydrocarbon contamination in terrestrial ecosystems—fate and microbial responses. *Molecules*, 24 (18), 3400.
- Vallenet, D., Labarre, L., Rouy, Z., Barbe, V., Bocs, S., Cruveiller, S., Lajus, A., Pascal, G., Scarpelli, C., & Médigue, 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.
- Van Ginkel, C. G., & De Bont, J. A. M. (1986). Isolation and characterization of alkene-utilizing *Xanthobacter* spp. *Archives of microbiology*, 145, 403-407.
- Van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2006). Physiological aspects: Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology advances*, 24 (6), 604-620.
- Vainshtein, M. B., & Kudryashova, E. B. (2000). Nannobacteria. *Microbiology*, 69, 129-138.
- Verstraete, W., Vanlooche, R., DeBorger, R., & Verlinde, A. (1976). Modelling of the breakdown and the mobilization of hydrocarbons in unsaturated soil layers. In: *Proceedings of the 3rd International Biodegradation Symposium, Applied Science Publishers Ltd., London*, p. 99-112.
- 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.
- Villatoro-Monzón, W. R., Mesta-Howard, A. M., & Razo-Flores, E. (2003). Anaerobic biodegradation of BTEX using Mn (IV) and Fe (III) as alternative electron acceptors. *Water Science and Technology*, 48 (6), 125-131.
- Wang, X., Wang, X., Liu, M., Zhou, L., Gu, Z., & Zhao, J. (2016). Bioremediation of marine oil pollution by *Brevundimonas diminuta*: effect of salinity and nutrients. *Desalination and Water Treatment*, 57 (42), 19768-19775.
- Wang, S., Yu, L., Tan, X., Cao, X., Tang, X., & Jian, H. (2020). Genomic analysis of *Brevundimonas mediterranea* D151-2-6 isolated from hadal sediment of the Pacific Ocean. *Marine genomics*, 54, 100787.
- Wang, M., Garrido-Sanz, D., Sansegundo-Lobato, P., Redondo-Nieto, M., Conlon, R., Martin, M., ... & Germaine, K. J. (2021). Soil microbiome structure and function in ecopiles used to remediate petroleum-contaminated soil. *Frontiers in Environmental Science*, 9, 39.

- Weelink, S. A., Tan, N. C., ten Broeke, H., van den Kieboom, C., van Doesburg, W., Langenhoff, A. A., Gerritse, J., Junka, H., & Stams, A. J. (2008). Isolation and characterization of *Alicyclophilus denitrificans* strain BC, which grows on benzene with chlorate as the electron acceptor. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (21), 6672-6681.
- WHO (1986). World Health Organization. Environmental Health Criteria 52: Toluene. World Health Organization, Geneva.
- WHO (1997). World Health Organization. Environmental Health Criteria 190: Xylenes. World Health Organization, Geneva.
- Wiegel, J., Wilke, D., Baumgarten, J., Opitz, R., & Schlegel, H. G. (1978). Transfer of the nitrogen-fixing hydrogen bacterium *Corynebacterium autotrophicum* Baumgarten et al. to *Xanthobacter* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 28 (4), 573-581.
- Williams, P. R., Panko, J. M., Unice, K., Brown, J. L., & Paustenbach, D. J. (2008). Occupational exposures associated with petroleum-derived products containing trace levels of benzene. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 5 (9), 565-574.
- Willems, A., Falsen, E., Pot, B., Jantzen, E., Hoste, B., Vandamme, P., Kersters, K., & De Ley, J. (1990). Acidovorax, a new genus for *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas delafieldii*, E. Falsen (EF) group 13, EF group 16, and several clinical isolates, with the species *Acidovorax facilis* comb. nov., *Acidovorax delafieldii* comb. nov., and *Acidovorax temperans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 40 (4), 384-398.
- Willems, A., & Gillis, M. (2005). *Acidovorax*. In: Kersters, K., Vancanneyt, M., (Szerk.): *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Boston: Springer, MA. Vol.2. p. 696-703
- Wilson, L. P., & Bouwer, E. J. (1997). Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18, 116-130.
- 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.
- Wu, Z., Liu, G., Ji, Y., Li, P., Yu, X., Qiao, W., Wang, B., Shi, K., Liu, W., Liang, B., Wang, D., Januka-Golub, K., Freilich, S., & Jiang, J. (2022). Electron acceptors determine the BTEX degradation capacity of anaerobic microbiota via regulating the microbial community. *Environmental Research*, 215, 114420.
- 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.

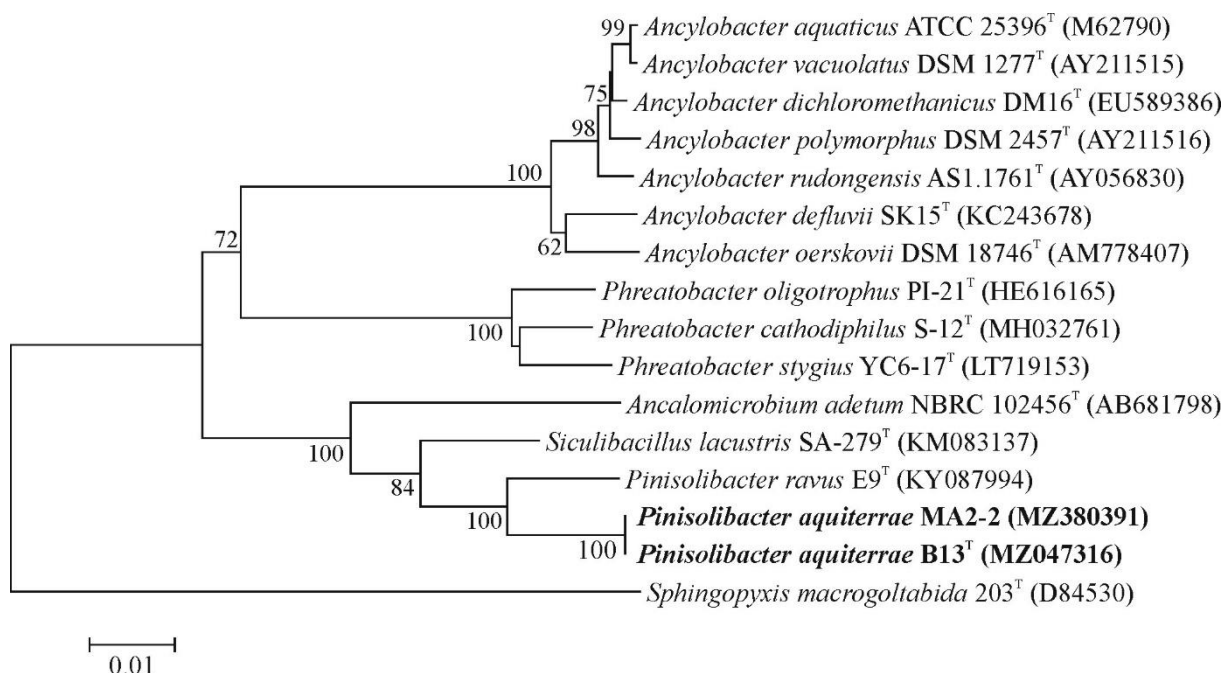
- Yang, B., Wang, M., Wang, J., Song, X., Wang, Y., Xu, H., & Bai, J. (2018). Mechanism of high contaminant removal performance in the expanded granular sludge blanket (EGSB) reactor involved with granular activated carbon for low-strength wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal*, 334, 1176-1185.
- Yang, E., Liu, J., Chen, D., Wang, S., Xu, L., Ma, K., Zhang, X., Sun, L., & Wang, W. (2022). *Rhizobium cremeum* sp. nov., isolated from sewage and capable of acquisition of heavy metal and aromatic compounds resistance genes. *Systematic and Applied Microbiology*, 45 (3), 126322.
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R., & Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12 (9), 635-645.
- Yeom, S. H., & Yoo, Y. J. (1999). Removal of benzene in a hybrid bioreactor. *Process Biochemistry*, 34 (3), 281-288.
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67 (5), 1613.
- Young, C. C., Ho, M. J., Arun, A. B., Chen, W. M., Lai, W. A., Shen, F. T., Rekha, P. D., & Yassin, A. F. (2007). *Pseudoxanthomonas spadix* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57 (8), 1823-1827.
- Zhang, T., Bain, T. S., Nevin, K. P., Barlett, M. A., & Lovley, D. R. (2012). Anaerobic benzene oxidation by *Geobacter* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (23), 8304-8310.
- Zhang, W. Y., Fang, M. X., Zhang, W. W., Xiao, C., Zhang, X. Q., Yu, Z. P., Zhu, X-F., & Wu, M. (2013a). *Extensimonas vulgaris* gen. nov., sp. nov., a member of the family Comamonadaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63 (6), 2062-2068.
- Zhang, T., Tremblay, P. L., Chaurasia, A. K., Smith, J. A., Bain, T. S., & Lovley, D. R. (2013b). Anaerobic benzene oxidation via phenol in *Geobacter metallireducens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (24), 7800-7806.
- Zhang, X. L., Ma, F. J., Wu, B., Li, F. S., & Gu, Q. B. (2015). Effect of different particle sizes of red soil on BTEX sorption and desorption. *Journal of Safety and Environment*, 15 (2), 210-215.

- Zhang, X., Bao, D., Li, M., Tang, Q., Wu, M., Zhou, H., Liu, L., & Qu, Y. (2021). Bioremediation of petroleum hydrocarbons by alkali–salt-tolerant microbial consortia and their community profiles. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 96 (3), 809-817.
- Zhao, D., Liu, C., Liu, L., Zhang, Y., Liu, Q., & Wu, W. M. (2011). Selection of functional consortium for crude oil-contaminated soil remediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65 (8), 1244-1248.
- Zukauskaitė, A., Jakubauskaitė, V., Belous, O., Ambrazaitienė, D., & Stasiskienė, Z. (2008). Impact of heavy metals on the oil products biodegradation process. *Waste management & Research*, 26 (6), 500-507.
- Żur, J., Wojcieszńska, D., Hupert-Kocurek, K., Marchlewicz, A., & Guzik, U. (2018). Paracetamol–toxicity and microbial utilization. *Pseudomonas moorei* KB4 as a case study for exploring degradation pathway. *Chemosphere*, 206, 192-202.
- Żur, J., Piński, A., Wojcieszńska, D., Smulek, W., & Guzik, U. (2020). Diclofenac degradation - Enzymes, genetic background and cellular alterations triggered in diclofenac-metabolizing strain *Pseudomonas moorei* KB4. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (18), 6786.
- Zylstra, G. J., McCombie, W. R., Gibson, D. T., & Finette, B. A. (1988). Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1: genetic organization of the tod operon. *Applied and Environmental Microbiology*, 54 (6), 1498-1503.

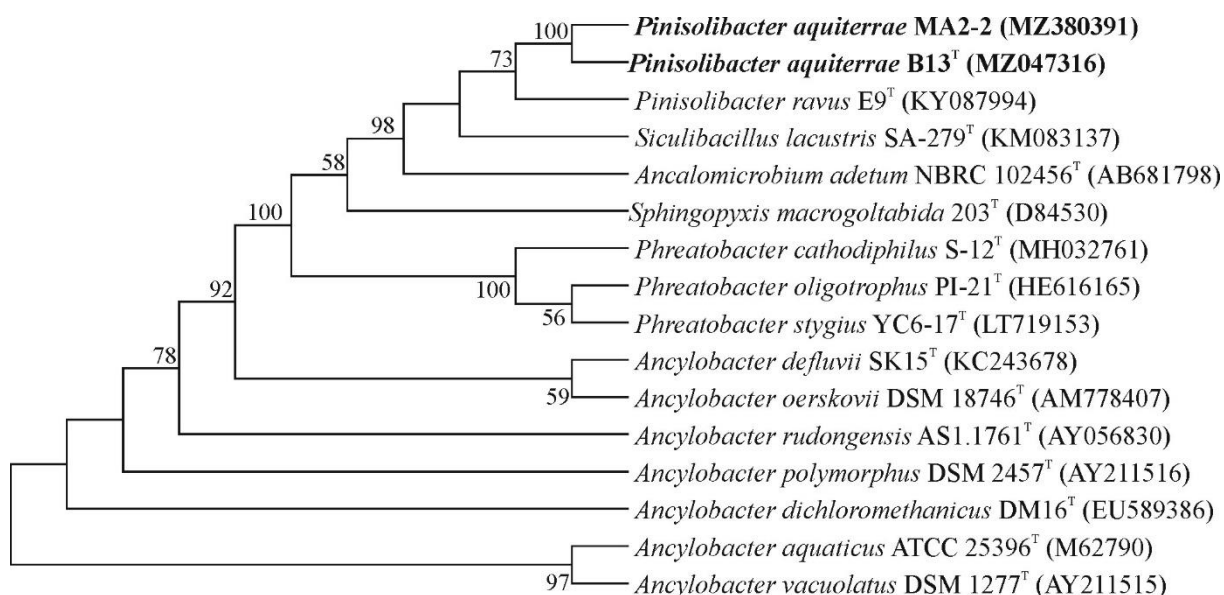
### Internetes hivatkozások:

- http1: <https://www.theguardian.com/us-news/2022/dec/09/keystone-kansas-pipeline-biggest-spill-yet-14000-barrels>
- http2: <https://www.visualcapitalist.com/cp/map-oil-and-gas-spills-in-the-u-s-since-2010/>
- http3: <https://worldpopulationreview.com/state-rankings/oil-production-by-state>
- http4: [https://www.npms.phmsa.dot.gov/Documents/NPMS\\_HeatMap\\_HLAccidents\\_wPoints.pdf](https://www.npms.phmsa.dot.gov/Documents/NPMS_HeatMap_HLAccidents_wPoints.pdf)
- http5: <https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=a0900006.kvv>
- http6: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzene#section=Solubility>
- http7: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/n-HEXANE#section=Flash-Point>
- http8: <https://www.chemanalyst.com/industry-report/benzene-market-56>
- http9: <https://www.reference.com/science-technology/toluene-used-9bc16bafda0b74b8>
- http10: [https://www.met.hu/eghajlat/magyarorszag\\_eghajlata/eghajlati\\_visszatekinto/elmult\\_evek\\_idojarasa/](https://www.met.hu/eghajlat/magyarorszag_eghajlata/eghajlati_visszatekinto/elmult_evek_idojarasa/)
- http11: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- http12: <https://www.ezbiocloud.net/>
- http13: [http://www.mothur.org/wiki/MiSeq\\_SOP](http://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP)
- http14: <http://microbial-genomes.org6>
- http15: <https://www.ezbiocloud.net/tools/ubcg>
- http16: <https://ggdc.dsmz.de/>
- http17: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>
- http18: <https://lpsn.dsmz.de/genus/rhodoferrax>
- http19: <https://lpsn.dsmz.de/genus/ideonella>
- http20: <https://lpsn.dsmz.de/genus/acidovorax>

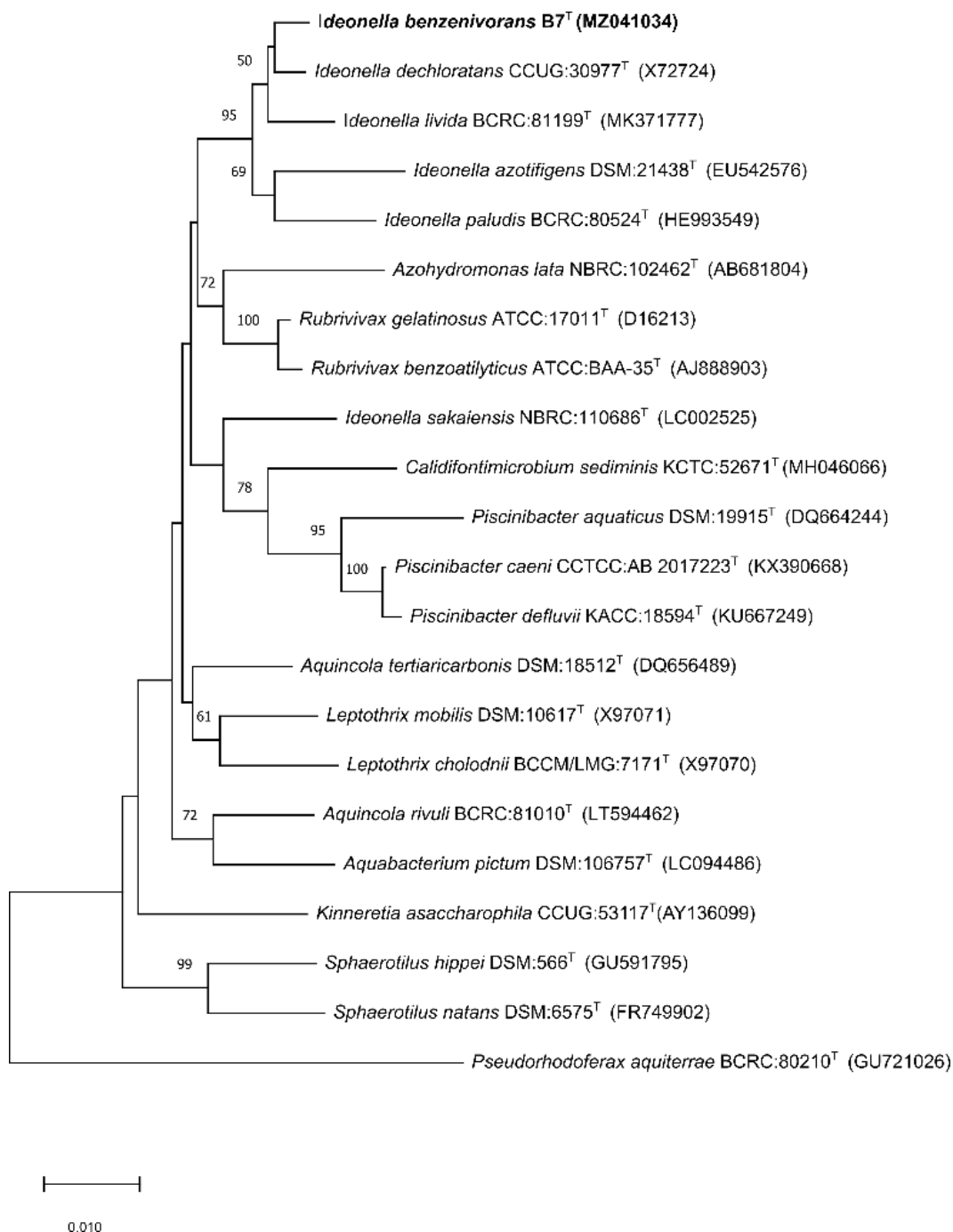
## 8.2. Táblázatok, ábrák



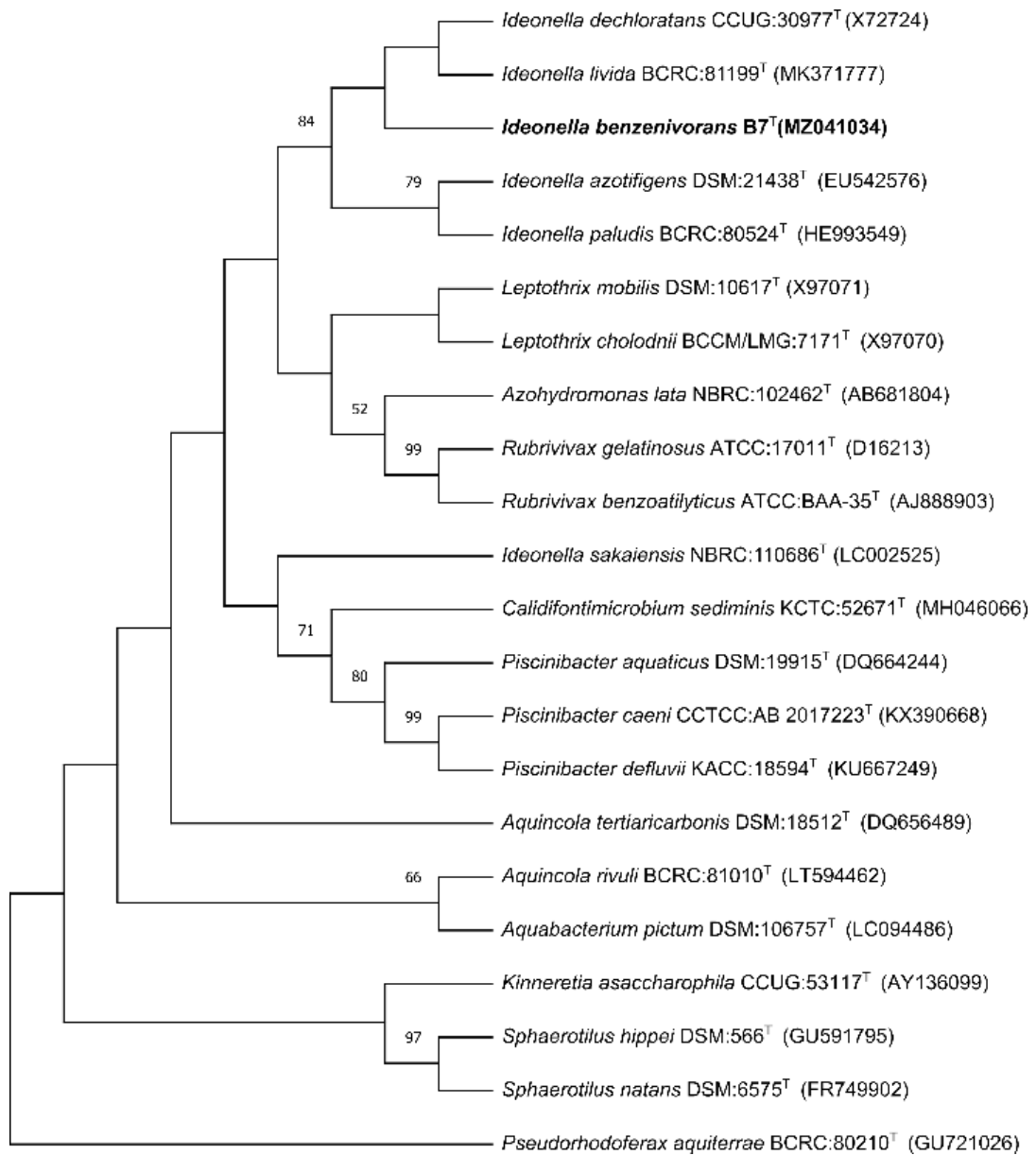
8.2.1. ábra: 16S rRNS génszekvenciák alapján létrehozott neighbor-joining filogenetikai fa, amely a B13<sup>T</sup> törzs és legközelebbi rokonai közötti filogenetikai kapcsolatokat mutatja.



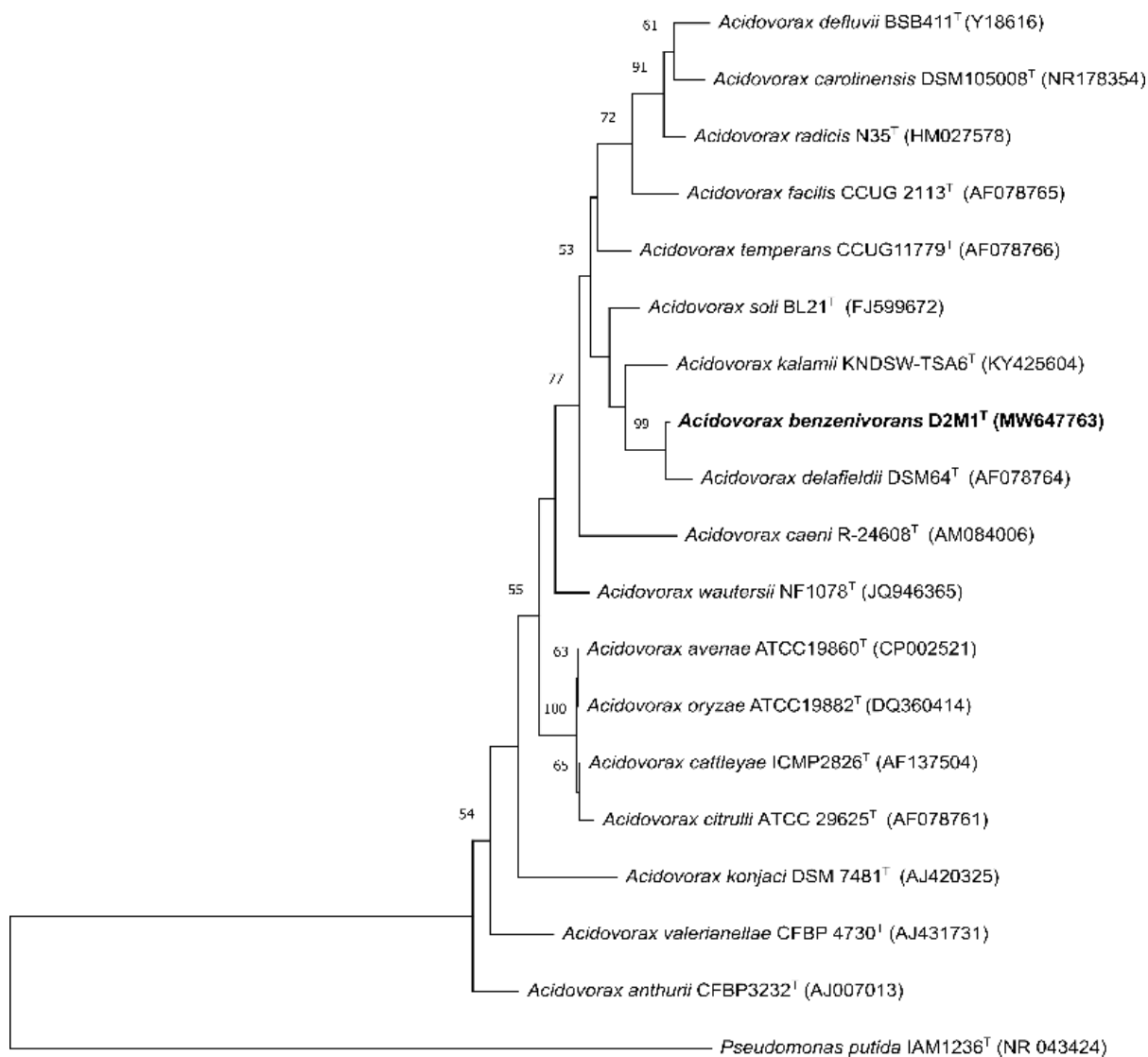
8.2.2. ábra: 16S rRNS génszekvenciák alapján létrehozott maximum-parszimónia filogenetikai fa, amely a B13<sup>T</sup> törzs és legközelebbi rokonai közötti filogenetikai kapcsolatokat mutatja.



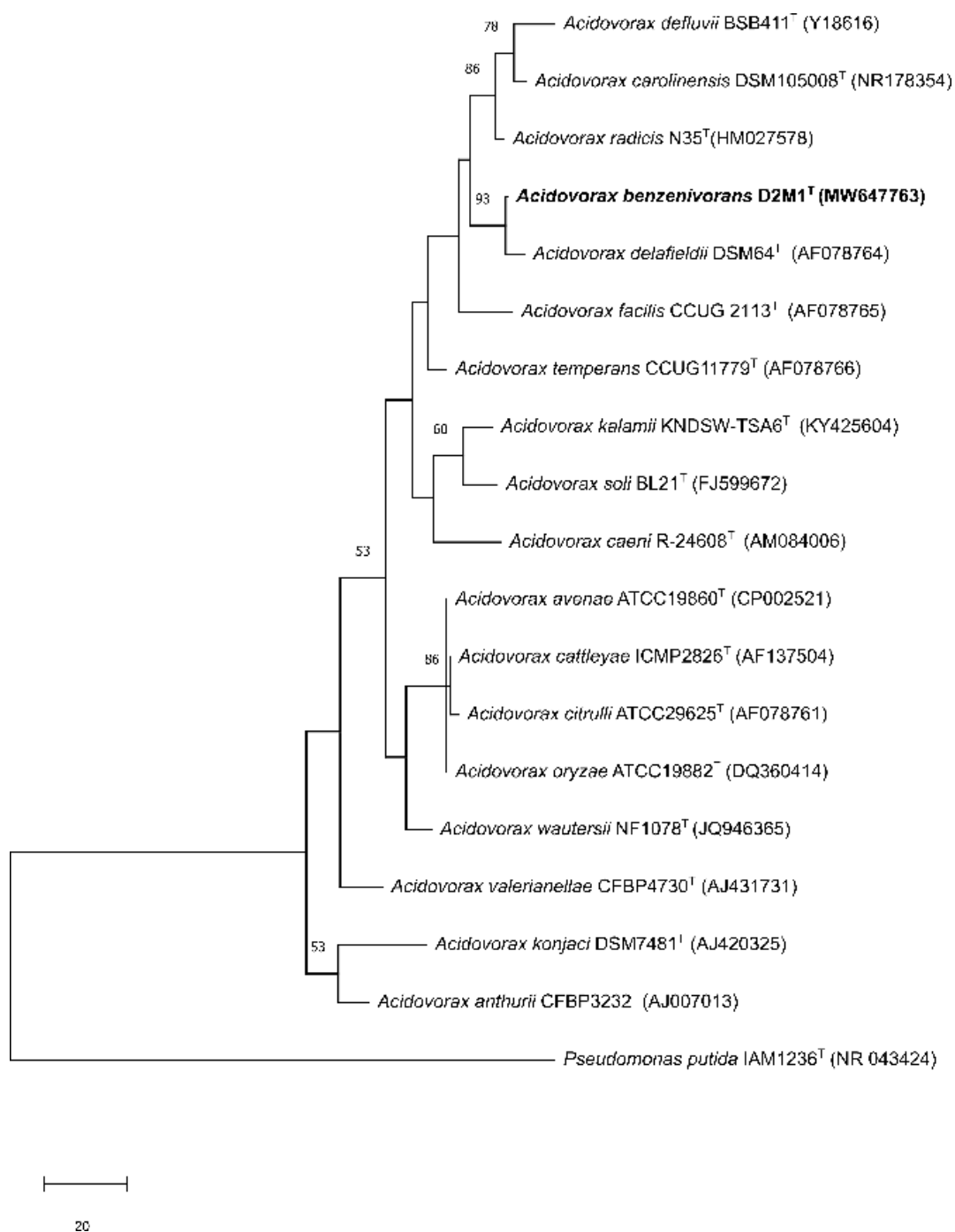
8.2.3. ábra: 16S rRNS génszekvenciák alapján létrehozott neighbor-joining filogenetikai fa, amely a B13<sup>T</sup> törzs és legközelebbi rokonai közötti filogenetikai kapcsolatokat mutatja.



8.2.4. ábra: 16S rRNS génszekvenciák alapján létrehozott maximum-parszimónia filogenetikai fa, amely a B7<sup>T</sup> törzs és legközelebbi rokonai közötti filogenetikai kapcsolatokat mutatja.



8.2.5. ábra: 16S rRNS génszekvenciák alapján létrehozott neighbor-joining filogenetikai fa, amely a D2M1<sup>T</sup> törzs és legközelebbi rokonai közötti filogenetikai kapcsolatokat mutatja.



8.2.6. ábra: 16S rRNS génszekvenciák alapján létrehozott maximum-parszimónia filogenetikai fa, amely a D2M1<sup>T</sup> törzs és legközelebbi rokonai közötti filogenetikai kapcsolatokat mutatja.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Táncsics Andrásnak az évek során nyújtott szakmai segítséget és útmutatást, mely nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el.

Köszönöm továbbá Dr. Kriszt Balázs intézetigazgató úrnak, hogy lehetőséget teremtett a munka megvalósulásához.

Köszönöm, hogy részese lehettem a Molekuláris Ökológia Tanszék közösségének szakmai szempontból és emberileg is egyaránt.

Köszönettel tartozom Dr. Farkas Milánnak, Dr. Benedek Tibornak és Dr. Sinchan Banerjee-nek, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk a kérdéseimmal.

Hálásan köszönöm Dr. Hahn Juditnak és Oláh Zoltánnak a dolgozat javítása során nyújtott pótolhatatlan segítségüket.

Szeretném megköszönni Márton Dalmának, Csépanyi Andreának, Pápai Mártonnak és Balogh Rékának, hogy bármikor számíthattam rájuk szakmailag és barátilag egyaránt.

Köszönöm férjemnek, Dr. Harkai Péternek, hogy mindig a segítségemre sietett akár mintavételről, kísérletekről, vagy a dolgozat aprólékos javításáról volt szó, eközben mindig felvidített, bátorított és támogatott.

Végül pedig köszönöm drága családomnak és kedves barátaimnak, hogy mindig készen voltak meghallgatni, mellém állni és velem nevetni.