

Üzemanyag-oxigenátként alkalmazott éterek mikrobiális bontása: a *Mycolicibacterium* sp. CH28 jelű, új baktériumtörzs izolálása és jellemzése

Doktori értekezés

Zsilinszky Ingrid

Témavezetők:

Dr. Kiss István és Dr. Szabó Zsolt



Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közhasznú Nonprofit Kft.
Biotechnológiai Divízió (BAY-BIO)



Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Környezettudományi Doktori Iskola

Szeged

2021

TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítések jegyzéke.....	6
1. Bevezetés.....	8
2. Irodalmi áttekintés.....	10
2.1. Az oxigenátok.....	10
2.2. Az éter típusú üzemanyag-adalékok.....	12
2.3. Az éterek környezeti hatásai.....	13
2.4. Az éterek környezeti vonatkozásai.....	15
2.5. Az éterek humán egészségügyi vonatkozásai.....	17
2.6. Diizopropil-éter (DIPE).....	19
2.7. Etil- <i>terc</i> -butil-éter (ETBE).....	20
2.8. Az éter típusú üzemanyag-adalékok mikrobiális bontása.....	20
2.8.1. A DIPE mikrobiális bontása.....	20
2.8.2. Az ETBE mikrobiális bontása.....	21
2.9. Az ETBE anaerob bontása.....	26
2.10. <i>Mycobacterium</i> -ok általános jellemzése.....	27
2.10.1. A <i>Mycolicibacterium</i> -ok általános jellemzése.....	29
2.11. Mesterséges konzorciumok a biodegradáció szolgálatában.....	30
2.12. Új baktériumfajok azonosítása.....	32
3. Célkitűzések.....	34
4. Anyagok és módszerek.....	35
4.1. DIPE-bontó mikroorganizmus izolálása talajvízből.....	35
4.2. Az izolált törzs általános növesztési körülményei.....	37
4.2.1. Az izolált törzs fenntartása.....	37
4.2.2. Oltókultúra előállítása TSB tápoldatban.....	37
4.2.3. DIPE-vel indukált oltókultúra előállítása.....	37

4.3.	A CH28 jelű izolátum hőmérséklet optimumának meghatározása	38
4.4.	A CH28 jelű izolátum pH toleranciájának vizsgálata	39
4.5.	A CH28 jelű izolátum sótűrő képességének vizsgálata.....	39
4.6.	A CH28 jelű izolátum antibiotikum rezisztenciájának vizsgálata.....	40
4.7.	A CH28 jelű izolátum növekedési tesztjei különböző szubsztrátokon.....	41
4.8.	„Resting cell” (nyugvó sejtes) kísérlet	41
4.9.	A DIPE lebontási útvonalában szereplő intermedierek azonosítása a CH28 jelű izolátummal.....	42
4.10.	A CH28 jelű izolátum mikrokozmosz tesztjei DIPE-vel mesterségesen szennyezett talajvizekkel	43
4.11.	ETBE-bontó mesterséges konzorcium létrehozása a CH28 jelű izolátum és a <i>Hydrogenophaga</i> sp. T4 törzsekkel	44
4.12.	A CH28 jelű izolátum kometabolikus képességeinek vizsgálata.....	45
4.13.	Laboratóriumi oszlopkísérletek.....	46
4.14.	Az analitikai mérések módszertani leírása.....	52
4.14.1.	Az illékony komponensek, éterek, 2-propanol és aceton koncentrációjának meghatározása	52
4.14.2.	Ecetsav mérése vizes mátrixú mintákból HS-GC/MS-sel.....	52
4.14.3.	Anionok koncentrációjának meghatározása	53
4.14.4.	Szerves savak és alkoholok koncentrációjának meghatározása	53
4.15.	Molekuláris biológiai vizsgálatok.....	54
4.15.1.	DNS-izolálás és a DNS-koncentráció mérése	54
4.15.2.	DGGE (denaturáló grádiens gélelektroforézis) módszer a baktériumok nyomon követésére.....	54
4.15.3.	Szekvencia azonosítás	55
4.15.4.	Kolónia PCR.....	55
4.15.5.	A CH28 <i>de novo</i> genomszekvenálása	55
5.	Eredmények és megvitatásuk	57

5.1.	DIPE-bontásra képes egyedi baktériumtörzs izolálása talajvízből.....	57
5.2.	A <i>Mycolicibacterium</i> sp. CH28 <i>de novo</i> genom szekvenálása.....	57
5.3.	A <i>Mycolicibacterium</i> sp. CH28, mint új faj	58
5.4.	A <i>Mycolicibacterium</i> sp. CH28 növesztésének általános jellemzői.....	60
5.5.	A <i>Mycolicibacterium</i> sp. CH28 hőmérséklet optimuma	61
5.6.	A <i>Mycolicibacterium</i> sp. CH28 pH toleranciájának vizsgálata.....	63
5.7.	A <i>Mycolicibacterium</i> sp. CH28 sótűrő képessége.....	64
5.8.	A <i>Mycolicibacterium</i> sp. CH28 antibiotikum rezisztenciájának vizsgálata	64
5.9.	A <i>Mycolicibacterium</i> sp. CH28 növekedése különböző szubsztrátokon.....	66
5.10.	A DIPE lebontási útvonalában szereplő intermedierék azonosítása.....	67
5.11.	„Resting cell” („nyugvó sejtes”) kísérlet	70
5.12.	DIPE mikrokozmosz tesztek talajvízzel	73
5.13.	ETBE-bontó mesterséges konzorcium létrehozása a <i>Mycolicibacterium</i> sp. CH28 és a <i>Hydrogenophaga</i> sp. T4 törzsekkel	76
5.13.1.	50 mg/l ETBE-vel összeállított mikrokozmoszok.....	76
5.13.2.	200 mg/l ETBE-vel összeállított mikrokozmoszok.....	78
5.13.3.	500 mg/l ETBE-vel összeállított mikrokozmoszok.....	79
5.13.4.	A mesterséges konzorciummal végzett mikrokozmosz kísérletek eredményeinek összefoglalása	80
5.14.	A CH28 jelű izolátum kometabolikus képességeinek felmérése.....	81
5.15.	Laboratóriumi oszlopkísérletek DIPE és ETBE bontásának modellezésére	83
5.15.1.	Oszlopkísérletek DIPE-vel kiegészített minimál tápoldattal.....	84
5.15.2.	Oszlopkísérlet ETBE-vel és TBA-val szennyezett talajvízkezelés modellezésére.....	88
6.	Összefoglalás.....	95
7.	Köszönetnyilvánítás	104
8.	Irodalomjegyzék.....	105
9.	Mellékletek.....	128

1. számú melléklet..... 128

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

3M4N: 3-metil-4-nitrofenol

alkB: az alkán hidroxiláz enzimet (AlkB) kódoló gén

CH28: *Mycolicibacterium* sp. CH28

CSI: egy fehérje (evolúciósan) konzervált régióját kódoló DNS szakaszban található, filogenetikai azonosításra alkalmazható inszerciók/deléciók [*Conserved Signature Indels*]

CSP: egy fehérje (evolúciósan) konzervált régiójában található, (filogenetikai azonosításra alkalmazható) „extra” aminosav(ak) vagy aminosav hiány(ok) [*Conserved Signature Proteins*]

CYP: citokróm P450 monooxygenáz

dDDH: digitális DNS-DNS hibridizáció

DIPE: diizopropil-éter

ETBE: etil-*terc*-butil-éter

HS üveg: statikus gőztér analízisre szolgáló laboratóriumi üvegeszköz [*HeadSpace bottle*]

IPTBE: izopropil-*terc*-butil-éter

K_{oc}: talaj szerves szén-víz megoszlási hányados [*Soil Organic Carbon-Water Partitioning Coefficient*]

K_{ow}: oktanol-víz megoszlási hányados [*Octanol-Water Partitioning Coefficient*]

LBA lemez: Luria-Bertani Agar lemez

LNAPL: víznél könnyebb, nem-vizes fázisú folyadék [*Light Non-Aqueous Phase Liquid*]

MTBE: metil-*terc*-butil-éter

NO_x: nitrogén-oxidok

nr: nem redundáns [*Non-Redundant*]

PCR: polimeráz láncreakció [*Polymerase Chain Reaction*]

PRB: permeábilis reaktív gát [*Permeable Reactive Barrier*]

RVP: Reid-gőznyomás [*Reid Vapor Pressure*]

T4: *Hydrogenophaga* sp. T4

TAA: *terc*-amil-alkohol

TAAE: *terc*-amil-etil-éter

TAME: *terc*-amil-metil-éter

TBA: *terc*-butil-alkohol

USEPA: az Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala [*United States Environmental Protection Agency*]

VOC: illékony szerves vegyület [*Volatile Organic Compound*]

WHO: Egészségügyi Világszervezet [*World Health Organization*]

1. BEVEZETÉS

Az első autókat az 1800-as évek végén gyártották, melyek abban az időben meglehetősen költségesnek számítottak. Ezek a járművek nemcsak a kényelmet biztosították, hanem a jólét státuszszimbólumaként is szolgáltak, így a fejlett országokban rövid időn belül elterjedtek, hiszen használatukkal az emberek mobilisabbá váltak, szabadabbnak érezhették magukat. Az autók számának növekedésével az utak eleinte tisztábbnak tündek, hiszen egyre kevesebb lótrágya került ki rájuk. Nem sokkal később azonban sokkal komolyabb problémák adódtak a gépjárművek kipufogó gázainak és az üzemeltetésükhöz szükséges üzemanyagok kitermelésének, szállításának, előállításának, felhasználásának előre nem látott következményei miatt (1). Ebből kifolyólag a gépjárművek elterjedését számos szabályozás követte (pl. katalizátorok kötelező használata, az ólom-tetraetil adagolás megszüntetése, illetve emissziós határértékek, az európai kibocsátási normák bevezetése), amelyek célja az emberi egészség és az ökoszisztémák védelme volt (1, 2).

A benzin összetételével és oktánszámával szorosan összefüggő kopogásos égés kiküszöbölésére az 1920-as évektől kezdve alkilezett ólomszármazékokat adagoltak az üzemanyagokhoz. A motor működése szempontjából ideális oktánszám beállítására több lehetséges módszer közül - hatékonyságának és alacsony költségének köszönhetően - az ólom-tetraetil adagolást rendszeresítették (3, 4). Azonban a benzinfogyasztás egyre növekvő felhasználásának következtében drasztikus mértékben megnőtt az ólomkibocsátás (3). Ennek egészségügyi hatása világméretűvé nőtte ki magát; számos tanulmány készült a gépjárművek által a környezetbe kibocsátott ólom emberi egészségre és környezetre gyakorolt negatív hatásairól, például a központi idegrendszert, a hem szintézist és a szaporító szervrendszert érintő elváltozásokról (5, 6). A fentiekén kívül az ólom-tetraetil kiváltásában szerepet játszott a háromutas katalitikus konverterek elterjedése is, mivel az ólomszármazékokkal kiegészített üzemanyagok a katalizátor felületén ólomtartalmú bevonatot képeztek, amely rövidtávon csökkentette a katalizátor hatásfokát, hosszabb távon pedig tönkre is tette azt (7).

Az ólom adagolásának beszüntetése miatt az üzemanyagokban jelentős mértékben lecsökkent az oktánszám, ami a magas oktánszámú üzemanyagra tervezett autók millióinál problémát okozott, így mihamarabb megoldást kellett találni. Azonnali reakcióként az üzemanyagokban megnövelték a butánok és az aromás szénhidrogének koncentrációját. Egy másik, sokkal innovatívabb ötlet a magas oktánszámú komponensek egy új, korábban nem használt osztályának, az oxigenátoknak a bevezetése volt (8).

Az 1970-es évektől az ólom kiváltását szolgáló üzemanyag-oxigenátok számos előnyüknek köszönhetően gyorsan elterjedtek. Bár az ólom kivonása környezetvédelmi szempontból igen kedvezőnek tekinthető, azonban a helyettesítésére használt, biológiai úton nehezen lebontható éter típusú üzemanyag-adalékok a talajba és talajvízbe kerülve komoly problémát jelentenek. Ezek a vegyületek szerkezetükből adódóan ellenállóak a kémiai, a fizikai és a biológiai degradációval szemben, ráadásul evolúciós léptékben mérve a mikroorganizmusoknak is csak meglehetősen csekély idő állt rendelkezésükre az adaptációhoz.

Doktori értekezésem témája egy diizopropil-éter (DIPE) és etil-*terc*-butil-éter (ETBE) biodegradációjára képes új izolátum átfogó bemutatása, továbbá a benne rejlő potenciál felfedése, ismertetése annak érdekében, hogy jobban átláthatóvá, tervezhetővé és nyomon követhetővé váljon a bioremediációval hatékonyan kezelhető, éter típusú üzemanyag-adalékokkal szennyezett talajok és talajvizek kármentesítése.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az oxigenátok

Az oxigént tartalmazó oxigenátok tökéletesen égő szerves anyagok, amelyek üzemanyagként vagy üzemanyag-adalékként használhatóak, ilyenek például az alkoholok és az éterek. Egyes oxigenátok kopogásgátló hatását már az 1930-as években felfedezték; az etanolt már 1935-től használták az üzemanyagok minőségének javítására. Rövid időn belül ismertté vált az is, hogy néhány elágazó láncú dialkil-éter (pl.: a metil-*terc*-butil-éter (MTBE), az etil-*terc*-butil-éter (ETBE) és az izopropil-*terc*-butil-éter (IPTBE)), továbbá egyes alkil-fenil-éterek, mint például az anizol és a fenetol nagyon kedvező oktán tulajdonságokkal bírnak (8).

Azonban az előnyök ellenére az oxigenátok ipari előállítása és használata csak fokozatosan valósult meg, majd terjedt el. Az éterek, mint kopogásgátló anyagok az érdeklődés igazi középpontjába csak az 1970-es évek elején kerültek. Abban az időben a kémiai köztiterméként keletkező, hasznosításra váró kis szénatomszámú alkoholokat, a metanolt és az etanolt, már előszeretettel használták az üzemanyagok minőségének javítására. Az MTBE ipari méretű előállítását követően 1973-tól megindult az éter típusú oxigenátok - mint oktánszámnövelők - adagolása az üzemanyagokhoz. Az oxigenátok elterjedésének szintén kedvezett az 1970-es évek eleji olajválság, amely alatt nemcsak kopogásgátló, de térfogatnövelő anyagokként is előszeretettel alkalmazták őket (8).

A napjainkban széles körben használatos üzemanyag-oxigenátok közé sorolható az MTBE, az ETBE, a *terc*-amil-metil-éter (TAME) és az etanol. Azonban a közeljövőben a manapság még kevésbé ismert diizopropil-éter (DIPE) és *terc*-amil-etil-éter (TAEE) elterjedése is joggal valószínűsíthető. A korábban előszeretettel használt OxynolTM néven forgalmazott, *terc*-butil-alkoholból (TBA-ból) és metanolból álló keverék gyártása jelenleg szünetel (8). Az **1. táblázat**ban a benzollal összehasonlítva összefoglaltam a főbb oxigenátokat, továbbá bemutattam a környezeti szempontból releváns fizikai-kémiai tulajdonságaikat.

1. táblázat: Az oxigenátok és a benzol környezeti szempontból releváns fizikai-kémiai tulajdonságainak összehasonlítása (25 °C-on) ((9–13) alapján)

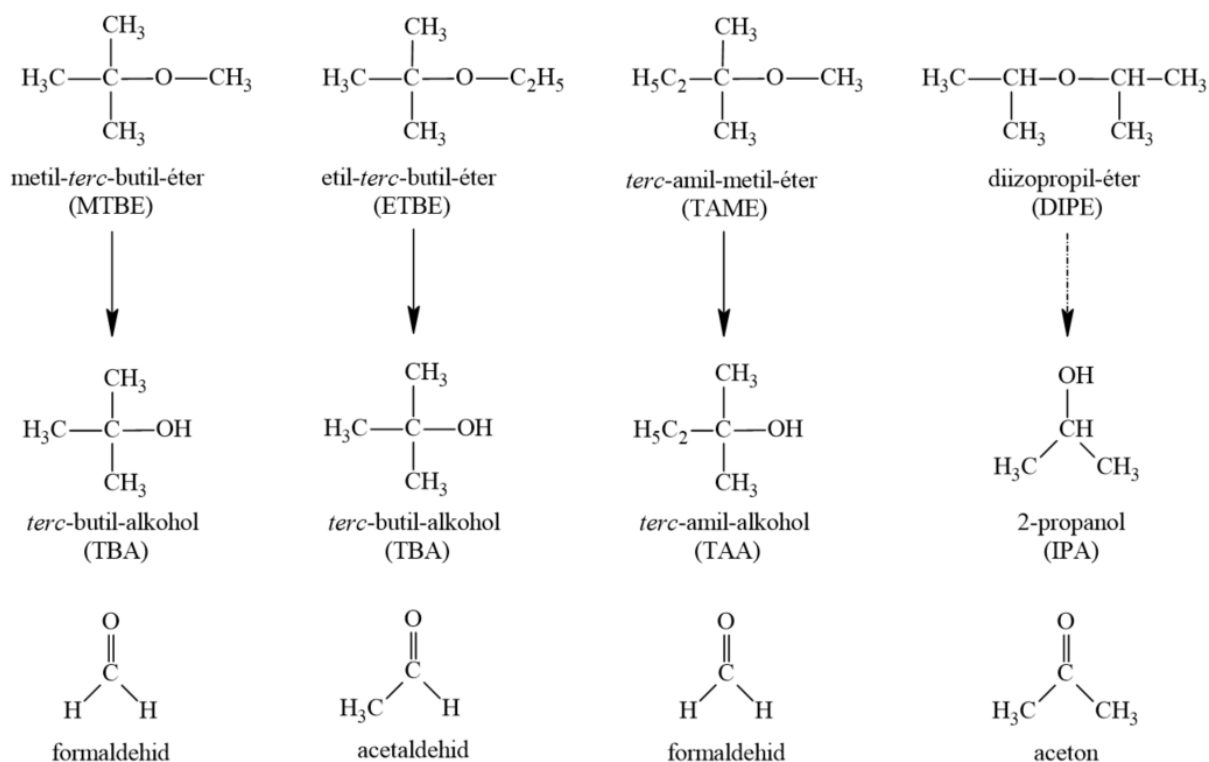
Tulajdonság	Benzol	MTBE	TBA	DIPE	ETBE	TAME	Etanol	Metanol
Molekulaképlet	C ₆ H ₆	C ₅ H ₁₂ O	C ₄ H ₁₀ O	C ₆ H ₁₄ O	C ₆ H ₁₄ O	C ₆ H ₁₄ O	C ₂ H ₆ O	CH ₄ O
Moláris tömeg (g/mol)	78,11	88,15	74,12	102,17	102,17	102,17	46,07	32,04
Sűrűség (g/cm ³)	0,88	0,74	0,79	0,73	0,74	0,77	0,79	0,79
Vízoldhatóság (mg/l)	1 780	48 000	korlátlan	2 039	12 000	12 000	korlátlan	korlátlan
Az üzemanyag fázisból a vizes fázisba történő oldhatóság (mg/l)	<100	3393-5500	25000	745-804	1018-3300	1210-2400	57000	n.a.
Gőznyomás (kPa)	10-13	33-34	5-6	20	20	9	7-8	16
Henry-állandó (dimenzió nélküli)	0,180-0,220	0,012-0,045	0,00048-0,00059	0,195-0,410	0,108-0,110	0,052-0,081	0,00021-0,00026	0,00011
log K _{oc}	1,5-2,2	1,0-1,1	1,57	1,46-1,82	1,0-2,2	1,3-2,2	0,2-1,21	0,44-0,92
log K _{ow}	2,13	1,24	0,35	1,52	1,74	1,55	-0,31	-0,77
Kísérleti oktánszám	123	118	109	110	118	112	108,6	108,7
Ízküszöbérték vízben (mg/l)	500	20-40	n.a.	n.a.	47	128	n.a.	n.a.
Szagküszöbérték (ppm)	0,5	0,053	21	n.a.	0,013	0,027	49	n.a.

n.a.: nem áll rendelkezésre adat

2.2. Az éter típusú üzemanyag-adalékok

Az éter típusú üzemanyag-adalékok több mint 30 éve kiemelkedő szerepet töltenek be a globális üzemanyag felhasználásban. Az „éter típusú” elnevezés arra utal, hogy ezek a vegyületek éterkötés formájában oxigént tartalmaznak, melynek köszönhetően fokozzák az üzemanyagok égésének hatékonyságát, továbbá csökkentik a levegőbe kerülő káros anyagok kibocsátását (pl.: CO, NO_x, illékony szerves vegyületek), mindemellett pedig oktánszámnövelő tulajdonsággal is rendelkeznek. Megannyi pozitív tulajdonságukból kifolyólag ezen anyagokat gyakran adagolják nagy koncentrációban (jellemzően maximum 15% (v/v)) az üzemanyagokhoz (14).

A leggyakrabban használt éter típusú üzemanyag-adalékok konstitúciós képletét az **1. ábrán** tüntettem fel. A TBA nemcsak üzemanyag-adalék, de az MTBE és az ETBE lebomlásának köztterméke is, így biológiai kármentesítés során a biodegradáció egyik indikátorának tekinthető (15).

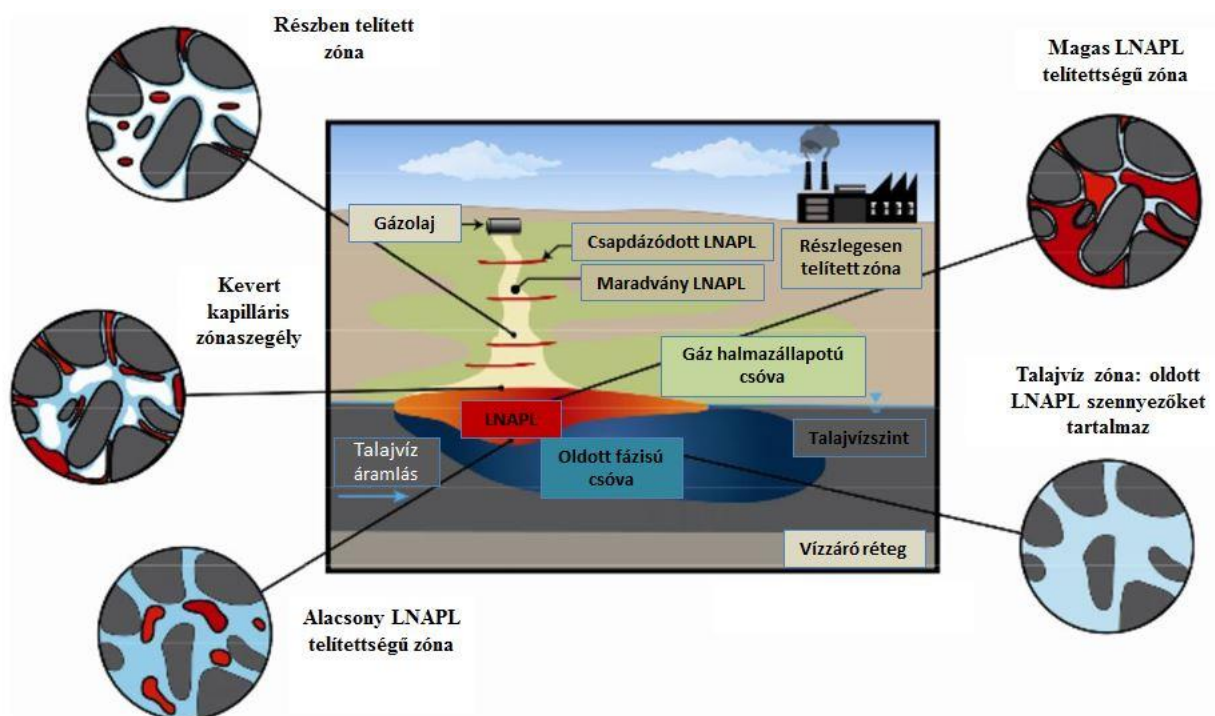


1. ábra: Éter típusú üzemanyag-adalékok és lebontási közttermékeik ((15) alapján). A képleteket a ChemDraw® Ultra szoftverrel készítettem. A szaggatott nyilak feltételezett lebontási lépést jelölnek

Az oxigenátok üzemanyag-adalékként történő felhasználásában kezdetben az MTBE dominált, magas oktánszámnövelő tulajdonságának, az üzemanyaggal való tökéletes keveredésének, továbbá alacsony fázisszeparációra és peroxidációra való hajlamának köszönhetően. Az 1980-as években az MTBE világviszonylatban az egyik legnagyobb mennyiségben gyártott vegyszer volt (8).

2.3. Az éterek környezeti hatásai

Az üzemanyagok vízdékonysága kicsi, sűrűségük lényegesen alacsonyabb, mint a vízé, így a talajba bekerülve és elérve a talajvízréteget, megfelelően nagy koncentráció esetén, önálló fázist hoznak létre, melyet az angol betűszó alapján LNAPL-nek (light non-aqueous phase liquid) nevezünk. Ez a tulajdonság alapvetően meghatározza a talajban és a talajvízben történő mozgásukat. A talajba kerülés során az üzemanyag perzisztens módon sokáig megmarad: a víz felszínén a talajvízzel együtt mozogva, lassan, de folyamatosan oldódik be a víztömegbe (16, 17). A **2. ábra** szemlélteti az LNAPL anyagok viselkedését, elhelyezkedését és terjedését a talajban és a talajvízben.



2. ábra: LNAPL típusú anyagok transzportja a talajban és a talajvízben (18)

Amint az üzemanyag egyes komponensei feloldódnak az LNAPL-lel mozgó talajvízben, az összetevők megoszlanak a víz- és a talajfázis között. Az éterekben található éterkötések elősegítik a vízdoldhatóságot. Ennek köszönhetően ezek a vegyületek jellemzően a vízfázisban találhatóak, azonban kis mértékben kötődnek a talajvízben található egyéb szerves anyagokhoz is. Tehát a víztömeggel mozgó szerves anyagok egy része a stacionárius, álló szerves anyag fázisába kerül, ezáltal csökken a szerves csóva szennyezettségi koncentrációja. A hígulás mértéke a szerves vegyületek mennyiségétől, illetve a szennyező anyag fázishoz történő kötődési hajlamától függ (17).

A telítetlen zónában az oxigenátok elsősorban lefelé irányuló mozgást végeznek, de bizonyos geológiai tulajdonságok (pl. törések vagy alacsony áteresztőképességű rétegek) következtében mozgásuk oldalirányú is lehet. Ebben a zónában az oxigenátok négyféle fázisban lehetnek jelen: gáz (gőz), vízben oldott formában, talajhoz vagy üledékhez kötötten és LNAPL fázisban (7).

A telített zónában az oxigenátok mozgása jellemzően oldalirányú. A pórusvíz változásának és a talajvízszint fluktuációjának következtében korlátozott függőleges irányú elmozdulás tapasztalható. A telített zónában az oxigenátok háromféle fázisban fordulhatnak elő: vízben oldva, a talaj vagy üledék felületéhez szorpcióval kötődve és az LNAPL fázisban (7).

A talajvízbe bekerülő, üzemanyag eredetű LNAPL-típusú szennyezés esetében a magasabb vízdoldhatósági fokkal rendelkező frakciók nagyobb affinitást mutatnak a környező vízben történő oldódásra, mint az alacsonyabb vízdoldhatóságú összetevők. Az éter típusú oxigenátok oldhatósága (**1. táblázat**, 2.1 fejezet) széles tartományban mozog: 2 000 mg/l-től (DIPE) 48 000 mg/l-ig (MTBE). Az éterek molekuláris struktúrájuknak köszönhetően sokkal jobban oldódnak a vízben, mint az üzemanyagok meghatározó komponensei. Például a benzol (1 780 mg/l) vízdoldhatósága közel 27-szer alacsonyabb, mint az MTBE-é (48 000 mg/l) (17). Az MTBE kiváló vízdoldhatósága miatt tekintélyes kiterjedésű csóvákat tud képezni, melyek jelentősen nagyobbak, mint benzol-szennyezés esetében (12).

Az üzemanyag-adalékként használt alkoholok (metanol, etanol és TBA), a hidroxil-csoportok vízzel kialakított hidrogén kötéseinek köszönhetően, szobahőmérsékleten korlátlanul elegyednek vízzel (17). Az egyes oxigenát éterek vízdoldhatósága a benzollal összehasonlítva az alábbiak szerint alakul:

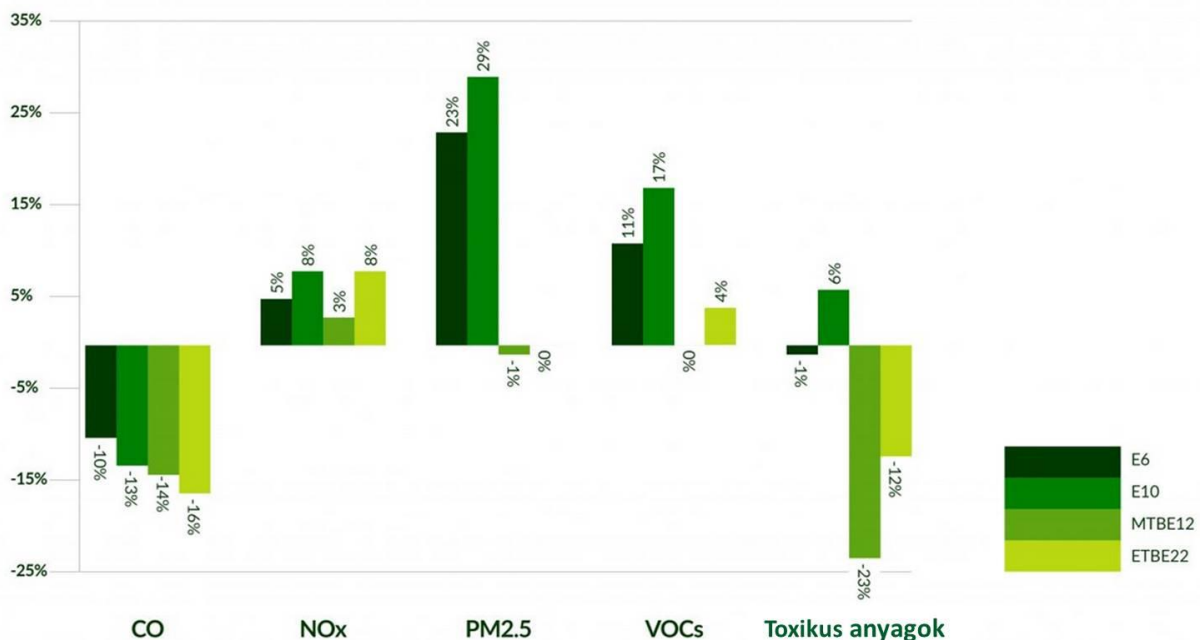
TBA > MTBE > ETBE = TAME > DIPE > TAEE > benzol (7, 9, 10).

A szerves szennyezők egyes környezeti elemekben történő viselkedésének előrejelzésére és jellemzésére alkalmazott viszonyszám az *n*-oktanol és a víz közötti

megoszlási hányados (K_{ow}). Egy magas K_{ow} értékkel rendelkező szennyező anyag nagyobb affinitást mutat a környezetben található szerves fázisok irányába (19). Általánosságban elmondható, hogy az alkoholok kisebb, míg az éterek (különösen az ETBE és a TAME) magasabb K_{ow} értékkel bírnak (1. táblázat, 2.1 fejezet).

2.4. Az éterek környezeti vonatkozásai

Az oxigenátok csökkentik a gépjárművek károsanyag kibocsátását, mivel oxigéntartalmuknak köszönhetően növelik az égés hatékonyságát. Az éter típusú üzemanyag-adalékok további előnye, hogy kompatibilisek a régebbi károsanyag kibocsátás csökkentő rendszerrel felszerelt gépjárművekkel is (20). Húsz évnél idősebb (ezredforduló előtti) modellek esetében nem javasolják az 5% feletti etanol tartalmú üzemanyagok használatát. Mindazonáltal a törvényi szabályozásban előírt, megújuló energiaforrásnak minősülő, biológiai eredetű összetevők legkisebb összevont mértékének ezekben az autókban felhasznált benzinekben is el kell érnie a 8,2%-ot, amelyet Magyarország esetében az ETBE bekeverésével érnek el (21). A 3. ábra összehasonlítja a különböző oxigenát tartalmú üzemanyagok környezetre gyakorolt hatását az oxigenátot nem tartalmazó üzemanyagokkal.



3. ábra: Az E6, E10, MTBE12 és az ETBE22 üzemanyagok környezeti hatásai az oxigenátot nem tartalmazó üzemanyagokhoz képest. Az E6 jelű üzemanyag 6%, az E10 pedig 10% etanolt tartalmaz. Az MTBE12-es üzemanyag 12% az MTBE-, míg az ETBE22-esnek 22% az ETBE-tartalma(22)

A diagramon feltüntetett összes üzemanyag-oxigenát adalékolása 10-16%-kal csökkenti a keletkező szén-monoxid (CO) mennyiségét, azonban 3-8%-kal fokozza a keletkező nitrogén-oxidokét (NO_x). Az MTBE és az ETBE a PM_{2,5} (a 2,5 µm alatti frakcióhoz tartozó szálló por), továbbá az illékony szerves szennyezők emissziójára elhanyagolható hatást gyakorolnak, viszont az E6 és E10 használata jelentős mértékben növeli az egészségre káros PM_{2,5} és a VOC kibocsátást. Az oxigéntartalmú oktánszámnövelő anyagok közül az éter típusú üzemanyag-adalékok használata során keletkezik a legkevesebb ózon (22).

Amennyiben az MTBE a talajvízbe kerül, akkor jellemzően a degradációjáig ebben a fázisban is marad. Az üzemanyagokban megtalálható szénhidrogének jelentős része, mint például a benzol, a vízből gyakran elpárolog a levegőbe. Egy anyag folyadékból való elillanásának mértéke a Henry-állandóval jellemezhető. Ez az állandó azt az arányt fejezi ki, hogy egy adott hőmérsékleten és nyomáson, egyensúlyi állapotban az adott koncentrációban lévő anyag milyen megoszlásban van jelen a folyadékban (vízben), illetve a gőztérben. Minél nagyobb az értéke, annál illékonyabb az adott vegyület. 25 °C-on ez az érték MTBE esetében 0,024, benzol esetében pedig 0,220 (**1. táblázat**, 2.1 fejezet). Egy vegyület rendkívül illékonynak tekinthető, amennyiben Henry-állandója 0,050-ös érték feletti, tehát a folyadékban már oldott állapotban jelen lévő MTBE nem tartozik a kifejezetten illékony vegyületek közé (23). Az ETBE Henry-állandója (0,110) egy nagyságrenddel magasabb, mint az MTBE-é, azonban csak fele akkora, mint a benzolé. Az oxigenátok közül a legmagasabb Henry-állandóval a DIPE bír (0,195-0,410), a legalacsonyabb pedig az alkoholokra (metanol, etanol, TBA) jellemző: értékük megközelítően három nagyságrenddel kisebb, mint az étereké.

Az MTBE más üzemanyag komponensekhez képest nagyfokú oldhatósága (48 000 mg/l) komoly problémákat vethet fel, amikor a talajvízbe kerül, hiszen ott rendkívül gyorsan szállítható a talajvízzel, könnyen bekerülhet a felszíni vizekbe vagy akár az ivóvízbázisokba (9). Környezeti szempontból az ETBE oldhatósága (12 000 mg/l) miatt kedvezőbbnek tekinthető, mivel szennyezés esetén jellemzően a BTEX-ek fázisában marad, nem pedig a könnyen és gyorsan mozgó, vizes fázisban, mint az MTBE (24–26). Az ETBE alacsonyabb vízdoldhatóságának köszönhetően, a kontaminációt követően kisebb ETBE csóva alakul ki a talajvízben, mint MTBE esetében (27–29).

Az üzemanyag-oxigenátok tulajdonságai közül számottevő szerepe van a Reid-gőznyomásnak (RVP), amely az üzemanyagok illékonyságának meghatározására szolgáló index (30). Az RVP értéke környezetvédelmi (levegőtisztasági) és gazdasági szempontból is jelentős; minél magasabb az adott folyadék RVP-je, annál inkább hajlamos a párolgásra. Az egyes országok különböző határértékek segítségével szabályozzák, illetve korlátozzák, hogy

maximálisan milyen magas lehet az üzemanyag RVP-je. A tiszta ETBE-nek 27,6 és 31,7 kPa közötti az RVP-je, míg a tiszta MTBE-nek 55,2 kPa (11, 30, 31). A benzinhoz ETBE-t keverve az RVP csökkenést mutat, míg MTBE adagolásnál stagnálás vagy az RVP kismértékű növekedése tapasztalható. Alacsony RVP-jű üzemanyaghoz több bután adható, ezáltal még jobb minőségű keverék állítható elő (11).

Az oktánszámokat tekintve az MTBE és az ETBE kísérleti oktánszáma (118) megegyezik, míg a DIPE-é (110) valamivel alacsonyabb (**1. táblázat**, 2.1 fejezet).

Az MTBE hosszantartó, szinte kizárólagos használatát követően az utóbbi évtizedekben előtérbe került a többi éter oxigenát, így a DIPE használata is (32). Az MTBE-vel összehasonlítva, ezek az éterek számos olyan tulajdonsággal rendelkeznek, amelyek miatt előnyösebb az üzemanyaghoz történő adagolásuk, mint az MTBE-é (pl. alacsonyabb vízben való oldhatóság, magasabb forráspont) (33). Az MTBE-t helyettesítő éter oxigenátok (pl. az ETBE és a TAME) jellemzően komoly szerepet és figyelmet kaptak, azonban a DIPE használata, mint éter oxigenát jelentős mértékben mégsem terjedt el (34). A DIPE-t összehasonlítva egyéb éterekkel azt tapasztaljuk, hogy a hasonló tulajdonságok mellett a DIPE-nek mind az oktánszáma, mind pedig a Reid-gőznyomása kicsit alacsonyabb. A DIPE hajtóereje, valamint égési jellemzői megegyeznek a többi éter komponensével. A DIPE előnye, hogy propilénből és vízből egyszerűen előállítható (34).

Összehasonlítva az éterek biodegradálhatóságát az látható, hogy mind az MTBE, mind pedig az ETBE bomlási köztiterméke a nehezen degradálható TBA, amely ráadásul korlátlanul elegyedik vízzel. Az MTBE biológiai bomlása során a TBA mellett formaldehid is keletkezik, mely már kis koncentrációban is igen káros az élővilág számára, emellett jelentős szaghatással is bír. Az éter típusú üzemanyag-adalékok közül a DIPE oldhatósága (2 000 mg/l) a legalacsonyabb. Szakirodalmi adatok alapján a DIPE biológiai lebontása során feltételezhetően 2-propanol és acetone keletkezik, melyek biodegradációja megszokottabb az élővilág számára (35–37), mint a TBA-é, hiszen az előbbi vegyületek általános biológiai lebontó folyamatok során is keletkeznek. Így a fentiek tekintetében valószínűsíthető, hogy a közeljövőben a DIPE a jelenlegi helyzeténél jóval meghatározóbb szerepet fog betölteni a világpiacon.

2.5. Az éterek humán egészségügyi vonatkozásai

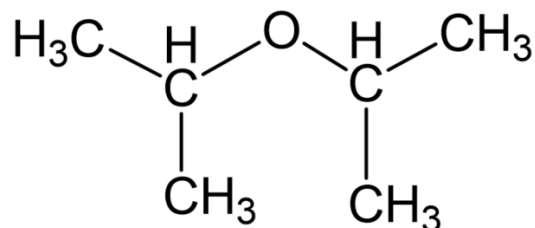
Az éter típusú üzemanyag-adalékok emberi egészségre gyakorolt hatásairól nem rendelkezünk teljes körű, átfogó ismeretekkel. Bár az MTBE-t igen széleskörűen vizsgálták,

azonban az egyes kutatási eredmények nagyon eltérőek. Mivel az MTBE-t használják a legelterjedtebben, így annak egészségügyi hatásairól készült a legtöbb tanulmány is (38). Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organisation (WHO)) állásfoglalása és több tudományos tanulmány szerint az üzemanyag éterek nem tartoznak a potenciálisan rákkeltő anyagok közé és nem károsítják az endokrin rendszert sem (22). A WHO-nak ellentmondó véleményt formált az National Toxicology Program (NTP), mely szerint az MTBE karcinogén hatására már rendelkezünk bizonyítékokkal (39). Az American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) vizsgálatai pedig azt mutatták ki, hogy az MTBE az állatok számára karcinogén, az emberekre gyakorolt hatását pedig egyelőre ismeretlenként írták le (38). Az MTBE egészségre gyakorolt esetleges negatív hatásai is elősegítették, hogy előtérbe került az ETBE üzemanyagokba történő adagolása, mivel az ETBE mutagenicitásának vizsgálata negatív eredményeket hozott (40). Az Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala (United States Environmental Protection Agency (USEPA)) által meghatározott egészségügyi határérték MTBE-re 70 µg/l, azonban már 20-40 µg/l közötti koncentrációjú MTBE szag- és ízbeli problémákat okoz (23).

Az emberi szervezetben az MTBE metabolizációja során elsődleges metabolitokként megjelenhet a TBA és a formaldehid is, amelyek a gerinces állatokra nézve bizonyítottan karcinogén hatásúak (41). Mindazonáltal a TBA, mint lebontási köztitermék, nemcsak az MTBE, de az ETBE biotranszformációja során is kimutatható (42). Az emberi szervezetben az MTBE és a TAME oxidatív demetilációjáért, továbbá az ETBE deetilációjáért a citokróm P450 (CYP) szupercsaládba tartozó enzimek felelősek. A metabolizmusban a fő szerepet a CYP2A6 enzim játssza, a folyamathoz kisebb mértékben a CYP3A4 is hozzájárul (43, 44). Emberekben eddig bár nem sikerült azonosítani a DIPE-lebontás lépéseit, azonban az összes rendelkezésre álló vizsgálati eredmény azt mutatja, hogy az alkil-éterek oxidatív O-dealkilezése során egy alkohol és egy karbonilvegyület képződik, amely tovább oxidálható. Emiatt az oxidatív O-dealkilezést követően a DIPE esetében várhatóan 2-propanolnak és acetonnak kell keletkeznie, amelyek reaktív toxikus metabolitok keletkezése nélkül tovább bomlanak (45).

2.6. Diizopropil-éter (DIPE)

A diizopropil-éter (**4. ábra**), más néven izopropoxi-izopropán vagy izopropil éter, $(\text{CH}_3)_2\text{CH-O-CH}(\text{CH}_3)_2$, tiszta, színtelen, gyúlékony, jellegzetes éter szagú folyadék. Vízdoldhatósága alacsonynak tekinthető, szerves oldószerekben jól oldódik (46).



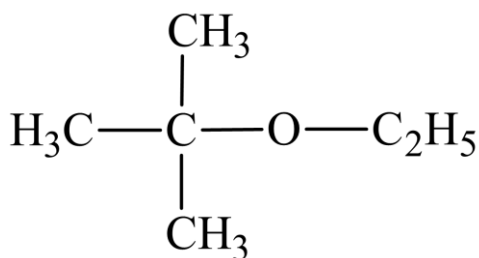
4. ábra: A DIPE konstitúciós képlete

A DIPE ipari előállítása két különböző módszer segítségével valósul meg. Legnagyobb mennyiségben a DIPE melléktermékként képződik a 2-propanol szintetizálása során. Ez a nyers DIPE, mely bár 2-propanolt és egyéb melléktermékeket is tartalmaz, üzemanyag-adalékként történő felhasználás esetén nem igényel további tisztítási lépéseket, kiválóan hasznosítható, kitűnő kopogásgátló tulajdonságokkal ruházza fel az üzemanyagot (36). Nem üzemanyag-adalékként történő felhasználáshoz a keletkezett, nyers DIPE szeparációjára több technológia ismeretes (47–49). A másik szintén hatékony, de jelentősen költségesebb előállítási módszer során a DIPE-t közvetlen úton, egylépcsős eljárással állítják elő propilénből (46).

Bár a DIPE-t használják üzemanyag-oxigenátként is, azonban ipari felhasználása sokkal jelentősebb (50). Főként speciális oldószerként alkalmazzák, segítségével poláris szerves vegyületek (pl. etanol, ecetsav és fenolok) vonhatóak ki a vizes fázisból (47). A „Phenosolvan” technológia során DIPE segítségével távolítják el a szennyvízből a fenolokat (51). A DIPE magasabb forrásponttal, alacsonyabb gőznyomással és vízdoldhatósággal bír, mint a dietil-éter, mely tulajdonságoknak köszönhetően ipari jelentősége meghatározó, mind oldószerként, mind pedig extrahálószerként történő felhasználása során (46). A dietil-éterhez hasonlóan, etanollal keverve a DIPE is oldja a nitrocellulózt, így a DIPE a robbanószer gyártásban is szerepet játszik. Gyógyszergyártás során, ipari felhasználásához hasonlóan, extrahálószerként, továbbá számos vegyület tisztítására is használják, főként szteroidok és vitaminok előállításakor (52, 53, 46). Apolárosságának és nagyfokú illékonyosságának köszönhetően a DIPE kitűnő felteltávolító szer, hiszen nem hagy maga után nyomot (46).

2.7. Etil-*terc*-butil-éter (ETBE)

Az etil-*terc*-butil-éter (**5. ábra**), más néven 2-etoxi-2-metilpropán, $(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_3$ tiszta, színtelen, gyúlékony, jellegzetes éter szagú, a legtöbb üzemanyag komponenssel szemben vízben jól oldódó folyadék (54–56).



5. ábra: Az ETBE konstitúciós képlete

Az MTBE felhasználás korlátozásával, a DIPE-vel ellentétben, az ETBE-nek, mint üzemanyag-adaléknak szignifikáns szerep jutott. Ipari léptékben (bio)etanol és fosszilis alapú izobutilén heterogén katalitikus észterifikációjával állítják elő. Az ETBE előállításának költsége az MTBE-nél jelentősen magasabb; míg az utóbbihoz szükséges metanol földgázból olcsón megszintetizálható, addig az ETBE egyik alapanyagaként szolgáló etanol fermentációval és desztillációval nyerhető ki. A biotechnológiai eljárások alkalmazásának köszönhetően azonban az ETBE bio-üzemanyag komponensnek minősül (57–59).

Az ETBE nyílt rendszerekben relatíve magas gőznyomásának és illékonyságának köszönhetően gyorsan párolog. Bár a szakirodalomban erre vonatkozóan nem találhatóak konkrét kísérleti adatok, azonban a fentiek ismeretében joggal feltételezhető, hogy az ETBE gyorsan elillan a felszíni vizekből, illetve a talaj felső rétegéből (59).

Az éter típusú üzemanyag-oxigenátok európai piaci részesedését tekintve az ETBE aránya 8 év alatt 15%-ról 60%-ra emelkedett a 2010-es év végére (7). 2020-ban a globális ETBE előállítás éves szinten meghaladta a hárommillió tonnát, melynek piaci értéke több mint 2 billió euróra tehető (60, 61). Becslések szerint évente 4%-os emelkedésre lehet számítani, továbbá a nyugat-európai (60%) és az amerikai (25%) felhasználás mellett a közeljövőben várható, hogy Japánban is lényegesen növekedni fog az ETBE fogyasztás (62).

2.8. Az éter típusú üzemanyag-adalékok mikrobiális bontása

2.8.1. A DIPE mikrobiális bontása

Az MTBE és a hasonló kémiai szerkezettel rendelkező vegyületek, mint a DIPE és az ETBE, a mikrobiális transzformációkkal szemben rezisztensnek tekinthetőek (63–65). Ezek a vegyületek perzisztens mivoltukat elsősorban a bennük található stabil éterkötésnek, illetve az MTBE és ETBE esetében annak a terciér szénatomnak köszönhetik, amely az enzimátikus támadásokkal szemben rendkívül ellenálló (66, 67).

Az elmúlt évtizedek adatait figyelembe véve látható, hogy a DIPE felhasználása az MTBE-hez, vagy az ETBE-hez viszonyítva jelentősen kisebb mértékű, melyből logikusan következik, hogy számottevően kisebb a DIPE-vel szennyezett területek, talajvizek száma és kiterjedése is. Emiatt egyrészt kevesebb annak az esélye, hogy a szennyezéssel már találkozott olyan mikroorganizmus, mely képes lehet a DIPE lebontására, másrészt pedig alacsonyabb léptékű használatának következtében a DIPE kevésbé került a kutatók figyelmének középpontjába. A fentiekből és a biológiai degradációs folyamatoknak ellenálló szerkezetéből kifolyólag napjainkig mindösszesen három (aerob) DIPE-bontó mikrobát tudtak izolálni: a *Rhodococcus ruber* IFP 2001-et (68), a *Pseudonocardia* sp. ENV478-at (69) és az *Aquincola tertiaricarbonis* L108-at (70). A leírt baktériumok közül az első kettő az Aktinobaktériumok, míg az *A. tertiaricarbonis* L108, a Proteobaktériumok törzsébe tartozik.

A DIPE degradációs útvonaláról és a lebontásban szerepet játszó génekről kevés információ áll rendelkezésre. Az L108 izolátummal végrehajtott aerob DIPE biodegradációra irányuló kutatások során a kutatóknak sikerült acetont azonosítaniuk (70). A vizsgálat során keletkező acetont tovább már nem bomlott. Egy másik kísérlet során fény derült arra, hogy az L108 törzs képes a 2-propanol bontásra is, a bomlás közben szintén acetont felhalmozódást tapasztaltak (71). A fenti eredmények arra engednek következtetni, hogy a DIPE oxidációja feltételezhetően a $\text{DIPE} \rightarrow 2\text{-propanol} + \text{acetont}$ útvonalon valósul meg. A DIPE és egyéb dialkyl-éterek mikrobiális, oxidatív lebontásában bizonyítottan egy citokróm P450 monooxigenáz, az EthB enzim tölt be kulcsfontosságú szerepet (68, 70, 72). Anaerob DIPE mineralizációt mindeközéig még nem sikerült megfigyelni (15).

2.8.2. Az ETBE mikrobiális bontása

Az üzemanyag-oxigenát éterek európai piacát tekintve az ETBE éves megoszlása 2002-ben 15%, 2010-ben pedig már 60% volt. Az ETBE széleskörű használatának következtében rohamosan megnőtt a talajokból és felszíni vizekből kimutatható ETBE mennyisége, amely arra ösztönözte a kutatókat, hogy a témában átfogó kutatásokat végezzenek. Ennek köszönhetően az ETBE mikrobiális lebontásáról lényegesen több ismerettel és tapasztalattal rendelkezünk, mint a szűkebb körben alkalmazott DIPE esetében.

Az MTBE és az ETBE strukturális különbségeit figyelembe véve az éter kötésben lévő metil-, vagy etilcsoport gyakorolhatja a legszámottevőbb hatást a biológiai lebonthatóságra (73, 74). Továbbá az ETBE etoxi-szénje hajlamosabb a biodegradációra, mint az MTBE metoxi-szénje, mivel az ETBE esetében az említett szénatom az éterkötéstől távolabb helyezkedik el, ezért a kezdeti enzimatikus szétválasztás akadályozott (75).

2.8.2.1 Az ETBE aerob bontása

A 2. táblázatban összefoglaltam az ETBE aerob lebontására képes mindaddig leírt törzseket, továbbá az egyes izolátumokban azonosított, a biodegradációban szerepet játszó géneket és enzimeket. Elsőként az ETBE-bontó *Rhodococcus ruber* IFP 2001 törzsben izolálták az *ethRABCD* gén klasztert. Az operon tagjai kódolják az AraC-XylS-típusú EthR pozitív transzkripció regulátort (*ethR* gén), a ferredoxin reduktázt (*ethA* gén), a citokróm P450 monooxigenázt (*ethB* gén), a ferredoxint (*ethC* gén) és egy fehérjét, melynek funkciója egyelőre ismeretlen (*ethD* gén), azonban jelenléte esszenciális az ETBE-degradációs aktivitáshoz (70, 72, 76).

Az *ethRABCD* génklasztert azóta sikerült több ETBE-bontó mikroorganizmusban (pl.: *A. tertiaricarbonis* L108, *Gordonia* sp. IFP 2009 és *Rhodococcus zopfii* IFP 2005) is megfigyelni (70, 72, 76, 77). Az Aktinobaktériumok törzsébe tartozó baktériumoknál leírt *ethB* gének magas (99%) szekvencia hasonlóságot mutatnak (77). Az *eth* gének két, II. csoportba tartozó, IS3-típusú transzpozon között találhatóak. Ezek a transzpozonok „hajtű” (hairpin) struktúrát alakíthatnak ki, amely homológ rekombinációt követően, deléziós mutánsok létrejöttét eredményezheti, mely során az adott törzs elveszti ETBE-bontó képességét (72, 76). Ez a felismerés arra is enged következtetni, hogy a kialakult hajtű struktúra horizontális transzfere két különböző törzs között a természetben gyakran előforduló esemény lehet (70). Fontos megjegyezni, hogy az *eth* gének jelenléte nem elegendő az ETBE mineralizációjához. Habár a *Rhodococcus ruber* IFP 2001, a *Rhodococcus zopfii* IFP 2005 és a *Mycobacterium* sp. IFP 2009 egyaránt képesek az ETBE degradációjára, azonban az összes fenti baktérium esetében TBA akkumulációt figyeltek meg, tehát az *eth* gének nem játszanak szerepet a TBA lebontásában (78). A Proteobaktériumok törzsébe tartozó *A. tertiaricarbonis* L108 törzs képes az ETBE mineralizációjára, azonban ez nem csak a baktériumban azonosított *ethABCD* génklaszternek, hanem a TBA hidroxilázt kódoló *mdpJ* génnek is köszönhető. Ezt a gént a szintén a Proteobaktériumok közé tartozó MTBE-bontó *Methylibium petroleiphilum* PM1 és *Methylibium* sp. T29 törzsekben is sikeresen azonosították (79, 80).

2. táblázat: Az ETBE aerob lebontásában szerepet játszó törzsek és gének/enzimek I.

Izolátum megnevezése	Besorolás (törzs)	Bontásban szerepet játszó gének(en)/enzim(enek)	Megjegyzés	Referencia
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> MCM2/2/1	Proteobaktériumok	citokróm P450 monooxygenáz	ETBE mineralizáció	(81)
<i>Aquincola tertiaricarbonis</i> L108	Proteobaktériumok	<i>ethABCD</i> operon (citokróm P450 monooxygenáz) <i>mdpJ</i> gén: a TBA bontásáért felelős	ETBE mineralizáció	(70)
<i>Betaproteobacteria</i> IFP 2047 (<i>Rubrivivax/Leptothrix/Ideonella</i>)	Proteobaktériumok	n.a.	lassú ETBE mineralizáció, TBA akkumuláció nélkül	(58)
<i>Comamonas testosteroni</i> E1 és az azonosítatlan besorolású E2	Proteobaktériumok	citokróm P450 monooxygenáz	ETBE mineralizáció MTBE és TAME mineralizáció is	(56)
<i>Gordonia</i> sp. IFP 2009	Aktinobaktériumok	<i>ethRABCD</i> operon (citokróm P450 monooxygenáz)	ETBE mineralizáció	(77)
<i>Mycobacterium austroafricanum</i> IFP 2012	Aktinobaktériumok	<i>alkB</i> gének: alkán hidroxiláz enzimet (AlkB) kódoló gének <i>mdp</i> gének: az MTBE és a TBA bontásában játszanak szerepet (82)	ETBE mineralizáció, azonban az ETBE degradáció TBA-ig lassan játszódik le	(82–85)
<i>Mycobacterium austroafricanum</i> IFP 2015	Aktinobaktériumok	<i>alkB</i> gének: alkán hidroxiláz enzimet (AlkB) kódoló gének	ETBE mineralizáció, gyorsabb ETBE bontás, mint a <i>M. austroafricanum</i> IFP 2012-nél	(83, 85)
<i>Mycobacterium</i> sp. IFP 2009	Aktinobaktériumok	n.a.	TBA akkumuláció	(85)

n.a.: nem áll rendelkezésre adat

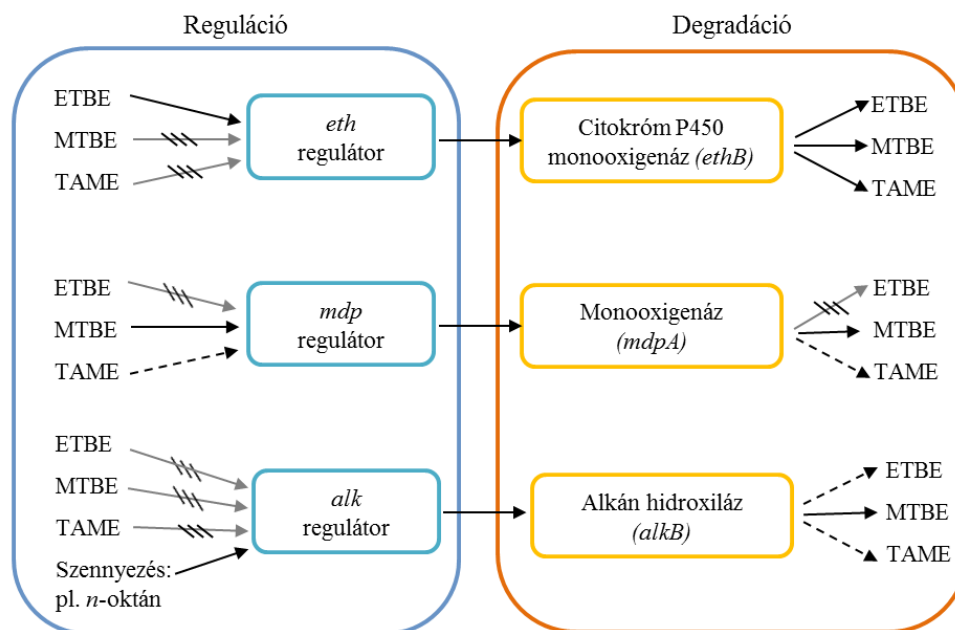
2. táblázat (folytatás): Az ETBE aerob lebontásában szerepet játszó törzsek és gének/enzimek II.

Izolátum megnevezése	Besorolás (törzs)	Bontásban szerepet játszó gén(ek)/enzim(ek)	Megjegyzés	Referencia
<i>Pseudonocardia</i> sp. IFP 2050	Aktinobaktériumok	n.a.	ETBE mineralizáció	(55)
<i>Rhodococcus aetherivorans</i> IFP 2017	Aktinobaktériumok	<i>ethB</i> gén (citokróm P450 monooxygenáz)	TBA akkumuláció	(84)
<i>Rhodococcus</i> sp. IFP 2040	Aktinobaktériumok	n.a.	TBA akkumuláció	(55)
<i>Rhodococcus</i> sp. IFP 2041	Aktinobaktériumok	n.a.	TBA akkumuláció	(55)
<i>Rhodococcus</i> sp. IFP 2042	Aktinobaktériumok	<i>alkB</i> gének: alkán hidroxiláz enzimet (AlkB) kódoló gének, nincsenek <i>ethB</i> és <i>ethR</i> génjei	TBA akkumuláció	(85)
<i>Rhodococcus</i> sp. IFP 2043	Aktinobaktériumok	n.a.	TBA akkumuláció	(55)
<i>Rhodococcus ruber</i> IFP 2001 korábban: <i>Gordonia terrae</i> IFP 2001	Aktinobaktériumok	<i>ethRABCD</i> operon (citokróm P450 monooxygenáz)	TBA akkumuláció MTBE és TAME degradáció, amennyiben az <i>ethR</i> génnel interakcióba kerül az ETBE, ami aktiválja az <i>ethB</i> expresszióját	(69, 72, 73)
<i>Rhodococcus ruber</i> IFP 2007 a <i>Rhodococcus ruber</i> IFP 2001-ből spontán mutációval létrejött törzs	Aktinobaktériumok	<i>ethABCD</i> operon: a citokróm P450 konstitutív expressziója	TBA akkumuláció (MTBE degradáció is, TBA felhalmozódással)	(68)
<i>Rhodococcus zopfii</i> IFP 2005	Aktinobaktériumok	<i>ethRABCD</i> operon, (citokróm P450 monooxygenáz)	TBA akkumuláció	(74)

n.a.: nem áll rendelkezésre adat

Az éter típusú oxigenátok kezdő oxidációs lépését az L108-as törzsből a különböző ETBE-bontó *Rhodococcus* törzsekben is izolált *ethB* gén homológ által kódolt citokróm P450 monooxigenáz enzim végzi (72). Azonban a *R. ruber* IFP 2001 és *R. zopfii* IFP2005 törzsekben megtalálható *ethRABCD* operontól az L108 törzs operonja annyiban különbözik, hogy hiányzik belőle a transzkripció regulátort kódoló *ethR* gén, ezáltal pedig a citokróm P450 monooxigenáz expressziója folyamatos. A szakirodalmi adatok alátámasztják, hogy a fenti géneknek feltételezhetően szerepük van nemcsak az ETBE, de a DIPE és egyéb éterek bontásában is (15, 70, 86). Az L108 törzsből spontán mutációval létrejött, *eth* operonnal nem rendelkező L10 törzs ETBE-bontó képességének elvesztése mellett, a továbbiakban az MTBE, TAME, TAEE, DIPE és dietil-éter degradációjára sem volt képes (70).

Az ETBE és egyéb éterek aerob bontásában kiemelkedő szerepe van a monooxigenázoknak, mint pl. az ETBE degradációjáért felelős EthB-nek és az MTBE (és valószínűsíthetően a TAME) degradációjáért felelős MdpA-nak, azáltal hogy katalizálják az oxidatív katabolizmus első lépését, az éterkötés bontását (6. ábra) (59).



6. ábra: Az ETBE, MTBE és TAME biodegradációjában szerepet játszó regulátorok és gének (59). A szaggatott vonallal rajzolt nyilak esetében feltételezhető, de nem bizonyított az adott reakció, az áthúzott nyilak esetében nincs kapcsolat a két elem között

A fentiekben már említésre került, hogy a *R. ruber* IFP 2001, *R. zopfii* IFP 2005 és *Gordonia* sp. IFP 2009 törzsekben megtalálható az EthB jelű citokróm P450 monooxigenáz, de arra még nem tértem ki, hogy ezek a törzsek nemcsak az ETBE, hanem az MTBE és a

TAME biodegradációjára is képesek. Mindhárom törzs esetében az ETBE a leginkább preferált szubsztrát, degradációs rátája kb. 10-szeres az MTBE-jéhez és TAME-jéhez viszonyítva. Sem az MTBE, sem pedig a TAME nem indukálta az *ethB* expresszióját, ami arra utalhat, hogy ezek az oxigenátok nem lépnek kapcsolatba az *eth* regulátorral (*ethR*) (77). Amíg az MTBE és a TAME lebontásához a fent megnevezett három baktériumnak - az *ethB* gén indukció miatt - szüksége van ETBE-re, addig az *ethR* regulátorral nem rendelkező *A. tertiarycarbonis* L108 nem igényel ETBE-t, hiszen ebben az izolátumban az Eth monooxigenáz konstitutív expressziója figyelhető meg (70). Ezeknek a törzseknek kiemelkedő szerepe lehet a kevert éter oxigenátokkal szennyezett közegek bioremediációja során.

Érdemes megemlíteni, hogy az éterkötések bontása nem tartozik a citokróm P450 monooxigenázok általános tulajdonságai közé, pl. a két citokróm P450 monooxigenázt is hordozó *Rhodococcus rhodochrous* nem képes sem az MTBE, sem az ETBE degradációjára (87). Azonban mindenképp figyelemre méltó, hogy a baktériumokhoz hasonlóan, az emberi szervezetben is a citokróm P450 családba tartozó enzimek végzik az MTBE, az ETBE és a TAME oxidatív lebontását (43, 44).

Az MTBE-vel és ETBE-vel szennyezett talajból izolált *Achromobacter xylosoxidans* MCM2/2/1 a két étert szintén egy a CYP szupercsaládba tartozó protein segítségével bontja, amelynek aminosav szekvenciája azonban a *R. zopfii* EthB-jével csak 23%-ban egyezik meg (81).

A szennyezett talajvizekből izolált IFP 2047 és IFP 2050 törzsek képesek az ETBE és a TBA degradációjára is, azonban a lebontás genetikai hátteréről egyelőre kevés információ áll rendelkezésünkre (58).

2.9. Az ETBE anaerob bontása

Az ETBE anaerob lebontása kitüntetett figyelmet kap, hiszen az üzemanyaggal szennyezett talajvizekben a könnyebben bontható szénhidrogének biotikus bomlásakor az elérhető oldott oxigén gyorsan elfogy, ezáltal a kontaminált közeg rövid időn belül anaerobbá válik (15, 57). Az éter típusú üzemanyag-oxigenátok közül az MTBE és a TAME anaerob biodegradációja számos kevert kultúra esetében sikeresen megvalósult (88–90), azonban az ETBE anaerob biológiai lebontásáról csak kevés információ áll rendelkezésünkre (15, 57).

Szulfátredukáló körülmények között, szénhidrogénekkal szennyezett talajokból összeállított mikrokozmosz rendszerekben már sikerült megfigyelni az MTBE és a TAME

anaerob biodegradációját, azonban az ETBE ilyen típusú anaerob bomlására mindezidáig nem találtak bizonyítékot (91). A szulfátredukáló körülmények között lejátszódó MTBE- és TAME-bomlás során a kezdő lépés feltételezhetően a metilcsoport eltávolítása (O-demetiláció), amely folyamat során TBA, illetve TAA (*terc*-amil-alkohol) keletkezik. A keletkezett intermediereket az acetogén baktériumok C-1 vegyületekké vagy acetáttá alakítják, amelyeket a szulfátredukáló közösségek már szénforrásként tudnak hasznosítani (64, 91, 92).

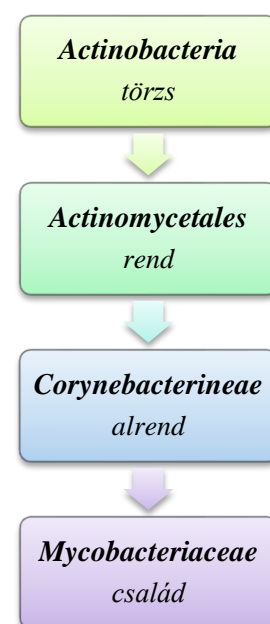
Habár denitrifikáló és metanogén körülmények között igazolták az ETBE anaerob degradációját, azonban a lebontás során TBA akkumulálódott, az ETBE teljes mineralizációja nem tudott lejátszódni (65).

Napjainkig az ETBE anaerob mineralizációjáról semmilyen anaerob körülmény között nem sikerült megbizonyosodni, azonban mivel az MTBE és a TAME esetében is lejátszódik a teljes lebontási folyamat, így elméletben ez az ETBE degradációja esetében is elképzelhető.

2.10. *Mycobacterium*-ok általános jellemzése

Az Aktinobaktériumok törzséhez tartozó *Mycobacteriaceae* család (7. ábra) Gram-pozitív, pálcika alakú, aerob mikroorganizmusokat foglal magába (93). A családhoz közel 200 faj tartozik (94, 95). A mikobaktériumokra egységesen jellemző sajátosság, hogy sejtfaluk vastagabb, mint a legtöbb baktériumé, hidrofób, viaszos és jelentős mikolinsav tartalommal rendelkezik (96). A mikobaktériumokra jellemző továbbá, hogy a DNS-ük G+C-aránya magas (62-70%) (97).

Az ökológiai niche, amelyben e nemzetség tagjai megtalálhatóak különösen változatos. A mikobaktériumok rendkívül eltérő növekedési mintázattal, morfológiával és alkalmazkodási képességgel rendelkeznek (98–101). Ezek a mikroorganizmusok széles körben elterjedtek, megtalálhatóak folyókban, tavakban, mocsarakban, talajokban, ráadásul mivel a család tagjai között több humán patogén faj is szerepel, így mindezeneken felül az emberek közvetlen környezetében, például szennyvízkezelő telepeken is előfordulhatnak (101–105). Egy vizsgálat szerint a mikobaktériumok átlagosan a talajban megtalálható összes mikroba 2,6%-át teszik ki (111).

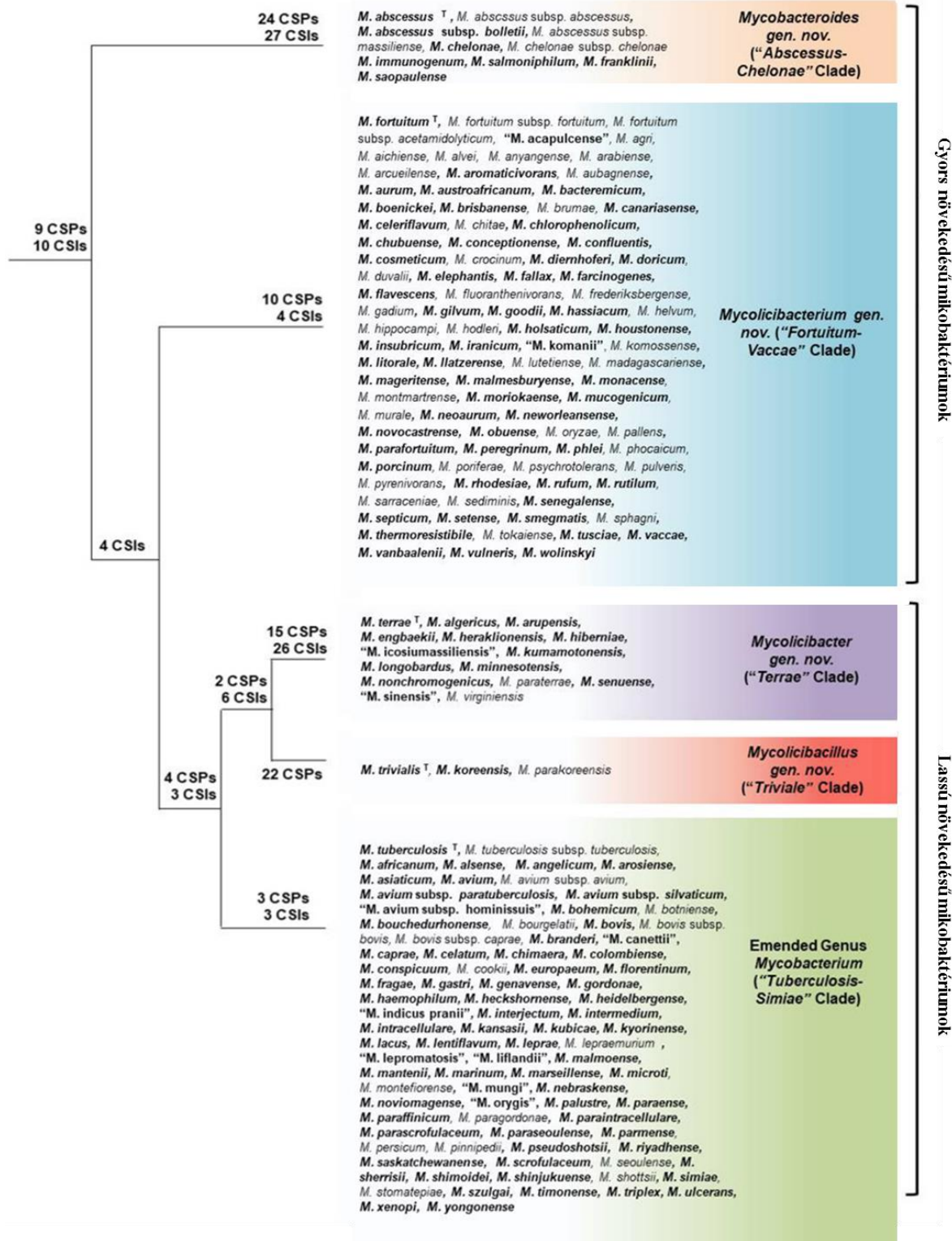


7. ábra: A mikobaktériumok rendszertani besorolása

Korábbi rendszerezésük, mely két csoportra osztotta ezeket a mikrobákat, növekedési rátájuk szerint történt. Azokat a mikobaktériumokat, amelyeknek több mint hét napra van szükségük lemezen a telepek képzéséhez, a lassan növők (slow-growing) csoportjába sorolták, míg amelyeknek ehhez kevesebb, mint hét nap is elegendőnek bizonyul, a gyorsan növők (rapid-growing) csoportjába tartoztak (106, 107). A lassan növő mikobaktériumok jellemzően egy, míg a gyors növekedést mutatók két 16S rRNS génekkel rendelkeznek (108). Feltételezik, hogy az egy vagy két 16S rRNS gének nemcsak a növekedés gyorsaságát befolyásolja, de a metabolikus aktivitás sebességére, illetve az új környezethez történő adaptációhoz szükséges időre is hatást gyakorolhat (109).

A genomszekvenálás fejlődése, a baktériumok genetikai kapcsolatainak egyre szélesebb körben történő megismerése egy új, genetikai markereken alapuló rendszerezés kialakulását tette lehetővé (110, 111). Az átfogó molekuláris biológiai vizsgálatoknak köszönhetően a korábban elfogadott *Mycobacterium* nemzetséget öt monofiletikus kládra osztották (**8. ábra**). Így születtek meg a “*Tuberculosis-Simiae*,” a “*Terrae*,” a “*Triviale*,” a “*Fortuitum-Vaccae*” és az “*Abscessus-Cheloniae*” elnevezésű kládok, amelyek rendre megfelelnek a *Mycobacterium*, a *Mycolicibacter*, a *Mycolicibacillus*, a *Mycolicibacterium* és a *Mycobacteroides* nemzetségeknek (93).

A mikobaktériumok környezetvédelmi és bioremediációs szempontból különösen jelentősnek tekinthetők. A család tagjai közül több izolált törzs képes alifás szénhidrogének és policiklikus aromás szénhidrogének (PAH-ok) metabolizációjára (112–114). A *Mycobacterium* sp. SNP11 többek között mineralizálja a pirént, a fluorantént, a fenantrént és a fluorént is (115). Sok mikobaktérium, mint például a *M. vanbaalenii* sp. PYR-1 és a *M. hodleri* segít a naftalin, a fenantrén, az antracén, a pirén, a fluorantén, a benz[a]antracén vagy a benz[a]pirén degradációs útvonalának feltérképezésében (96, 116, 117). Ezek az eredmények kiemelkedő fontossággal bírnak, hiszen elősegítik a PAH-ok baktériumok által történő enzimikus bontásának megértését és tisztázását. Mindemellett a mikobaktériumok nemcsak a policiklusos aromás vegyületek, hanem az éter oxigenátok biodegradációjában is részt vesznek. Például a *Mycolicibacterium austroafricanum* IFP 2012 és IFP 2015 aerob körülmények között képesek az MTBE-t egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítani (83, 118).



8. ábra: A mikobaktériumok csoportosítása (93)

2.10.1. A *Mycolicibacterium*-ok általános jellemzése

A *Mycolicibacterium*-ok („*Fortuitum-Vaccae*” klád) a gyorsan növekvő mikobaktériumok közé sorolhatóak. A klád tagjainak többségére jellemző, hogy szaprofiták és nem humán patogének (108, 119). A *Mycolicibacterium*-ok a többi mikobaktériumtól 14

molekula marker segítségével különböztethetők meg, melyek közül négy konzervált jelölésű indel (conserved signature indel, CSI) és tíz konzervált jelölésű fehérje (conserved signature proteins, CSP). A CSI-k és a CSP-k olyan markerek, amelyek segítik a prokarióta taxonok körülhatárolását és a különböző fajok csoportosításának pontosítását, tisztázását és feltérképezését (120). A CSI-k a filogenetikai kapcsolatok megértése szempontjából meghatározó jelentőségű, ritka genetikai változások. A CSI-k a konzervált régiókon belül filogenetikai markerként szolgáló inszerciók (új bázispárok beépülése a DNS láncba) vagy deléciók (bázispárok kitörlődése, kiesése a DNS láncból) (93, 121, 122). A CSP-k csoportjába különleges, egyedi eredetű, specifikus, konzervált, egy adott kládra jellemző fehérjék tartoznak (123–125). A *Mycolicibacterium*-oknál a LacI transzkripciós regulátor család konzervált régiójában található az egyik ilyen CSI, amely egy öt aminosav hosszúságú inszerció. Ez specifikusan jellemző a kládra, más mikobaktériumban nem található meg (93). További három CSI, a cikláz (két aminosav inszerció), a CDP-diacilglicerín-glicerín-3-foszfát 3-foszfátidiltranszferáz (egy aminosav inszerció) és a CDP-diacilglicerín-szerin O-foszfátidiltranszferáz (egy aminosav inszerció), jellemzi a *Mycolicibacterium*-ok csoportját. A négy egyedi CSI-n kívül további tíz, egyedülállóan a *Mycolicibacterium*-okra jellemző CSP is található. A *Mycolicibacterium*-ok genom mérete 3,95-8,00 Mbp közötti, átlagos G+C tartalmuk 65,4-70,3% (93).

2.11. Mesterséges konzorciumok a biodegradáció szolgálatában

Egy természetes mikroba közösségben nehéz meghatározni azt, hogy valójában mely fajok vesznek részt a szennyező anyagok lebontásában (126). A mesterségesen létrehozott mikrobiális konzorciumok előnye az endogén mikrobapopulációval szemben, hogy *in situ* használatukkal a talajban lejátszódó folyamatok - a mikroorganizmusok alapos laboratóriumi vizsgálatának köszönhetően - széleskörűen tanulmányozhatóvá, jól ismertté és tervezhetővé válnak. Ez jelentős mértékben elősegítheti a talajban játszódó lebontási folyamatok megértését, ezáltal gyorsíthatja a bioremediáció sebességét. Emellett pontosabban megtervezhetővé válik az injektálandó anyagok koncentrációja; csak a valóban szükséges mennyiségeket kell kijuttatni, így egy környezetbarátabb, ráadásul költséghatékonyabb technológia valósulhat meg. A molekuláris biológia fejlődésének köszönhetően a már ismert gének is könnyen monitorozhatóvá váltak, segítségükkel gyorsan és pontosan meghatározható, hogy az adott szennyező komponens lebontásához szükséges különböző gének milyen mértékben változtak a remediáció során. A mesterséges konzorciumok terepi

előnyei mellett tudományos jelentőségük sem elhanyagolható, mivel ezek a baktérium közösségek a lebontási útvonalak és a degradációért felelős gének felfedezésében is meghatározó szerepet játszhatnak. Mikobaktériumokból álló konzorciumok tanulmányozása során már számos degradációs útvonalat sikerült feltérképezni, kiemelt tekintettel a PAH-ok degradációs lépéseire (96, 116, 117).

A természetbe szennyező anyagként kikerült különböző xenobiotikumok biodegradációját és a nehézfémek által kontaminált közegek bioremediációját gyakran nem egyetlen törzs, hanem számos baktérium által alkotott konzorcium viszi véghez (127–130). Hasonlóan a klórozott alifás vegyületek konzorciummal történő lebontásához (131, 132), az esetek túlnyomó többségében az éter típusú üzemanyag-oxigenátok teljes biodegradációját sem egy törzs végzi el, hanem általában a talajban megtalálható mikroba közösség (67, 133–135). Habár az *A. tertiaricarbonis* L108 képes az ETBE mineralizációjára (73), azonban a baktériumok jelentős hányada nem rendelkezik az ETBE teljes biodegradációjához szükséges génkészlettel (**2. táblázat**, 2.8.2.1 fejezet). Az esetek jelentős részében az ETBE bakteriális degradációja során TBA akkumuláció tapasztalható, ez a jelenség a *Rhodococcus* nemzetségben kifejezetten gyakorinak tekinthető (58, 72, 136).

A mesterséges konzorciumok előnyeinek egy tökéletes mintapéldája a 2008-ig használt fenitrotion (*O,O*-dimetil *O*-(3-metil-4-nitrofenil) foszfortioát) rovarölő biológiai lebontása. Azt követően, hogy a japán kutatók egy talajjal összeállított, fenitrotionnal kezelt mikrokozmosz rendszerben megfigyelték a rovarölő szer bomlását, a mintából két mikroorganizmust sikerült izolálniuk. A *Sphingomonas* sp. TFEE bár degradálta a fenitrotiont, azonban a bontás során felhalmozódó 3-metil-4-nitrofenolt (3M4N-t) nem volt képes tovább hasítani. A másik izolátum, a *Burkholderia* sp. MN1, bár nem tudta a fenitrotiont szénforrásként hasznosítani, de a *Sphingomonas* sp. TFEE fenitrotion bontása közben intermediéerként akkumulálódott 3M4N-t hatékonyan bontotta. A két baktériummal együttesen beoltott minták esetében már megfigyelhető volt a perzisztens fenitrotion mineralizációja (137).

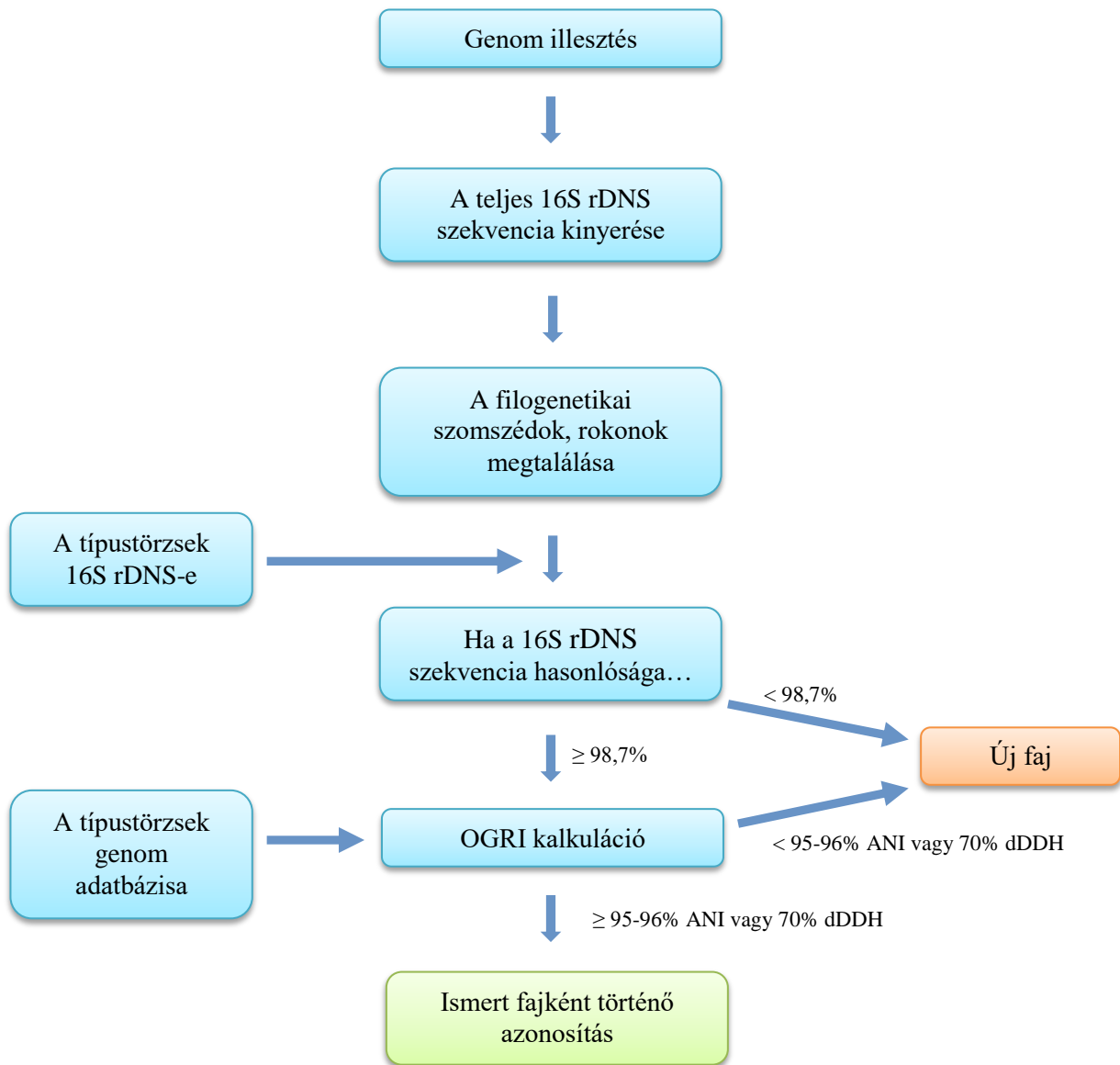
Az éter oxigenátok mineralizációjára is létrehozta már több mesterséges konzorciumot. 2009-ben két MTBE-degradáló mikroorganizmussal, a *Methylibium petroleiphilum* PM1-gyel és az *A. tertiaricarbonis* L108-cal kialakított konzorciumban azt vizsgálták, hogy az üzemanyagokkal szennyezett területekre jellemző oxigén limitáció hogyan hat a törzsekre külön-külön és konzorciumként (138). Egy másik kísérlet során 2013-ban francia kutatók két éterbontó törzssel megalkottak egy olyan konzorciumot, amely segítségével megvalósulhatott az ETBE-mineralizáció (139). A *Rhodococcus* sp. IFP 2042 az ETBE-t TBA-ig bontotta, míg

a *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049 a keletkezett TBA-t biomasszává és szén-dioxiddá alakította át. A kísérletek során az MTBE, az ETBE és a TBA degradációjában szerepet játszó gének (*ethB*, *ethR*, *alkB*, *mdpA*, *mpdB*, *mpdC*) közül a *Rhodococcus* sp. IFP 2042 törzs esetében csak az *alkB* gént sikerült detektálni, a *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049-nél pedig nem találták meg az ismert gének egyikét sem. Az *alkB* gén expresszállódásához szükség van az *alk* regulátor aktiválásához, amely ETBE-vel nem indukálható (6. ábra, 2.8.2.1 fejezet). Emiatt elképzelhető, hogy a degradációért egy másik, eddig nem ismert gén tehető felelőssé (139). Továbbá érdemes még azt is megemlíteni, hogy az *alkB* gén expresszióját a *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012 törzsben nemcsak *n*-propán, *n*-hexán és *n*-hexadékan, hanem a TBA is kiválthatja (85).

2.12. Új baktériumfajok azonosítása

Napjainkban az egyes baktériumok azonosítása a 16S rDNS szekvenciák meghatározásán alapul. Az új fajok azonosítására és meghatározására használt protokollok között létezik egy olyan szisztematikus módszer, amely a 16S rDNS hasonlóságán és az OGRI-n (Overall Genome Related Index) alapul (137).

A korábban általánosan alkalmazott eljárásrend szerint (54, 140, 141) azok az izolátumok voltak külön fajnak tekinthetők, melyek 16S rDNS-ei közötti szekvencia egyezés kisebb volt 97,0%-nál. Az új, 2018-ban leírt protokoll (9. ábra) alapján akkor tekinthető egy baktériumtörzs új fajnak, ha a már leírt fajokkal a 16S rDNS egyezése kisebb, mint 98,7%. Amennyiben a vizsgált mikroorganizmus 16S rDNS szekvenciájának hasonlósága eléri, vagy meghaladja a 98,7% küszöbértéket, akkor a baktérium teljes genomszekvenciája alapján kell kiszámolni az adott törzs egyéb szekvencia adatbázisokban elérhető rokon mikrobákhoz viszonyított OGRI értékét, melyre a legszélesebb körben alkalmazott viszonyszám az Average Nucleotide Identity (ANI). Az ANI egy mérőszám, amely a prokarióta szervezetek közötti különbségeket és hasonlóságokat vizsgálja a genomban található kódoló régiók egymáshoz viszonyításával. Amennyiben az ANI értéke alacsonyabb, mint 95-96%, akkor a vizsgált törzs szintén új fajnak tekinthető (142).



9. ábra: A 16S rDNS szekvenciák hasonlóságán és az OGRI-n alapuló protokoll (137)

3. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori értekezésem célja volt olyan egyedi baktériumtörzs izolálása és környezeti szempontból releváns leírása, amely képes a DIPE és az ETBE hatékony biológiai lebontására.

A rendelkezésre álló szakirodalmi adatokat is figyelembe véve az alábbi célkitűzéseket fogalmaztam meg:

1. Hazai, DIPE-vel szennyezett területről származó talajvízminták felhasználásával a DIPE, illetve az ETBE bontására képes baktériumtörzs izolálása.
2. Az izolált, egyedi törzs rutinszerű laboratóriumi fenntartása, továbbá szubsztrát spektrumának és környezeti, illetve bioremediációs szempontból alapvető fontosságú tulajdonságainak megismerése. Céljaim között szerepelt az izolált, DIPE- és ETBE-bontásra képes mikroorganizmus rendszertani besorolása, illetve a törzs genetikai állományában megtalálható, bioremediációs szempontból fontos gén azonosítása, melyek a jövőbeli *in situ* kármentesítési beavatkozások során lehetővé tehetik majd a törzs terepi nyomon követését.
3. Az izolált törzs DIPE-bontó potenciáljának összehasonlítása a szakirodalmi adatokkal. Kontaminált terület szennyezési csóvjából származó talajvizek felhasználásával összeállított, bioaugmentált mikrokozmosz kísérletekkel alátámasztani az izolált törzs DIPE-bontó képességét.
4. A DIPE lebontási útvonalának feltérképezése.
5. A törzs további kometabolikus képességének vizsgálata, különös tekintettel az éter típusú oxigenátokra.
6. Kármentesítési technológia tervezése és modellezése

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. DIPE-bontó mikroorganizmus izolálása talajvízből

A DIPE-bontó mikroorganizmus izolálásához egy gyógyszergyár területén található monitoring kutakból vett, DIPE-t tartalmazó talajvízmintákat használtunk. A mintákból 5-5 ml-t (10%) pipettáztunk 250 ml-es teflonbetétes kupakkal légmentesen zárható üvegekbe, melyekbe előzőleg 45 ml DM minimál tápoldatot (**3. táblázat**) mértünk (**10. ábra**).

3. táblázat: A DM tápoldat, a DMA táplemez és a készítéséhez használt mikroelem oldat összetétele

DM tápoldat és DMA táplemez:

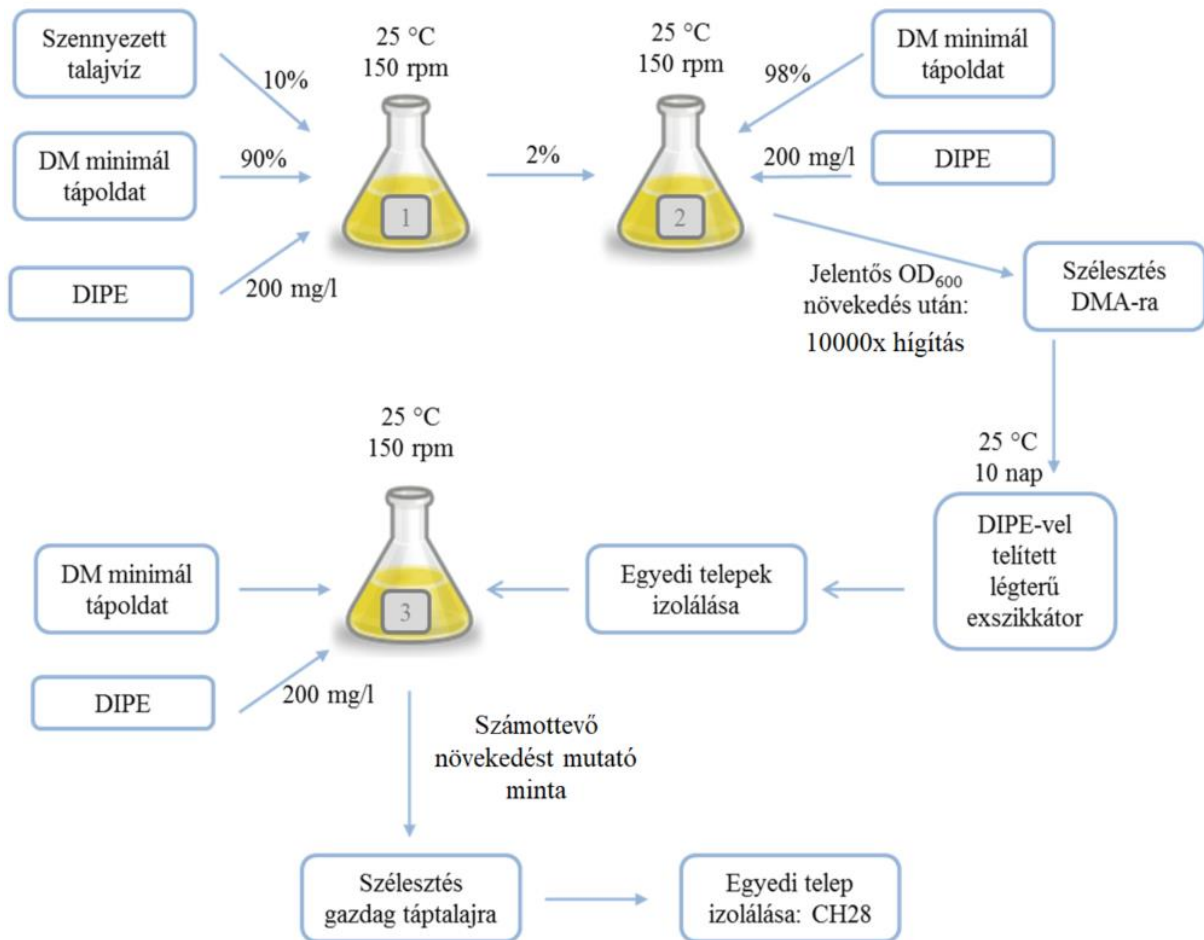
K ₂ HPO ₄	0,425 g
KH ₂ PO ₄	0,350 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,124 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,050 g
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,0125 g
Mikroelem oldat	1 ml
Agar (DMA táplemezhez)	15 g
Desztillált víz	1000 ml
<hr/>	
pH=6,7	

Mikroelem oldat:

FeSO ₄ *7 H ₂ O	1,00 g
CoCl ₂ *6 H ₂ O	1,00 g
MnSO ₄ *H ₂ O	1,00 g
ZnSO ₄ *7 H ₂ O	1,00 g
Na ₂ MoO ₄ *2 H ₂ O	1,00 g
Na ₂ WO ₄ *2 H ₂ O	1,00 g
NiCl ₂ *6 H ₂ O	0,25 g
H ₃ BO ₃	0,10 g
CuSO ₄ *5 H ₂ O	0,10 g
Desztillált víz	1000 ml

Egyedüli szén- és energiaforrásként 200 mg/l koncentrációban DIPE-t pipettáztunk a rendszerekbe, majd két hétig 25 °C-on, 150 rpm-mel rázattuk őket. Ezt követően ezekből a dúsításokból 1000 µl-t (2%) friss DM tápoldatba oltottunk tovább, majd 200 mg/l DIPE hozzáadása után a rendszereket ismét a fenti körülmények között inkubáltuk. Azokból a mintákból, amelyekben 600 nm-en mérve számottevő optikai denzitásbeli (OD₆₀₀) növekedést tapasztaltunk, hígítási sorokat készítettünk, majd a tízezerszeres hígításokból 100 µl-t szélesztettünk DMA lemezre. A Petri-csészéket egy olyan exszikkátorban tároltuk, melynek

aljába 10 ml desztillált vízben oldott 100 µl DIPE-t tartalmazó üvegedényt helyeztünk. A DIPE párolgása során telítette az exszikkátor légterét, ahonnan a mikrobák felvehették és hasznosíthatták az étert. A fenti körülmények között a lemezeket tíz napig, 25 °C-on inkubáltuk.



10. ábra: DIPE-bontó mikroorganizmus izolálása talajvízből

A lemezeken megjelent kevert kultúrákban 6 különböző morfológiájú telepet tudtunk elkülöníteni, melyek mindegyikéből egyet-egy TSA lemezre (4. táblázat) szélesztettünk át, hogy tiszta tenyészeteket kapjunk. Ezekből egy-egy telepet 50-50 ml DM minimál tápoldatba oltottunk, melybe egyedüli szén- és energiaforrásként 200 mg/l koncentrációban DIPE-t pipettáztunk. Két hetes rázatást követően (25 °C, 150 rpm) az egyetlen növekedést mutató tenyészetet TSA lemezre szélesztettük és egy hétig 25 °C-on inkubáltuk. Az izolátum 16S rDNS-en alapuló meghatározásához az egyedi telepek közül háromnak kolónia PCR

segítségével felsokszoroztuk a 16S rDNS-ét, majd a PCR termékek tisztítása után azokat megszekvenáltattuk.

4. táblázat: A TSB táptalaj, illetve a TSA táplemez összetétele

Kazein pepton (pankreász hidrolizátum)	17 g
Szója pepton (papain hidrolizátum)	3 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
D-(+)-glükóz-monohidrát	2,5 g
Tween [®] 80 (TSB tápoldathoz)	1 ml
Agar (TSA táplemezhez)	15 g
Desztillált víz	1000 ml
pH=7,3 ± 0,2	

4.2. Az izolált törzs általános növesztési körülményei

4.2.1. Az izolált törzs fenntartása

A mindennapi munkához a CH28 jelű izolátumot TSA lemezen tartottuk fent. Az inokulált TSA lemezt egy hétig 32 °C-on inkubáltuk, majd ezt követően 4 °C-on tároltuk.

Törzsünket a BAY-BIO törzsgyűjteményében, illetve a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében (azonosító NCAIM: B.02558) is letétbe helyeztük.

4.2.2. Oltókultúra előállítása TSB tápoldatban

Az oltókultúra (starter kultúra) előállításához egy TSA lemezen felnőtt CH28 telepet TSB tápoldatba oltottunk át, majd a rendszert öt napig, 32 °C-on 150 rpm sebességgel rázattuk. A felnövesztett starter kultúrát 15 °C-on, 5500 rpm sebességgel, 12 percig centrifugáltuk, majd kétszer fiziológiás sóoldattal mostuk. Ezt követően állítottuk be az adott kísérlethez szükséges optikai denzitás (OD₆₀₀) értéket.

4.2.3. DIPE-vel indukált oltókultúra előállítása

A DIPE-vel indukált oltókultúra előállításához egy TSA lemezen felnőtt CH28 telepet DM vagy SMM tápoldatba (**5. táblázat**) oltottunk át, melybe egyedüli szén- és energiaforrásként DIPE-t pipettáztunk 200 mg/l koncentrációban. Ezután a szorosan lezárt kupakkal ellátott rendszert hét napig, 32 °C-on, 150 rpm sebességgel rázattuk. A felnövesztett starter kultúrákat a TSB-n előnövesztett kultúrával (4.2.2 fejezet) megegyező módon készítettük elő kísérleteinkhez.

5. táblázat: Az SMM tápoldat és a hozzá szükséges mikroelem oldat összetétele

SMM tápoldat:

Na ₂ HPO ₄	0,7098 g
KH ₂ PO ₄	0,4083 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	0,2301 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2643 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,0482 g
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,0147 g
Mikroelem oldat	1 ml
Desztillált víz	1000 ml

pH=6,9

Mikroelem oldat:

FeSO ₄ *7 H ₂ O	1,1121 g
CoSO ₄ *7 H ₂ O	0,2249 g
MnSO ₄ *H ₂ O	0,1339 g
ZnSO ₄ *7 H ₂ O	0,1151 g
Na ₂ MoO ₄ *2 H ₂ O	0,0484 g
CuSO ₄ *5 H ₂ O	0,0313 g
NiSO ₄ *6 H ₂ O	0,0263 g
H ₃ BO ₃	0,0050 g
Desztillált víz	1000 ml

A forró, sterilizált tápoldatokat kézmelegre hűtöttük, majd ezt követően pipettáztuk hozzájuk a megfelelő mennyiségű 0,22 µm pórusméretű fecskendőszűrővel előzetesen sterilre szűrt mikroelem oldatot (**5. táblázat**), ezáltal el tudtuk kerülni az egyes mikroelem komponensek kicsapódását.

4.3. A CH28 jelű izolátum hőmérséklet optimumának meghatározása

A baktérium szaporodását TSB tápfolyadékban és TSA lemezen, 3-3 párhuzamosban vizsgáltuk az alábbi hőmérsékleteken: 6 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 28 °C, 30 °C, 32 °C, 35 °C, és 37 °C. Kísérleteinket két körben, egy magasabb (25-37 °C) és egy alacsonyabb (6-30 °C) hőmérsékleti intervallumon végeztük el, referencia hőmérsékletnek a 30 °C-ot választottuk, melyet mindkét teszt során vizsgáltunk.

A starter kultúra előállítása TSB tápoldatban történt a módszerleírásban (4.2.2 fejezet) ismertetett módon. A folyadék kultúrák hőmérsékleti tesztek során az előnevelt, magas sejtszámú oltókultúrából steril, 3 ml TSB-t és 0,1% Tween 80-at tartalmazó műanyag kémcsövekbe 30-30 µl-t (a vizsgált rendszerek 1%-a) oltottunk át. Ezt követően a megfelelő

hőmérsékleten rázatva a magasabb hőmérsékleti tartomány vizsgálata során egy, míg az alacsonyabb esetében három hétig inkubáltuk a tesztrendszereket, majd végül meghatároztuk az OD_{600} értékeket az egyes mintákból. A lemezes vizsgálatoknál az oltókultúrát TSA lemezekre szélesztettük (3-3 lemez/hőmérséklet), majd a megfelelő hőmérsékleten három hétig inkubáltuk a Petri-csészéket, folyamatosan nyomon követve a baktérium növekedését.

4.4. A CH28 jelű izolátum pH toleranciájának vizsgálata

A CH28 törzs pH túrását DIPE-t tartalmazó (200 mg/l) rendszerekben pH=3,0-10,0 között vizsgáltuk, 3-3 párhuzamosban. A lúgos közeget (pH=7,5-10,0) DM és 5 normális kálium-hidroxid oldat segítségével alakítottuk ki. A savas körülményeket, a tápoldat pufferkapacitása miatt, nem tudtuk a lúgos tartomány logikáját követve a DM-hez adott erős sav (sósav) adagolásával előállítani. Emiatt a savas pH tartomány (pH=3,00-7,00) vizsgálatához citrát-foszfát puffert (McIlvaine-puffert) használtunk (143, 144). Az eredeti citrát-foszfát puffer receptúráján annyit változtattunk, hogy hígításnál a desztillált vizet egy olyan DM tápoldattal helyettesítettük, amelyből a pufferelésért felelős vegyületeket (K_2HPO_4 és KH_2PO_4) kihagytuk, a tápoldatban található káliumot pedig kálium-klorid (KCl) formájában pótoltuk.

Ehhez a kísérlethez a CH28 starter kultúrát a módszerleírásban (4.2.3 fejezet) ismertetettek szerint, 200 mg/l DIPE-vel kiegészített DM minimál tápoldatban növesztettük elő. Az adott pH-n történő növekedési képességet az OD_{600} változásán keresztül követtük nyomon. Kétheti, 32 °C-on történő inkubációt követően a kísérleti rendszerekben spektrofotométer segítségével megmértük az OD_{600} értékeket.

4.5. A CH28 jelű izolátum sótűrő képességének vizsgálata

A *Mycolicibacterium* sp. CH28 sótűrő képességének vizsgálata során 0%, 5% és 10% sókoncentrációkat vizsgáltunk. A rendszerek összeállításához a megfelelő mennyiségű NaCl-ot DM tápoldatban oldottuk fel, majd 50-50 ml-t jól záródó, teflonkupakos üvegekbe mértünk. Ezt követően inokuláltuk a CH28-as törzset, végül pedig szén- és energiaforrásként 200 mg/l DIPE-t adtunk a rendszerekhez. A tesztrendszereket 3-3 párhuzamosban vizsgáltuk. A mintákat négy hétig 32 °C-on, 150 rpm-mel rázattuk.

4.6. A CH28 jelű izolátum antibiotikum rezisztenciájának vizsgálata

A kísérletek során folyadékban, illetve táplemezhez keverten, továbbá korong diffúziós módszerrel vizsgáltuk a törzs antibiotikumokkal szembeni ellenálló képességét. A tesztekhez DIPE-vel kiegészített DM tápoldatban felnevesztett tenyészeteket használtunk (4.2.3 fejezet).

Az antibiotikus lemezek kiöntése során a még folyékony, kézmelegre hűlt 25 ml TSA-hoz pipettáztuk a megfelelő mennyiségű, sterilre szűrt antibiotikumot tartalmazó oldatokat, ezután Petri-csészékbe öntöttük azokat. A dermedést követően az előnevelt tenyészetből 5-5 µl-eket cseppentettünk az antibiotikus lemezekre. Pozitív kontrollként az előnevesztett tenyészet növekedését antibiotikummentes TSA lemezeken is figyelemmel kísértük.

A folyadékkultúrák tesztek során az antibiotikus rendszereket magas sejtszámú CH28 oltó kultúrával inokuláltuk (1% v/v). Pozitív kontrollként antibiotikummentes TSB tápoldatot használtunk. A tesztek 3-3 párhuzamosban végeztük el. A kísérleti rendszereket 32 °C-on egy hétig rázattuk, majd ezt követően értékeltük az egyes antibiotikumokkal szembeni rezisztencia mértékét.

A lemezes és a folyadékkultúrák kísérletek során az alábbi antibiotikumokat vizsgáltuk 3-3 párhuzamosban (a tesztelt koncentrációkat zárójelben tüntettem fel): ampicillin (50 és 100 µg/ml), apramicin (25 és 50 µg/ml), gentamicin (20 és 40 µg/ml), higromicin (50 és 100 µg/ml), kanamicin (25 és 50 µg/ml), karbenicillin (50 és 100 µg/ml), kloramfenikol (15 és 30 µg/ml), neomicin (6,25 és 12,5 µg/ml), sztreptomycin (12,5 és 25 µg/ml), tetraciklin (6,25 és 12,5 µg/ml) és tobramicin (6,25 és 12,5 µg/ml). A lemezeket 32 °C-on egy hétig inkubáltuk, majd ezután értékeltük ki az egyes antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát és toleranciát.

A korong diffúziós antibiotikum rezisztencia teszthez a CH28 jelű izolátumból 200 µl-t szélesztettünk TSA lemezekre, amelyekre ezt követően adott mennyiségű antibiotikumokkal átitatott korongokat (3 db korong/lemez) (Thermo Scientific™) helyeztünk. A vizsgálatokat az alábbi antibiotikummal végeztük el (a tesztelt mennyiségeket zárójelben tüntettük fel): amikacin (30 µg), karbenicillin (100 µg), klindamicin (2 µg), oxitetraciklin (30 µg), rifampicin (50 µg). A lemezeket 32 °C-on egy hétig inkubáltuk, majd ezt követően értékeltük az egyes antibiotikumokkal szembeni rezisztencia mértékét.

4.7. A CH28 jelű izolátum növekedési tesztjei különböző szubsztrátokon

A CH28 jelű izolátum által egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítható vegyületek vizsgálatát DM tápoldatban végeztük el. Az egyedi szubsztrátokat 200 mg/l koncentrációban teszteltük, kivéve a formaldehidet, amelynél 40 mg/l-es kísérleti rendszereket állítottunk össze.

Minden szubsztrátot 3-3 párhuzamosban teszteltünk, 250 ml-es, teflonbetétes kupakkal légmentesen zárható üvegekben. Az alábbi egyedi szubsztrátok vizsgálatára került sor: metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, etilén-glikol, glicerin, formaldehid, propionaldehid, aceton, hangyasav, ecetsav, piroszőlősav, citromsav, *n*-pentán, *n*-hexán, *n*-dekán, *n*-undekán, *n*-dodekán, *n*-hexadekán, *n*-oktadekán, *n*-eikozán, *n*-dokozán, prisztán, ciklohexán, benzol, toluol, etilbenzol, *o*-xilol, *m*-xilol, *p*-xilol, fenol, naftalin, dietil-éter, MTBE, ETBE, TAME, DIPE, TBA, TAA, anizol, 1,4-dimetoxibenzol, bifenil, difenil-éter, tetrahidrofurán, Tween 80, PEG 200, PEG 1500, PEG 4000, PEG 6000 és PEG 20000.

Az DIPE-vel indukált előnövesztett sejtekből (4.2.3 fejezet) az 50 ml végtérfogatú tesztrendszerekbe annyit inokuláltunk, hogy a kiindulási OD₆₀₀ érték 0,020 legyen. A mintákat 32 °C-on, két hétig, 150 rpm-mel rázatva inkubáltuk. A törzs adott szubsztráton történő növekedési képességét az inkubációs idő végén, az abszorbancia változásával (OD₆₀₀) követtük nyomon. A formaldehid kivételt képezett, mivel degradációját kisebb koncentráción vizsgáltuk, így ennél a vegyületnél az optikai denzitás vizsgálaton kívül a Merck MQuant[®] formaldehid gyorseszteszt eredményeire is támaszkodtunk. Az esetleges elillanás következtében fellépő koncentrációcsökkenés kimutatására a formaldehides tesztek során három abiotikus kontroll rendszert is összeállítottunk, melyek DM minimál tápoldatot, higany-szulfátot (240 mg/l) és formaldehidet (40 mg/l) tartalmaztak.

4.8. „Resting cell” (nyugvó sejt) kísérlet

A „resting cell” vagy más néven „nyugvó sejt” kifejezés olyan metabolikusan aktív (indukált enzimeket hordozó) sejteket jelent, amelyek olyan közegben vannak felfuszpendálva, ami a szaporodásukat, illetve új fehérjék szintetizálását nem teszi lehetővé. Ily módon nagyszámú baktériumsejt vizsgálható kis térfogatokban, ezért gyakran alkalmazzák az eljárást például a biodegradációra képes törzsek bontási sebességének összehasonlító elemzésére.

A CH28 jelű izolátum degradációs potenciálját össze kívántuk hasonlítani a már leírt DIPE-bontásra képes mikroorganizmusokéval. A teszthez a CH28 sejtjeit 200 mg/l DIPE-vel

kiegészített SMM tápoldatban, 32 °C-on neveltük elő. A minél pontosabb összehasonlíthatóság érdekében a kísérletet az *Aquincola tertiaricarbonis* L108 törzsnél leírt (70) vizsgálat szerint valósítottuk meg. A DIPE-n felnevesztett sejteket a módszerleírásban ismertetettek szerint centrifugáltuk (4.2.3 fejezet), majd kétszer MSM tápoldattal (70) mostuk. Az előkészített sejtek OD₇₀₀ értékét MSM tápoldattal 2,5-re állítottuk be. (Az értekezésemhez végzett összes kísérletben 600 nm-en mértük az optikai denzitást, kivéve ezt a tesztet, mivel az L108 törzs esetében is OD₇₀₀ értékeket adtak meg. Az eredmények összehasonlíthatósága érdekében ennél a vizsgálatnál indokoltnak tartottam az azonos, 700 nm-en történő méréseket.) Az L108 törzsnél leírt eljárásnál csak egy ponton változtattunk: a nitrogénmentes MSM minimál tápoldat pH-ját a cikkben szereplő 7,5 helyett 6,0-ra állítottuk be. A nitrogénmentes tápközegnek köszönhetően a sejtek nem tudnak szaporodni, így a kísérleti rendszerekben a vizsgálat teljes időtartama alatt állandónak tekinthető a sejtszám.

A három párhuzamosban összeállított kísérleti rendszereket (100 ml-es üvegekben 30 ml végtérfogatban) jól záródó, teflonbevonatú szeptummal ellátott kupakkal zártuk le. A mintavételezés a szűrhető szeptumokon keresztül, Hamilton-fecskendővel, az illékony komponensek meghatározásánál leírt módon (4.14.1 fejezet) előkészített headspace-es üvegekbe, koncentrációtól függően 5-szörös vagy 50-szeres hígításban történt. A levett minták előkészítése és az illékony szerves vegyületek koncentrációjának meghatározása az analitikai módszerleírásban részletezett lépések (4.14.1 fejezet) szerint zajlott.

A tesztrendszerek az összeállításukat követően azonnal síkrázóba kerültek (150 rpm), majd 30 perc rázatás után kiindulási mintákat vettünk belőlük. Ezt követően a mikrokozmoszok a további mintavételig ismét visszakerültek a 30 °C-os rázógéphez inkubálódni. A tesztrendszerekből óránként történt a mintavételezés, a kísérlet időtartama 11 óra volt.

4.9. A DIPE lebontási útvonalában szereplő intermedierek azonosítása a CH28 jelű izolátummal

A DIPE degradációs útvonalának feltérképezéséhez a CH28-at TSB tápoldatban nevesztettük fel. A starter kultúrát a módszerleírásban (4.2.2 fejezet) ismertetettek szerint készítettük elő. 250 ml-es üvegekben, 50-50 ml SMM tápoldatban a kiindulási OD₆₀₀ értéket 0,050-ra állítottuk be, majd a rendszerekbe 1 mM (102,18 mg/l) DIPE-t juttattunk, végül 25 °C-on, 150 rpm-mel rázatva inkubáltuk őket. (Doktori értekezésemben a mért koncentrációkat minden esetben mg/l-ben adtam meg, kivéve ennél a kísérletnél, mivel a lebontási útvonal

feltérképezése során meghatározó szerepe lehet a keletkező köztitermékek anyagsűrűségének.) A CH28 törzset nem tartalmazó, higany-szulfáttal (240 mg/l) kiegészített abiotikus kontrollokat, illetve a beoltott kísérleti rendszereket három-három párhuzamosban vizsgáltuk. A rendszerek összeállítását követő 30 perces rázatásnak köszönhetően a DIPE beoldódott, így az analitikai módszerleírásban ismertetett módon (4.14.1 fejezet) kiindulási mintát tudunk venni annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az egyes rendszerekben a DIPE, a 2-propanol és az acetone koncentrációját. A további mintavételezések 20 óránként történtek a DIPE mineralizációjának eléréséig.

4.10. A CH28 jelű izolátum mikrokozmosz tesztjei DIPE-vel mesterségesen szennyezett talajvizekkel

A mikrokozmosz tesztekhez gázolajjal szennyezett terület szennyezési csóvájából származó talajvizeket (1. számú melléklet) használtunk. A kísérlet során kétféle DIPE koncentrációt (75 és 300 mg/l) vizsgáltunk. A mikrokozmosz rendszerek beoltását TSB-n felnőtt CH28 tenyésztettel valósítottuk meg (4.2.2 fejezet), a kiindulási OD₆₀₀ érték 0,050 volt. Az alábbi kísérleti rendszereket állítottuk össze, 3-3 párhuzamosban, 250 ml-es üvegekben, 50 ml végtérfogatban:

- Abiotikus kontroll: Higany-szulfáttal (240 mg/l) kiegészített rendszer
- Biotikus kontroll: Csak talajvizet, illetve DIPE-t tartalmazott
- Biostimulált: Ásványi só keverékkel kiegészített
- Biostimulált és bioaugmentált: CH28 inokulummal és ásványi só keverékkel kiegészített

Az abiotikus mikrokozmoszokhoz adott higany-szulfát célja, hogy előlje a talajvízben élőmikroorganizmusokat. A biostimuláció során az alábbi makro- és mikroelemeket használtuk: nitrogén (ammónium-foszfátok és karbamid formájában, 120 mg/l), foszfor (ammónium- és kálium-foszfátok formájában, 113 mg/l), kálium (kálium-monofoszfát és kálium-szulfát formájában, 43 mg/l), kén (kálium-szulfát formájában, 9 mg/l), vas (1,4 mg/l), réz (0,7 mg/l), mangán (0,7 mg/l), cink (0,7 mg/l), bór (0,3 mg/l) és molibdén (0,01 mg/l).

A talajvíz eredeti állapotában nem tartalmazott DIPE-t, így azt a megfelelő koncentrációban (75 és 300 mg/l) mi adtuk hozzá a rendszerekhez.

A mikrokozmoszok az összeállításukat követően azonnal síkrázóba kerültek (150 rpm), majd 30 perc rázatás után kiindulási mintákat vettünk belőlük. A mintavételezés a

nyugvó sejtes kísérletben (4.8 fejezet) ismertetettek szerint történt. A levett minták előkészítése és az illékony szerves vegyületek koncentrációjának meghatározása az analitikai módszerleírásban (4.14.1 fejezet) részletezett lépések szerint zajlott. Az első mintavételt követően a rendszerek a további mintavételig ismét visszakerültek a 30 °C-os rázó gépbe inkubálódni. A DIPE-vel szennyezett talajvizekkel összeállított mikrokozmosz rendszerek esetében 6 óránként történt a mintavételezés.

4.11. ETBE-bontó mesterséges konzorcium létrehozása a CH28 jelű izolátum és a *Hydrogenophaga* sp. T4 törzsekkel

Előkísérleteinkből már tudtuk, hogy a CH28 jelű izolátum bár képes az ETBE-t TBA-ig bontani, azonban a keletkező alkoholt már nem tudja tovább hasznosítani. Korábbi kutatásaink eredményeként kutatóintézetünk rendelkezik egy olyan izolátummal (*Hydrogenophaga* sp. T4), amely az ETBE-t nem, de a TBA-t képes rendkívül hatékonyan bontani. A T4 jelű baktériumtörzset üzemanyaggal szennyezett talajvízből izoláltuk, a CH28-nál ismertetett dúsítós-szélesztési módszer szerint (4.1 fejezet) egyedüli szén- és energiaforrásként TBA-t (200 mg/l) alkalmazva. A T4 törzs nem képes egyik éter típusú üzemanyag oxigenát biológiai lebontására sem, azonban a TBA-t 1000 mg/l feletti koncentrációban is képes mineralizálni.

A mesterséges konzorcium teszteléséhez, a DIPE-s mikrokozmosz kísérletekhez hasonlóan, gázolajjal szennyezett terület mellől vett talajvizet használtunk (1. számú melléklet). A háromféle ETBE-koncentráció (50, 200 és 500 mg/l) vizsgálatához más-más mintavételi kútból származó talajvizekkel dolgoztunk. A CH28 törzset TSB tápoldatban szaporítottuk fel. A T4 törzs előnövesztése 100 ml SMM tápoldatban, 200 mg/l TBA-n, mint egyedüli szén- és energiaforráson, 25 °C-on, 150 rpm-en történő rázatással történt, az inkubációs idő egy hét volt. A tenyészeteket 12 percig 20 °C-on 5500 rpm-en lecentrifugáltuk és a felülúszókat leöntöttük. Ezután 1000 µl SMM tápoldattal mostuk a kiülepedett sejteket, ezt követően 3 percig 12000 rpm-en centrifugáltuk a mintákat. A felülúszókat eltávolítottuk, végül 1000 µl SMM tápoldatba felvettük a mintákat.

Az alábbi kísérleti rendszereket állítottuk össze, 250 ml-es üvegekben, 50 ml végtérfogatban:

- Abiotikus kontroll: Higanyszulfáttal (240 mg/l) kiegészített rendszer
- Biotikus kontroll: Csak talajvizet tartalmazó mikrokozmosz
- Biostimulált: Ásványi só keverékkel adalékolt rendszer
- Bioaugmentált 1.: CH28 törzssel beoltott, ásványi só keverékkel kiegészített

- Bioaugmentált 2.: Mindkét törzssel beoltott, ásványi só keverékkel kiegészített
- Bioaugmentált 3.: *Hydrogenophaga* sp. T4 törzssel beoltott, ásványi só keverékkel kiegészített

Az Abiotikus, Biotikus és Biostimulált mikrokozmoszok célja és összeállításának módja megegyezik a DIPE-vel kiegészített talajvizes mikrokozmoszoknál (4.10 fejezet) leírtakkal.

A Bioaugmentált 1. és a Bioaugmentált 3. rendszerekben a CH28, illetve a *Hydrogenophaga* sp. T4 kiindulási OD₆₀₀ értékét 0,050-ra állítottuk be. A Bioaugmentált 2. rendszerekben ez az érték 0,025 volt mind a CH28, mind pedig a *Hydrogenophaga* sp. T4 esetében, ezáltal el tudtuk érni, hogy az összes mikrokozmosz ugyanarról a kiindulási optikai denzitás értékről induljon.

A biostimuláció során a DIPE-s mikrokozmoszoknál leírt makro- és mikroelemeket (4.10 fejezet) használtuk. A talajvíz eredeti állapotában nem tartalmazott ETBE-t, így azt a megfelelő koncentrációban adalékoltuk a rendszerekhez. Minden összeállítást 3-3 párhuzamosban vizsgáltunk, a rendszereket a nyugvó sejtes kísérletnél már ismertetett, szűrhető kupakos üvegekben állítottuk össze. A mintavétel módja és az éterek koncentrációjának meghatározása az analitikai módszerleírásban (4.14.1 fejezet) foglaltak szerint valósult meg.

Az összeállított mikrokozmoszokat síkrázóba helyeztük (150 rpm, 25 °C), majd 30 perc rázatást követően kiindulási mintákat vettünk belőlük. Ezután a további mintavételig a rendszereket visszahelyeztük a rázógépbbe inkubálódni.

4.12. A CH28 jelű izolátum kometabolikus képességeinek vizsgálata

A kometabolizmus vizsgálatához a CH28 jelű izolátumot DIPE-n növesztettük elő (4.2.3 fejezet) és a DIPE-vel kiegészített mikrokozmosz teszteknel leírt módszerrel (4.10 fejezet) készítettük elő. A tesztrendszereinket a korábbi kísérletekben is használt szűrhető kupakos, jól záródó üvegekben állítottuk össze 0,050-os kiindulási OD₆₀₀ értékkel. A mintavételezés az analitikai módszerleírásban (4.14.1 fejezet) ismertettek szerint történt.

Az egyes éterek degradációját 75-75 mg/l koncentrációban vizsgáltuk. Hatféle kísérleti mikrokozmosz tesztrendszert állítottunk össze 250 ml-es üvegekben, 50 ml végtérfogatban, három-három párhuzamosban:

- Abiotikus kontroll: Higany-szulfáttal (240 mg/l) kiegészített DIPE-t, MTBE-t és TAME-t tartalmazó kontroll rendszerek

- DIPE-t tartalmazó rendszer
- MTBE-t tartalmazó rendszer
- TAME-t tartalmazó rendszer
- DIPE-t és MTBE-t is tartalmazó rendszer
- DIPE-t és TAME-t is tartalmazó rendszer

A mikrokozmoszokat tartalmazó üvegeket 32 °C-on, 150 rpm-en rázattuk. A rendszerekből 6 óránként történt mintavételezés, amelyek után az éterek koncentrációját GC-MS-sel határoztuk meg (4.14.1), a mikroorganizmusok szaporodását pedig spektrofotométer segítségével (OD_{600}) követtük nyomon.

4.13. Laboratóriumi oszlopkísérletek

Az oszlopreaktorokban folytatott vizsgálatok a folyamatos anyagáramok révén közelebb állnak a terepi megvalósításokhoz, mint a laboratóriumban összeállított mikrokozmosz tesztrendszerek. Használatukkal pontosabban modellezhető, hogy a kezelendő közegben várhatóan milyen reakciók és kölcsönhatások fognak lejátszódni (145, 146).

A batch mikrokozmosz tesztek mellett megvizsgáltuk a CH28 törzs DIPE-, illetve a mesterségesen létrehozott, CH28 és *Hydrogenophaga* sp. T4 törzsekből álló konzorcium ETBE- és TBA-bontó potenciálját átfolyós rendszerekben (11. ábra).

Töltésként többféle homokot (0,5-



11. ábra: A laboratóriumi kísérletek során használt oszlopreaktorok

2,0 mm szemcseméret), kétféle perlit (P2, illetve P3) és tőzeg keverékét (tömegre vonatkoztatva 1:4 arányban), továbbá agyaggranulátumot (szemcseátmérő: 8 mm) vizsgáltunk.

A kísérletek során 730 ml-es rozsdamentes acél oszlopokat alkalmaztunk (belső átmérő: 53 mm, hossz: 300 mm), amelyek egymással akár össze is illeszthetőek. A DIPE-degradációs tesztekben 2-2 oszlopot (kb. 1460 ml egyesített térfogat) csatlakoztattunk egymással, míg az ETBE-bontást egyetlen oszlop segítségével vizsgáltuk.

Az oszlopok beoltásához 250 ml TSB-n növesztett CH28 tenyészetet, továbbá az ETBE-s oszlop esetében még 250 ml 200 mg/l TBA-n SMM tápoldatban felszaporított T4 kultúrát használtunk. A tenyészeteket 12 percig 5500 rpm-en centrifugáltuk, majd két mosást követően, 50 ml tápoldatba vettük fel a sejteket. Ehhez a DIPE-s oszlopok hatékonyságának teszteléséhez kezdetben DM minimál tápoldatot, majd később ennek módosított változatát (MDM tápoldat) használtuk (**6. táblázat**).

6. táblázat: Az MDM tápoldat/táplemez összetétele

K ₂ HPO ₄	0,115 g
KH ₂ PO ₄	0,591 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,124 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,050 g
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,0125 g
Mikroelem oldat	1 ml
Agar (amennyiben szükséges)	15 g
Desztillált víz	1000 ml
pH=6,0	

A DM kémhatását, valamint a pufferkapacitását a benne lévő foszfátok (K₂HPO₄ és KH₂PO₄), mennyisége és aránya határozza meg. Mivel előzetes eredményeink arra engedtek következtetni, hogy a CH28 enyhén savas környezetben aktívabb, és jobban képes szaporodni, mint semleges vagy lúgos körülmények között, így a DM tápoldatot úgy módosítottuk, hogy megváltoztattuk a foszfátformák arányát a Cold Spring Harbor Laboratory foszfátpuffer receptje (143) alapján. A tápközegben a foszfát anyagmennyisége, valamint a többi összetevő változatlan maradt, csak a dikálium-hidrogén-foszfát és a kálium-dihidrogén-foszfát egymáshoz viszonyított aránya módosult. A DM tápoldatnak 6,70-es a pH-ja, míg az MDM 6,00-os pH-ra pufferelt, ezáltal a CH28 számára optimálisabb közeget biztosít. A mesterséges konzorciumot vizsgáló oszlopnál ETBE-vel (~25 mg/l) és TBA-val (~4 mg/l)

szennyezett talajvizet alkalmaztunk, a szennyezett víz paramétereit az 1. számú mellékletben tüntettem fel.

Az oszlopok beoltását steril fülkében egy perisztaltikus pumpa (áramlási sebesség: 5 ml/perc) segítségével valósítottuk meg (**12. ábra**). A tömény oltókultúrák megtapadását követően az oszlopokat légmentesített (25 °C) helyeztük, ahol csatlakoztattuk őket az oszlopokra felmenő folyadékáramhoz (befolyó ág), továbbá a kifolyó ágak bekötésére is sor került.



12. ábra: Az oszlopreaktorok beoltása (bal oldali fotó), illetve a mintavételi pont (befolyó ág) kialakítása (jobb oldali fotó)

Kísérleteink során magnézium-peroxiddal és hidrogén-peroxiddal, mint „oxigén-leadó” vegyületekkel, illetve sterilre szűrt légköri levegő beinjektálásával (80 ml/óra) biztosítottuk a megfelelő mennyiségű oxigént. A magnézium-peroxidot az oszlopreaktorok „felvízi” részében elhelyezett rétegében alakítottuk ki, a megfelelő mennyiségű hidrogén-peroxid adagolását, perisztaltikus pumpa segítségével valósítottuk meg.

A DIPE-s kísérletekben DIPE-vel mesterségesen szennyezett MDM minimál tápoldatot, míg az ETBE-s oszlopoknál 0,22 µm-es steril szűrőn átszűrt ETBE-vel és TBA-val

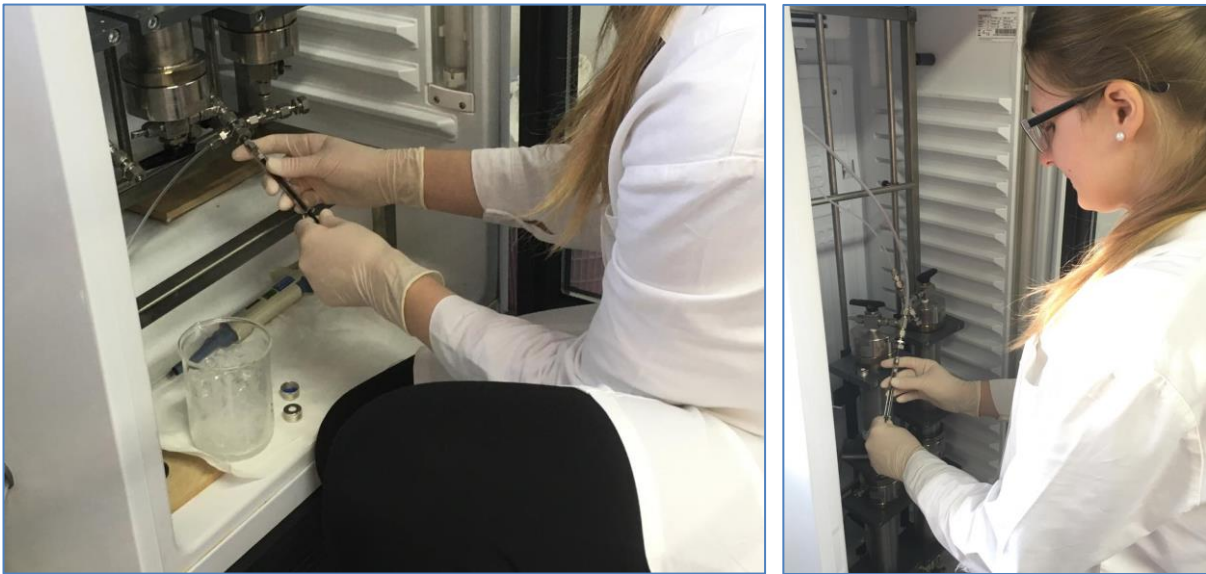
kontaminált talajvizet (1. számú melléklet, GW-6 jelű talajvíz) használtunk. A pontos koncentrációk bekeverését, illetve a megfelelő mennyiségű folyadékok oszlopra történő feljuttatását minden oszlopreaktor esetében egy-egy HPLC pumpa biztosította.

A hatékonyan működő DIPE-s oszlopok esetében a vizsgálat első szakasza (perlit-tőzeg keverékes oszlop: 4-40. nap, agyaggranulátumos oszlop: 9-32. nap) alatt az oszlopokra felmenő DIPE koncentrációját fokozatosan emeltük (20 mg/l-ről 85 mg/l-re). A második szakaszban (perlit-tőzeg keverékes oszlop: 41-60. nap, agyaggranulátumos oszlop: 33-60. nap) a 85 mg/l DIPE koncentrációt fenntartva az oszlopra felmenő szennyezett víz áramlási sebességét fokoztuk. A kezdeti áramlási sebesség minden oszlop esetében 500 ml/nap volt, amelyet 100 ml/nap-pal emeltünk. A legnagyobb áramlási sebesség a perlit-tőzeges oszlop esetében 800 ml/nap, míg az agyaggranulátumos oszlopnál 1300 ml/nap volt. A póruster alapján számított tartózkodási idő 500 ml/nap áramlási sebesség esetén a DIPE tesztek során a perlit-tőzeg keverékes oszlopnál 16,8 óra, míg az agyaggranulátumos oszlopnál 21,6 óra volt. Az ETBE-s tesztnél 8,4 óra volt a tartózkodási idő.

Az ETBE-s oszlopteszt során egyetlen oszlopból álló (szimpla), mesterséges konzorciummal beoltott oszlopreaktort vizsgáltunk. Ennél az oszlopnál a szennyezést a talajvíz (1. számú melléklet, GW-6 jelű talajvíz) biztosította egészen a 49. napig, majd az 50. napon annyi ETBE-t és TBA-t adalékoztunk a talajvízhez, hogy az ETBE koncentrációja a szennyezett vízben található ETBE-vel együtt 50 mg/l, a TBA mennyisége pedig 15 mg/l legyen. Az ETBE-s oszlop áramlási sebessége a kísérlet 112 napos időtartama alatt állandó volt (500 ml/nap).

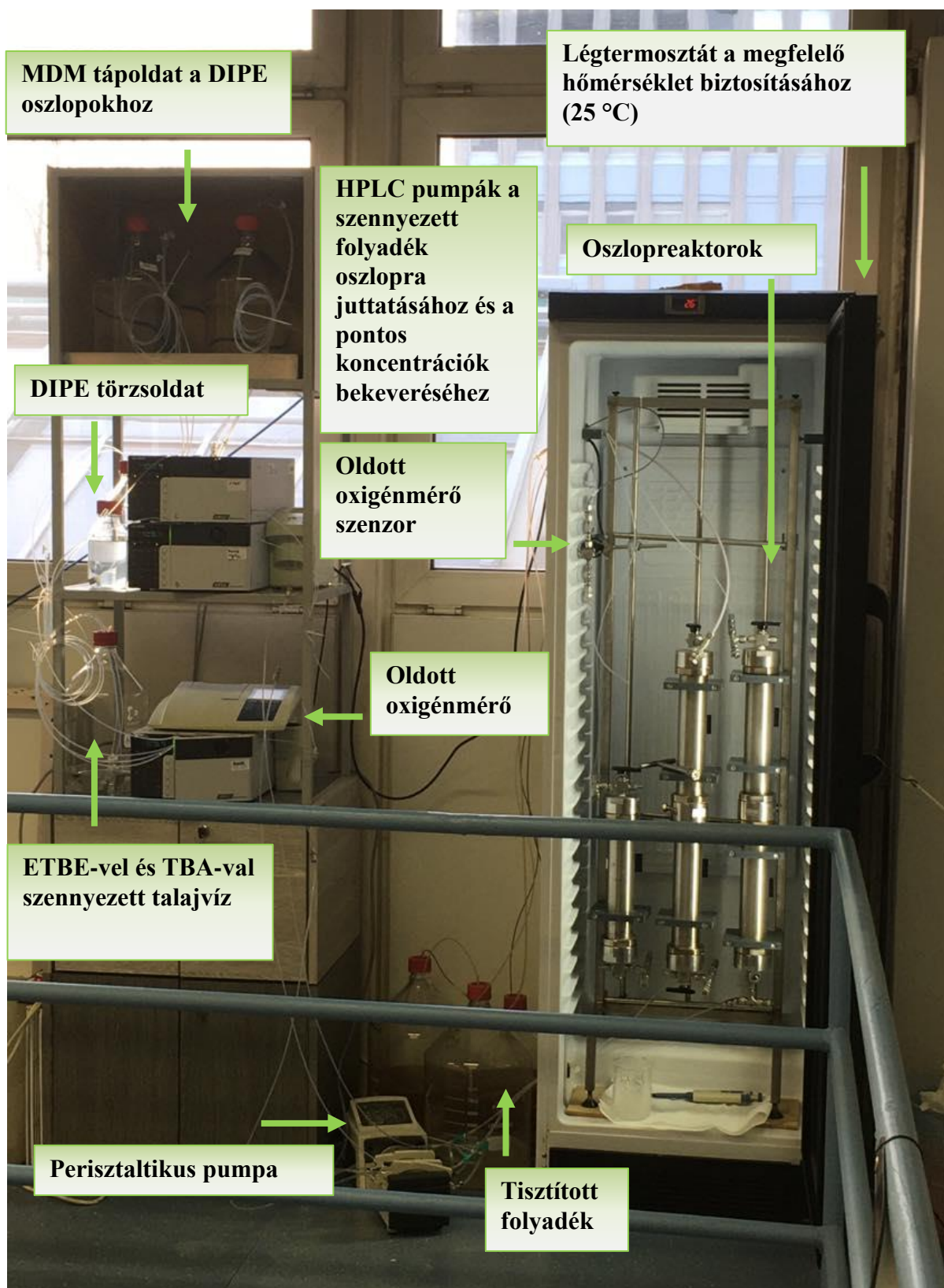
A bioaugmentált oszlopok mellett két abiotikus, higany-szulfáttal (0,5 g higany-szulfát/ oszloptöltet kg) csíráatlanított oszlopot is teszteltünk, hogy felmérjük a DIPE párolgását, továbbá megkötődését a különböző tölteteken. Ezekben a tesztekben is 2-2 oszlopot csatlakoztattunk egymással. Az egyik abiotikus oszloptöltet P3 perlit és tőzeg keverék (tömegre vonatkoztatva 1:4 arányban), a másiké pedig agyaggranulátum (szemcseátmérő: 8 mm) volt. Az abiotikus rendszerek a bioaugmentált oszlopokkal azonos feltételek mellett, azokkal megegyező paraméterekkel működtek.

A VOC komponensek nyomon követése során minden mintavételezés alkalmával a felmenő és a kifolyó vizekből is mértük az éterek és alkoholok koncentrációját. A mintavétel Hamilton-fecskendő segítségével történt, az oszlopok alján (az oszlopra felmenő, kezelendő mintából) és tetején (az oszlopról távozó, tisztított mintából) kialakított, szeptumokkal ellátott mintavételi pontokból (**13. ábra**). A mintavételezéshez jégbe hűtött HS üvegeket használtunk. Az illékony szerves komponensek meghatározása az analitikai módszerleírásban (4.14.1 fejezet) ismertetettek szerint történt.



13. ábra: Mintavételezés

A magas biológiai aktivitást mutató oszlopok (**14. ábra**) kifolyó ágaiból kéthetente vettünk mintát, hogy megbizonyosodjunk afelől, hogy az oszlopokon továbbra is jelen vannak az általunk felhasznált törzsek. A kéthetes mintavételek alkalmával a CH28 és a T4 jelenlétét a CH28 esetében TSA, míg a T4 törzsnél Luria-Bertani Agar (LBA) lemezeken telepmorfológia alapján, illetve DIPE-vel vagy TBA-val kiegészített minimál tápoldatban is monitoroztuk. Továbbá a törzsek jelenlétét havonta egyszer, kolónia PCR segítségével is nyomon követtük (4.15.4 fejezet). Ezen felül az ETBE-s oszlop kifolyó ágából kéthetente 40-100 ml mintát vettünk DNS tisztításra, hogy meghatározzuk a távozó minta DNS-koncentrációját. Az oszlopkísérletek végén a tisztított DNS minták egy részét DGGE segítségével is analizáltuk (4.15.2 fejezet), hogy megvizsgáljuk, az oszlopon megtelepedett mikroba közösségből kimutatható-e a CH28 és a T4.



14. ábra: Oszlopreaktorok működés közben

4.14. Az analitikai mérések módszertani leírása

4.14.1. Az illékony komponensek, éterek, 2-propanol és aceton koncentrációjának meghatározása

A mintavételezés a mikrokozmosz üvegek kinyitása nélkül, szűrhető, teflonbevonatú szeptummal ellátott kupakokon keresztül, Hamilton fecskendővel történt. A minták hígítása a mérni kívánt komponensek várható koncentrációinak megfelelően történt, ~ 4 °C-os vizet tartalmazó, jégben álló, mintavevő automata által kezelhető HS üvegekbe. A mintákat teflon bélésű, csavaros kupakkal zártuk le, majd -80 °C-on tároltuk őket a mérés megkezdéséig.

A mintaelőkészítés során az illékony szerves szennyezők (VOC) koncentrációjának meghatározásához a -80 °C-on megfagyasztott HS üvegekbe kimért mintákhoz 2 g nátrium-kloridot, 2 ml ~ 4 °C-os vizet, és belső standardként 100 μ l, metanolban oldott, jelzett anyagmintákat (1,2-diklóretán- d_4 , fluorbenzol, toluol- d_8 és *p*-brómfluorbenzol; 5 ml mintára vonatkoztatva koncentrációjuk ~ 1000 μ g/l) adtunk. Az így előkészített mintákat a készülék mintatartójába helyeztük. Az éterek, a 2-propanol és az aceton koncentrációjának meghatározásához ugyanezt a protokollt követtük, de belső standardként csak az 1,2-diklóretán- d_4 oldatát használtuk. E komponensek analíziséhez fejlesztenünk kellett egy kevésbé intenzív felfűtési programmal rendelkező módszert.

Az automata mintaadagoló az üvegeket egyenként 85 °C-on, 15 percen át rázta, majd ezt követően vett a gázfázisból 250 μ l mintát, és a gázkromatográfba (Agilent Technologies 6850GC) injektálta. Az injektor 250 °C-os volt, split üzemmódban (1:20) működött. Az elválasztást Rxi-624 Sil MS (20 m x 0,18 mm x 1,00 μ m) kolonnán végeztük, a mozgófázis 6.0 tisztaságú hélium volt.

A detektálást a gázkromatográfhoz csatlakoztatott Agilent 5975C VL MS tömegspektrométerrel végeztük BFB tune módban, elektronütköztetési ionizációval (EI), szelektív ion monitoring (SIM) és pásztázó (SCAN) üzemmódban. A vivőgáz hélium volt (Linde, 6.0). A mérések elvárt pontossága $\pm 10\%$ volt. A VOC mérések kalibrált tartománya 10-6000 μ g/l, alsó méréshatára pedig 10 μ g/l volt. Az éterek, 2-propanol és aceton mérés kalibrált tartománya 200-10000 μ g/l, alsó méréshatára az éterek esetében 10 μ g/l, míg a 2-propanolnál és az acetonnál 20 μ g/l volt.

4.14.2. Ecetsav mérése vizes mátrixú mintákból HS-GC/MS-sel

Az ecetsav mérésénél a mintavételezés, illetve hígítás az éterek, 2-propanol és aceton komponensek előkészítésénél és mérésénél leírtak szerint történt. Az eljárás során

észterképzést alkalmaztunk: a minta 3 ml-éhez 2 g NaCl-ot, további 1 ml ultratiszta vizet, majd a belső standard oldatának 100 µl-ét, 300 µl HPLC minőségű metanolt és 5 µl cc. kénsavat adtunk. A mintákat 85 °C-on, 15 percig rázattuk, majd gáztömör fecskendővel 1 ml-t injektáltunk a gázkromatográfba. A méréseknél az illékony komponensek méréséhez is használt mérőberendezést használtuk. Belső standardként ecetsav-d₄-et, 4-metil-valeriánsavat és *p*-brómfluorbenzolt használtunk. Az ecetsav-metilészter kalibrált tartománya 0,5-50,0 mg/l, alsó méréshatára 0,5 mg/l volt.

4.14.3. Anionok koncentrációjának meghatározása

A minták előkészítésekor a mintákat 3 percig 13000-es fordulatszámon centrifugáltuk, majd a felülúszóból 1 ml-t vialokba (Agilent Technologies, AMBER, 2 ml, 9 mm S/T) pipettáztuk, és a lezárást követően a készülék mintatartójába helyeztük.

Az automata mintaadagoló (Agilent Technologies 1260 ALS) 5 µl-t injektált a mintákból. A mérést izokratikusan végeztük, az eluens 1,8 mM Na₂CO₃ / 1,7 mM NaHCO₃ puffer oldat, az áramlási sebesség pedig 1,5 ml/perc volt. Az elválasztást szobahőmérsékleten Phenomenex STAR_ION A300 kolonnával végeztük, SeQuant SAMS anion IC szupresszor alkalmazásával. A detektor Sykam S3111 CD volt. A mérés során az alábbi anionok koncentrációit vizsgáltuk: klorid, szulfát, nitrát, nitrit, foszfát és bromid. A mérés alsó méréshatára 1 mg/l volt.

4.14.4. Szerves savak és alkoholok koncentrációjának meghatározása

A mintákat az analízis kezdetéig lefagyasztottuk (-20 °C). Felolvasztás után 3 percig 13000-es fordulatszámon centrifugáltuk őket, majd a felszínükről 1-1 ml-t vialokba (Agilent Technologies, AMBER, 2 ml, 9 mm S/T) pipettáztunk, és a lezárást követően a készülék mintatartójába helyeztük.

Az automata mintaadagoló (Agilent Technologies 1260 ALS) 50 µl-t injektált a mintákból. A mérést izokratikusan végeztük, az eluens 0,01 N-os kénsav, az áramlási sebesség 0,6 ml/perc volt. Az elválasztást Rezex Monosaccharide H+ (300 x 7,8 mm) kolonna végezte, a kolonna hőmérséklete 50 °C volt. A detektálást Agilent UV és RID detektorral végeztük. Az analízis időtartama 30 perc. A mérés során az alábbi vegyületek koncentrációit vizsgáltuk: oxálsav, citromsav, piroszőlősav, tejsav, hangyasav, ecetsav, propionsav, izovajsav, vajsav, metanol, etanol, 2-propanol és acetone. A mérés alsó méréshatára 5 mg/l volt, kivéve a metanolt (50 mg/l), az etanolt (20 mg/l) és az acetont (15 mg/l).

4.15. Molekuláris biológiai vizsgálatok

4.15.1. DNS-izolálás és a DNS-koncentráció mérése

A genomi DNS izolálása a Mo Bio PowerSoil® DNA Isolation Kit felhasználásával (MO BIO Laboratories, Inc.), a gyártó utasításai szerint történt. A DNS koncentrációját Qubit® 2.0 Fluorometerrel (Invitrogen), dsDNA HS Assay Kit felhasználásával, a minták 2 µl-éből, a gyártó előírásai szerint határoztuk meg.

4.15.2. DGGE (denaturáló grádiens gélelektroforézis) módszer a baktériumok nyomon követésére

A 16S rRNS-t kódoló régiót eubaktériumokra specifikus primerekkel (EubA [5' AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA 3'] és EubB [5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3']) végzett PCR-rel (Polymerase Chain Reaction: polimeráz láncreakció) amplifikáltuk, melyhez templátként a mintákból izolált DNS 10 ng-ját használtuk fel. Negatív kontrollként olyan reakció szolgált, ahol a templátként bemért DNS-t víz helyettesítette.

A reakciók 15 µl térfogatban KOD polimeráz (Novagen) felhasználásával, PTC 200 Thermal Cycler (MJ Research) készülékben zajlottak a következő programmal: denaturáció (95 °C, 5 perc), majd 30 ciklus: denaturáció (95 °C, 20 másodperc), annealing (55 °C, 10 másodperc), extenzió (70 °C, 40 másodperc) és végső extenzió (70 °C, 5 perc). A termékeket 1%-os agaróz gélen ellenőriztük.

A DGGE-hez szükséges GC-clampet tartalmazó DNS fragmenteket egy újabb PCR-ben állítottuk elő. Ebben a reakcióban a következő két primerpárt használtuk: 341F-GC [5'(CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G) CTA CGG GAG GCA GCA G 3'] és 907R [5' CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT 3'], valamint 8F-GC [5'(CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G) AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'] és 519R [5'ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'], templátként pedig az előző, a teljes hosszúságú 16S rDNS-t amplifikáló PCR-ek 1 µl-e szolgált. A PCR reakciók 30 µl-es térfogatban a következő program alkalmazásával készültek: denaturáció (95 °C, 2 perc); 9 ciklus: denaturáció (95 °C, 20 másodperc), annealing (63 °C, 10 másodperc), extenzió (70 °C, 15 másodperc), ciklusonként az annealing hőmérséklet 1 °C-kal csökkentve; 26 ciklus denaturáció (95 °C, 20 másodperc), annealing (55 °C, 10 másodperc), extenzió (70 °C, 15 másodperc) és végső extenzió (70 °C, 3 perc). A termékeket 1%-os agaróz gélen ellenőriztük, majd 15 µl-t választottunk el denaturáló gélen.

A denaturáló grádiens gélelektroforézist VS20WAVE-DGGE készülékkel (Clever Scientific Ltd) végeztük. A fragmenteket 6%-os poliakrilamid gélen választottuk el, amely 40-60% denaturáló grádienszt tartalmazott. A gélelektroforézis során folyamatosan 60 °C-on tartott hőmérséklet mellett 100 V-os feszültséggel 12-14 órán át végeztük az elválasztást. A sávokat GelRed festéssel tettük láthatóvá és UV-transzilluminátort tartalmazó Vilber Lourmat INFINITY VX2 képalkotó rendszerrel dokumentáltuk.

4.15.3. Szekvencia azonosítás

Futtatás után az azonosítani kívánt DNS fragmenteket az akrilamid gélből kivágtuk, egy éjszakán át 50 µl AccuGENE™ (LONZA) vízben inkubáltuk 4 °C-on, majd újra amplifikáltuk a megfelelő primerpárral. A PCR amplifikációhoz 5 µl-nyi, az akrilamid gélből vízbe oldódott DNS-t használtunk templátként, a reakciókörülmények és primerek a fent leírtak voltak. A PCR termékeket EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kittel (Bio Basic) tisztítottuk, majd az így kinyert DNS fragmentek nukleotidsorrendjének meghatározása Sanger-féle szekvenálással történt. A kapott szekvenciákat a BLAST (National Center for Biotechnology Information, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) nukleotid adatbázisával hasonlítottuk össze és azonosítottuk.

4.15.4. Kolónia PCR

A lemezen nőtt egyedi baktériumtelepekből oltókacsnyi mennyiséget felszuszpendáltunk 20 µl AccuGENE™ (LONZA) vízben, majd 95 °C-on 10 percig inkubáltuk. A feltárt sejtek 1 µl-ét használtuk templátként a baktériumok 16S rDNS-ét amplifikáló PCR-ben 50 µl végtérfogatban. A reakciók KOD polimeráz (Novagen) felhasználásával, PTC 200 Thermal Cycler (MJ Research) készülékben zajlottak a következő programmal: denaturáció (95 °C, 5 perc), 30 ciklus: denaturáció (95 °C, 20 másodperc), annealing (55 °C, 10 másodperc), extenzió (70 °C, 40 másodperc), majd végső extenzió (70 °C, 5 perc). Az eubaktériumokra specifikus primerek az EubA [5' AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA 3'] és EubB [5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'] voltak. A termékeket 1%-os agaróz gélen ellenőriztük, tisztítottuk, megmértük a DNS koncentrációjukat, majd továbbítottuk Sanger-féle szekvenciameghatározásra.

4.15.5. A CH28 *de novo* genomszekvenálása

A DIPE-bontó CH28 genetikai hátterének átfogóbb megismerése érdekében megszekvenáltattuk a törzset. A DNS izolálásához a módszerleírásban ismertetettek szerint DIPE-vel indukált oltó kultúrát állítottunk elő (4.2.3 fejezet). A genomi DNS izolálását az

UltraClean® Microbial DNA Isolation Kittel (MO BIO Laboratories, Inc.) a gyártó előírásait követve hajtottuk végre.

A genomi könyvtár készítéséhez a SureSelect^{QXT} (Agilent) könyvtárkészítő reagenst használtuk a gyártói protokollnak megfelelően. Az újgenerációs szekvenálás Illumina MiSeq készüléken zajlott (250-bp paired-end szekvenálás). Elsőként a nyers, paired-end szekvenciákban előforduló szekvenálási hibákat a Lighter (v1.1.1) programmal korrigáltuk (147). Mivel a szekvenciapárok az inszertméret miatt átfednek, ezért mesterséges hosszú read-eket lehet belőlük építeni. Az ilyen megoldás javítja az összeszerelés hatékonyságát. Ezt a fúziós műveletet a FLASH programmal (v1.2.11) végeztük (148). A vektor eredetű szekvenciákat a DeconSeq (v0.4.3) programmal távolítottuk el (149), melyhez referenciaként az [UniVec](#) adatbázisát használtuk. A program nem tud párosított read-ekkel dolgozni, ezért az eredeti párosítás elvész, ami jelentős információvesztést jelent. Az eredeti párosítást a fastq-pair (v0.1) programmal helyre lehet állítani, de nem minden esetben, mivel a tisztítás során egyes párosított read-ek egyik fele elvész (150). Az előkészítési műveletek során így végül három read-csoportunk lesz: összeillesztett hosszú read-ek, párosított, illetve párosítatlan read-ek. A három szekvenciacsoport felhasználásával a vázlatos genomot a MIRA genom-összeszerelő programmal (v5rc2) építettük meg. A teljes bioinformatikai pipeline megtalálható az alábbi linken: https://github.com/gyulap/CH28_genome_assembly. A vázlatos genom által kódolt géneket az NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline segítségével azonosítottuk.

A törzs rokonsági viszonyainak megállapítása során a nukleinsav adatbázisokból elérhető genomszekvenciákkal történő összehasonlító analízishez a JSpeciesWS-t (v3.1.2) (151) használtuk. A szekvenciák illesztését a ClustalW program, a filogenetikai fa készítését pedig a MEGA X (152) programban a szomszédösszevonó vagy neighbor-joining módszer (NJ method) (153) segítségével végeztük el. Az evolúciós távolságok kiszámítása a LogDet (Tamura-Kumar) módszerrel (154) történt.

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

5.1. DIPE-bontásra képes egyedi baktériumtörzs izolálása talajvízből

Célkitűzéseink megvalósításához, vagyis, hogy izoláljunk egy olyan mikroorganizmust, mely alkalmazható DIPE-vel szennyezett területek biológiai kármentesítése során, DIPE-vel szennyezett talajvízmintákból végeztünk dúsítási, izolálási lépéseket. A dúsítások során DIPE-n, mint kizárólagos szénforráson jelentős növekedést mutató mintát, a CH28-nak elnevezett törzset egy gyógyszergyárhoz közeli területről származó szennyezett talajvízmintából, 200 mg/l DIPE-n történő dúsítással izoláltuk. Ehhez az eljáráshoz azért a 200 mg/l DIPE koncentrációt választottuk, mert az éterbontók dúsítására és izolálására ez a legáltalánosabban használt mennyiség (58, 155). A továbbiakban az izolált baktérium rutinszerű fenntartását, a gazdag tápközeg (TSB) mellett, DIPE-n, mint egyedüli szén- és energiaforráson végeztük.

A CH28 a 16S rDNS szekvenciája alapján az Aktinobaktériumok törzsébe, a Mycobacteriaceae családon belül a *Mycolicibacterium* nemzetséghez („*Fortuitum-Vaccae*” klád) sorolható (93, 156, 157). Az általunk izolált baktériumtörzs a gyors növekedésű, nem patogén mikobaktériumok közé tartozik.

5.2. A *Mycolicibacterium* sp. CH28 *de novo* genomszekvenálása

A DIPE-bontó *Mycolicibacterium* sp. CH28 genetikai hátterének átfogóbb megismerése érdekében megszekvenáltattuk a törzs teljes genomját. A *de novo* genomszekvenálásból nyert 1 214 702 db szekvenciárészletből 43 kontigot (minden kontig 500 bp-nál hosszabb) állítottunk össze, amelyek együttes hossza 6 046 830 bp (48x lefedettség). Az N₅₀ érték 426 266 bp volt. A genom G+C tartalma 66,7%, mely érték a nemzetségen belül átlagosnak tekinthető.

A genomszekvencia adatok alapján sikerült azonosítanunk az EthB enzimet kódoló *ethB* gén jelenlétét, amely 99%-os hasonlóságot mutatott a *R. ruber* IFP 2001 és az *A. tertiaricarbonis* L108 azonos génjével. A gén által kódolt citokróm P450 monooxygenáz enzim bizonyítottan részt vesz az ETBE, a DIPE és más dialkil éterek lebontásában is (68, 70, 72).

A CH28 genomjában az *ethB* regulátora, az *ethR* gén szintén detektálásra került. A gén jelenléte miatt feltételezhető az *eth* operon specifikus szabályozása a CH28-ban.

A teljes genom shotgun projekt a DDBJ/ENA/GenBank-ba került feltöltésre [SRLQ00000000](#) azonosító számmal (BioProject azonosító: [PRJNA520790](#), BioSample azonosító: [SAMN10867835](#)). A nyers szekvenciaadatok letölthetőek az NCBI SRA adatbázisából (azonosító: [SRR8797416](#)). A szekvenálási adatok kiértékelését a Microbiology Resource Announcements folyóiratban publikáltuk (158).

5.3. A *Mycolicibacterium* sp. CH28, mint új faj

A baktérium teljes hosszúságú 16S rDNS-ének a SILVA nem redundáns (nr) adatbázisával (<https://www.arb-silva.de/>) történő összehasonlítása során három olyan baktériumot találtunk, amelyek legalább 98,7%-os azonosságot mutattak az általunk vizsgált törzssel. E három baktérium közül kettőnek (*Mycobacterium* sp. DL592 /javasolt név: *Mycolicibacterium* sp. DL592, NCBI azonosító: [NZ_CP050192.1](#)/ és a *Mycolicibacterium anyangense* sp. JCM30275 /NCBI azonosító: [NZ_AP022620.1](#)/) elérhető a teljes genom szekvenciája, így ezeket a törzseket mélyrehatóbban össze tudtuk hasonlítani a CH28 törzssel. Mivel a JSpeciesWS adatbázisában nem található meg a két összehasonlítani kívánt baktérium, így ezek adatait, a CH28 törzssel együtt, feltöltöttük a szerverre, majd a MUMmer algoritmussal kiszámoltuk az ANI-t. A *Mycobacterium* sp. DL592 esetében 84,76%-os (45,73%-os nukleotid illeszkedés), míg a *Mycolicibacterium anyangense* sp. JCM30275-nél 84,56%-os (41,11%-os nukleotid illeszkedés) egyezést találtunk. Tehát a genomoknak kevesebb, mint a fele illeszkedett, és ami illeszkedett, az is kevesebb, mint 85%-os azonosságot mutatott.

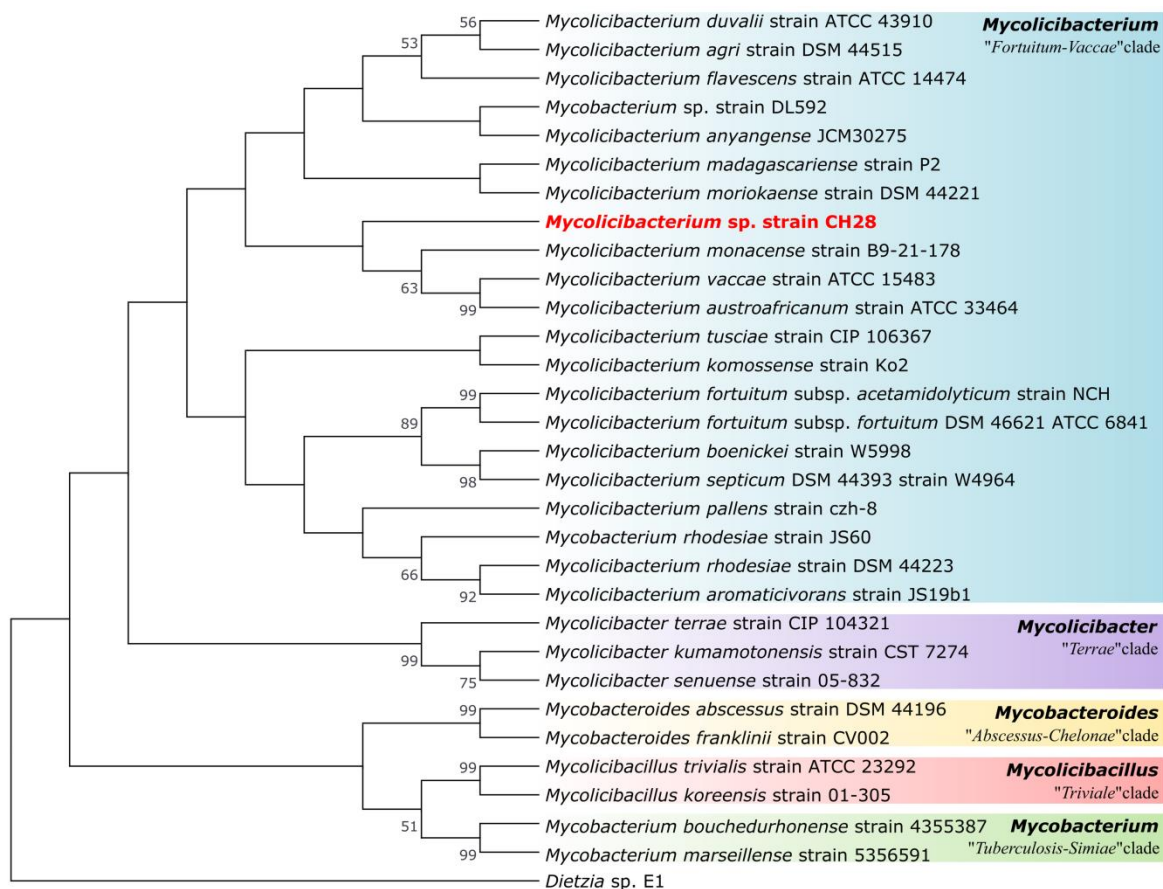
A JSpeciesWS az ANI meghatározásán kívül tetranukleotid-összetélen alapuló összehasonlításra is lehetőséget nyújt (Tetranucleotide Signature Correlation Index, (TETRA)) (151). A TETRA-n alapuló összehasonlítás során hat baktériumot találtunk, amelyek az elfogadható szinten (>0,989%) belüli, de a küszöbérték (<0,999%) (159) alatti értékekkel rendelkeztek. E hat mikroorganizmus genom szekvenciáját is összevetettük a CH28 törzsével. Az összes, eredményként kapott ANI érték alapján valamennyi vizsgált törzs genom szekvenciája csak 85% körüli azonosságot mutatott a CH28 törzsével (**7. táblázat**).

7. táblázat: A *Mycolicibacterium* sp. CH28 tetranukleotid-összetélen alapuló összehasonlítása a közeli rokon mikobaktérium törzsekkel

Vizsgált baktérium	ANI	Nukleotid illeszkedés
<i>Mycolicibacterium rhodesiae</i> JS60	84,80%	44,14%
<i>Mycolicibacterium aromaticivorans</i> JS19b1	84,74%	42,17%
<i>Mycolicibacterium sphagni</i> ATCC 33027	84,74%	43,92%
<i>Mycobacterium</i> sp. EPa45	84,71%	42,34%
<i>Mycolicibacterium rhodesiae</i> DSM 44223	84,62%	43,60%
<i>Mycolicibacterium aichiense</i> NCTC 10820	84,56%	44,01%

A fenti értékek mindegyike jelentősen a 95-96%-os küszöbérték alatti (142), amiből az következik, hogy az általunk izolált törzs valószínűsíthetően új fajnak tekinthető.

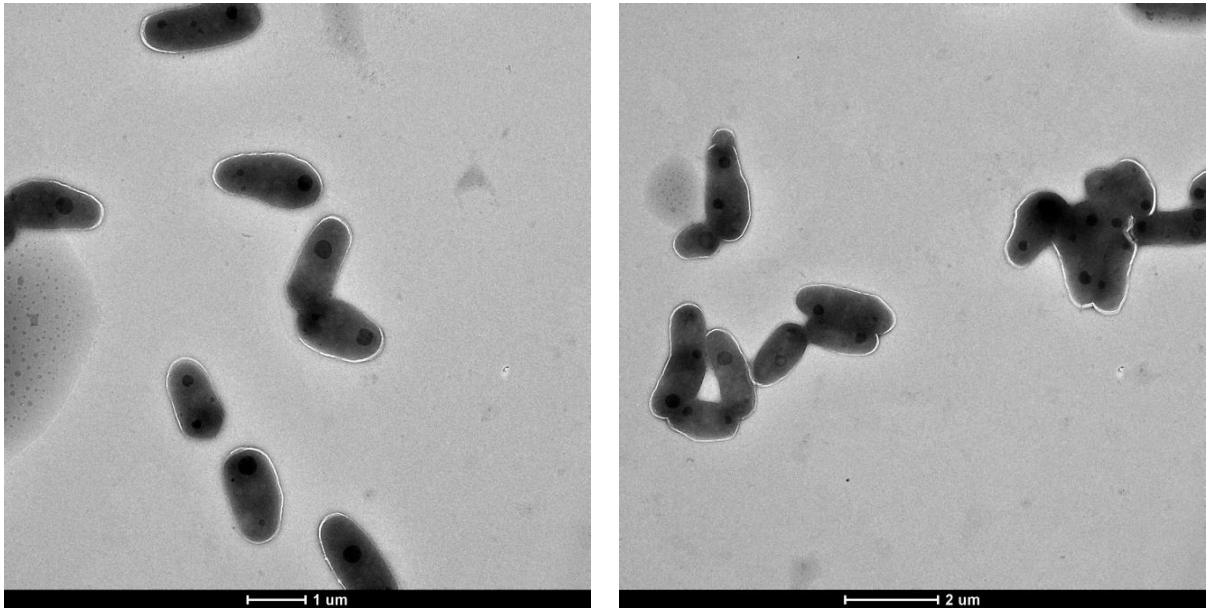
A CH28 törzs ([NZ_SRLQ00000000.1](#)) rokonsági viszonyainak ábrázolására a 16S rDNS szekvenciák alapján elkészítettük a törzs legközelebbi rokonainak filogenetikai törzsfáját (15. ábra).



15. ábra: A mikobaktériumok 16S rDNS szekvenciákon alapuló filogenetikai törzsfája

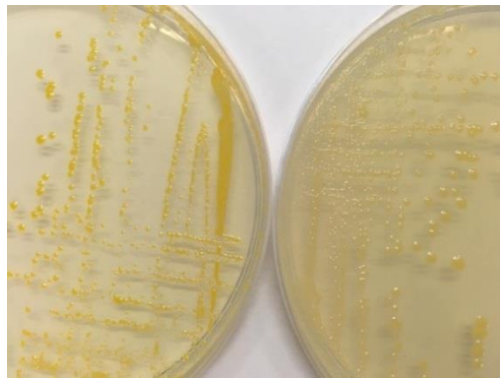
5.4. A *Mycolicibacterium* sp. CH28 növesztésének általános jellemzői

Mikroszkóppal megvizsgálva a CH28 sejtjei átlagosan 2,0 μm x 0,8 μm nagyságúak, a mikobaktériumokra jellemzően pálcika alakúak. TSA lemezen, 32 °C-on, 7 napig történő inkubációt követően a törzs átlagosan 1-2 mm átmérőjű telepeket képzett (**16. ábra**), melyek színe kezdetben enyhén sárgás, majd pár nap elteltével narancssárgássá, kissé barnássá váltak.



16. ábra: A *Mycolicibacterium* sp. CH28-ről készült TEM fotó. A képeket FEI TECNAI G2 20 X-Twin transzmissziós elektronmikroszkóppal, 100 kV gyorsítófeszültség alkalmazása mellett készítettük

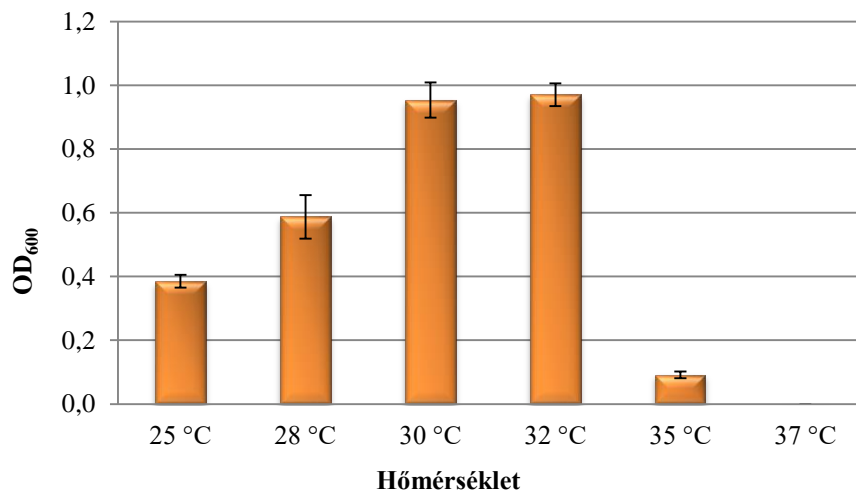
A törzs érdekes növekedési tulajdonsága volt, hogy fényen történő inkubáció hatására a telepek egy árnyalatnyival narancssárgásabbak lettek (**17. ábra**). A genomszekvenciából nyert adatok alapján feltételezhető, hogy a CH28-ban a narancssárga színért karotinoid pigment(ek) felelős(ek).



17. ábra: A fény hatása a *Mycolicibacterium* sp. CH28 törzs növekedésére: az inkubáció a bal oldali Petri-csésze esetében fényen történt, míg a jobb oldalinál sötétben

5.5. A *Mycolicibacterium* sp. CH28 hőmérséklet optimuma

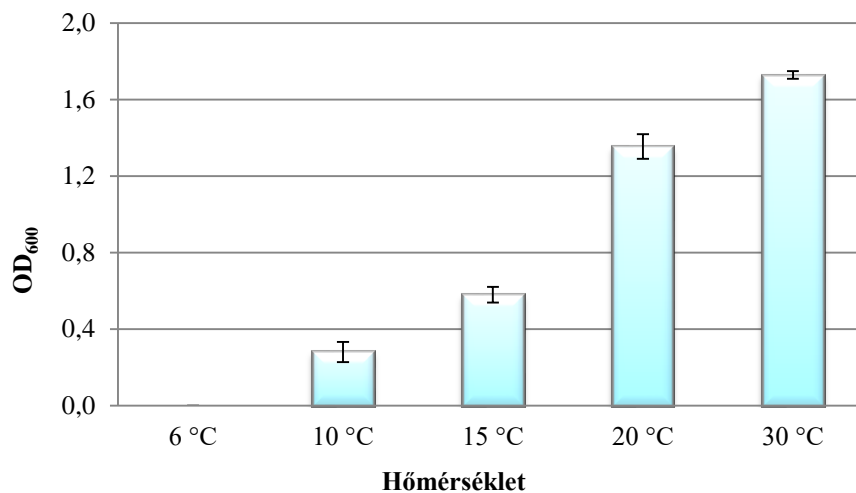
A későbbi kísérletekhez, vizsgálatokhoz célszerű megállapítani, hogy az általunk izolált mikroorganizmus milyen hőmérsékleti toleranciával rendelkezik, illetve hogy azon belül is mi számára az optimális hőmérsékleti tartomány. A CH28 hőmérséklettűrését 6 °C és 37 °C közötti tartományban vizsgáltuk, a tesztet - a vizsgálni kívánt nagyszámú kísérleti hőmérséklet folytán - két részletben hajtottuk végre. A kísérlet első felében a magasabb hőmérsékleteket, a 25-37 °C közötti tartományt tanulmányoztuk. A tápoldatban (**18. ábra**) és a lemezekon (**20. ábra**) tapasztalt eredmények kiváló összhangban voltak: a TSA lemezekon megfigyelt növekedési intenzitás hasonló tendenciát mutatott, mint amit a folyadékkultúrák esetében láttunk. Az eredményeknek köszönhetően már az egy hetes inkubációt követően sikerült megállapítanunk, hogy az izolátumunk számára optimális hőmérsékleti tartomány: 30-32 °C. Az optimális tartományban inkubált lemezek esetében a telepek a vizsgált egyéb hőmérsékleti értéktől eltérést mutattak: a csontszínű telepek az egy hetes inkubáció során fokozatosan narancssárga színűvé változtak. A vizsgálatot a 35 °C és 37 °C-os minták esetében további két hétig folytatattuk, azonban számottevő növekedést már egyik hőmérsékleten sem tudtunk megfigyelni. A 35 °C hőmérséklet jelentősen, a 37 °C pedig teljesen gátolja a CH28 szaporodását.



18. ábra: Hőmérséklet tolerancia teszt 25-37 °C-on TSB tápoldatban, egyhetes inkubációt követően. A hibasávok a három párhuzamos minta szórását jelölik

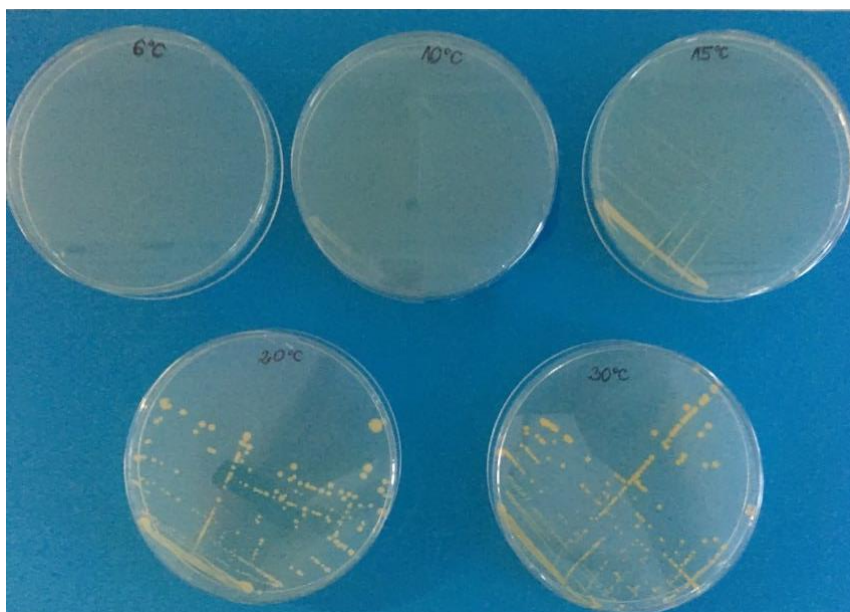
A vizsgálat második felében az alacsonyabb hőmérsékleti tartományon (6-20 °C) követtük figyelemmel a CH28 törzs növekedését (**19. ábra**). Az adatok összehasonlítása

érdekében kontrollként 30 °C-on ismét teszteltük a növekedést. A kontrollként használt 30 °C-nál mért OD₆₀₀ értékek eltérnek a magasabb és az alacsonyabb hőmérsékleti vizsgálatoknál, mivel az alacsonyabb hőmérséklet vizsgálatokor az inkubációs idő (három hét) háromszor hosszabb volt, mint a magasabb hőmérsékletek tesztelése során. A 25-37 °C tartományhoz hasonlóan, ennél a vizsgálatnál is azonos tendenciát tudunk megfigyelni a törzs növekedési intenzitásában a különböző hőmérsékleti értékeknél inkubált folyadék tenyészetek, illetve szélesztések esetében.



19. ábra: Hőmérséklet tolerancia teszt 6-30 °C-on TSB tápoldatban, háromhetes inkubációt követően. A hibásávok a három párhuzamos minta szórását jelölik

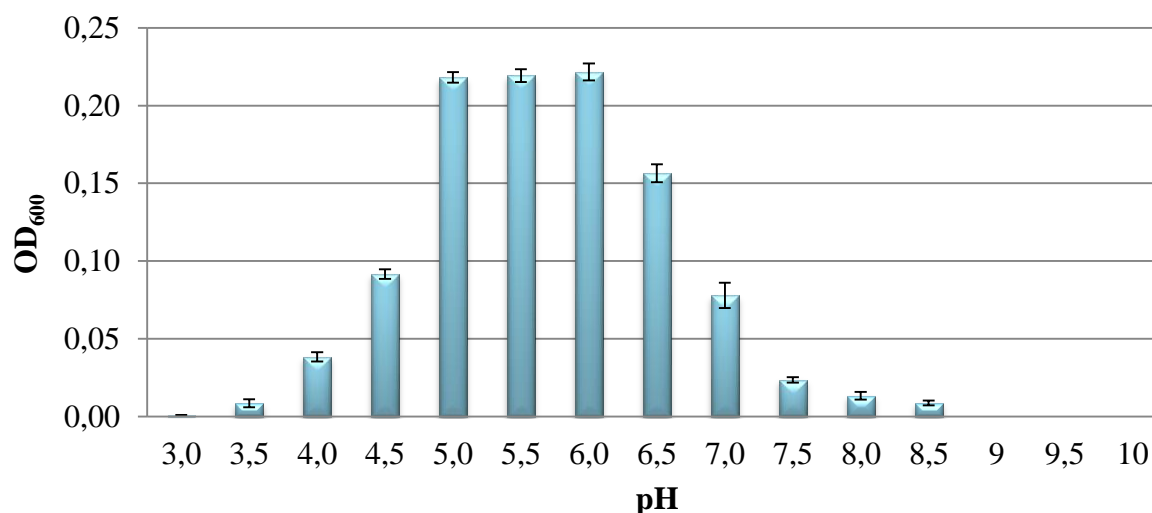
6 °C-on a háromhetes inkubációt követően sem tudunk növekedést megfigyelni a tápoldatokban és a lemezeken sem. 10 °C-on a kéthetes inkubációnál kis telepek jelentek meg, amelyek a harmadik hétre még jobban láthatóvá váltak. 15 °C-on sok kicsi, jellemzően 1, maximum 2 mm-es telep nőtt fel a lemezeken. 20 °C-on az első hét végére sok 1,5 mm-es telep vált láthatóvá, amelyek a második hétre 3-4 mm-esek, majd a harmadik hét végére akár 5-6 mm-esek is lehettek. A 30 °C-on inkubált lemezek esetében jelentek meg legkorábban a telepek, amelyek már az első hét végére narancssárgává váltak.



20. ábra: A CH28 6-30 °C-on történő inkubációja során képzett telepei három hetes inkubációt követően

5.6. A *Mycolicibacterium* sp. CH28 pH toleranciájának vizsgálata

A CH28 pH optimumának meghatározása során a savas tartomány pH értékeit (pH=3,0-7,0) citrát-foszfát puffer segítségével állítottuk be és vizsgáltuk. A pufferoldatot 200 mg/l DIPE-vel, mint egyedüli szén- és energiaforrással, továbbá K_2HPO_4 - és KH_2PO_4 -mentes DM tápoldattal egészítettünk ki. A szubsztráthasznosítási tesztek eredményeiből tudtuk, hogy a CH28 a citrátot (citromsavat), mint egyedüli szén- és energiaforrást nem képes hasznosítani, emiatt a savas és a lúgos rendszerekben is egyenlő mennyiségű felhasználható szénforrás (200 mg/l) állt izolátumunk rendelkezésére. A lúgos pH tartomány értékeit (pH=7,5-10,00) DM tápoldat és 5 normális kálium-hidroxid oldat megfelelő arányban történő keverésével állítottuk elő, szén- és energiaforrásként ezekhez a rendszerekhez is DIPE-t (200 mg/l) adagoltunk. A kéthetes, 32 °C-on történő inkubációt követően mért OD_{600} eredményekből (21. ábra) látható, hogy az általunk izolált törzs savas közegben (pH=4,6-6,6) gyorsabb szaporodásra képes. A legmagasabb OD_{600} értékeket 5,00-ös ($OD_{600}= 0,218$) és 6,00-os ($OD_{600}=0,222$) pH értékek mellett tapasztaltuk.



21. ábra: A CH28 pH-tűrő képessége. A hibásávok a három párhuzamos minta szórását jelölik

5.7. A *Mycolicibacterium* sp. CH28 sótűrő képessége

A *Mycolicibacterium* sp. CH28 sótűrő képességének vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a NaCl-ot nem tartalmazó rendszerekben a baktérium már 5 nap elteltével szemmel jól látható szaporodást mutatott. Azonban az 5 és 10% (m/m) NaCl-ot tartalmazó mintákban növekedés még egy hónap után sem volt megfigyelhető. Az eredmények alapján elmondható, hogy a *Mycolicibacterium* sp. CH28 rosszul tolerálja a magasabb sókoncentrációt, tehát nem tartozik a sótűrő fajok közé.

5.8. A *Mycolicibacterium* sp. CH28 antibiotikum rezisztenciájának vizsgálata

A molekuláris biológiai vizsgálatok, továbbá a terepi alkalmazások során célszerű, ha ismerjük a kijuttatni kívánt törzs antibiotikumokkal szembeni tűrését, illetve rezisztenciáját, ezért vizsgálatokat végeztünk a *Mycolicibacterium* sp. CH28 lehetséges antibiotikum rezisztenciáinak megállapítására. A lemezes és a folyadékkultúras antibiotikum rezisztencia tesztek során kapott eredményeket a **8. táblázatban**, a korongos teszt eredményeit pedig a **9. táblázatban** foglaltuk össze.

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a *Mycolicibacterium* sp. CH28 szenzitív az amikacinra, az ampicillinre, az apramicinre, a gentamicinre, a higromicinre, a kanamicinre, a klindamicinre, a kloramfenikolra, a neomicinre, az oxitetraciklinre, a rifampicinre, a

sztreptomycinre és a tetraciklinre. A tesztheink eredményei alapján a *Mycolicibacterium* sp. CH28 kismértékű toleranciát mutat a tobramicinnel szemben, továbbá rezisztens a karbenicillinre.

8. táblázat: Antibiotikum rezisztencia teszt I: A lemezes és a folyadékkultúrák kísérletek során kapott eredmények összefoglalása. A „+” jel arra utal, hogy a tesztelt rendszerben tapasztalható volt a CH28 növekedése, a „-” jel esetében az adott rendszerben nem tudtuk megfigyelni a CH28 szaporodását

Antibiotikum megnevezése	<i>Lemezen</i>			<i>Folyadékkultúrában</i>		
	A vizsgált alacsonyabb koncentráció	A vizsgált magasabb koncentráció		A vizsgált alacsonyabb koncentráció	A vizsgált magasabb koncentráció	
ampicillin	- - -	- - -		- - -	- - -	
apramicin	- - -	- - -		- - -	- - -	
gentamicin	- - -	- - -		- - -	- - -	
higromicin	- - -	- - -		- - -	- - -	
kanamicin	- - -	- - -		- - -	- - -	
karbenicillin	+ + +	+ + +		+ + +	+ + +	
kloramfenikol	- - -	- - -		- - -	- - -	
neomicin	- - -	- - -		- - -	- - -	
sztreptomycin	- - -	- - -		- - -	- - -	
tetraciklin	- - -	- - -		- - -	- - -	
tobramicin	+ + +	- - -		+ + +	- - -	

9. táblázat: Antibiotikum rezisztencia teszt II: A korongos antibiotikum teszt eredményeinek összefoglalása. A „+” jel arra utal, hogy a tesztelt rendszerben tapasztalható volt a CH28 növekedése, a „-” jel esetében az adott rendszerben nem tudtuk megfigyelni a CH28 szaporodását

Antibiotikum megnevezése	Mennyiség	1. párhuzamos	2. párhuzamos	3. párhuzamos
amikacin	30 µg	-	-	-
karbenicillin	100 µg	+	+	+
klindamicin	2 µg	-	-	-
oxitetraciklin	30 µg	-	-	-
rifampicin	50 µg	-	-	-

5.9. A *Mycolicibacterium* sp. CH28 növekedése különböző szubsztrátokon

A CH28 jelű izolátum különböző szubsztrátokon történő növekedési tesztje során a törzs bontókéességét az egyes szubsztrátok esetében 200 mg/l koncentrációban teszteltük (kivéve a formaldehidet, amelynél 40 mg/l-es kísérleti rendszereket állítottunk össze). A szubsztrátspektrum meghatározására a vonatkozó szakirodalomban az egyik legszélesebb körben alkalmazott koncentráció a 200 mg/l (63, 160), ezen a koncentráción tesztelték például a DIPE lebontására szintén képes *Pseudonocardia* sp. ENV478 szubsztrátspektrumát is (69). A 200 mg/l szubsztrát koncentráció két szempontból is előnyös: jellemzően még nem toxikus a mikrobák számára, továbbá esetében már jól mérhető és értékelhető optikai denzitásbeli növekedés várható.

Amennyiben egy adott szubsztrát vizsgálata során számottevő optikai denzitásbeli növekedést ($OD_{600} \geq 0,075$) tudtunk megfigyelni, abban az esetben úgy tekintettük a szubsztrátot, hogy a törzs hasznosítani tudja. Annak ellenére, hogy a törzs növekedési képességét OD_{600} változással követtük nyomon, nem tartottuk célszerűnek bemutatni a mért OD_{600} értékeket, mivel a különböző szubsztrátok esetében a bemért anyagmennyiségek nem voltak azonosak. A mért OD_{600} értékek csak azt mutatják meg, hogy a törzs a 200 mg/l koncentrációban jelen lévő vegyületből mekkora sejtnövekedést tudott produkálni, nem pedig azt, hogy a törzs esetlegesen melyik szubsztráton nő jobban, vagy melyiket részesíti előnyben.

A DM minimál tápoldatban történő nevelése alapján a *Mycolicibacterium* sp. CH28 törzs az alábbi vegyületeket képes egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítani: metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, etilén-glikol, glicerin, formaldehid, aceton, hangyasav, ecetsav, piroszőlősav, *n*-dodekán, *n*-hexadekán, *n*-oktadekán, prisztán, *m*-xilol, *p*-xilol, dietil-éter, ETBE, DIPE, Tween 80, PEG 200, PEG 1500, PEG 4000, PEG 6000, PEG 20000.

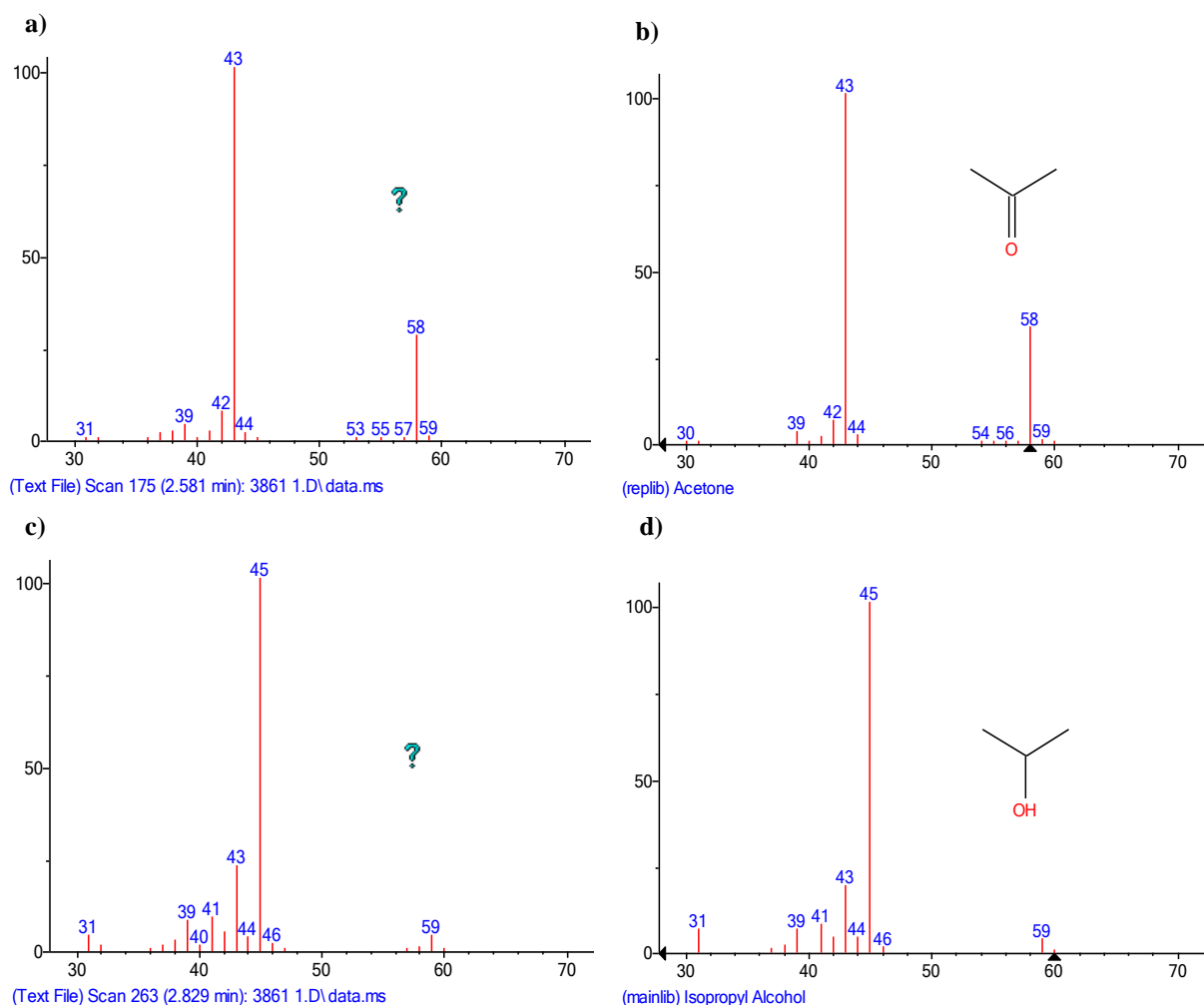
Vizsgálataink szerint a CH28 izolátum az alábbi vegyületeket a vizsgált koncentrációban nem képes egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítani: propionaldehid, citromsav, *n*-pentán, *n*-hexán, *n*-dekán, *n*-undekán, *n*-eikozán, *n*-dokozán, ciklohexán, benzol, toluol, etilbenzol, *o*-xilol, fenol, naftalin, MTBE, TAME, TBA, TAA, anizol, 1,4-dimetoxibenzol, bifenil, difenil-éter és tetrahidrofurán.

5.10. A DIPE lebontási útvonalában szereplő intermedierek azonosítása

Az oltókultúra előnövesztéséhez TSB tápoldatot használtunk, mivel előkísérleteink során megbizonyosodtunk arról, hogy a gazdag tápoldatban előnövesztett CH₂8 tenyészetet DIPE-re átolva lényegesen több köztitermék detektálható, mint ha DIPE-n, mint egyedüli szén- és energiaforráson növesztenénk elő a törzset. Feltételezéseink szerint ez annak köszönhető, hogy a DIPE degradációjában szerepet játszó *eth* operon szabályozás alatt áll, aktiválásához ETBE vagy DIPE szükséges. A DIPE-n előnövesztett sejtekben emiatt az enzimrendszer már aktivált állapotban van és „készen áll” a DIPE lebontására. Ezzel szemben a gazdag tápoldatban nevelt sejtekben a lebontásban szerepet játszó enzimrendszer indukálódásához és a lebontó folyamatok összehangolásához a törzsnek időre van szüksége, ami lehetővé teszi a köztitermékek átmeneti felhalmozódását.

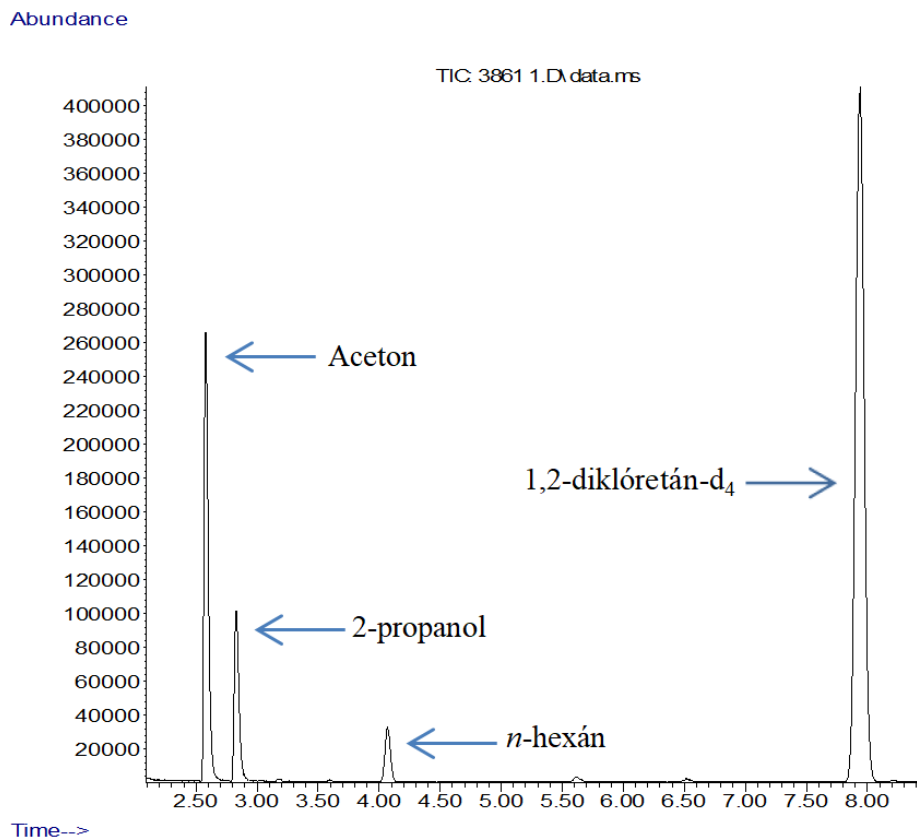
A DIPE-vel kiegészített, SMM tápoldattal összeállított mikrokozmosz rendszerekből mintát vettünk, majd azokat az analitikai módszerleírásban (4.14.1 fejezet) ismertetett módon vizsgáltuk. A kapott retenciós idők és tömegspektrumok alapján az adatbázisból (NIST Mass Spectral Search Program, verzió: 2.0, 2008) azonosítani tudtuk a komponenseket. A **22/a ábra** szemlélteti az általunk mért egyik ismeretlen komponenst, a **22/b ábra** pedig az adatbázisban szereplő acetont. A **22/c ábra** az általunk mért másik ismeretlen komponens, a **22/d ábra** pedig az adatbázisban szereplő 2-propanol.

A kísérlet eredményeként kapott tömegspektrumok - az aceton és a 2-propanol esetében is - az anyagminták által alátámasztott adott retenciós időknél találhatók, kiváló egyezéssel.



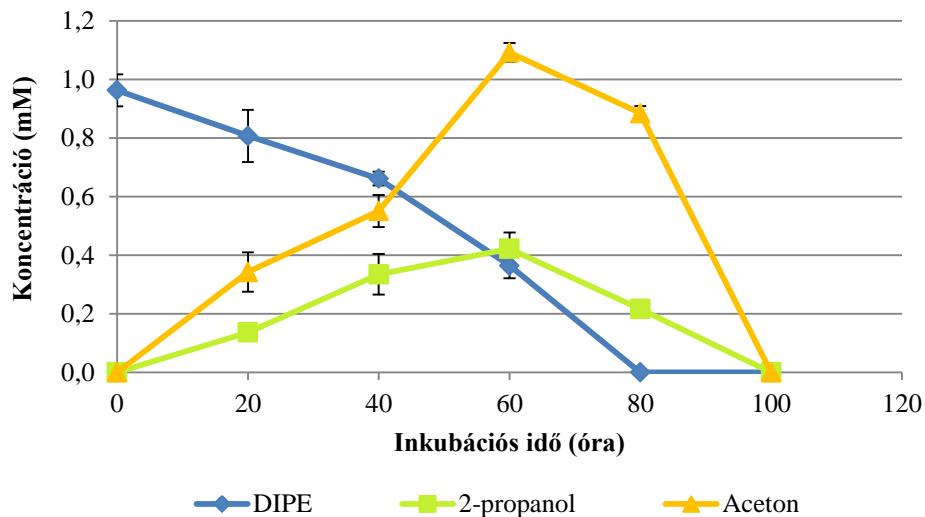
22. ábra: A kiértékelő programban kapott ismeretlen komponensek (a és c), továbbá az adatbázisban szereplő aceton (b) és 2-propanol (d)

A **23. ábrán** bemutatott kromatogramon láthatóak a detektált aceton ($t_R=2,578$ perc) és 2-propanol ($t_R=2,829$ perc) csúcsok. A $t_R=4,073$ percnél megjelenő csúcs az *n*-hexán, amely a mintában azért jelenhetett meg, mert az analitikai laboratóriumban, ahol a méréseket végeztük napi szinten használják ezt a rendkívül illékony vegyszert. Mivel az abiotikus kontroll mintákban is azonos koncentrációban detektáltuk az *n*-hexánt, így kizárható, hogy az a DIPE lebomlásából származott volna. A $t_R=7,938$ percnél a méréshez belső standardként használt 1,2-diklóretán- d_4 figyelhető meg.

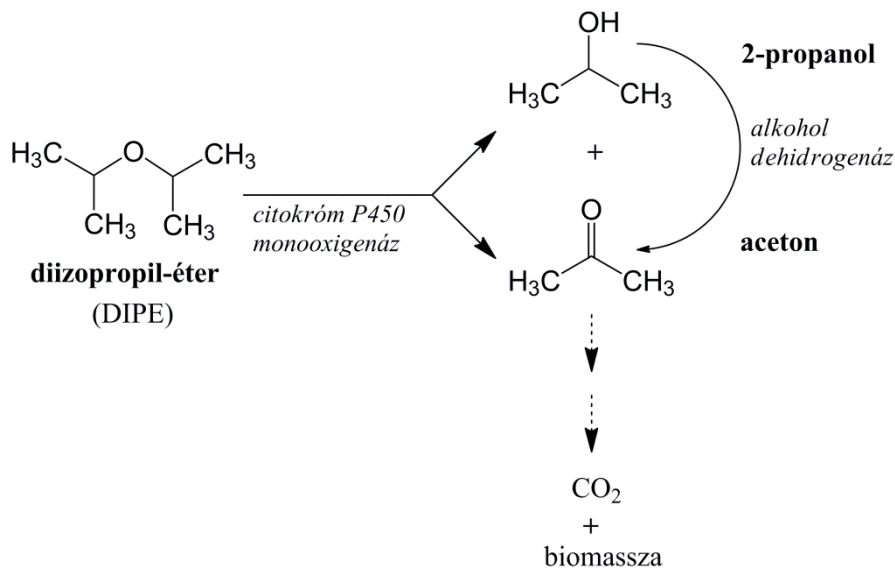


23. ábra: A DIPE biodegradációja során detektált intermedierek (2-propanol és aceton), illetve a mintákban kimutatott szennyező (*n*-hexán) és a belső standard (1,2-diklóretán-*d*₄)

A DIPE lebontási útvonalának feltérképezéséhez elvégzett kísérlet során detektált illékony vegyületek koncentrációit a **24. ábrán** tüntettük fel. Mivel az abiotikus kontroll rendszerekben nem tapasztaltuk a DIPE fogyását, vagy közttermékek keletkezését, így a jobb áttekinthetőség érdekében az abiotikus mintákból mért koncentrációkat nem ábrázoltuk. A diagramon három párhuzamos rendszer átlagát ábrázoltuk a szórással együtt. A bontás során a szakirodalomban feltételezeten keletkező 2-propanolt, továbbá az acetont is, mint közttermékeket sikerült detektálnunk. A 2-propanol kimutatása jelentős eredmény, hiszen ezáltal egyértelműen alá tudjuk támasztani a DIPE feltételezett aerob lebontásának első két lépését (**25. ábra**).



24. ábra: A DIPE aerob mineralizációja során keletkező köztitermékek és koncentrációik változásának nyomon követése GC-MS analízissel. A hibásávok a három párhuzamos minta szórását jelölik

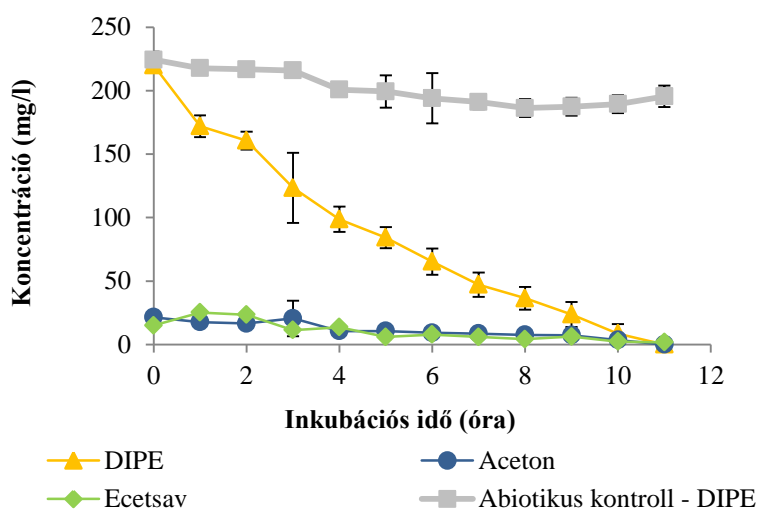


25. ábra: A DIPE aerob lebontási útvonalának felső szakasza a CH28 jelű izolátumban

5.11. „Resting cell” („nyugvó sejtes”) kísérlet

A resting cell kísérlet során aktív, de - a nitrogénmentes tápoldat miatt – szaporodásra képtelen CH28 baktériumtenyészet DIPE-bontó képességét vizsgáltuk. A tesztet 200 mg/l

DIPE-vel indítottuk, amely a 11. órára degradálódott (**26. ábra**). A kapott eredményekből kiszámítottuk, hogy a lebontás sebessége $1,63 \pm 0,03$ nmol/perc/mg biomassza (száraztömegre vonatkoztatva) volt. A teszt során sikerült intermediereként acetont és ecetsavat detektálnunk. Utóbbi komoly tudományos értékkel bír, mivel korábban az ecetsavat, mint a DIPE biodegradációjának köztitermékét nem tudták még kimutatni.



26. ábra: A Resting cell kísérlet eredményei. A hibásávok a három párhuzamos minta szórását jelölik

A DIPE biológiai bontása jelentős eredmény, hiszen napjainkig, az általunk izolált törzsön kívül, mindösszesen három DIPE degradációra képes izolátumot írtak le. A szakirodalomban megtalálható törzseket és DIPE-degradációjuk főbb paramétereit a **10. táblázat**ban foglaltuk össze. Összehasonlítva a *R. ruber* IFP 2001, az *A. tertiaricarbonis* L108 és a CH28 DIPE-degradációs rátáját elmondható, hogy a három törzs esetében ez az érték nagyságrendileg megegyező. Habár e kísérleti körülmények között az *A. tertiaricarbonis* L108 törzs bír a legnagyobb degradációs sebességgel, azonban az L108 izolátum esetében a DIPE degradációjakor acetont, mint végtermék halmazódik fel. Ezzel szemben a CH28 törzs az acetont kiválóan tudja egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítani, tehát a bontás során szén-dioxid és biomassza keletkezik. Ez egyrészt abból a szempontból felettébb előnyös, hogy a környezetben nem halmazódik fel egy olyan intermedier, amely a mikrobák jelentős részére toxikus. Másrészt pedig a lebontási folyamatból a CH28 törzs több energiát nyerhet, mint az L108, tehát valószínűsíthetően a szennyezett közegben is hatékonyabban tud elszaporodni, amely meggyorsíthatja a bioremediációs folyamatokat.

10. táblázat: A szakirodalomban leírt DIPE-bontó törzsek főbb biodegradációs paraméterei

Törzs	Származási hely	Degradációs ráta	Hóm.	Tesztelt DIPE koncentráció	Megjegyzés	Referencia
<i>Aquicola tertiaricarbonis</i> L108	Szennyezett talajvíz, Németország	Resting cell kísérlet (MTBE-indukált sejtek): Degradációs sebesség: $1,9 \pm 0,20$ nmol/perc/mg biomassa	30 °C	2,5 mM (~255 mg/l)	Azonosított végtermék: aceton	(70)
<i>Mycolicibacterium</i> sp. CH28	Szennyezett talajvíz, Magyarország	Resting cell kísérlet (DIPE-indukált sejtek): Degradációs sebesség: $1,6 \pm 0,03$ nmol/perc/mg biomassa	30 °C	200 mg/l	Azonosított köztitermékek: aceton és ecetsav	saját eredmény (161)
		Batch teszt talajvízzel: Kiindulási sejt koncentráció: 2,5 mg/l (OD ₆₀₀ =0,050) Elsőrendű bomlási állandó: $k=10,74$ Felezési idő (nap): 0,06 Lebontási határfok: ~100%	30 °C	75 mg/l és 300 mg/l	Azonosított köztitermékek: 2-propanol és aceton	saját eredmény (161)
<i>Pseudonocardia</i> sp. ENV478	Tetrahidrofuránon növesztett kultúra, USA	Növekedési teszt A DIPE-t egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítja a baktérium. Ennél a törzsnél a degradációs ráta egyelőre nem ismert.	30 °C	200 mg/l	Ennél a törzsnél eddig csak növekedési teszten vizsgálták a DIPE biodegradációját.	(69)
<i>Rhodococcus ruber</i> IFP 2001, korábban <i>Gordonia terrae</i> IFP 2001	Városi szennyvíztisztító telepről származó eleveniszap, Franciaország	Resting cell kísérlet (ETBE-indukált sejtek): Sejt koncentráció: 0,5 g/l Lebontási határfok: 78% (24 órás inkubáció után)	30 °C	100 mg/l		(68)

5.12. DIPE mikrokozmosz tesztek talajvízzel

A CH28 DIPE-bontó potenciáljának átfogóbb megismerésére DIPE-vel mesterségesen szennyezett talajvizekből mikrokozmosz kísérleteket állítottunk össze. Az intermedierek kimutathatósága érdekében a kísérletekhez TSB tápoldatban neveltük elő törzsünket.

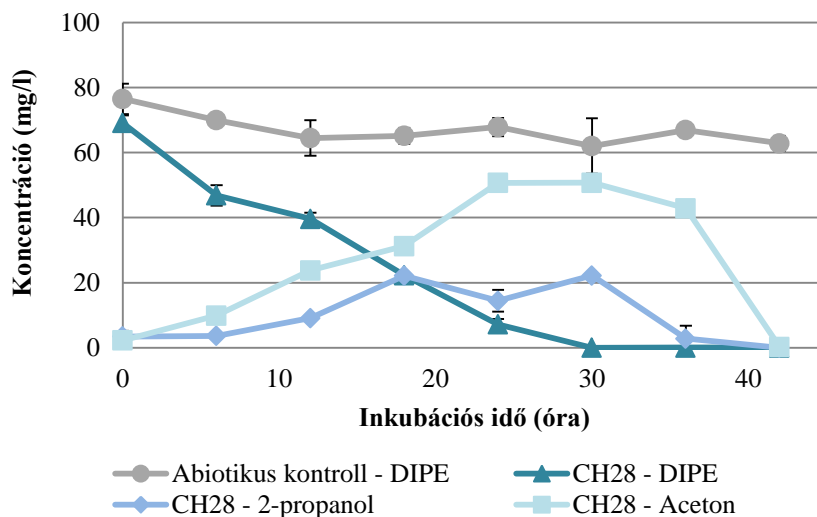
A CH28 széleskörűbb vizsgálatához eltérő mintavételi kutakból származó talajvizeket használtunk (1. számú melléklet) a mikrokozmoszok összeállításához, mivel fel szerettük volna mérni, hogy a CH28 képes-e hatékony DIPE-bontásra egy számára „idegen” mikrobiális közösségben is, mintegy modellezve egy terepi kezelést. Általánosságban elmondható, hogy bioaugmentáció során az exogén mikroorganizmusok aktivitása sokszor alacsony marad a környezet, illetve leggyakrabban az endogén mikroflóra gátló hatásai miatt.

Az egyes vegyületek különböző mértékű elillanásának, illetve az esetleges abiotikus folyamatok nyomon követése érdekében minden mikrokozmosz kísérlet esetében higany-szulfáttal csírántlanított Abiotikus kontroll rendszereket is összeállítottunk. A Biotikus minták csak talajvizet tartalmaztak, ezeket a rendszereket nem egészítettük ki semmivel, csak megfelelő koncentrációban adagolt DIPE-vel. A Biotikus és Biostimulált kontroll minták összeállítását azért tartottuk fontosnak, mert meg szerettük volna tudni, hogy megtalálhatóak-e endogén DIPE-bontó mikroorganizmusok a talajvizekben.

Mivel a rendelkezésünkre álló vízminták eredeti állapotukban nem tartalmaztak DIPE-t, így azt 75 és 300 mg/l koncentrációban adalékoltuk a rendszerekhez. A két különböző koncentráció vizsgálatát azért tartottuk szükségesnek, hogy széleskörűen be tudjuk mutatni törzsünk előnyeit, illetve hogy több ponton is alá tudjuk támasztani a feltételezett lebontási útvonal során keletkezett intermediereket. Az alacsonyabb tartomány tesztelésénél igyekeztünk olyan éter koncentrációt választani, melynél gátló hatást feltételezhetően még nem fogunk tapasztalni. Ennek köszönhetően a DIPE mineralizációja várhatóan viszonylag gyorsan (48 órán belül) lejátszódik majd, azonban nem annyira gyorsan, hogy a keletkező intermediereket ne tudnánk nyomon követni. A 300 mg/l-es koncentráció kiválasztásánál az vezérelt minket, hogy bemutassuk törzsünk kiemelkedő éterbontó-képességét és éter-toleranciáját. A szakirodalomban leírt mikrokozmosz vizsgálatok során jellemzően a legnagyobb tesztelt koncentráció a 200 mg/l volt (162–164), azonban előfordult, hogy 200 mg/l-nél nagyobb koncentrációkkal is indítottak kísérleti rendszereket. Az általunk alkalmazott 300 mg/l koncentrációban vizsgálták korábban a törzsünkkel közeli rokonsági viszonyban álló *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012 éterdegradáló potenciálját is (63).

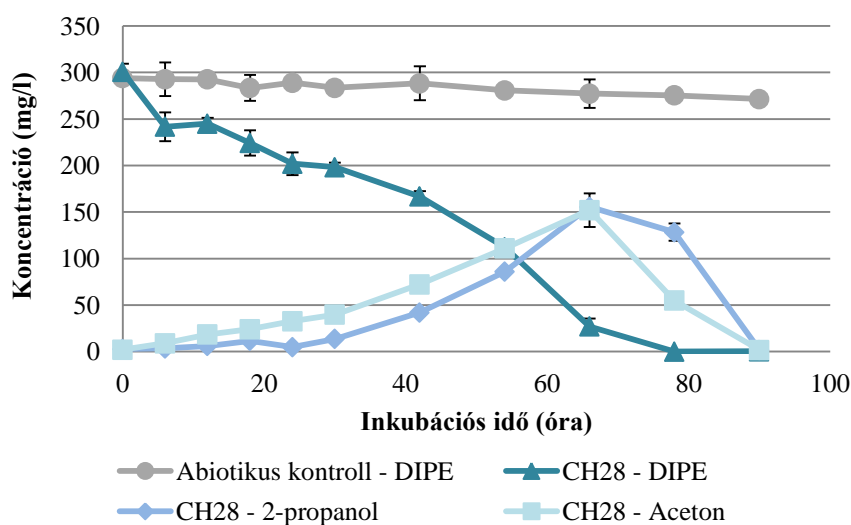
A talajvizekkel végzett mikrokozmosz tesztek során megpróbálkoztunk az optikai denzitás változásának nyomon követésével, de a mintákban megtalálható apró talajszemcsék, illetve a különböző szervesanyagok kicsapódása miatt a mérési eredmények nem tekinthetők megbízhatónak. Mindazonáltal azt érdemes megjegyezni, hogy a Biotikus kontroll rendszerekkel összehasonlítva a Bioaugmentált rendszerek mindegyikében szemmel jól látható bakteriális növekedést tapasztaltunk.

A 75 mg/l DIPE-t tartalmazó kísérlet (**27. ábra**) során a DIPE koncentrációja már az első mintavételi pontban (6. óra) csökkenést mutatott, továbbá - bár kis koncentrációban - de megjelentek a DIPE-bontás intermedierei is, a 2-propanol és az acetone. A további mintavételezések során a DIPE fokozatosan, minden mérési pontban egyre alacsonyabb koncentrációban volt kimutatható. A kísérlet 12. órájában a 2-propanolt a három párhuzamos mintából átlagosan 9 mg/l, míg az acetont 24 mg/l koncentrációban tudtuk kimérni a CH28 törzssel inokulált mikrokozmosz rendszerekből. A 30. órában a 2-propanol elérte maximális koncentrációját (22 mg/l), ekkor a DIPE már a detektálási küszöbérték (0,01 mg/l) közelében volt. Az acetone koncentrációja az inkubációs idő 24. órájában érte el maximumát (51 mg/l), a 42. órára azonban teljesen degradálódott. A kísérlet 42 órás időtartama alatt sikerült elérnünk a DIPE mineralizációját. Hasonlóan az Abiotikus kontroll mintákhoz, a Biotikus és a Biostimulált rendszerekben sem tapasztaltuk a DIPE koncentrációjának érdemi csökkenését. A kísérlet teljes időtartama alatt az Abiotikus, a Biotikus és a Biostimulált rendszerekben 2-propanol és acetone sem volt kimutatható. A könnyebb áttekinthetőség érdekében a Biotikus és a Biostimulált mikrokozmoszokból mért koncentrációkat nem tüntettük fel a **27. ábrán**.



27. ábra: Mikrokozmosz kísérlet 75 mg/l DIPE-vel szennyezett talajvízzel. A hibasávok a három párhuzamos minta szórását jelölik

A 300 mg/l DIPE-vel szennyezett, CH28 törzzsel beoltott mikrokozmoszokban is megfigyelhető volt a DIPE biodegradációja (28. ábra). A Bioaugmentált rendszerekben az inkubáció során a DIPE koncentrációk erőteljes csökkenését és katabolikus intermedierek (2-propanol és acetone) keletkezését, majd ideiglenes akkumulációját tapasztaltuk, ahogyan azt a 75 mg/l-es mikrokozmoszok esetében is megfigyeltük. A 2-propanol és az acetone legmagasabb koncentrációit (156 mg/l és 152 mg/l) a 66. órában mértük. A kísérlet végére (90. óra) a DIPE teljes lebontása lejátszódott. Az alacsonyabb DIPE koncentrációval indított mikrokozmosz teszthez hasonlóan, ebben a kísérletben sem tapasztaltuk az Abiotikus, a Biotikus és a Biostimulált mintákban a DIPE koncentráció számottevő mértékű csökkenését.



28. ábra: Mikrokozmosz kísérlet 300 mg/l DIPE-vel szennyezett talajvízzel. A hibasávok a három párhuzamos minta szórását jelölik

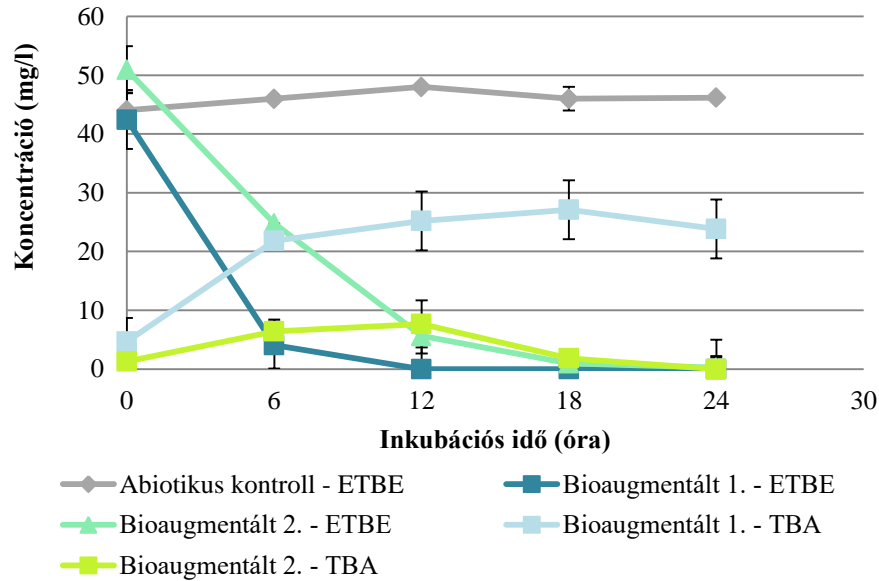
A 75 mg/l és 300 mg/l DIPE-vel mesterségesen szennyezett talajvizekkel összeállított, CH28 törzssel inokulált mikrokozmoszok mindegyikében DIPE-mineralizációt tapasztaltunk. Mindkét kísérlet során köztiterméként 2-propanol és aceton keletkezett, melyek az ideiglenes felhalmozódást követően teljes mértékben lebomlottak. Legjobb tudomásunk szerint mi publikáltunk először DIPE-vel végzett mikrokozmosz teszteket (161).

5.13. ETBE-bontó mesterséges konzorcium létrehozása a *Mycolicibacterium* sp. CH28 és a *Hydrogenophaga* sp. T4 törzsekkel

Szubsztráthasznosítási kísérleteink eredményeiből tudjuk, hogy a CH28 törzs az üzemanyag-oxigenátként alkalmazott éterek közül nemcsak a DIPE, de az ETBE lebontására is képes, azonban a folyamat során TBA akkumulálódik. Kutatóintézetünk rendelkezik egy TBA-bontó törzssel, a *Hydrogenophaga* sp. T4 jelű izolátummal. Az ETBE teljes lebontásának elérése érdekében mesterséges konzorciumot hoztunk létre a CH28 és a T4 törzsekkel. A konzorcium teszteléséhez gázolajjal szennyezett területekről származó talajvizekből (1. számú melléklet) mikrokozmosz kísérleteket állítottunk össze. Három különböző ETBE koncentrációt (50 mg/l, 200 mg/l, 500 mg/l) vizsgáltunk háromféle talajvízben, 3-3 párhuzamosban.

5.13.1. 50 mg/l ETBE-vel összeállított mikrokozmoszok

Az 50 mg/l-es rendszerekben mért VOC értékekből (29. ábra) látható, hogy a *Mycolicibacterium* sp. CH28-at tartalmazó összes rendszerben (Biostimulált 1. és 2.) az ETBE gyors biodegradációja játszódott le. Mivel a rendszereket azonos OD₆₀₀ értékről indítottuk, így a Bioaugmentált 2. mikrokozmoszokban, amelyek a T4-et is tartalmazták, feleannyi volt a CH28 kiindulási sejtszáma, mint a Bioaugmentált 1. mikrokozmoszokban, amelyekben csak CH28 volt az oltókultúra. Emiatt a Bioaugmentált 2. mintáknál az ETBE lebontása kissé lassabb volt, mint a Bioaugmentált 1. rendszerekben.



29. ábra: Mesterséges konzorciummal végzett mikrokozmosz kísérlet 50 mg/l ETBE-t tartalmazó talajvízzel. A Bioaugmentált 1. mikrokozmoszok kizárólag a CH28 törzset, míg a Bioaugmentált 2. mikrokozmoszok a mesterséges konzorciumot (CH28 és T4 törzsek) tartalmazták. A hibaszávok a három párhuzamos minta szórását jelölik

Az ETBE biodegradációja során minden CH28 törzssel inokulált minta esetében a bontás során megjelenő TBA akkumulációját tapasztaltuk. Az ETBE TBA-vá történő átalakulását követően a Bioaugmentált 1. rendszerekben nem vártunk további biológiai lebomlást mivel – korábbi kísérleteinknek köszönhetően – tudtuk, hogy a CH28 nem bontja a TBA-t. 18 óra inkubációs idő elteltével a Bioaugmentált 1. rendszerekből 27,2 mg/l TBA-t tudtunk kimutatni, mely a kísérlet végéig számottevő mértékben nem változott. A *Hydrogenophaga* sp. T4-et is tartalmazó Bioaugmentált 2. mikrokozmoszokban szintén már az első mintavételi pontban (6. óra) kimutatható volt a TBA, melynek maximális koncentrációja 10,8 mg/l (12. óra) volt. A Bioaugmentált 2. mikrokozmoszokban a TBA koncentrációja a 18. órára már jelentős csökkenést mutatott, a 24. óra végén pedig már a kimutatási határérték alatt volt. A TBA ideiglenes felhalmozódásából arra következtetünk, hogy ezek között a kísérleti körülmények között a TBA degradációs sebessége alacsonyabb volt, mint az ETBE-é.

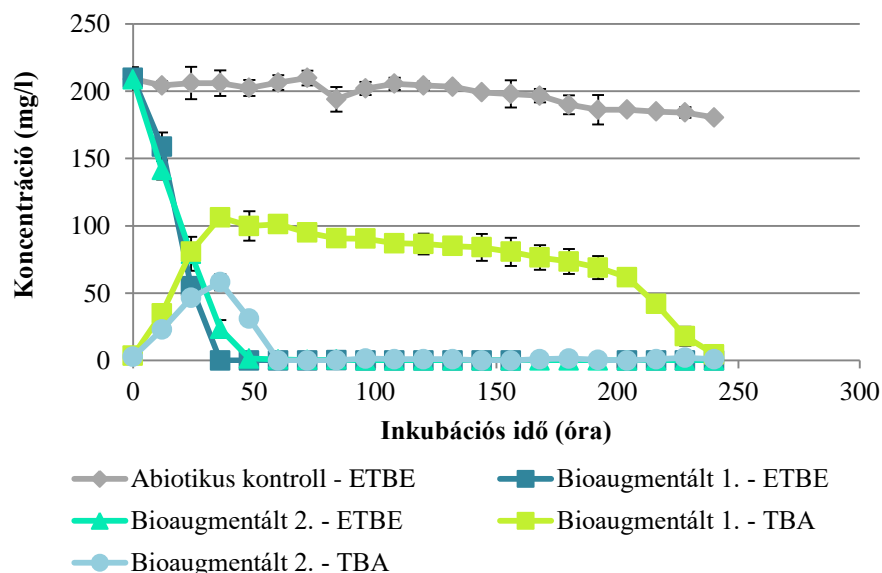
A mesterséges konzorciummal összeállított rendszerekből a 24. óra végére mind az ETBE, mind pedig az abból keletkezett TBA biodegradálódott, tehát az ETBE teljes mineralizációját tudtuk megfigyelni. A kísérletben az Abiotikus és a Bioaugmentált 3. mikrokozmoszok egyikéből sem tudtunk TBA-t kimutatni. Az ETBE koncentrációja az Abiotikus, Biotikus és a Bioaugmentált 3. rendszerekben a kísérlet teljes időtartama alatt szórási hibahatáron belül nem változott, továbbá e minták egyikében sem detektáltunk TBA-t.

A fentieket figyelembe véve a könnyebb áttekinthetőség érdekében az Abiotikus minták TBA, illetve a Biotikus és a Bioaugmentált 3. mikrokozmosz rendszerek ETBE és TBA koncentrációit nem tüntettem fel a diagramon.

A mi mesterséges konzorciumunkhoz hasonló ETBE-bontó mikrobaközösséget hoztak létre az ETBE-bontó *Rhodococcus* sp. IFP 2042 és a TBA-bontó *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049 törzsek segítségével (139). Ennek a konzorciumnak 204,36 mg/l (2 mM) ETBE lebontásához 250 órára volt szüksége. Egy másik mesterséges ETBE-bontó konzorciumot, amelyet a *Rhodococcus erythropolis* ET10 és a *Pseudonocardia benzenivorans* No. 8 törzsek alkottak, 102,18 mg/l (1 mM) kezdeti ETBE koncentráción vizsgálták (165). Az ETBE teljes mineralizációjához a konzorciumnak 25 napra volt szüksége, ami 0,46 nmol/perc/mg biomassa degradációs rátának felel meg. Az általunk létrehozott mesterséges mikrobaközösség degradációs rátája 2,30 nmol/perc/mg biomassa. Eredményeink többszörösen meghaladták az irodalomban eddig leírt közösségek biodegradációs hatékonyságát.

5.13.2. 200 mg/l ETBE-vel összeállított mikrokozmoszok

A 200 mg/l-es mikrokozmosz tesztek során kapott eredmények remek összhangban voltak az 50 mg/l-es rendszerekben korábban tapasztaltakkal: már a 48. óra végére a Bioaugmentált 1. és 2. rendszerekben is 0,5 mg/l alá csökkent az ETBE koncentrációja (30. ábra).



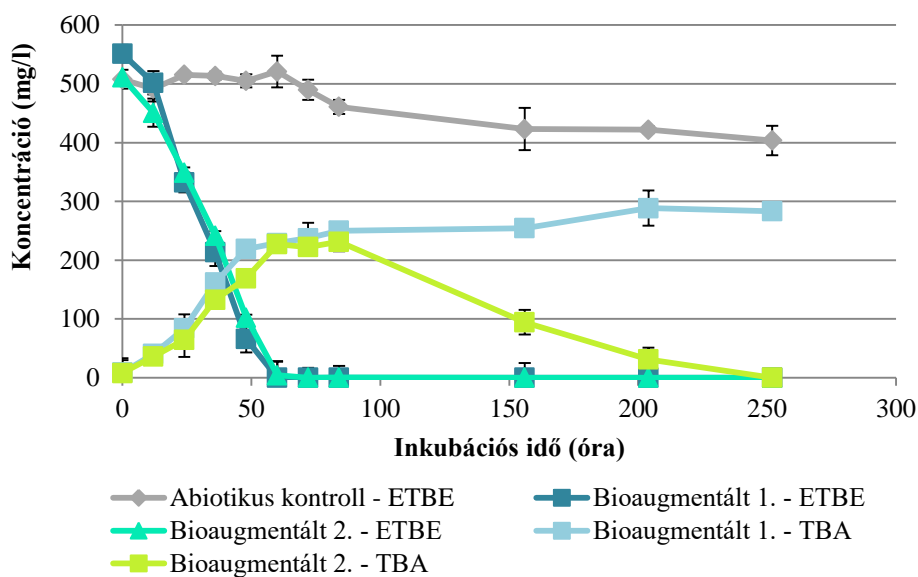
30. ábra: Mesterséges konzorciummal végzett mikrokozmosz kísérlet 200 mg/l ETBE-t tartalmazó talajvízzel. A Bioaugmentált 1. mikrokozmoszok kizárólag a CH28 törzset, míg a Bioaugmentált 2. mikrokozmoszok a mesterséges konzorciumot (CH28 és T4 törzsek) tartalmazzák. A hibásávok a három párhuzamos minta szórását jelölik

Hasonlóan az 50 mg/l ETBE koncentrációval végzett kísérletekhez, ezekben a tesztrendszerekben is TBA-akkumulációt tudtunk megfigyelni. A TBA teljes degradációja a T4 törzset tartalmazó Bioaugmentált 2. rendszerekben 60 óra alatt következett be. A kizárólag CH28 törzssel inokulált Bioaugmentált 1. mikrokozmoszokban a 200. órától megfigyelhető az akkumulálódott TBA koncentrációjának csökkenése. Ezekben a rendszerekben 240 óra (10 nap) alatt tapasztaltuk a TBA teljes mineralizációját. Szubsztráthasznosítási kísérleteinkből tudjuk, hogy a CH28 nem képes a TBA degradációjára, így minden bizonnyal a talajvízben volt(ak) jelen olyan endogén aerob mikroorganizmus(ok), amely(ek) bár nem képes(ek) az ETBE lebontására, azonban a degradáció során keletkező TBA-t képes(ek) voltak lebontani. A mesterséges konzorciumot tartalmazó Bioaugmentált 2. mikrokozmoszok esetében kb. fele annyi volt a legnagyobb mért TBA koncentráció (58 mg/l), mint a csak a CH28 törzssel beoltott Bioaugmentált 1. rendszerekben (106 mg/l).

Hasonlóan az 50 mg/l-es rendszerekhez, az ETBE koncentrációja sem az Abiotikus, sem a Biotikus, sem pedig a Bioaugmentált 3. rendszerekben nem változott jelentős mértékben a kísérlet során. Emiatt a könnyebb áttekinthetőség érdekében az Abiotikus minták TBA-, illetve a Biotikus és a Bioaugmentált 3. mikrokozmosz rendszerek ETBE és TBA koncentrációit nem tüntettem fel a diagramon.

5.13.3. 500 mg/l ETBE-vel összeállított mikrokozmoszok

A legnagyobb ETBE koncentrációval (500 mg/l) indított mikrokozmosz rendszerekben is megfigyelhető volt a DIPE biodegradációja (**31. ábra**). A mesterséges konzorciumra sem az 500 mg/l ETBE, sem a keletkező intermedierék nagy koncentrációi nem voltak toxikus hatással. A 200 mg/l-es rendszerekkel ellentétben, de az 50 mg/l ETBE-s rendszerekhez hasonlóan, ebben a talajvízben nem következett be a Bioaugmentált 1. rendszerekben a TBA degradációja. Ennek egyik oka a magas ETBE vagy TBA koncentráció lehet, mely már toxikus mértékűnek bizonyulhatott az őshonos mikroorganizmusok számára, illetve elképzelhető az is, hogy ebben a talajvízben nem voltak megtalálhatóak olyan mikrobák, melyek képesek lettek volna a TBA-t egyedüli szén- és energiaforrásként, vagy kometabolizmus során ko-szubsztrátként hasznosítani.



31. ábra: Mesterséges konzorciummal végzett mikrokozmosz kísérlet 500 mg/l ETBE-t tartalmazó talajvízzel. A Bioaugmentált 1. mikrokozmoszok kizárólag a CH28 törzset, míg a Bioaugmentált 2. mikrokozmoszok a mesterséges konzorciumot (CH28 és T4 törzsek) tartalmazták. A hibásávok a három párhuzamos minta szórását jelölik

A Bioaugmentált 2. rendszerekben a 60. óra (2,5 nap) végére játszódtott le az ETBE lebontása. A köztitermékként keletkezett TBA degradációja azonban lassabb lefolyású volt, a 252. órai (10,5 nap) mintavételnél a kimutatási határérték közelében volt. Hasonlóan az 50 mg/l és 200 mg/l ETBE-vel szennyezett rendszerekhez, az ETBE koncentrációja sem az Abiotikus, sem a Biotikus, sem pedig a Bioaugmentált 3. rendszerekben nem változott a kísérlet során (vizsgálati eredményeinket befolyásoló mértékben). Az áttekinthetőség érdekében az Abiotikus minták TBA-, illetve a Biotikus és a Bioaugmentált 3. mikrokozmosz rendszerek ETBE- és TBA-koncentrációit nem tüntettem fel a diagramon.

5.13.4. A mesterséges konzorciummal végzett mikrokozmosz kísérletek eredményeinek összefoglalása

A konzorciummal végzett mikrokozmosz tesztek segítségével megvizsgáltuk, hogy a különböző koncentrációjú (50-500 mg/l) ETBE-vel szennyezett talajvizek toxikusak-e a kísérletbe bevont mikrobák számára, a vizekben történik-e biológiai lebontás, illetve hogy tartósan halmozódik-e fel intermedier (TBA), mely egy *in situ* remediáció során akár komoly egészségügyi és környezeti kockázatot is rejthet magában.

A kísérletek összegzéseként elmondható, hogy a mesterséges konzorcium tagjai kiválóan tudtak együttműködni, hiszen az összes beoltott mikrokozmoszban, a TBA ideiglenes

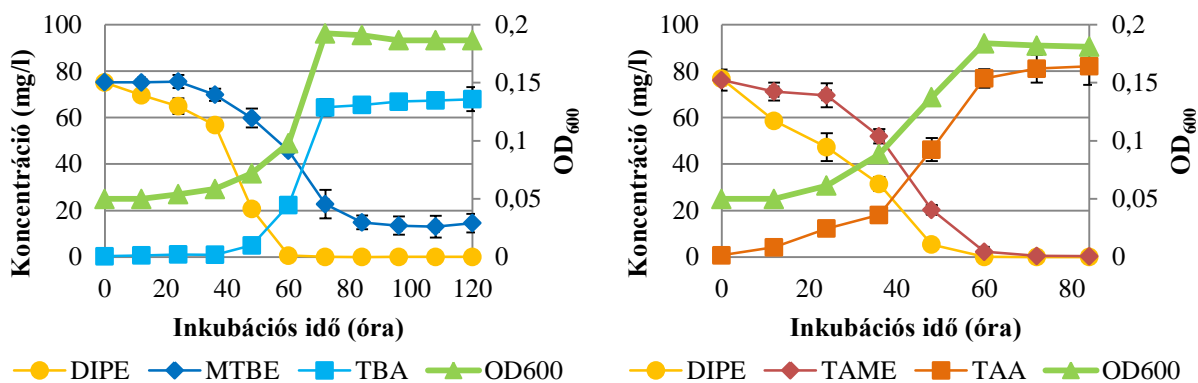
felhalmozódását követően, az ETBE mineralizációját tapasztaltuk. Az általunk vizsgált legmagasabb ETBE koncentráció és a bomlás során keletkező intermedierek koncentrációja sem bizonyult toxikusnak a konzorcium tagjai számára.

Mindhárom talajvízzel végzett kísérlet eredménye azt támasztotta alá, hogy az általunk létrehozott mesterséges konzorcium kiemelkedő hatékonysággal képes bontani az ETBE-t, minimális, átmeneti TBA-akkumuláció mellett. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy e két baktérium konzorciuma jelentős potenciált hordoz magában, mind az aerob *in situ* és *ex situ* (pl.: bioreaktorok) talaj- és talajvízkezelésben, illetve akár ipari szennyvizek tisztítása során is.

5.14. A CH28 jelű izolátum kometabolikus képességeinek felmérése

Az üzemanyag-oxigenátként alkalmazott éterek CH28 általi hatékony bontását igazoltuk a DIPE és az ETBE esetében. A szubsztrát hasznosítási vizsgálatokban (5.9 fejezet) megbizonyosodtunk afelől, hogy a CH28 jelű izolátum nem képes az MTBE-t és a TAME-t egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítani. Azonban az ETBE mikrobiális bontásának szakirodalma (2.8.2 fejezet), különös tekintettel a **6. ábrára** (2.8.2.1 fejezet) kérdéseket vetett fel bennünk. Az *ethABCD* géneket hordozó, az MTBE, az ETBE, a DIPE és a TAME bontására képes L108 törzsből spontán mutációval létrejött L10 törzs elveszítette *eth* operonját, így a továbbiakban nem volt képes egyik üzemanyag-oxigenát éter bontására sem (70). Az L108 törzsből hiányzik az IFP 2001 és a CH28 törzsekben azonosított *ethR* szabályozó gén, ezáltal az *ethB* gén folyamatosan kifejeződik (68, 70, 72). A fentieknek köszönhető, hogy az L108 nemcsak az ETBE és a DIPE, hanem a TAME és az MTBE bontására is képes. Az *eth* operon esetében bizonyították, hogy ETBE-vel történő indukció hatására tapasztalható az MTBE és a TAME kometabolikus bontása (77). Mivel az *ethR* gén nemcsak az ETBE-vel, de DIPE-vel is indukálható, így felvetődött bennünk az a kérdés, hogy vajon DIPE-vel történő indukció hatására is lejátszódik-e az MTBE és a TAME kometabolizmusa. Annak érdekében, hogy ezt megvizsgáljuk mikrokozmosz kísérleteket állítottunk össze a CH28 törzsszel.

A kísérlet eredményei azt mutatták, hogy amennyiben az MTBE, vagy a TAME mellett jelen van a DIPE, akkor a CH28 képes ezeket az étereket is átalakítani. A bontás során mindkét esetben sztöchiometrikus arányban keletkeztek intermedierek: az MTBE-ből TBA, a TAME-ből pedig TAA. Hasonlóan az ETBE degradációjánál tapasztaltakhoz, a keletkezett köztitermékek (TBA és TAA) tovább már nem bomlottak, akkumulálódtak.



32. ábra: Az MTBE és a TAME kometabolikus bontása. A másodlagos tengelyen a bal oldali diagram esetében a DIPE-vel és MTBE-vel, a jobb oldali esetében pedig a DIPE-vel és TAME-vel kiegészített mikrokozmoszokban mért OD₆₀₀ értékeket tüntettük fel. A hibásávok a három párhuzamos minta szórását jelölik

A **32. ábrán** található diagramokon látható, hogy az MTBE-vel és a TAME-vel kiegészített rendszerekben a DIPE degradációja már a 60. óra végére lejátszódott. A diagramokon feltüntetett MTBE-s és TAME-s rendszerekben a mért végső OD₆₀₀ értékek (**32. ábra**) is csaknem teljesen azonosak voltak, ráadásul közelítőleg teljesen megegyeztek a csak DIPE-vel indított mikrokozmoszokban mért OD₆₀₀ értékekkel. Ez arra enged következtetni, hogy a degradáció során az MTBE és a TAME nem, vagy csak igen kismértékben hasznosul egyedüli szén- és energiaforrásként. Az **1. ábrán** (2.2 fejezet) látható, hogy az MTBE és a TAME degradációja során nemcsak TBA és TAA, hanem formaldehid is keletkezik, amelyet a CH28 képes egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítani. Ezen a szubsztráton a CH28 csak minimálisan képes szaporodni, így ebből a bontási reakcióból számottevő OD₆₀₀ növekedés nem várható. A lebontási folyamat során keletkezett formaldehidet egyik mikrokozmosz rendszerből sem sikerült detektálnunk, ami arra enged következtetni, hogy a CH28 esetében a degradációs folyamatok során nem várható formaldehid akkumuláció.

Habár a DIPE lebontásához mindkét esetben 60 óra volt szükséges, azonban a kezdeti szakaszban a TAME esetében sokkal gyorsabb tempóban degradálódott a DIPE, mint az MTBE-vel kiegészített mikrokozmoszokban. A 36. órában az MTBE-s mikrokozmoszokban 57 mg/l volt a DIPE koncentrációja, a TAME-s rendszerekben ezzel szemben már csak 31 mg/l. A kísérlet teljes időtartalmát tekintve a 2-propanol koncentrációja mind az MTBE-s, mind pedig a TAME-s rendszerekben 7 mg/l alatt maradt. Az acetón koncentrációjának változása azonban jelentősen eltért a kétféle rendszer között: az MTBE-s mintákban a

maximális koncentrációt a 60. órában mértük, míg a TAME-s mikrokozmoszokban a legmagasabb értéket a 24. órában detektáltuk. Ráadásul nemcsak időbeli, de jelentős koncentrációbeli különbséget is meg tudtunk figyelni: a DIPE-vel és MTBE-vel kiegészített rendszerek esetében a legnagyobb koncentráció 63 mg/l, míg a DIPE-vel és TAME-vel kiegészített mikrokozmoszokban csak 23 mg/l volt.

A kísérlet közben megfigyelt OD_{600} értékek változásai is a fenti trendet követték, tehát a TAME-s tesztrendszerekben gyorsabban szaporodtak a baktériumok, mint az MTBE-s mintákban. Az acetone lebomlása után azonban a kétféle rendszerben közel azonosak, mérési hibahatáron belüliek voltak a mért OD_{600} értékek.

Az MTBE és a TAME eltérő bontási sebességének az okát egyelőre nem tudtuk teljes mértékben megfejtetni, valószínűleg a két vegyület közötti eltérő szerkezeti tulajdonságokból eredhet, nem pedig a köztitermékek (TBA és TAA) megjelenéséből és akkumulációjából. Ezt a feltételezésemet arra alapozom, hogy az értekezésemben be nem mutatott előkísérleteink során az ebben a kísérletben keletkező TBA és TAA mennyiségénél jelentősen nagyobb TBA és TAA koncentráció (akár 300 mg/l) esetében sem tapasztaltunk gátló hatást. Habár a kezdeti koncentrációt a tesztrendszerekben egységesen 75 mg/l-re állítottuk be, ez anyagmennyiségre vonatkoztatva több MTBE-nek (0,0425 mmol) felel meg, mint TAME-nak (0,0367 mmol). Valószínűsíthetően ez a magyarázata annak is, hogy a 75 mg/l DIPE (0,0367 mmol) nem bizonyult elegendőnek a 75 mg/l MTBE lebontásához.

Az Abiotikus, a csak MTBE-vel és a csak TAME-vel adalékolt mikrokozmoszok esetében nem tapasztaltuk egyik éter bomlását, illetve köztitermékek keletkezését sem.

5.15. Laboratóriumi oszlopkísérletek DIPE és ETBE bontásának modellezésére

A batch mikrokozmosz tesztek mellett megvizsgáltuk a *Mycolicibacterium* sp. CH28 törzs DIPE-, továbbá a mesterségesen létrehozott konzorcium ETBE- és TBA-bontó potenciálját átfolyós, a terepi körülményekhez a batch rendszereknél jobban hasonlító körülmények között is. Az oszlopkísérletek egyik elsődleges célja volt, hogy az általunk izolált törzsek számára találjuk egy olyan felületet, hordozót, amelyen képesek hatékonyan megtapadni és sejtszámnövekedést produkálni. A megfelelő töltet megtalálása a későbbi terepi kezelés során, például permeábilis reaktív barrier (PRB) telepítésekor meghatározó jelentőségű.

5.15.1. Oszlopkísérletek DIPE-vel kiegészített minimál tápoldattal

5.15.1.1 Előkísérletek

A tesztelendő oszloptöltetek kiválasztásakor fő szempontjaink között szerepelt, hogy a töltet ne adszorbeálja számottevő mértékben sem az étereket, sem bomlástermékeiket. Az előkísérletek során számos hordozót kipróbáltunk, melyek közül a többféle (szemcseméretű) homok, illetve a P2-es perlit nem bizonyult megfelelőnek, ugyanis a CH28 nem tudott kellő tömegben megtapadni az adott felületeken, így az ezekkel a töltetekkel összeállított oszlopreaktorok biodegradációs potenciálja is a várakozásunkon aluli maradt. Előkísérleteink alapján a P3 perlit és tőzeg 1:4 tömegarányú keverékén, továbbá az agyaggranulátumon képes volt a CH28 megtapadni és szaporodni, így további vizsgálataink során is ezeket a tölteteket használtuk.

A CH28 aerob mikroorganizmus, ezért szükséges volt megoldani az oszlopreaktorok folyamatos üzemben történő oxigénellátását. Az oszlopteszték során a lebontáshoz szükséges megfelelő mennyiségű oxigént magnézium-peroxiddal, hidrogén-peroxiddal, továbbá sterilre szűrt levegővel biztosítottuk.

A szakirodalomban a magnézium-peroxidot naftalinnal és toluollal szennyezett talajvizek bioremediációjában sikeresen alkalmazták a PRB kialakítását megelőző oszlopkísérletekben (166). Azonban mi a kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a töltet „felvízi” részében elhelyezett magnézium-peroxidos réteg ugyan képes volt a kellő mennyiségű oxigén leadására, azonban a kialakult életfeltételek (valószínűleg a pH eltolódása következtében) kedvezőtlennek bizonyultak a CH28 jelű izolátum számára.

Kármentesítési eljárások során a hidrogén-peroxidot, nemcsak mint oxidáló ágenst (167, 168), de mint oxigénleadó vegyületet is alkalmazzák (169, 170). Oszlopreaktorban kipróbálva a vegyületet, az eredményeket vizsgálva egyértelművé vált számunkra, hogy a hidrogén-peroxid már önmagában oxidálja a DIPE-t, így ezt a vegyületet további tesztjeinkben nem kívántuk felhasználni, mivel az oszlopkísérleteket a CH28 biodegradációs potenciáljának felmérésére végeztük. Azonban azt érdemes megemlíteni, hogy törzsünket az oszlopról távozó vízből ezekben a vizsgálatokban is ki tudtuk mutatni, ráadásul a baktériumsejteket DM tápoldatba visszaolttva DIPE-bontást tapasztaltunk, ezáltal igazolódott, hogy a CH28 képes tolerálni a hidrogén-peroxidos közeget. Izolátumunk e tulajdonsága bioremediációs szempontból kedvezőnek tekinthető, hiszen egy kémiai kármentesítéssel elősegített biodegradációval, különösképpen nagy szennyezőanyag koncentrációjú területeken, jelentős mértékben növelhető a lebontás sebessége. Kashir és munkatársai MTBE

hidrogén-peroxiddal történő kémiai oxidációja esetében megfigyelték, hogy az oxidáló ágens nanovas vagy citromsav jelenlétében képes jelentős mértékben regenerálódni (167, 168). Egy esetleges kémiai-biológiai kármentesítés reményében a későbbiekben érdemes lenne a DIPE-vel is hasonló kísérleteket végezni és megvizsgálni azt, hogy a CH28 milyen koncentrációban képes tolerálni a hidrogén-peroxidot. Ezáltal az *in situ* kémiai oxidáció (ISCO) során teljes mértékben le nem bomlott vegyületek, illetve nagyobb DIPE koncentrációjú, a CH28 számára már toxikus talajvizek is kezelhetőek lennének. Jövőbeli terveink között szerepel, hogy törzsünk e képességét jobban megismerjük egy lehetséges kémiai-biológiai kombinált kármentesítési technológia reményében.

A kémiai (magnézium-peroxidos, illetve a hidrogén-peroxidos) kísérleteket követően fizikai eljárással kíséreltük meg a megfelelő mennyiségű oxigént biztosítani az aerob biológiai lebontáshoz. Az eljárás során az oszlopok oxigénnel történő ellátását alacsony térfogatáramú, sterilre szűrt légköri levegő beadagolásával (80 ml/óra) oldottuk meg. A bejuttatott levegő mennyiségét az alapján határoztuk meg, hogy az még biztosan ne okozza a szennyezés elillanását. A felmenő folyadékáramba egy perisztaltikus pumpa segítségével injektáltuk a levegőbuborékokat.

A rendszerekben a DIPE illékonyágát két abiotikus oszlop segítségével vizsgáltuk. Mivel ezek egyikében esetében sem tapasztaltunk párolgást, továbbá az egyes tölteteken történő DIPE megkötődést, így az ETBE-s oszlopnál már nem alakítottunk ki abiotikus rendszereket, mivel a DIPE vízzoldhatósága alacsonyabb, Henry-állandója pedig magasabb az ETBE-énél.

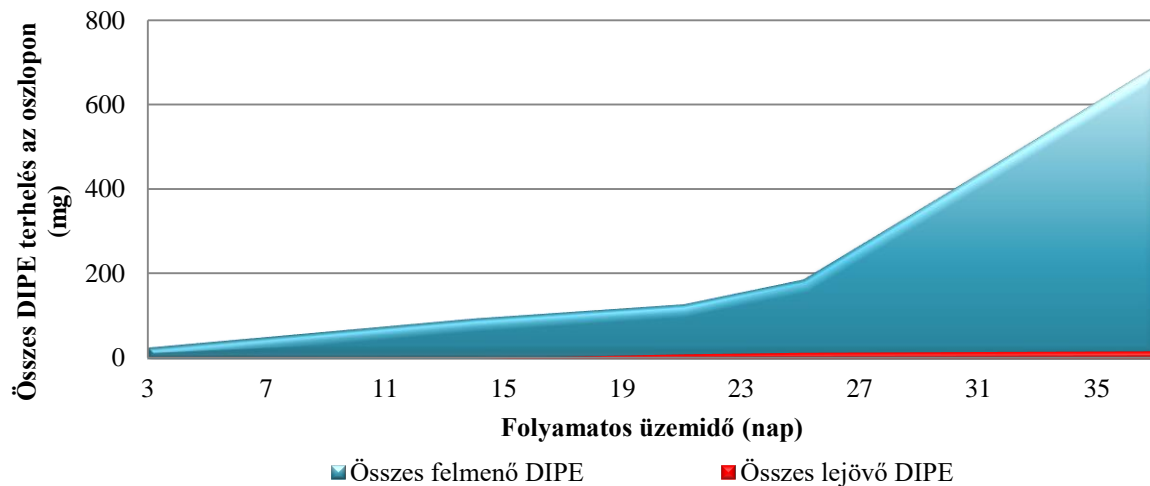
5.15.1.2 Hatékonyan működő oszlopreaktorok

A DIPE-vel, mint szennyezőanyaggal végzett oszlopkísérletek során sikerült két oszlopreaktort is hatékonyan működtetnünk. Mindkét oszlopreaktorban a lebontáshoz szükséges oxigént perisztaltikus pumpa segítségével biztosítottuk. Oszloptöltésként az egyik kísérleti rendszerben P3 perlit és tőzeg 1:4 tömegarányú keverékét, míg a másikban agyaggranulátumot alkalmaztunk. A kísérlet során az oszlopokra felmenő tápoldatban fokozatosan emeltük a DIPE koncentrációját egészen 85 mg/l-ig, majd ezt követően állandó koncentráció (85 mg/l) mellett, az áramlási sebesség növelésével folyamatosan emeltük az oszlopokon tisztítandó MDM minimál tápoldat mennyiségét. A módosított DM tápolda használatát azért tartottuk szükségesnek, mivel a CH28 enyhén savas környezetben aktívabb, és jobban képes szaporodni, mint semleges vagy lúgos körülmények között.

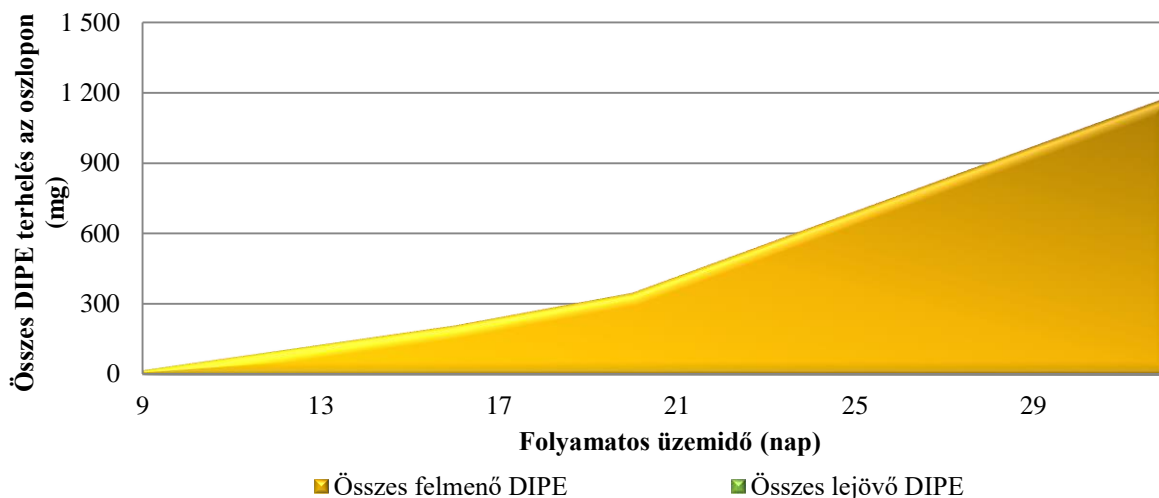
I. szakasz

A levegővel oxigenált oszlopok az első napokban (perlit-tőzeg keverékes oszlop: 1-4. nap, agyaggranulátumos oszlop: 1-9. nap) folyamatosan és zavartalanul üzemeltek, a *Mycolicibacterium* sp. CH28 sejtjei megtapadtak és felszaporodtak a tölteten, beállt két stabil, jól működő rendszer. A sejtek exponenciális szaporodási fázisában (a kísérletsorozat fő szakasza: perlit-tőzeg keverékes oszlop: 4-40. nap, agyaggranulátumos oszlop: 9-32. nap) egységes (500 ml/nap) áramlási sebesség mellett a kezelendő MDM minimál tápoldatban fokozatosan emeltük a DIPE koncentrációját egészen 85 mg/l-ig.

Az oszlopokra összesen felmenő, illetve távozó DIPE mennyiségeket a **33.** és **34. ábrák** mutatják be. A tesztrendszerek átlagolt hatékonysága a kísérlet teljes időtartamát tekintve a perlit-tőzeg töltetes oszlop esetében 94%, az agyaggranulátumos reaktornál pedig 99% felett volt.



33. ábra: A P3-as perlit és tőzeg keverékével töltött oszlop DIPE-bontó potenciálja (I. szakasz)

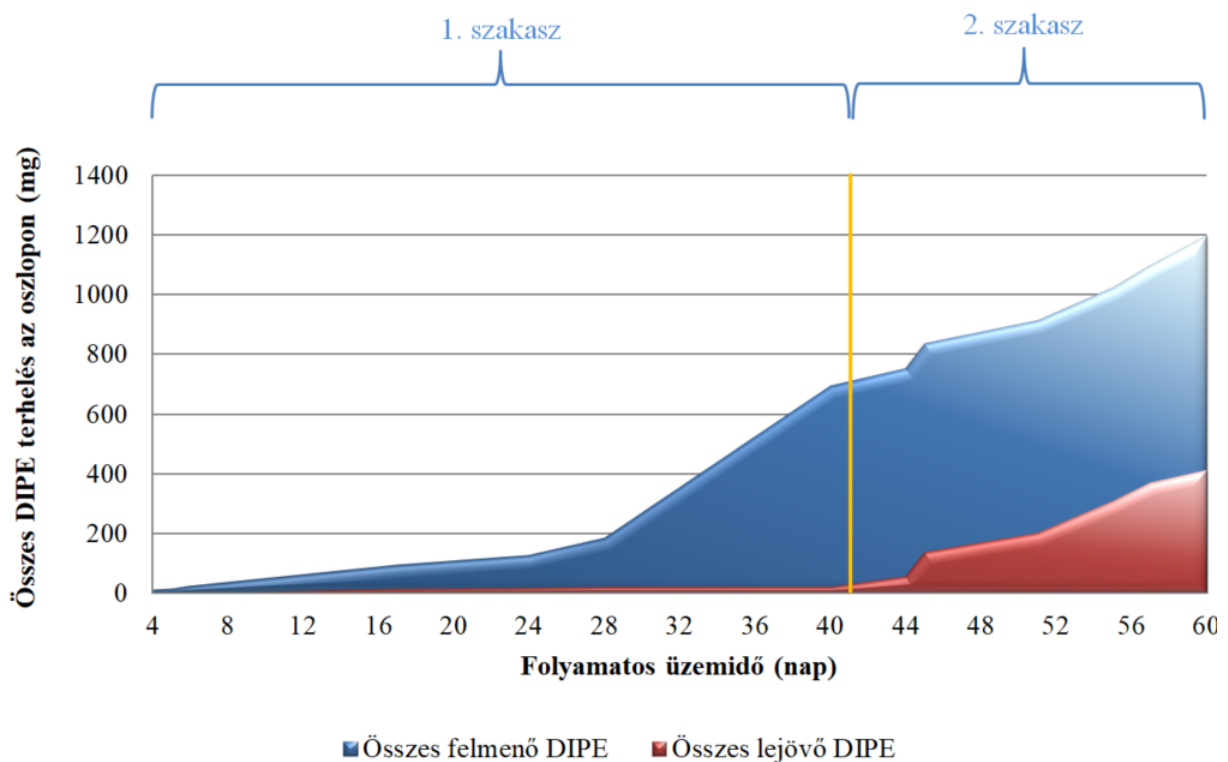


34. ábra: Az agyaggranulátum töltetű oszlop DIPE-bontó potenciálja (I. szakasz)

II. szakasz

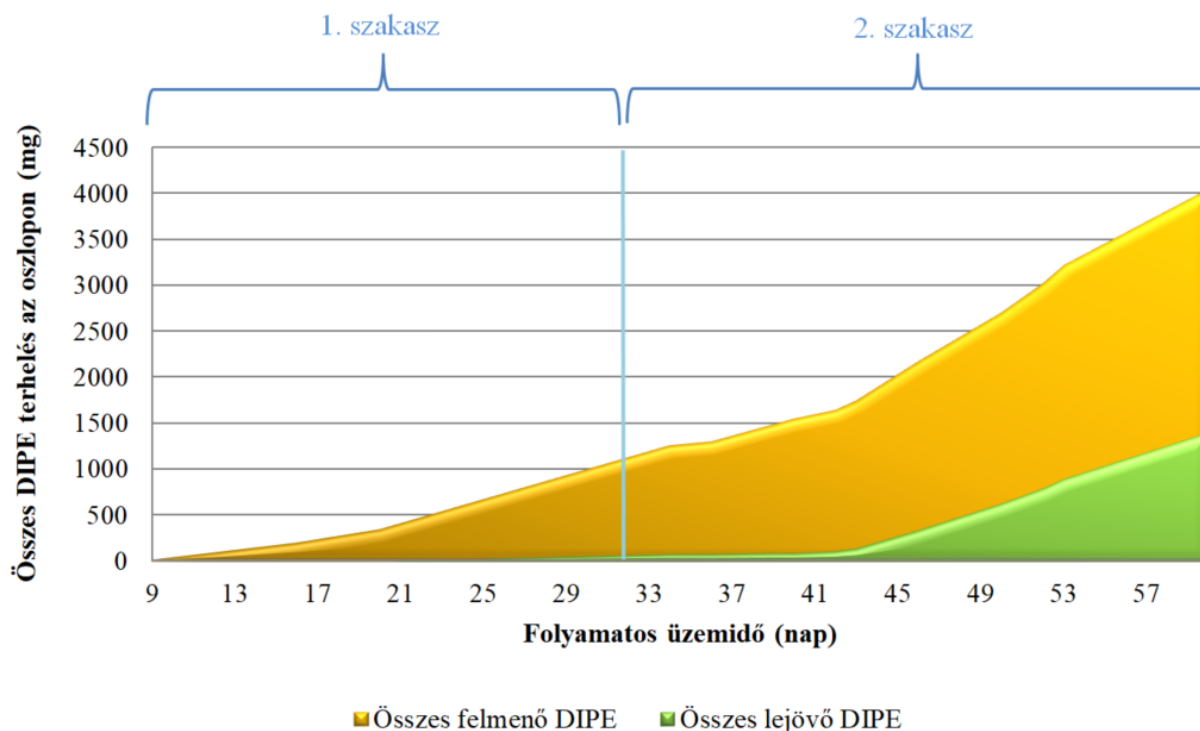
A 85 mg/l koncentrációban alkalmazott DIPE mineralizációjának sikeres elérését követően megvizsgáltuk az oszlopokban a DIPE-bontás hatékonyságát állandó koncentrációjú (85 mg/l), de lépcsőzetesen emelkedő áramlási sebesség mellett. Egy-egy áramlási sebesség növelésnél 100 ml/nap-pal növeltük a tisztítandó tápoldat mennyiségét. Mindkét oszlop kiindulási áramlási sebessége 500 ml/nap volt.

A perlit-tőzeges oszlop nagyon hamar, már 700 ml/nap áramlási sebességnél elérte a teljesítőképessége határát, 800 ml/nap sebességnél pedig a hatékonysága 60% alá esett (35. ábra).



35. ábra: A P3-as perlit és tőzeg keverékével töltött oszlop DIPE-bontó potenciálja (II. szakasz)

Az agyaggranulátumos oszlop lebontási hatékonysága 800 ml/nap áramlási sebességnél (36. nap), még meghaladta a 98%-ot, 900 ml/nap-ra emelve (43. nap) viszont már 69%-ra esett vissza (36. ábra). Ezt követően 3 naponta további 100 ml/nap-pal emeltük az oszlopon kezelendő DIPE-vel kiegészített minimál tápoldat mennyiségét, mely növeléseket követően az oszlop hatékonysága jelentős mértékben nem változott, minden esetben közel 50%-os volt.



36. ábra: Az agyaggranulátum töltetű oszlop DIPE-bontó potenciálja (II. szakasz)

A CH28 jelenlétének igazolására az oszlopkokról távozó mintákból rendszeresen szélesztettünk TSA lemezekre, ahonnan kolónia PCR-eket is végeztünk, mely tesztek során minden alkalommal ki tudtuk mutatni a CH28 törzset.

Az oszlopkísérletek során keletkező intermedierek (2-propanol és acetone) koncentrációja a kísérletek teljes időtartama alatt a kimutatási küszöbérték (20,0 µg/l) alatt maradt. Ezek az eredmények a jövőbeli terepi kármentesítésekre nézve biztatónak tekinthetők, hiszen hasonlóan körülmények között várhatóan az *in situ* kezelése során sem fog toxikus koncentrációban intermedier felhalmozódni.

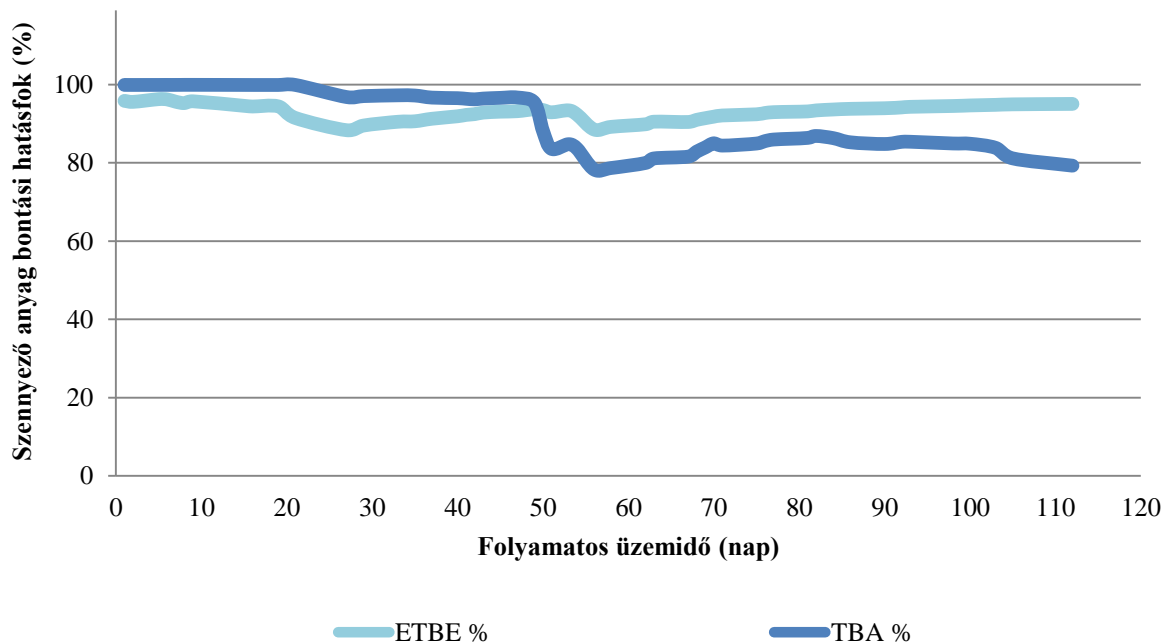
A DIPE-vel végzett oszlopkísérletekről összességében elmondható, hogy a *Mycobacterium* sp. CH28 mind a tőzeg-perlites, mind pedig az agyaggranulátumos oszloptölteteken megtapadt, szaporodást mutatott és kiemelkedő DIPE-biodegradációt produkált, intermedierek felhalmozódása nélkül. A sikeres oszlopkísérletek megerősítik azt a feltételezésünket, hogy az általunk izolált DIPE-bontó baktérium terepi körülmények között, akár nagy (85 mg/l) DIPE koncentráció mellett is komoly potenciált rejt magában.

5.15.2. Oszlopkísérlet ETBE-vel és TBA-val szennyezett talajvízkezelés modellezésére

A sikeres DIPE-bontó oszlopreaktorok létrehozása és fenntartása közben szerzett tapasztalatokat kamatoztattuk az ETBE-bontó oszlopreaktor tervezése, összeállítása és

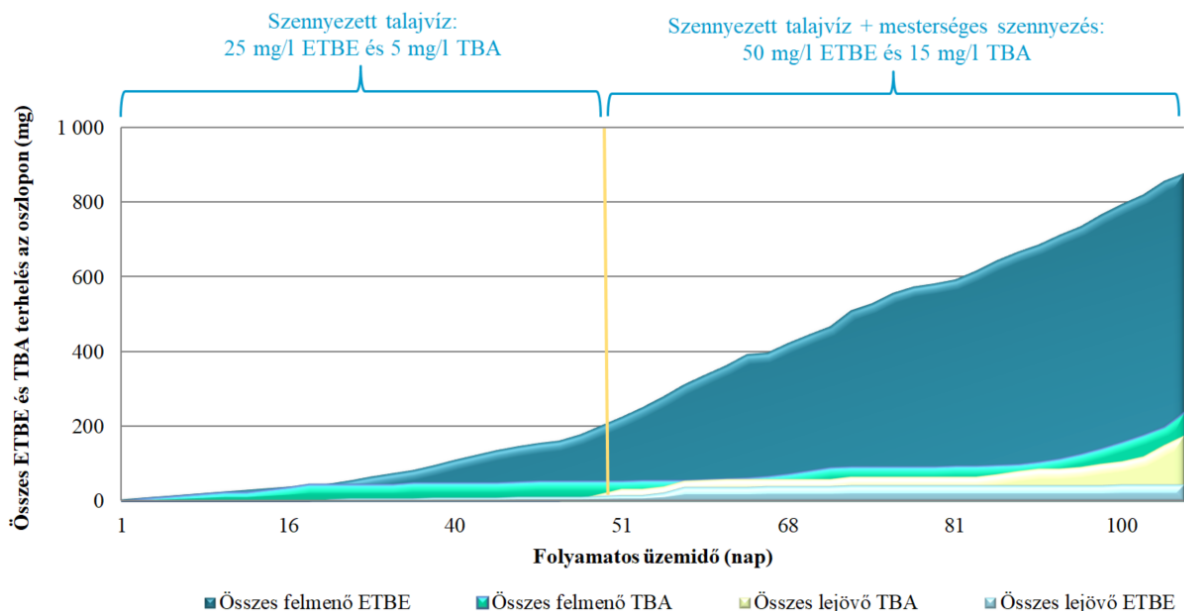
üzemeltetése során. A DIPE-s oszlopreaktorok esetében két összeépített oszloptagot, az ETBE-s tesztnél egyetlen oszlopot használtunk. A különböző méretű és térfogatú rendszerek tesztelésével fel kívántuk mérni, hogy akár egy kisebb, dinamikusabban működő reaktorban is kivitelezhető-e a biodegradáció. Továbbá azonos áramlási sebesség (500 ml/nap) mellett az egyetlen oszlop hátránya a rövidebb tartózkodási idő, előnye viszont az egyenletesebb oxigénellátottság. A mikroorganizmusok számára a lebontáshoz szükséges oxigént, a DIPE-bontó oszlopokhoz hasonlóan, alacsony térfogatáramú levegő beadagolásával biztosítottuk. Az ETBE- (~25 mg/l) és TBA- (~4 mg/l) tartalmú talajvíz kezelésére kialakított oszlop folyamatos üzemideje 112 nap volt.

Az oszlop működtetése során nem tapasztaltunk jelentős hullámvölgyeket, visszaeséseket, az oszlop zavartalanul és hatékonyan működött. A tölteten egyaránt megtapadt az ETBE-bontó CH28, továbbá a TBA-bontó T4 törzs is. A talajvízzel elvégzett mikrokozmosz kísérletekhez hasonlóan, a mesterségesen létrehozott konzorcium tagjai az ETBE hatékony mineralizációját tudták együtt megvalósítani. Az oszlop működési hatásfoka az egész kísérletsorozat alatt ETBE-re vonatkoztatva nem csökkent 88%, illetve TBA-ra nézve 78% alá (**37. ábra**). A teljes kísérletre nézve a lebontási hatékonyságok átlaga mindkét vegyület esetében meghaladta a 90%-ot: az első 50 napban az ETBE esetében 93%, míg a TBA-nál 98% volt a lebontás hatásfoka. Az ETBE és TBA koncentrációk emelkedése az ETBE bontására nem volt jelentős hatással, azonban a TBA-bontás hatékonysága az 50. naptól kisebb csökkenést mutatott. Ennek háttérében feltételezhetően a szennyezett vízhez adalékolt további szennyezés, illetve az alkalmazott oszlopméret áll, ugyanis ennél a kísérletnél csak fele akkora oszlopreaktort használtunk, mint a DIPE-s tesztekben, így a lerövidült tartózkodási idő a T4 számára már nem bizonyult elegendőnek.



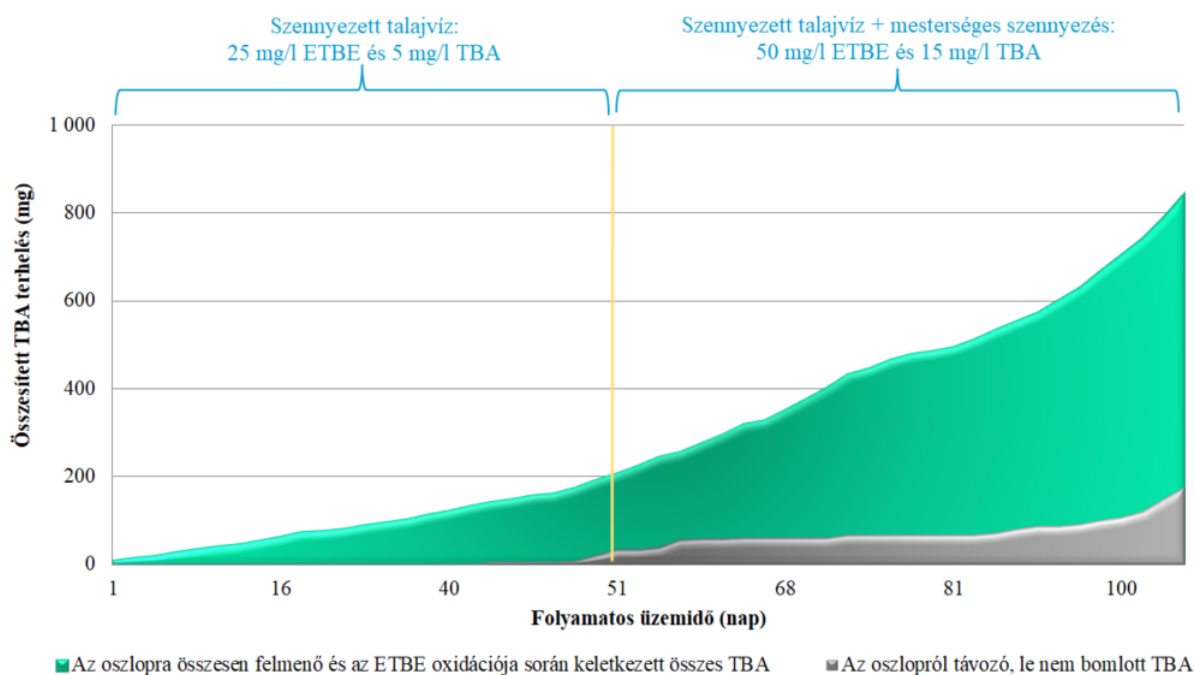
37. ábra: Az ETBE-vel és TBA-val szennyezett talajvízzel működtetett oszlopreaktor szennyező anyag bontási hatásfoka

Az oszlopra felmenő, ETBE-vel és TBA-val szennyezett talajvíz (1-49. nap), majd a mesterségesen hozzáadott ETBE- és TBA-szennyezés (50-112. nap) összesített mennyiségét a 38. ábrán tüntettem fel. A diagramon ábrázoltam az oszlopról távozó, tisztított talajvízben mért összesített ETBE- és TBA-mennyiségeket.



38. ábra: Az ETBE-vel és TBA-val szennyezett talajvízzel működtetett oszlopreaktor ETBE-bontó potenciálja

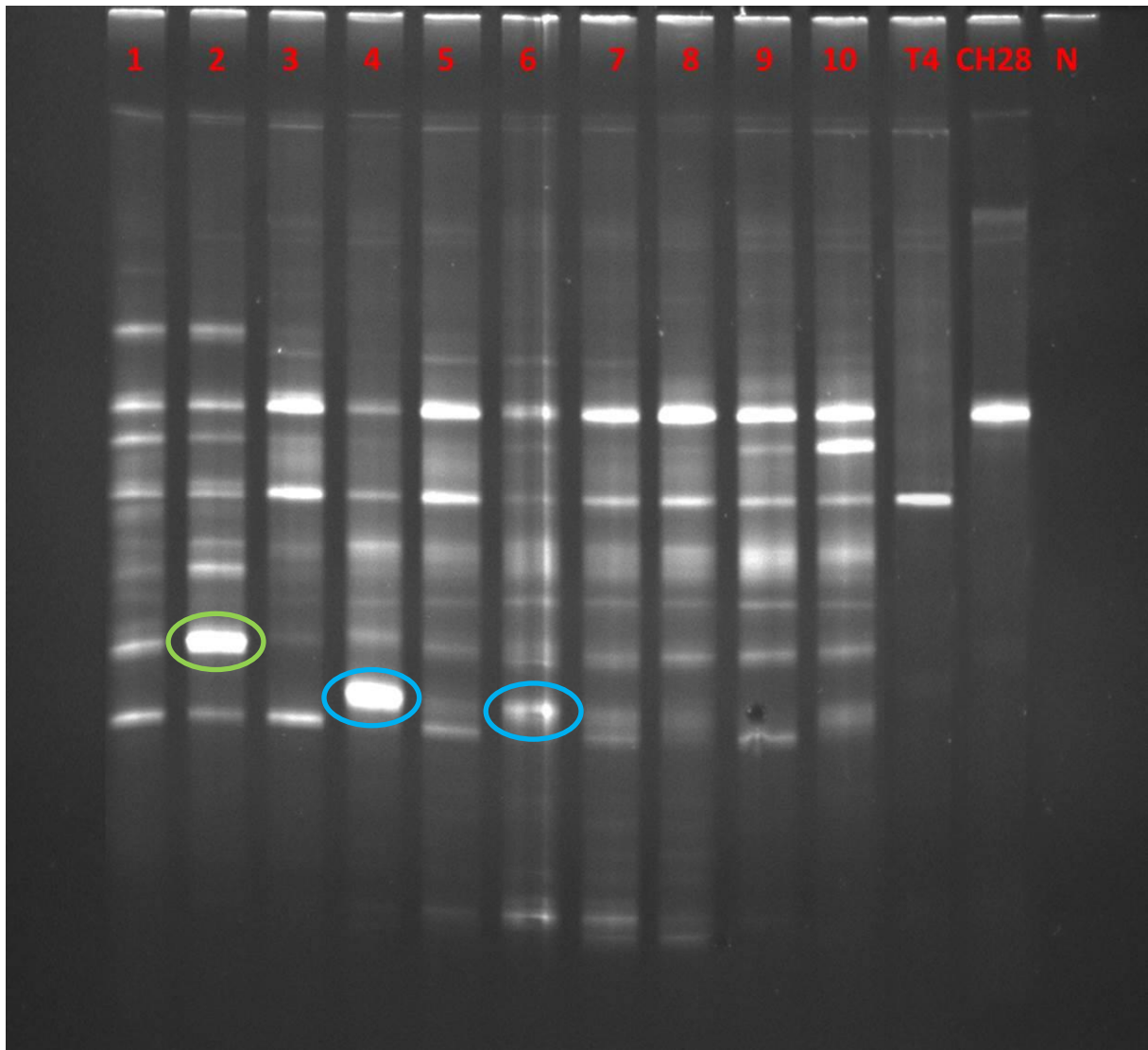
A TBA degradációjának szemléletesebb bemutatása érdekében a **39. ábrán** az oszlopra felmenő összes TBA mennyiségéhez hozzáadtam az ETBE oxidációja során, intermedierként keletkező TBA mennyiségét, ezáltal megkaptam a kísérlet során az oszlopra jutó és ott megjelenő összes TBA mennyiségét. Az ábrán szürkével tüntettem fel az oszlopról távozó, kezelt talajvízből kimutatott összes TBA-t.



39. ábra: Az oszlopra összesen felmenő és az ETBE oxidációja során keletkező összes TBA mennyisége, illetve az oszlopról távozó TBA összesítése

A mért VOC koncentráció változások alapján elmondható, hogy az általunk létrehozott mesterséges konzorciummal sikerült egy jól működő, a nehezen mineralizálható ETBE-t alacsony TBA-akkumuláció mellett bontó oszlopreaktort létrehozni, majd 112 napon át üzemeltetni.

Az ETBE-s oszlopról távozó mintákból kéthetente DNS-t tisztítottunk, majd megmértük a mintákban a DNS koncentrációját, amelynek értéke az összes mérés során 2,4-8,0 ng/ml között változott. A tisztított DNS mintákat DGGE-vel analizáltuk, a gélről készített fotó a **40. ábrán** látható. Az első tíz minta az oszlopról távozó mintákat ábrázolja, a következő kettő pedig a tiszta T4, illetve CH28 törzsek DGGE mintázatát mutatja be, míg az N minta a negatív kontroll. Az eredményekből látható, hogy a két törzs az összes mintavétel során kimutatható volt.



40. ábra: Az ETBE-s oszlopról távozó vizekből készített DGGE

A DGGE mintázat alapján látható, hogy más mikroorganizmusok is megtelepedtek az oszlopon. Ezek közül három DNS fragmentet kivágtunk, a módszerleírásban (4.15.3 fejezet) ismertetett módon előkészítettünk, majd elküldtünk szekvenálásra. A 2. mintából (a **40. ábrán** zölddel bekarikázva) egy *Pseudomonas brenneri*, a 4-ből és a 6-ból (a **40. ábrán** késsel bekarikázva) pedig egy-egy *Cupriavidus necator* törzset azonosítottunk. A szakirodalomban nem találtunk arra példát, hogy ezek a mikroorganizmusok meghatározóak lennének a kérdéses vegyületek, vagy azok bomlástermékeinek degradációjában.

Úgy véljük, hogy kísérletünknek jelentős szerepe lehet az egyre gyakrabban megjelenő ETBE-vel adalékolt üzemanyag eredetű szennyezések biológiai kármentesítése során. A konzorcium használható közvetlenül a talajba injektálva, vagy akár permeábilis reaktív barrierek (PRB-k) telepítése során is, melynek kiváló töltete lehet a tesztben alkalmazott perlit-tőzeg keverék.

A szakirodalomban még nem publikáltak DIPE-vel és ETBE-vel végzett oszlopkísérleteket, így kísérleteink eredményeit egy másik üzemanyag-oxigenátként alkalmazott éterrel, az MTBE-vel tudjuk összehasonlítani. Liu és munkatársai két különálló oszlopból kialakított rendszer segítségével tanulmányozta az MTBE biodegradációját (171). Kísérletükben az első oszlop a lebontáshoz szükséges oxigént (kalcium-peroxid formájában), illetve a degradációs folyamatokat elősegítő ásványi sókat tartalmazott. A második oszlopot expandált perlittel töltötték meg, melynek felületén el tudott szaporodni az MTBE biológia lebontására képes kultúra. A kezelendő, mesterségesen szennyezett víz 160 mg/l MTBE-t tartalmazott, áramlási sebessége megegyezett az általunk is alkalmazott kiindulási áramlási sebességgel (500 ml/nap). A kezelendő víz tartózkodási ideje 80 óra volt. A mi kísérleteinkben lényegesen rövidebb volt a tartózkodási idő (500 ml/nap áramlási sebességgel számolva): a DIPE tesztek során a perlit-tőzeg keverékes oszlopnál 16,8 óra, míg az agyaggranulátumos oszlopnál 21,6 óra. Az ETBE-s oszlopnál pedig 8,4 óra volt a tartózkodási idő. Az MTBE-vel végzett oszlopkísérlet esetében nem egyedi törzseket, hanem talajvízből MTBE-n, mint egyedüli szén- és energiaforráson felszaporított mikroba konzorciumot vizsgáltak. A kísérletben ~50%-os MTBE eltávolítást sikerült elérniük. Az MTBE lebontása során keletkező TBA a kísérlet első felében ideiglenesen akkumulálódott, majd a lag fázist követően elkezdett biodegradálódni. Az általunk végzett kísérletek esetében a tesztelt éter koncentráció kisebb (85 mg/l DIPE, illetve 50 mg/l ETBE + 15 mg/l TBA), azonban a tartózkodási idő jelentősen rövidebb volt, emiatt nehéz összehasonlítani az eredményeket. A DIPE biodegradációját modellező oszlopok esetében 500 ml/nap áramlási sebességnél 85 mg/l DIPE koncentráció esetében a perlit-tőzeg töltetes oszlopnál ~94%, míg az agyaggranulátumos reaktornál ~99% volt a hatásfok. A keletkező köztitermékek (2-propanol és aceton) koncentrációja a kísérlet teljes időtartama alatt a kimutatási határ alatt marad, így a bomlás során nem akkumulálódott toxikus vegyület. Az ETBE-vel és TBA-val adalékolt szennyezett talajvíz (50 mg/l ETBE + 15 mg/l TBA) kezelése során az ETBE esetében ~90%, a TBA esetében pedig ~80% volt a lebontás hatásfoka.

Az oszlopkísérletek összegzéseként elmondható, hogy sikerült olyan oszlopreaktorokat kialakítanunk, amelyekben a DIPE-s oszlop esetében a CH28, az ETBE-vel és TBA-val szennyezett oszlopnál pedig az általunk létrehozott mesterséges konzorcium képes volt megtapadni és elszaporodni. Az oszlopokban a DIPE és az ETBE mineralizációja eredményesen meg tudott valósulni. A hatékonyan működő DIPE-s oszlopok esetében

közttermékeket (2-propanol és acetont) nem tudunk kimutatni, ami arra enged következtetni, hogy feltételezhetően terepi körülmények között sem fognak akkumulálódni ezek a vegyületek. Az ETBE-s oszlop esetében a szennyezett területről származó talajvízben található ETBE és TBA lebontása szinte teljes mértékben megvalósult, így a továbbiakban mesterségesen szennyeztük a talajvizet. Az ETBE oxidációja során tartósan és nagy mennyiségben nem halmozódott fel TBA. Legjobb tudomásunk szerint a szakirodalomban korábban még nem írtak le sikeresen megvalósult oszlopkísérleteket sem DIPE-vel, sem pedig ETBE-vel, emiatt munkánk mindenképp egyedinek tekinthető.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A gépjárművek rohamos elterjedéséből és az üzemanyag-fogyasztás folyamatos emelkedéséből következik, hogy egyre inkább fokozódik az üzemanyag-adalékok iránti kereslet is. A kopogásgátlóként használt ólom-tetraetil kiegészítő komponens betiltását követően jellemzően az oxigenát adalékok terjedtek el, melyek az oktánszám növelése mellett biztosítják az üzemanyagok tökéletesebb égését is, ezáltal csökkentve a szén-monoxid, az ózon és egyéb toxikus vegyületek kibocsátását. Az éter típusú üzemanyag-oxigenátok hátránya, hogy kiváló vízdoldhatóságuknak köszönhetően könnyen elszennyezhetik a felszíni és a talajvizet, mellyel veszélyeztetik az élővilágot és az ivóvízbázisokat. Ezek a vegyületek stabil kémiai szerkezetükből adódóan rendkívül ellenállóak a különböző fizikai-kémiai és biológiai degradációs folyamatoknak.

Az oxigenátok üzemanyag-adalékként történő felhasználása során kezdetben az MTBE domináns kiemelkedő oktánszámnövelő tulajdonságának és az üzemanyagokkal való tökéletes keveredésének köszönhetően. Az MTBE széleskörű használata maga után vonta az MTBE-vel szennyeződött területek számának rohamos növekedését. A vegyület kiváló vízdoldékonysága révén komoly, nagy kiterjedésű és tartós környezeti problémákat okozott. Habár az oxigenátok humán egészségügyi hatásairól még keveset tudunk, állatkísérletekben bebizonyosodott az MTBE rákkeltő hatása, így potenciális humán karcinogénnek minősül. Az MTBE-t negatív tulajdonságai miatt számos országban a hasonló fizikai és kémiai sajátságokkal rendelkező ETBE váltotta fel, de egyéb üzemanyag-oxigenátok (pl.: TAME, DIPE) is egyre szélesebb körben terjednek el.

Az MTBE globális használata és a szennyezett területek jelentős száma miatt számos, az MTBE bontására képes mikroorganizmust és konzorciumot írtak le. Sokkal kevesebb ismerettel rendelkezünk azonban az ETBE-, illetve DIPE-bontó mikroorganizmusokról, holott az MTBE háttérbe szorulásával az e vegyületekkel szennyezett területek mennyisége folyamatosan növekszik. Környezetvédelmi és költséghatékonysági szempontból is a bioremediáció tekinthető a leghatékonyabb választásnak ezeknek a területeknek a kezelésére. A sikeres biodegradációhoz azonban szükség van olyan egyedi mikroorganizmusokra vagy konzorciumokra, amelyek hatékonyan, az emberi egészség veszélyeztetése és a környezetre káros melléktermékek tartós felhalmozódása nélkül képesek lebontani az adott szennyezést. Munkánk során ezért célunk volt egy olyan baktériumtörzs izolálása és mélyreható vizsgálata, amely képes az ETBE és a DIPE hatékony biodegradációjára.

DIPE-vel szennyezett terület monitoring kútjaiból származó talajvizek felhasználásával DIPE-n, mint egyedüli szén- és energiaforráson történő dúsítással egyedi telepek izolálását végeztük el. A dúsítási eljárás során izolált baktérium, a *Mycolicibacterium* sp. CH28 az Aktinobaktériumok törzsébe, azon belül pedig a Mycobacteriaceae családba, a *Mycolicibacterium* nemzetségéhez („*Fortuitum-Vaccae*” klád) tartozik. A CH28 a gyors növekedésű, nem patogén mikobaktériumok közé sorolható.

A *Mycolicibacterium* sp. CH28 sejtjei a mikobaktériumokra jellemzően pálcika alakúak, átlagosan 2,0 µm x 0,8 µm nagyságúak. A TSA lemezen felnőtt telepek kezdetben enyhén sárgás, majd további pár nap inkubációt követően narancssárgás, kissé barnás színűek. A törzs teljes genom szekvenciájából nyert adatok alapján feltételezhető, hogy a narancssárga színért a törzsben megtalálható karotinoid pigment(ek) felelős(ek).

A törzs vázlatos genomja 6 046 830 bp méretű, G +C tartalma 66,7%-os, mely a nemzetségen belül átlagosnak tekinthető. A genom szekvencia adatok alapján sikerült azonosítanunk a citokróm P450 monooxygenázok közé tartozó EthB enzimet kódoló *ethB* gén jelenlétét (158), amely 99%-os hasonlóságot mutatott a *R. ruber* IFP 2001 és az *A. tertiaricarbonis* L108 azonos génjeivel (68, 70). Ez az eredmény jelentősnek tekinthető, hiszen ez a monooxygenáz bizonyítottan felelős az ETBE, a DIPE és más dialkil éterek degradációjáért.

A genomok összehasonlító analízise során három olyan baktériumot találtunk, amelyek legalább 98,7%-os hasonlóságot mutattak a *Mycolicibacterium* sp. CH28, azonban ezek OGRI-n alapuló részletes vizsgálata arra enged következtetni, hogy az általunk izolált, CH28 jelű törzs valószínűsíthetően új fajnak tekinthető.

Részletesen megvizsgáltuk a CH28 által hasznosítható szubsztrátok spektrumát. A törzs az alábbi vegyületeket tudta egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítani: metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, etilén-glikol, glicerin, formaldehid, acetone, hangyasav, ecetsav, piroszőlősav, *n*-dodekán, *n*-hexadekán, *n*-oktadekán, prisztán, *m*-xilol, *p*-xilol, dietil-éter, ETBE, DIPE, Tween 80, PEG 200, PEG 1500, PEG 4000, PEG 6000, PEG 20000. A CH28 az alábbi vegyületeket nem volt képes egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítani: propionaldehid, citromsav, *n*-pentán, *n*-hexán, *n*-dekán, *n*-undekán, *n*-eikozán, *n*-dokozán, ciklohexán, benzol, toluol, etilbenzol, *o*-xilol, fenol, naftalin, MTBE, TAME, TBA, TAA, anizol, 1,4-dimetoxibenzol, bifenil, difenil-éter és tetrahidrofurán. Összességében elmondható, hogy az általunk izolált baktérium meglehetősen széles szubsztrát-spektrummal rendelkezik, hiszen képes normál alkánok, monoaromás vegyületek, elágazó láncú szénhidrogének, dialkil-éterek, egyszénatomos vegyületek, számos rövid szénláncú alkohol és

szerves sav bontására. A törzs robosztus metabolikus kapacitása reményeink szerint kiválóan kamatoztatható lesz majd kevert szénhidrogénekkal (pl.: üzemanyaggal) szennyezett közegek bioremediációja során.

A CH28 törzs 10-35 °C közötti hőmérséklet-tartományban mutatott növekedést, ezen belül az optimális hőmérsékleti intervallum 30-32 °C közé esett. A baktérium pH=3,5-8,5 tartományban mutat növekedést, a CH28 számára ideális közeg pH=5,0-6,0 között volt. Különböző NaCl koncentrációk mellett megvizsgáltuk a törzs sótűrő képességét. A kísérletek során fény derült arra, hogy a CH28 nem tartozik a halotoleráns mikroorganizmusok közé. A CH28 jelű izolátum szenzitív volt az amikacinra, az ampicillinre, az apramicinre, a gentamicinre, a higromicinre, a kanamicinre, a klindamicinre, a kloramfenikolra, a neomicinre, az oxitettraciklinre, a rifampicinre, a sztreptomycinre és a tetraciklinre. A tesztheink eredményei alapján a törzs kismértékű toleranciát mutatott a tobramicinnel szemben, továbbá rezisztens volt a karbenicillinre.

A DIPE lebontása során köztiterméként GC-MS segítségével sikeresen azonosítottuk a 2-propanolt, az acetont és az ecetsavat. A DIPE-lebontás metabolitjaiként keletkező 2-propanolt és ecetsavat a szakirodalomban korábban még nem igazolták. A kimutatott intermedierek birtokában felvázoltuk a mikrobiológiai DIPE lebontás felső szakaszát a CH28 törzsben, melyet korábban még nem írtak le.

Felmértük a CH28 biodegradációs potenciálját „resting cell” (nyugvó sejt) kísérlettel. A vizsgálat során kapott értékeket összehasonlítottuk a szakirodalomban korábban leírt két DIPE-bontó mikroorganizmussal, a *R. ruber* IFP 2001 és az *A. tertiaricarbonis* L108 törzsekkel (68, 70). A biodegradációs ráta mindhárom törzs esetében ugyanabban a nagyságrendben volt. Annak ellenére, hogy az L108 törzs bontja a leggyorsabban a DIPE-t, a biodegradáció során acetont, mint végtermék halmozódik fel. Ezzel szemben a CH28-as törzs az acetont kiválóan tudja egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítani, tehát a degradáció során szén-dioxid és biomassza keletkezik. A teljes mineralizáció lejátszódása több szempontból is előnyösnek tekinthető. Egyrészt a környezetben nem halmozódik fel olyan intermedier, amely az élőlények jelentős részére toxikus. Másrészt a lebontási folyamatból a CH28 törzs nyilvánvalóan több energiát is nyerhet, mint az L108, ezáltal valószínűsíthetően egy szennyezett közegben is hatékonyabban tudna szaporodni, ami jelentős mértékben meggyorsíthatná a lebontási folyamatokat és a szennyezett terület kármentesítését.

DIPE-vel (75 mg/l és 300 mg/l) mesterségesen szennyezett talajvizekkel mikrokozmosz kísérleteket állítottunk össze. A 75 mg/l DIPE-vel összeállított mikrokozmoszok esetében 42 óra, míg a 300 mg/l-es minták esetében pedig 90 óra kellett a teljes mineralizáció

lejátszódásához. Legjobb tudomásunk szerint az általunk talajvizekkel összeállított mikrokozmosz rendszerek voltak az elsőként publikált DIPE szennyezéssel végzett mikrokozmosz kísérletek (161).

A szubsztráthasznosítási tesztek felfedték, hogy habár a CH28 képes az ETBE biodegradációjára is, azonban a lebontás során TBA halmozódik fel. Felhasználva a kutatóintézetünk TBA-bontó *Hydrogenophaga* sp. T4 törzsét létrehoztunk egy olyan mesterséges konzorciumot, amely képes az ETBE hatékony mineralizációjára. A DIPE tartalmú mikrokozmoszokhoz hasonlóan, a rendszerek összeállításához talajvizet használtunk, amelyekhez szennyezésként különböző koncentrációban ETBE-t (50, 200 és 500 mg/l) adtunk. Mindhárom kísérlet során azt tapasztaltuk, hogy a konzorcium tagjai képesek hatékonyan együtt működni, a szennyezés rövid idő alatt mineralizálódott. A 200 mg/l ETBE-t tartalmazó mikrokozmoszok esetében érdemes megemlíteni azt, hogy a csak CH28 törzssel bioaugmentált rendszerekben is tapasztaltuk a mineralizációt, bár ahhoz jelentősen több időre volt szükség, mint a mesterséges konzorciummal inokulált mikrokozmoszoknál. A csak CH28 törzssel bioaugmentált mikrokozmoszokban elért ETBE mineralizáció nemcsak az általunk inokulált mikroorganizmusnak, hanem a helyi mikroba populációnak is köszönhető, hiszen a TBA degradációját csak az endogén mikroorganizmusok tudták végrehajtani.

A CH28 törzs bár nem képes az MTBE és a TAME egyedüli szén- és energiaforrásként történő felhasználására, azonban DIPE-vel indukálva bontani tudta ezt a két üzemanyag-oxigenátot is. A biodegradációs folyamat során TBA, illetve TAA halmozódott fel. Legjobb tudomásunk szerint nekünk sikerült először leírni az MTBE és a TAME DIPE-vel indukált kometabolikus bontását (161).

Perlit-tőzeg keverékkel, illetve agyaggranulátum töltettel aerob oszlopkísérleteket végeztünk a CH28 DIPE-bontó potenciáljának, illetve a mesterségesen létrehozott konzorcium ETBE-bontó képességének átfogóbb megismerése érdekében. Hosszú távon sikerült működtetnünk olyan oszlopreaktorokat, melyekben hatékonyan le tudott játszódni a vizsgált üzemanyag-oxigenátok mineralizációja. A kísérletek során az oszlop elfolyó vizében DIPE esetében csak méréshatárhoz közeli mennyiségben tudtunk intermediereket detektálni, míg az ETBE-s oszlopnál minimális TBA akkumulációt követően rendszerint teljes mineralizáció játszódott le. Vizsgálataink egyedinek tekinthetőek, hiszen a szakirodalomban nem találtunk DIPE-vel és ETBE-vel végzett oszlopkísérleteket.

Összefoglalásként elmondható, hogy az általunk izolált *Mycolicibacterium* sp. CH28 egy olyan új baktérium törzs, amely nemcsak számos üzemanyag-oxigenát lebontására, hanem megannyi egyéb környezeti szempontból releváns vegyület (pl.: alkánok, monoaromás

vegyületek, alkoholok, stb.) biodegradációjára is képes. Munkánk során meghatároztuk a baktérium növesztéséhez optimális, illetve aktivitásához minimálisan szükséges környezeti feltételeket. Nyugvó, illetve osztódóképes sejteket tartalmazó mikrokozmosz vizsgálatokban igazoltuk az izolátum DIPE-bontó aktivitását különböző DIPE koncentrációk mellett. A CH28, illetve az általunk korábban azonosított T4 baktérium felhasználásával mesterséges konzorciumot létrehozva nagy hatékonyságú ETBE mineralizációt értünk el. Továbbá megállapítottuk, hogy a CH28 jelű izolátum DIPE jelenlétében képes kometabolikus MTBE-, illetve TAME-bontásra, mely különösen jelentős eredmény az üzemanyag-oxigenátok lebontásának háttérében álló genetikai szabályzások megértéséhez. Eredményeink tekintetében bátran kijelenthető, hogy a CH28 jelű izolátum egy olyan mikroorganizmus, mely amellett, hogy oltóanyagként igen komoly bioremediációs potenciállal rendelkezik DIPE-, illetve ETBE-szennyezett területek kármentesítésében, további vizsgálata segíthet felderíteni az oxigenátok lebontásának molekuláris szintű szabályozását is.

SUMMARY

It follows from the rapid spread of motor vehicles and the continuous increase in fuel consumption that the demand for fuel additives is also constantly increasing. After the ban on lead tetraethyl, which is an antiknock additional component, oxygenate additives have become widespread, which, in addition to increasing the octane number, also ensure a more complete combustion of fuels, thereby reducing emissions of carbon monoxide, ozone and other toxic compounds. The disadvantage of ether fuel oxygenates is that, due to their excellent water solubility, they can easily contaminate the surface water and groundwater thereby endangering wildlife and drinking water supplies. Due to their stable chemical structure, these compounds are highly resistant to various physicochemical and biological degradation processes.

It was the methyl *tert*-butyl ether (MTBE) that initially dominated the use of oxygenates as fuel additives due to its outstanding octane-enhancing properties and perfect mixing with fuel. The widespread use of MTBE led to a rapid increase in the MTBE-polluted sites. The excellent water solubility of the compound has caused serious, extensive, and persistent environmental problems. Although little is known about the human health effects of oxygenates, MTBE has been found to be carcinogenic in animal experiments therefore it is considered a potential human carcinogen. Owing to its unfavourable properties, MTBE has been replaced in many countries by ethyl *tert*-butyl ether (ETBE) which has similar physical and chemical properties, but other fuel oxygenates (e.g. *tert*-amyl methyl ether (TAME), diisopropyl ether (DIPE)) are also becoming increasingly widespread.

Due to the global use of MTBE and the large number of polluted sites, several microorganisms and consortia capable of degrading MTBE have been described. However, much less is known about ETBE- and DIPE-degrading microorganisms, although with the reduction in the use of MTBE, the number of sites polluted with these compounds is constantly increasing. In terms of remediation and cost-effectiveness, bioremediation could be considered to be the most reasonable option to remediate these areas. However, successful biodegradation requires a microorganism or consortium that can efficiently mineralize a given pollution without endangering human health and without lasting accumulation of environmentally harmful by-products. In the present research we aimed to isolate and to fully characterize a bacterial strain capable of efficiently degrading ETBE and DIPE.

In the first phase of our research, we used DIPE contaminated groundwater samples from monitoring wells of a DIPE-polluted site. We managed to isolate a DIPE-degrading

individual strain, *Mycolicibacterium* sp. CH28 by enrichment on DIPE as the sole source of carbon and energy. According to the results of the 16S rDNA analysis the bacterium isolated during the enrichment process belongs to the phylum *Actinobacteria*, to the family of *Mycobacteria*, to the genus *Mycolicibacterium* (“*Fortuitum-Vaccae*” clade). Strain CH28 belongs to the fast-growing, non-pathogenic mycobacteria.

Mycolicibacterium sp. strain CH28 cells are rod-shaped which is typical for mycobacteria, and on average they are 2.0 µm x 0.8 µm in size. Colonies grown on TSA plate were initially slightly yellowish and after a few more days of incubation they became orange, slightly brownish. Based on the whole-genome sequence data, it can be assumed that the carotene pigment found in the strain may be responsible for the orange colour.

A total of 1,214,702 reads were assembled, resulting in 43 contigs (longer than 500 bp) with a total length of 6,046,830 bp. The G+C content (66.7%) of the genome could be considered average in the family of *Mycobacteria*. Based on the genome sequence data, we were able to identify the presence of *ethB* gene coding for a cytochrome P450 monooxygenase (158) showed 99% similarity to the corresponding genes of *Rhodococcus ruber* IFP 2001 and *Aquicola tertiaricarbonis* L108 (68, 70). This result can be considered significant, as the above-mentioned monooxygenase has been proven to be responsible for the degradation of ETBE, DIPE, and other dialkyl ethers.

In the comparative analysis of the genomes, we identified three bacteria that showed at least 98.7% similarity to strain CH28, but their analysis based on OGRI showed that strain CH28 we isolated could represent a novel species.

The spectrum of substrates that can be utilized by strain CH28 was examined in detail. The strain utilized the following substrates as the sole carbon and energy source: methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, ethylene glycol, glycerol, formaldehyde, acetone, formate, acetate, pyruvate, *n*-dodecane, *n*-hexadecane, *n*-octadecane, pristane, *m*-xylene, *p*-xylene, diethyl ether, ETBE, DIPE, Tween 80, PEG 200, PEG 1500, PEG 4000, PEG 6000, PEG 20000. Strain CH28 did not utilize the following substrates as the sole carbon and energy source: propionaldehyde, citrate, *n*-pentane, *n*-hexane, *n*-decane, *n*-undecane, *n*-eicosane, *n*-docosane, cyclohexane, benzene, toluene, ethylbenzene, *o*-xylene, phenol, naphthalene, MTBE, TAME, TBA, TAA, anisole, 1,4-dimethoxybenzene, biphenyl, diphenyl ether and tetrahydrofuran. Overall, the bacterium we isolated has extremely broad substrate specificity, as it is capable of degrading normal alkanes, monoaromatic compounds, branched-chain hydrocarbons, dialkyl ethers, C₁ compounds, several short-chain alcohols, as well as organic

acids. This robust metabolic capacity of the strain could effectively be utilized in the bioremediation of sites polluted with mixed hydrocarbons (e.g. fuel).

Strain CH28 grew in the temperature range of 10-35 °C, the optimum growth temperature for the strain was between 30-32 °C. CH28 was able to grow between pH 3.5 and 8.5, preferred acidic medium, and the optimum pH range for the strain was pH 5.0-6.0. The salt tolerance of the strain was tested at different salt concentrations. The experiments proved that strain CH28 is not a halotolerant microorganism. Strain CH28 was sensitive to amikacin, ampicillin, apramycin, gentamycin, hygromycin, kanamycin, clindamycin, chloramphenicol, neomycin, oxytetracycline, rifampicin, streptomycin and tetracycline. Based on our test results, it can be stated that the strain showed low tolerance to tobramycin and was resistant to carbenicillin.

2-propanol, acetone and acetic acid were identified as intermediates of DIPE degradation using GC-MS. The detection of 2-propanol and acetic acid was a significant result, as these compounds had not been previously identified in case of any of the strains. After the detection of the intermediates, we proposed the upper pathway of microbiological DIPE degradation, which has not yet been published.

The biodegradation potential of strain CH28 was compared with two previously described DIPE-degrading microorganisms, *R. ruber* IFP 2001 and *A. tertiaricarbonis* L108 (68, 70), using a resting cell experiment. The biodegradation rate was of the same order of magnitude for all three strains. Although strain L108 had the highest DIPE-degradation rate, acetone accumulated as an end product during biodegradation. In contrast, strain CH28 was excellent at utilizing acetone as the sole source of carbon and energy therefore carbon dioxide and biomass were produced during degradation. Complete mineralization could be considered highly advantageous in several respects. On the one hand, an intermediate that is toxic to a significant proportion of life forms would not accumulate in the environment. On the other hand, as strain CH28 can obviously gain more energy from the degradation process than L108, it could possibly grow more efficiently in a polluted medium and therefore it could significantly accelerate the degradation processes and the remediation of polluted sites.

Microcosm experiments were set up with DIPE-supplemented (75 mg/l and 300 mg/l) groundwater samples. Complete mineralization occurred within 42 hours in microcosms set up with 75 mg/l DIPE, while in those with 300 mg/l DIPE it took 90 hours. To the best of our knowledge, our microcosm study was the first ever published on the degradation of DIPE (161).

Substrate utilization tests revealed that although strain CH28 is capable of biodegrading ETBE, TBA accumulates during degradation. To further promote biodegradation, the TBA-degrading *Hydrogenophaga* sp. strain T4 was used, and an artificial consortium capable of ETBE mineralization was created. Similarly to the DIPE-supplemented microcosms, groundwater samples were used to assemble the systems, to which different concentrations of ETBE (50, 200 and 500 mg/l) were added as pollutants. In all three experiments it was found that the members of the consortium were able to work together effectively, the pollutant was mineralised in a short time. In the case of the 200 mg/l microcosm it is worth mentioning that mineralization was also observed in the system bioaugmented with strain CH28 only, although it took significantly more time than in the case of microcosms inoculated with the artificial consortium. In this case of 200 mg/l ETBE supplemented microcosms bioaugmented with CH28, the complete degradation of ETBE was due not only to the strain CH28 but also to the local microbial population, as the degradation of TBA could only be performed by endogenous microorganisms.

Experiments were also performed to identify the cometabolic potential of strain CH28. These confirmed that although the bacterium was unable to use MTBE and TAME as the sole carbon and energy source, strain CH28 was able to degrade these two fuel oxygenates in the presence of DIPE. During the decomposition process, TBA and TAA accumulated. To the best of our knowledge, we were the first in the literature to describe co-metabolism of MTBE and TAME in the presence of DIPE (161).

Aerobic column experiments were performed with perlite-peat mixture and clay granule to better understand the DIPE-degrading potential of strain CH28 and the ETBE-degrading potential of the artificial consortium. It can be stated that we managed to operate column reactors for a long term, in which the mineralization of the examined fuel oxygenates could take place efficiently. During the experiments, in the case of DIPE intermediates could be detected only in quantities close to the detection limit in the effluent of the column, while in the column with ETBE normally a complete mineralization took place after minimal accumulation of TBA. As they were the first ever published in the literature, these column experiments with DIPE and ETBE could be considered significant.

In summary, it can be stated that *Mycolicibacterium* sp. strain CH28 is a novel bacterial strain that is capable of degrading not only several fuel oxygenates, but also many other environmentally relevant compounds (e.g. alkanes, monoaromatic compounds, alcohols, etc.). Based on our results, it can be concluded that strain CH28 is a microorganism with an enormous bioremediation potential.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Őszinte hálával tartozom mindazoknak, akik hozzájárultak ahhoz, hogy ez az értekezés megszülethessen.

Elsősorban köszönettel tartozom témavezetőimnek a támogatásért és irányításért. Rendkívül hálás vagyok és külön köszönöm *Dr. Szabó Zsoltnak* a szakmai munkámban nyújtott végtelen segítségét és türelmét. Szakmai tudása, értékes tanácsai és precizitása nélkül nem születhetett volna meg ez a munka. Köszönöm *Dr. Kiss Istvánnak*, hogy kutatásaimhoz minden szükséges feltételt biztosított és irányt mutatott.

Hálás köszönettel tartozom *Dr. Fehér Balázsnak*, aki bár hivatalosan nem volt témavezetőm, de legalább olyan figyelemmel és felelősséggel kísérte munkámat.

Köszönettel tartozom *Apró Ritának* a laborban nyújtott rengeteg segítségért. Köszönet illeti *Komóczi Attilát* az analitikai mérésekért. Nélkülük nem jöhetett volna létre ez az értekezés.

Ezúton szeretném megköszönni *Dr. Gyula Péternek* a molekuláris biológiai és bioinformatikai analízisekben nyújtott segítséget.

Köszönetemet fejezem ki a Bay-BIO valamennyi munkatársának, akik szintén nagymértékben segítettek munkámat.

Óriási köszönettel tartozom a *családomnak* és *barátaimnak*, akik mindvégig támogattak és bíztattak.

Végül, de nem utolsósorban köszönettel tartozom a *Sabaton* nevű együttesnek is, akik bár tudtukon kívül, de számtalanszor segítettek át a nehezebb időszakokon, továbbá még az éjszakai és hajnali mintavételek során is erőt tudtak adni.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Crute SA: **Anthropology and Climate Change**. 1st edition. Routledge, Walnut Creek, CA 2009.
2. Hooftman N, Messagie M, Van Mierlo J, Coosemans T: **A review of the European passenger car regulations – Real driving emissions vs local air quality**. *Renew Sustain Energy Rev* 2018. **86**:1–21.
3. Landrigan PJ: **The worldwide problem of lead in petrol**. *Bull World Health Organ* 2002. **80**:768.
4. Kovarik W: **Ethyl-leaded gasoline: How a classic occupational disease became an international public health disaster**. *Int J Occup Environ Health* 2005. **11**:384–397.
5. Fewtrell LJ, Prüss-Ustün A, Landrigan P, Ayuso-Mateos JL: **Estimating the global burden of disease of mild mental retardation and cardiovascular diseases from environmental lead exposure**. *Environ Res* 2004. **94**:120–133.
6. Skerfving S, Bergdahl IA: **Handbook on the toxicology of metals - Chapter 43: Lead**. 4th edition, Academic Press, San Diego. *In* Nordberg, GF, Fowler, BA, Nordberg, M (eds.), 2015.
7. Concawe: **Gasoline ether oxygenate occurrence in Europe, and a review of their fate and transport characteristics in the environment**. 2012.
8. Ancillotti F, Fattore V: **Oxygenate fuels: market expansion and catalytic aspect of synthesis**. *Fuel Process Technol* 1998. **57**:163–194.
9. U.S. Environmental Protection Agency: **Technologies for treating MTBE and other fuel oxygenates**. 2004.

10. Szabó Z: **Éter típusú üzemanyag-adalékok mikrobiális bontása: a *Methylibium* sp. T29 jelű, új MTBE-bontó törzs izolálása és jellemzése.** Szegedi Tudományegyetem, Szeged 2015.
11. Diaz AF, Drogos DL: **Oxygenates in gasoline: Environmental aspects.** 1st edition. American Chemical Society, Washington, DC : Cary, NC 2001.
12. Damia Barcelo: **Handbook of Environmental Chemistry, Volume 5, Part 5R: Water Pollution: Fuel Oxygenates.** Springer-Verlag, 2007.
13. Leighton DT, Calo JM: **Distribution coefficients of chlorinated hydrocarbons in dilute air-water systems for groundwater contamination applications.** *J Chem Eng Data* 1981. **26**:382–385.
14. Interstate Technology & Regulatory Council: **Overview of groundwater remediation technologies for MTBE and TBA.** 2005.
15. Hyman M: **Aerobic degradation of gasoline ether oxygenates.** *Aerobic utilization of hydrocarbons, oils and lipids* Springer International Publishing, Cham. In Rojo, F (ed.), 2017.
16. Owen K, Coley T, Weaver CS: **Automotive Fuels Reference Book - Chapter 11: Gasoline Additives.** 3rd edition, Society of Automotive Engineers, Warrendale, PA 2014.
17. Trevor M. Letcher: **Thermodynamics, solubility and environmental issues - Chapter 13: Environmental issues of gasoline additives – aqueous solubility and spills.** 2007.

18. CL:AIRE: **Illustrated handbook of LNAPL transport and fate in the subsurface.** 2014.
19. Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM: **Environmental organic chemistry.** 3rd edition. Wiley, Hoboken, N.J 2016.
20. Health Effects Institute: **The potential health effects of oxygenates added to gasoline. A review of the current literature.** 1996.
21. www.autonavigator.hu: **Jön az E10 - új benzin érkezik a hazai töltőállomásokra is.** *Autónavigátor.hu* 2021.
22. globalfuelethers.com: **How can fuel ethers help improve air quality?** <https://globalfuelethers.com> 2017.
23. Kinner NE: **Fate, transport and remediation of MTBE.** Bedrock Bioremediation Center Professor of Civil/Environmental Engineering, University of New Hampshire Durham, NH, 2001.
24. Thornton SF, Bottrell SH, Spence KH, Pickup R, Spence MJ, Shah N, Mallinson HEH, Richnow HH: **Assessment of MTBE biodegradation in contaminated groundwater using ^{13}C and ^{14}C analysis: Field and laboratory microcosm studies.** *Appl Geochem* 2011. **26:**828–837.
25. Thornton SF, Tobin K, Smith JWN: **Comparison of constant and transient-source zones on simulated contaminant plume evolution in groundwater: Implications for hydrogeological risk assessment.** *Groundw Monit Remediat* 2013. **33:**78–91.

26. Spence MJ, Bottrell SH, Thornton SF, Richnow HH, Spence KH: **Hydrochemical and isotopic effects associated with petroleum fuel biodegradation pathways in a chalk aquifer.** *J Contam Hydrol* 2005. **79**:67–88.
27. Yee KF, Mohamed AR, Tan SH: **A review on the evolution of ethyl *tert*-butyl ether (ETBE) and its future prospects.** *Renew Sustain Energy Rev* 2013. **22**:604–620.
28. Yuan H: **ETBE as an additive in gasoline: Advantages and disadvantages.** Linköpings universitet, Sweden, 2006.
29. Rosell M, Lacorte S, Forner C, Rohms H-P, Irmischer R, Barceló D: **Fate of gasoline oxygenates in conventional and multilevel wells of a contaminated groundwater table in Düsseldorf, Germany.** *Environ Toxicol Chem* 2005. **24**:2785–2795.
30. Pumphrey JA, Brand JJ, Scheller WA: **Vapour pressure measurements and predictions for alcohol–gasoline blends.** *Fuel* 2000. **79**:1405–1411.
31. da Silva R, Cataluña R, Menezes EW de., Samios D, Piatnicki CMS: **Effect of additives on the antiknock properties and Reid vapor pressure of gasoline.** *Fuel* 2005. **84**:951–959.
32. Rosell M, Lacorte S, Barceló D: **Analysis, occurrence and fate of MTBE in the aquatic environment over the past decade.** *TrAC Trends Anal Chem* 2006. **25**:1016–1029.
33. Johnson R, Pankow J, Bender D, Price C, Zogorski J: **MTBE-To what extent will past releases contaminate community water supply wells?** *Environ Sci Technol* 2000. **34**:210A–7A.

34. Heese FP, Dry ME, Möller KP: **Single stage synthesis of diisopropyl ether – an alternative octane enhancer for lead-free petrol.** *Catal Today* 1999. **49**:327–335.
35. Hausinger RP: **New insights into acetone metabolism.** *J Bacteriol* 2007. **189**:671–673.
36. Taylor DG, Trudgill PW, Cripps RE, Harris P: **The microbial metabolism of acetone.** *Microbiology* 1980. **118**:159–170.
37. Kotani T, Yurimoto H, Kato N, Sakai Y: **Novel acetone metabolism in a propane-utilizing bacterium, *Gordonia* sp. strain TY-5.** *J Bacteriol* 2007. **189**:886–893.
38. Westphal GA, Krahl J, Brüning T, Hallier E, Bünger J: **Ether oxygenate additives in gasoline reduce toxicity of exhausts.** *Toxicology* 2010. **268**:198–203.
39. Burns KM, Melnick RL: **MTBE: recent carcinogenicity studies.** *Int J Occup Environ Health* 2012. **18**:66–68.
40. McGregor D: **Ethyl tertiary-butyl ether: A toxicological review.** *Crit Rev Toxicol* 2007. **37**:287–312.
41. McGregor D: **Methyl tertiary-butyl ether: Studies for potential human health hazards.** *Crit Rev Toxicol* 2006. **36**:319–358.
42. Dekant W, Bernauer U, Rosner E, Amberg A: **Biotransformation of MTBE, ETBE, and TAME after inhalation or ingestion in rats and humans.** *Res Rep Health Eff Inst* 2001. 29–71; discussion 95-109.

43. Le Gal A, Dréano Y, Gervasi P-G, Berthou F: **Human cytochrome P450 2A6 is the major enzyme involved in the metabolism of three alkoxyethers used as oxyfuels.** *Toxicol Lett* 2001. **124**:47–58.
44. Turini A, Amato G, Longo V, Gervasi PG: **Oxidation of methyl- and ethyl-tertiary-butyl ethers in rat liver microsomes: role of the cytochrome P450 isoforms.** *Arch Toxicol* 1998. **72**:207–214.
45. Romanelli L, Evandri MG: **Permitted daily exposure for diisopropyl ether as a residual solvent in pharmaceuticals.** *Toxicol Res* 2018. **34**:111–125.
46. Sakuth M, Mensing T, Schuler J, Heitmann W, Strehlke G, Mayer D: **Ethers, aliphatic.** *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* American Cancer Society, 2010.
47. Luo H, Liang K, Li W, Li Y, Xia M, Xu C: **Comparison of pressure-swing distillation and extractive distillation methods for isopropyl alcohol/diisopropyl ether separation.** *Ind Eng Chem Res* 2014. **53**:15167–15182.
48. Lladosa E, Montón JB, Burguet M, Muñoz R: **Effect of pressure and the capability of 2-methoxyethanol as a solvent in the behaviour of a diisopropyl ether–isopropyl alcohol azeotropic mixture.** *Fluid Phase Equilibria* 2007. **262**:271–279.
49. You X, Rodriguez-Donis I, Gerbaud V: **Low pressure design for reducing energy cost of extractive distillation for separating diisopropyl ether and isopropyl alcohol.** *Chem Eng Res Des* 2016. **109**:540–552.

50. Arce A, Arce A, Martínez-Ageitos J, Rodil E, Rodríguez O, Soto A: **Physical and equilibrium properties of diisopropyl ether+isopropyl alcohol+water system.** *Fluid Phase Equilibria* 2000. **170**:113–126.
51. Abdelmonem RM, Hashem MA, Mohmed AA: **Further studies on phenol removal from aqueous solutions by solvent extraction.** *Biomed Health* 2001. 139–149.
52. Harrington PJ: **Pharmaceutical process chemistry for synthesis: Rethinking the routes to scale-Up.** 1st edition. Wiley, Hoboken, N.J 2011.
53. William Andrew Publishing: **Pharmaceutical manufacturing encyclopedia.** 3rd edition. William Andrew, Norwich, NY 2007.
54. Kim M, Oh H-S, Park S-C, Chun J: **Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2014. **64**:346–351.
55. Zereshki S, Figoli A, Madaeni SS, Galiano F, Drioli E: **Pervaporation separation of ethanol/ETBE mixture using poly(lactic acid)/poly(vinyl pyrrolidone) blend membranes.** *J Membr Sci* 2011. **373**:29–35.
56. Kharoune M, Kharoune L, Lebeault J, Pauss A: **Isolation and characterization of two aerobic bacterial strains that completely degrade ethyl *tert*-butyl ether (ETBE).** *Appl Microbiol Biotechnol* 2001. **55**:348–353.
57. van der Waals MJ, Plugge C, Meima-Franke M, de Waard P, Bodelier PLE, Smidt H, Gerritse J: **Ethyl *tert*-butyl ether (EtBE) degradation by an algal-bacterial culture obtained from contaminated groundwater.** *Water Res* 2019. **148**:314–323.

58. Le Digabel Y, Demanèche S, Benoit Y, Fayolle-Guichard F, Vogel TM: **Ethyl tert-butyl ether (ETBE)-degrading microbial communities in enrichments from polluted environments.** *J Hazard Mater* 2014. **279**:502–510.
59. Thornton SF, Nicholls HCG, Rolfe SA, Mallinson HEH, Spence MJ: **Biodegradation and fate of ethyl tert-butyl ether (ETBE) in soil and groundwater: A review.** *J Hazard Mater* 2020. **391**:122046.
60. Global Bioenergies: **First production in history of fully renewable ETBE.** 2017.
61. Merchant Research & Consulting Ltd.: **Chemical market research reports.** 2021.
62. Merchant Research & Consulting Ltd.: **Ethyl tertiary butyl ether (ETBE): 2020 world market outlook and forecast up to 2029.** 2020.
63. François A, Mathis H, Godefroy D, Piveteau P, Fayolle F, Monot F: **Biodegradation of methyl tert-butyl ether and other fuel oxygenates by a new strain, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012.** *Appl Environ Microbiol* 2002. **68**:2754–2762.
64. Somsamak P, Richnow HH, Häggblom MM: **Carbon isotope fractionation during anaerobic degradation of methyl tert-butyl ether under sulfate-reducing and methanogenic conditions.** *Appl Environ Microbiol* 2006. **72**:1157–1163.
65. Yeh CK, Novak JT: **Anaerobic biodegradation of gasoline oxygenates in soils.** *Water Environ Res* 1994. **66**:744–752.
66. Bombach P, Nägele N, Rosell M, Richnow HH, Fischer A: **Evaluation of ethyl tert-butyl ether biodegradation in a contaminated aquifer by compound-specific isotope analysis and *in situ* microcosms.** *J Hazard Mater* 2015. **286**:100–106.

67. Kharoune M, Pauss A, Lebeault JM: **Aerobic biodegradation of an oxygenates mixture: ETBE, MTBE and TAME in an upflow fixed-bed reactor.** *Water Res* 2001. **35**:1665–1674.
68. Hernandez-Perez G, Fayolle F, Vandecasteele J-P: **Biodegradation of ethyl *t*-butyl ether (ETBE), methyl *t*-butyl ether (MTBE) and *t*-amyl methyl ether (TAME) by *Gordonia terrae*.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2001. **55**:117–121.
69. Vainberg S, McClay K, Masuda H, Root D, Condee C, Zylstra GJ, Steffan RJ: **Biodegradation of ether pollutants by *Pseudonocardia* sp. strain ENV478.** *Appl Environ Microbiol* 2006. **72**:5218–5224.
70. Schuster J, Purswani J, Breuer U, Pozo C, Harms H, Müller RH, Rohwerder T: **Constitutive expression of the cytochrome P450 EthABCD monooxygenase system enables degradation of synthetic dialkyl ethers in *Aquicola tertiaricarbonis* L108.** *Appl Environ Microbiol* 2013. **79**:2321–2327.
71. Schäfer F, Schuster J, Würz B, Härtig C, Harms H, Müller RH, Rohwerder T: **Synthesis of short-chain diols and unsaturated alcohols from secondary alcohol substrates by the Rieske nonheme mononuclear iron oxygenase MdpJ.** *Appl Environ Microbiol* 2012. **78**:6280–6284.
72. Chauvaux S, Chevalier F, Dantec CL, Fayolle F, Miras I, Kunst F, Beguin P: **Cloning of a genetically unstable cytochrome P-450 gene cluster involved in degradation of the pollutant ethyl *tert*-butyl ether by *Rhodococcus ruber*.** *J Bacteriol* 2001. **183**:6551–6557.

73. Müller RH, Rohwerder T, Harms H: **Degradation of fuel oxygenates and their main intermediates by *Aquicola tertiaricarbonis* L108.** *Microbiology*, 2008. **154**:1414–1421.
74. White GF, Russell NJ, Tidswell EC: **Bacterial scission of ether bonds.** *Microbiol Rev* 1996. **60**:216–232.
75. Fayolle F, Hernández G, Roux FL, Vandecasteele J: **Isolation of two aerobic bacterial strains that degrade efficiently ethyl *t*-butyl ether (ETBE).** *Biotechnol Lett* 2004. <https://doi.org/10.1023/A:1005390221856>.
76. Beguin P, Chauvaux S, Miras I, François A, Fayolle F, Monot F: **Genes involved in the degradation of ether fuels by bacteria of the *Mycobacterium/Rhodococcus* Group.** *Oil Gas Sci Technol* 2003. **58**:489–495.
77. Malandain C, Fayolle-Guichard F, Vogel TM: **Cytochromes P450-mediated degradation of fuel oxygenates by environmental isolates.** *FEMS Microbiol Ecol* 2010. **72**:289–296.
78. Kyselková M, Falcão Salles J, Dumestre A, Benoit Y, Grundmann GL: **Distinct bacterial consortia established in ETBE-degrading enrichments from a polluted aquifer.** *Appl Sci* 2019. **9**:4247.
79. Joshi G, Schmidt R, Scow KM, Denison MS, Hristova KR: **Gene *mdpC* plays a regulatory role in the methyl-*tert*-butyl ether degradation pathway of *Methylibium petroleiphilum* strain PM1.** *FEMS Microbiol Lett* 2015. **362**.

80. Szabó Z, Gyula P, Robotka H, Bató E, Gálik B, Pach P, Pekker P, Papp I, Bihari Z: **Draft genome sequence of *Methylibium* sp. strain T29, a novel fuel oxygenate-degrading bacterial isolate from Hungary.** *Stand Genomic Sci* 2015. **10**:39.
81. Gunasekaran V, Donmez E, Girhard M, Urlacher VB, Constantí M: **Biodegradation of fuel oxygenates and their effect on the expression of a newly identified cytochrome P450 gene in *Achromobacter xylosoxidans* MCM2/2/1.** *Process Biochem* 2014. **49**:124–129.
82. Ferreira NL, Labbé D, Monot F, Fayolle-Guichard F, Greer CW: **Genes involved in the methyl *tert*-butyl ether (MTBE) metabolic pathway of *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012.** *Microbiology*, 2006. **152**:1361–1374.
83. Ferreira NL, Maciel H, Mathis H, Monot F, Fayolle-Guichard F, Greer CW: **Isolation and characterization of a new *Mycobacterium austroafricanum* strain, IFP 2015, growing on MTBE.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2006. **70**:358–365.
84. Fayolle-Guichard F, Durand J, Cheucle M, Rosell M, Michelland RJ, Tracol J-P, Le Roux F, Grundman G, Atteia O, Richnow HH, Dumestre A, Benoit Y: **Study of an aquifer contaminated by ethyl *tert*-butyl ether (ETBE): Site characterization and on-site bioremediation.** *J Hazard Mater* 2012. **201–202**:236–243.
85. Lopes Ferreira N, Mathis H, Labbé D, Monot F, Greer CW, Fayolle-Guichard F: ***n*-Alkane assimilation and *tert*-butyl alcohol (TBA) oxidation capacity in *Mycobacterium austroafricanum* strains.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2007. **75**:909–919.
86. Lechner U, Brodkorb D, Geyer R, Hause G, Härtig C, Auling G, Fayolle-Guichard F, Piveteau P, Müller RH, Rohwerder T: ***Aquincola tertiaricarbonis* gen. nov., sp. nov., a**

- tertiary butyl moiety-degrading bacterium.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2007. **57**:1295–1303.
87. Steffan RJ, McClay K, Vainberg S, Condee CW, Zhang D: **Biodegradation of the gasoline oxygenates methyl *tert*-butyl ether, ethyl *tert*-butyl ether, and *tert*-amyl methyl ether by propane-oxidizing bacteria.** *Appl Environ Microbiol* 1997. **63**:4216–4222.
88. Abu-Lail L, Bergendahl JA, Thompson RW: **Adsorption of methyl *tertiary* butyl ether on granular zeolites: Batch and column studies.** *J Hazard Mater* 2010. **178**:363–369.
89. Wilson JT, Adair C, Kaiser PM, Kolhatkar R: **Anaerobic biodegradation of MTBE at a gasoline spill site.** *Groundw Monit Remediat* 2005. **25**:103–115.
90. Youngster LKG, Kerkhof LJ, Häggblom MM: **Community characterization of anaerobic methyl *tert*-butyl ether (MTBE)-degrading enrichment cultures.** *FEMS Microbiol Ecol* 2010. **72**:279–288.
91. Somsamak P, Cowan RM, Häggblom MM: **Anaerobic biotransformation of fuel oxygenates under sulfate-reducing conditions.** *FEMS Microbiol Ecol* 2001. **37**:259–264.
92. Häggblom MM, Youngster LKG, Somsamak P, Richnow HH: **Anaerobic biodegradation of methyl *tert*-butyl ether (MTBE) and related fuel oxygenates.** *Advances in Applied Microbiology* Academic Press, 2007.

93. Gupta RS, Lo B, Son J: **Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera.** *Front Microbiol* 2018. **9:67.**
94. Parte AC: **LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2018. **68:1825–1829.**
95. Nouioui I, Sangal V, Cortés-Albayay C, Jando M, Igual JM, Klenk H-P, Zhang Y-Q, Goodfellow M: ***Mycolicibacterium stelleriae* sp. nov., a rapidly growing scotochromogenic strain isolated from *Stellera chamaejasme*.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2019. **69:3465–3471.**
96. Dudhagara DR, Dave BP: ***Mycobacterium* as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degrader.** *Mycobacterium - Res Dev* 2018. [https://doi.org/10.5772/intechopen.73546.](https://doi.org/10.5772/intechopen.73546)
97. Cook GM, Berney M, Gebhard S, Heinemann M, Cox RA, Danilchanka O, Niederweis M: **Physiology of *Mycobacteria*.** *Adv Microb Physiol* 2009. **55:81–319.**
98. Vaerewijck MJM, Huys G, Palomino JC, Swings J, Portaels F: ***Mycobacteria* in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health.** *FEMS Microbiol Rev* 2005. **29:911–934.**
99. Häggblom MM, Nohynek LJ, Palleroni NJ, Kronqvist K, Nurmiäho-Lassila EL, Salkinoja-Salonen MS, Klatte S, Kroppenstedt RM, Häggblom MM: **Transfer of polychlorophenol-degrading *Rhodococcus chlorophenicus* (Apajalahti et al. 1986) to the genus *Mycobacterium* as *Mycobacterium chlorophenicum* comb. nov.** *Int J Syst Bacteriol* 1994. **44:485–493.**

100. Tortoli E: **Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: The new mycobacteria of the 1990s.** *Clin Microbiol Rev* 2003. **16**:319–354.
101. Falkinham JO: **Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment.** *J Appl Microbiol* 2009. **107**:356–367.
102. Tortoli E: **Phylogeny of the genus *Mycobacterium*: many doubts, few certainties.** *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis* 2012. **12**:827–831.
103. Brzostek A, Pawelczyk J, Rumijowska-Galewicz A, Dziadek B, Dziadek J: ***Mycobacterium tuberculosis* is able to accumulate and utilize cholesterol.** *J Bacteriol* 2009. **191**:6584–6591.
104. Makovcova J, Slany M, Babak V, Slana I, Kralik P: **The water environment as a source of potentially pathogenic mycobacteria.** *J Water Health* 2014. **12**:254–263.
105. Falkinham JO: **Environmental sources of nontuberculous *Mycobacteria*.** *Clin Chest Med* 2015. **36**:35–41.
106. Lory S: **The family *Mycobacteriaceae*.** *The Prokaryotes: Actinobacteria* Springer, Berlin, Heidelberg 2014.
107. Tsukamura M: **Identification of mycobacteria.** *Tubercle* 1967. **48**:311–338.
108. Stahl DA, Urbance JW: **The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria.** *J Bacteriol* 1990. **172**:116–124.
109. Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO: **Health impacts of environmental mycobacteria.** *Clin Microbiol Rev* 2004. **17**:98–106.

110. Qin Q-L, Xie B-B, Zhang X-Y, Chen X-L, Zhou B-C, Zhou J, Oren A, Zhang Y-Z: **A proposed genus boundary for the prokaryotes based on genomic insights.** *J Bacteriol* 2014. **196**:2210–2215.
111. Konstantinidis KT, Tiedje JM: **Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005. **102**:2567–2572.
112. Heitkamp MA, Cerniglia CE: **Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field.** *Appl Environ Microbiol* 1988. **54**:1612–1614.
113. Heitkamp MA, Franklin W, Cerniglia CE: **Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium.** *Appl Environ Microbiol* 1988. **54**:2549–2555.
114. Hennessee CT, Seo J-S, Alvarez AM, Li QX: **Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading species isolated from Hawaiian soils: *Mycobacterium crocinum* sp. nov., *Mycobacterium pallens* sp. nov., *Mycobacterium rutilum* sp. nov., *Mycobacterium rufum* sp. nov. and *Mycobacterium aromaticivorans* sp. nov.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2009. **59**:378–387.
115. Pagnout C, Rast C, Veber A-M, Poupin P, Férard J-F: **Ecotoxicological assessment of PAHs and their dead-end metabolites after degradation by *Mycobacterium* sp. strain SNP11.** *Ecotoxicol Environ Saf* 2006. **65**:151–158.
116. Moody JD, Freeman JP, Doerge DR, Cerniglia CE: **Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1.** *Appl Environ Microbiol* 2001. **67**:1476–1483.

117. Kleespies M, Kroppenstedt RM, Rainey FA, Webb LE, Stackebrandt E: ***Mycobacterium hodleri* sp. nov., a new member of the fast-growing mycobacteria capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons.** *Int J Syst Bacteriol* 1996. **46**:683–687.
118. Maciel H, Mathis H, Lopes Ferreira N, Lyew D, Guiot S, Monot F, Greer CW, Fayolle-Guichard F: **Use of *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012 in a MTBE-degrading bioreactor.** *J Mol Microbiol Biotechnol* 2008. **15**:190–198.
119. Brown-Elliott BA, Wallace RJ: **Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria.** *Clin Microbiol Rev* 2002. **15**:716–746.
120. Naushad HS, Lee B, Gupta RS: **Conserved signature indels and signature proteins as novel tools for understanding microbial phylogeny and systematics: Identification of molecular signatures that are specific for the phytopathogenic genera *Dickeya*, *Pectobacterium* and *Brenneria*.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2014. **64**:366–383.
121. Gupta RS: **Protein phylogenies and signature sequences: A reappraisal of evolutionary relationships among *Archaeobacteria*, *Eubacteria*, and *Eukaryotes*.** *Microbiol Mol Biol Rev* 1998. **62**:1435–1491.
122. Gupta RS, Griffiths E: **Critical issues in bacterial phylogeny.** *Theor Popul Biol* 2002. **61**:423–434.
123. Gupta RS, Mathews DW: **Signature proteins for the major clades of *Cyanobacteria*.** *BMC Evol Biol* 2010. **10**:24.

124. Gao B, Gupta RS: **Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum *Actinobacteria***. *Microbiol Mol Biol Rev* 2012. **76**:66–112.
125. Hu D, Zang Y, Mao Y, Gao B: **Identification of molecular markers that are specific to the class *Thermoleophilia***. *Front Microbiol* 2019. **10**.
126. Großkopf T, Soyer OS: **Synthetic microbial communities**. *Curr Opin Microbiol* 2014. **18**:72–77.
127. Gieg LM, Fowler SJ, Berdugo-Clavijo C: **Syntrophic biodegradation of hydrocarbon contaminants**. *Curr Opin Biotechnol* 2014. **27**:21–29.
128. O'Brien S, Buckling A: **The sociality of bioremediation**. *EMBO Rep* 2015. **16**:1241–1245.
129. Morris BEL, Henneberger R, Huber H, Moissl-Eichinger C: **Microbial syntrophy: interaction for the common good**. *FEMS Microbiol Rev* 2013. **37**:384–406.
130. Santisi S, Cappello S, Catalfamo M, Mancini G, Hassanshahian M, Genovese L, Giuliano L, Yakimov MM, Santisi S, Cappello S, Catalfamo M, Mancini G, Hassanshahian M, Genovese L, Giuliano L, Yakimov MM: **Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium**. *Braz J Microbiol* 2015. **46**:377–387.
131. Duhamel M, Wehr SD, Yu L, Rizvi H, Seepersad D, Dworatzek S, Cox EE, Edwards EA: **Comparison of anaerobic dechlorinating enrichment cultures maintained on tetrachloroethene, trichloroethene, *cis*-dichloroethene and vinyl chloride**. *Water Res* 2002. **36**:4193–4202.

132. Puentes Jácome LA, Edwards EA: **A switch of chlorinated substrate causes emergence of a previously undetected native *Dehalobacter* population in an established *Dehalococcoides*-dominated chloroethene-dechlorinating enrichment culture.** *FEMS Microbiol Ecol* 2017. **93**.
133. Fortin NY, Morales M, Nakagawa Y, Focht DD, Deshusses MA: **Methyl *tert*-butyl ether (MTBE) degradation by a microbial consortium.** *Environ Microbiol* 2001. **3**:407–416.
134. Kharoune M, Kharoune L, Lebault J-M, Pauss A: **Aerobic degradation of ethyl-*tert*-butyl ether by a microbial consortium: Selection and evaluation of biodegradation ability.** *Environ Toxicol Chem* 2002. **21**:2052–2058.
135. Gunasekaran V, Stam L, Constantí M: **The effect of BTX compounds on the biodegradation of ETBE by an ETBE degrading bacterial consortium.** *Biotechnol Bioprocess Eng* 2013. **18**:1216–1223.
136. Auffret M, Labbé D, Thouand G, Greer CW, Fayolle-Guichard F: **Degradation of a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives by *Rhodococcus aetherivorans* and *Rhodococcus wratislaviensis*.** *Appl Environ Microbiol* 2009. **75**:7774–7782.
137. Katsuyama C, Nakaoka S, Takeuchi Y, Tago K, Hayatsu M, Kato K: **Complementary cooperation between two syntrophic bacteria in pesticide degradation.** *J Theor Biol* 2009. **256**:644–654.
138. Rosell M, Finsterbusch S, Jechalke S, Hübschmann T, Vogt C, Richnow HH: **Evaluation of the effects of low oxygen concentration on stable isotope**

- fractionation during aerobic MTBE biodegradation.** *Environ Sci Technol* 2010. **44**:309–315.
139. Le Digabel Y, Demanèche S, Benoit Y, Vogel TM, Fayolle-Guichard F: **Ethyl tert-butyl ether (ETBE) biodegradation by a syntrophic association of *Rhodococcus* sp. IFP 2042 and *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049 isolated from a polluted aquifer.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2013. **97**:10531–10539.
140. Stackebrandt E, Goebel BM: **Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology.** *Int J Syst Evol Microbiol* 1994. **44**:846–849.
141. Stackebrandt E, Ebers J: **Taxonomic parameters revisited: Tarnished gold standards.** *Microbiol TODAY* 2006. **33**:152–155.
142. Chun J, Oren A, Ventosa A, Christensen H, Arahal DR, da Costa MS, Rooney AP, Yi H, Xu X-W, De Meyer S, Trujillo ME: **Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2018. **68**:461–466.
143. Cold Spring Harbor Laboratories: **Phosphate-buffered saline (PBS).** *Cold Spring Harb Protoc* 2006. <https://doi.org/10.1101/pdb.rec8247>.
144. McIlvaine TC: **A buffer solution for colorimetric comparison.** *J Biol Chem* 1921. **49**:183–186.
145. Langner HW, Inskeep WP, Gaber HM, Jones WL, Das BS, Wraith JM: **Pore water velocity and residence time effects on the degradation of 2,4-D during transport.** *Environ Sci Technol* 1998. **32**:1308–1315.

146. Kookana RS, Schuller RD, Aylmore LAG: **Simulation of simazine transport through soil columns using time-dependent sorption data measured under flow conditions.** *J Contam Hydrol* 1993. **14**:93–115.
147. Song L, Florea L, Langmead B: **Lighter: fast and memory-efficient sequencing error correction without counting.** *Genome Biol* 2014. **15**:509.
148. Magoč T, Salzberg SL: **FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies.** *Bioinformatics* 2011. **27**:2957–2963.
149. Schmieder R, Edwards R: **Fast identification and removal of sequence contamination from genomic and metagenomic datasets.** *PLOS ONE* 2011. **6**:e17288.
150. Edwards JA, Edwards RA: **Fastq-pair: efficient synchronization of paired-end fastq files.** *bioRxiv* 2019. 552885.
151. Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, Peplies J: **JSpeciesWS: A web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison.** *Bioinforma Oxf Engl* 2016. **32**:929–931.
152. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K: **MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms.** *Mol Biol Evol* 2018. **35**:1547–1549.
153. Saitou N, Nei M: **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.** *Mol Biol Evol* 1987. **4**:406–425.
154. Tamura K, Kumar S: **Evolutionary distance estimation under heterogeneous substitution pattern among lineages.** *Mol Biol Evol* 2002. **19**:1727–1736.

155. Salanitro JP, Diaz LA, Williams MP, Wisniewski HL: **Isolation of a bacterial culture that degrades methyl *t*-butyl ether.** *Appl Environ Microbiol* 1994. **60**:2593–2596.
156. Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D: **Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the evolutionary history of an ancient phylum.** *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* 2007. **71**:495–548.
157. Gupta RS: **Commentary: Genome-based taxonomic classification of the phylum *Actinobacteria*.** *Front Microbiol* 2019. **10**.
158. Zsilinszky I, Gyula P, Bihari Z, Fehér B, Szabó Z: **Draft genome sequence of *Mycolicibacterium* sp. strain CH28, a potential degrader of diisopropyl ether, isolated from pharmaceutical wastewater.** *Microbiol Resour Announc* 2019. **8**.
159. Ahn A-C, Meier-Kolthoff JP, Overmars L, Richter M, Woyke T, Sorokin DY, Muyzer G: **Genomic diversity within the haloalkaliphilic genus *Thioalkalivibrio*.** *PLOS ONE* 2017. **12**.
160. Lee KH, Wie YM, Lee Y-S: **Characterization of 1,4-dioxane biodegradation by a microbial community.** *Water* 2020. **12**:3372.
161. Zsilinszky I, Fehér B, Kiss I, Komóczy A, Gyula P, Szabó Z: **Biodegradation of fuel oxygenates: isolation and characterization of a novel ether-degrading bacterial strain, *Mycolicibacterium* sp. CH28.** *Bioremediation J* 2021. <https://doi.org/10.1080/10889868.2021.1911924>.
162. Ghasemian M, Amin MM, Morgenroth E, Jaafarzadeh N: **Anaerobic biodegradation of methyl *tert*-butyl ether and *tert*-butyl alcohol in petrochemical wastewater.** *Environ Technol* 2012. **33**:1937–1943.

163. Lee SG, Kim DJ, Choi JW, Lee SH: **Substrate interactions between toluene and methyl *tert*-butyl ether (MTBE) during microbial degradation by *Pseudomonas putida*.** *Environ Prog Sustain Energy* 2011. **30**:278–283.
164. Alimohammadi M, Mesdaghinia AR, Mahmoodi M, Nasser S, Mahvi AH, Nouri J: **Biodegradation of MTBE by a microorganism consortium.** *Iran J Environ Health Sci Eng* 2005. **2**:237–246.
165. Ohkubo N, Tsuboi S, Yamamura S, Iwasaki K, Yagi O: **Complete degradation of ethyl *tert*-butyl ether by co-culture of *Rhodococcus erythropolis* ET10 and *Pseudonocardia benzenivorans* No. 8.** *J Environ Biotechnol* 2017.
166. Gholami F, Mosmeri H, Shavandi M, Dastgheib SMM, Amoozegar MA: **Application of encapsulated magnesium peroxide (MgO₂) nanoparticles in permeable reactive barrier (PRB) for naphthalene and toluene bioremediation from groundwater.** *Sci Total Environ* 2019. **655**:633–640.
167. Kashir M, McGregor R, Gusti W, Shouakar-Stash O: **Chemical oxidation using stabilized hydrogen peroxide in high temperature, saline groundwater impacted with hydrocarbons and MTBE.** *Remediat J* 2017. **27**:19–28.
168. Kashir M, McGregor R: **Stabilized hydrogen peroxide for the remediation of hydrocarbons and MTBE in high temperature and saline groundwater.** *Remediat J* 2018. **29**:27–36.
169. Anid PJ, Alvarez PJJ, Vogel TM: **Biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in aquifer columns amended with hydrogen peroxide and nitrate.** *Water Res* 1993. **27**:685–691.

170. Vogt C, Alfreider A, Lorbeer H, Hoffmann D, Wuensche L, Babel W: **Bioremediation of chlorobenzene-contaminated ground water in an in situ reactor mediated by hydrogen peroxide.** *J Contam Hydrol* 2004. **68**:121–141.
171. Liu S-J, Jiang B, Huang G-Q, Li X-G: **Laboratory column study for remediation of MTBE-contaminated groundwater using a biological two-layer permeable barrier.** *Water Res* 2006. **40**:3401–3408.

9. MELLÉKLETEK

1. számú melléklet: A vizsgálatokhoz használt talajvizek

A vizsgálatokhoz felhasznált talajvizeket a mikrokozmoszok összeállításáig 4 °C-on tároltuk. A sterilizált talajvizeket 120 °C-on, 45 percen át tartó klávozással csírátlanítottuk, kivéve a GW-6 jelű talajvizet, melyet 0,02-es steril szűrőn szűrtünk át a talajvízben található ETBE és TBA miatt.

A vizsgálatokhoz felhasznált talajvizek megnevezése:

GW-1: 75 mg/l DIPE mikrokozmosz tesztben került felhasználásra

GW-2: 300 mg/l DIPE mikrokozmosz

GW-3: 50 mg/l ETBE mikrokozmosz

GW-4: 200 mg/l ETBE mikrokozmosz

GW-5: 500 mg/l ETBE mikrokozmosz

GW-6: ETBE-t és TBA-t tartalmazó talajvíz, amelyet az oszlopkísérletek során használtunk

A vizsgálathoz felhasznált talajvizekből mért pH értékek:

Talajvíz megnevezése	pH
GW-1	6,87
GW-2	7,01
GW-3	7,23
GW-4	6,92
GW-5	7,11
GW-6	7,09

A vizsgálathoz felhasznált talajvizekből mért **anion** koncentrációk (mg/l):

Talajvíz megnevezése	Klorid	Szulfát	Nitrát	Nitrit	Foszfát	Bromid
	mg/l					
GW-1	162,9	290,6	<1,0	<1,0	<0,3	<1,0
GW-2	90,6	204,0	<1,0	<1,0	<0,3	<1,0
GW-3	131,4	225,9	<1,0	<1,0	<0,3	<1,0
GW-4	182,4	183,1	<1,0	<1,0	<0,3	<1,0
GW-5	119,5	129,5	<1,0	<1,0	<0,3	<1,0
GW-6	146,7	102,3	<1,0	<1,0	1,5	<1,0

A vizsgálathoz felhasznált talajvizekből mért **szerves sav és alkohol** koncentrációk (mg/l):

A vizsgálathoz felhasznált talajvizekből az összes általunk mért komponens (oxálsav, citromsav, piroszőlősav, tejsav, hangyasav, ecetsav, propionsav, izovajsav, vajsav, metanol, etanol) a kimutatási határérték (oxálsav, citromsav, piroszőlősav, tejsav, hangyasav, ecetsav, propionsav, izovajsav, vajsav esetében <5 mg/l, metanol esetében <50 mg/l, etanol esetében <20 mg/l, acetone esetében <15 mg/l) alatt volt.

A vizsgálathoz felhasznált talajvizekből mért **VOC és éter** koncentrációk (µg/l):

Talajvíz megnevezése	ETBE	TBA	MTBE	Benzol	Toluol	Etil-benzol	Xilolok
	(µg/l)						
GW-1	<10,0	<10,0	<10,0	269,5	516,8	325,4	994,7
GW-2	<10,0	801,3	12,0	66,4	127,1	137,8	170,5
GW-3	<10,0	263,5	10,9	41,3	179,6	45,0	293,6
GW-4	<10,0	<10,0	<10,0	136,3	41,9	56,7	347,1
GW-5	<10,0	<10,0	<10,0	52,0	131,7	99,4	234,7
GW-6	25 020,0	4 077,0	<10,0	113,3	153,3	45,4	147,3

A DIPE, a 2-propanol és az acetone koncentrációja a GW-1-GW-6 talajvizek mindegyikében a kimutatási határ (DIPE esetében <10,0 µg/l, 2-propanol és acetone esetében <20,0 µg/l) alatt volt.