

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Kőolajeredetű szénhidrogénekkal szennyezett, oxigén-limitált felszín alatti
közegek mikrobiális ökológiája

Dr. Táncsics András



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem,
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet
Molekuláris Ökológia Tanszék
Gödöllő,
2021.

1. BEVEZETÉS és CÉLKITŰZÉSEK

A modern ipari társadalmak kialakulásának alappillére volt a fosszilis energiahordozóknak, azon belül is a kőolajnak a mind nagyobb mértékű felhasználása. Manapság a fosszilis energiahordozók kapcsán elsőként a légszennyezés, illetve az ebből fakadó globális klímaváltozás kerül előtérbe, mint a környezetvédelem első számú megoldásra váró, krónikus problémája. A kőolajkitermeléssel azonban szinte egyidős talajaink és vizeink kőolajszármazékokkal történő szennyezése is. Noha Magyarország nem foglal el előkelő helyet a kőolajkitermelő országok listáján, a leggyakoribb talaj- és talajvízszennyező anyagoknak a kőolaj, valamint a kőolaj eredetű szénhidrogének számítanak. Ennek oka az, hogy számtalan olyan ipari tevékenység van, ahol kőolajat, kőolajszármazékokat tárolnak, és a mindennapi tevékenység során, vagy kisebb-nagyobb haváriák (vezetéktörés, földalatti tároló tartály korrózió általi sérülése) következtében éri szennyezés a különböző környezeti elemeket. Emellett több évtizeddel ezelőtti tevékenységekből is visszamaradtak olyan felszín alatti szennyezések, amelyek a mai napig jelen vannak. Erre jó példát mutatnak a katonai létesítmények, vagy a Péti Nitrogénművek Rt. egykori pétfürdői olajfinomító üzeme, amelyet a II. világháború során 1944. június 14.-én ért bombázótámadás. Az ebből fakadó olajszennyezés pedig a mai napig jelen van az érintett pétfürdői iparterületen és okoz megoldandó problémát.

A kőolajeredetű szénhidrogének közül különösen nagy gondot jelentenek az egyszerű aromás vegyületek, mint a bizonyítottan rákkeltő benzol, illetve a toluol, etilbenzol és a xilolok (összefoglalóan BTEX-vegyületek). Köszönhetően annak, hogy e vegyületek aránylag nagy vízdékonysággal rendelkeznek, a szennyezés könnyedén terjed a talajvízben, ezáltal veszélyt jelentve a felszín alatti vízkészletekre. Ebből kifolyólag a szennyezett közegek kármentesítése Magyarországon minden esetben törvényileg kötelező. A kármentesítési eljárások egyik környezetkímélő és költséghatékony módja a biológiai kármentesítés, vagy másnéven bioremediáció. E folyamat során a mikroszervezetek azon képességét használjuk ki, hogy a szennyezőanyagot képesek az életfolyamataik során lebontani vagy átalakítani. Számos mikroba tudja szén- és energiaforrásként hasznosítani a kőolaj eredetű szénhidrogéneket, így a BTEX-komponenseket is, mégpedig elsősorban aerob körülmények között. Az aerob lebontási útvonalak kulcslépéseit (pl. az aromás gyűrű hasítását) oxigenáz, illetve dioxigenáz enzimek katalizálják, amelyek molekuláris oxigént igényelnek a működésükhöz. Az aerob lebontási folyamatoknak köszönhetően azonban a szennyezett felszín alatti közegben gyorsan megindul

a rendelkezésre álló oldott oxigén koncentrációjának csökkenése, végül pedig anaerob viszonyok alakulnak ki. Oxigén hiányában azonban a legtöbb kőolaj eredetű szénhidrogén biodegradációja lelassul, aminek következtében például a benzol és a xilolok perzisztens szennyezőkké válhatnak. Ennek köszönhetően a szennyezett felszín alatti közegek kármentesítése során bevett gyakorlat a közeg oxigénnel való ellátása. Kérdésként merül fel ugyanakkor, hogy léteznek-e olyan mikroszervezetek, amelyek mikroaerob körülmények mellett is képesek a szennyezőanyagok teljes lebontására. Régóta ismert, hogy egyes extradiol dioxigenáz enzimek hipoxikus körülmények (<2 mg/l oldott oxigén) között is képesek az aromás gyűrű hasítását katalizálni. Kukor és Olsen (1996) voltak az elsők, akik felvetették, hogy az extradiol dioxigenázok I.2.C alcsaládjába tartozó katekol 2,3-dioxigenázok, amelyek a *meta*-típusú gyűrűhasítási útvonal kulcsenzimeit, alacsony szubsztrát koncentrációkhoz adaptálódhattak az evolúció során, és emiatt maradhatnak aktívak hipoxikus körülmények között is. Eltis és Bolin (1996), valamint Hendrickx és munkatársai (2006) által közölt eredmények alapján jól ismert volt az is, hogy néhány *Pseudomonas* mellett főleg a Burkholderiales rend (korábban Betaproteobacteria osztály) nemzetségeibe tartozó baktériumok (*Comamonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia*) rendelkezhetnek ebbe az alcsaládba tartozó enzimekkel. Ugyanakkor a kódoló I.2.C *C23O* gének diverzitása jórészt ismeretlen maradt, mivel a kutatások középpontjában a kevésbé heterogén csoportokat alkotó, és ezáltal könnyebben vizsgálható I.2.A (Gammaproteobacteria osztály *Pseudomonas* nemzetsége) és I.2.B (Alphaproteobacteria osztály *Sphingomonas* nemzetsége) alcsaládokba tartozó extradiol dioxigenázok álltak (Hendrickx és mtsai, 2006). Logikus kérdésként merült fel tehát, hogy mekkora lehet a szerepük a BTEX-vegyületek felszín alatti közegekben történő lebontásában azoknak a mikroszervezeteknek, amelyek I.2.C alcsaládba tartozó extradiol dioxigenáz enzimmal rendelkeznek, illetve mekkora a kódoló *C23O* gének diverzitása? A dolgozat erre a gyakorlati vonatkozásokkal is rendelkező kérdésre próbál meg választ adni.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

A mikroaerob BTEX-lebontásra képes mikroszervezetek, illetve az I.2.C-típusú *C23O* gének diverzitásának feltárása alapvetően kétféle megközelítés alkalmazásával történt. Egyrészt *in situ* vizsgálatokat végeztünk, amelyek során magyarországi BTEX-vegyületekkel szennyezett felszín alatti közegek mikrobiális közösségeit igyekeztünk feltárni, elsősorban molekuláris mikrobiológiai módszerek segítségével. Emellett *in vitro* vizsgálatokat is végeztünk, amelyek során mikrokozmoszok, illetve dúsító tenyészetek segítségével próbáltunk

választ találni a feltett tudományos kérdésekre. A mikroba közösségek faji összetételének feltárása többnyire molekuláris ökológiai eszközök segítségével történt, de főleg a dúsítási kísérletek során klasszikus tenyésztési eljárásokat is alkalmaztunk a bakteriális diverzitások feltárásához.

Az *in situ* mikroba közösségek vizsgálatakor elsőként minden esetben egy molekuláris ujjlenyomat módszert, a terminális restrikciós fragmenthossz polimorfizmust (T-RFLP) használtuk arra, hogy képet kapjunk a mikroba közösségek 16S rRNS, illetve I.2.C-típusú *C23O* gén diverzitásáról. A domináns közösségalkotók, valamint a *C23O* genotípusok megismerése ezután kezdetben az akkor elérhető módszerrel, molekuláris klónozással történt. Később a nagyáteresztőképességű, újgenerációs szekvenálási módszerek elterjedté és hozzáférhetővé válása után a 16S rRNS gén diverzitását Roche 454 piroszekvenálás, vagy Illumina MiSeq ampliton szekvenálás segítségével tártuk fel.

Az I.2.C-típusú *C23O* gének aktivitását RNS alapú vizsgálatok segítségével tártuk fel. E során kvantitatív real-time PCR (qPCR) módszerrel számszerűsítettük a *C23O* mRNS transzkriptumok mennyiségét *in situ* körülmények között. Később az egyes genotípusok aktivitásának vizsgálatához egy molekuláris ujjlenyomat módszert fejlesztettünk, amely a single-nucleotide primer extension (SNuPE) eljárásán alapult.

Az *in situ* körülményeket imitáló mikrokozmosz kísérlet során a stabil izotópos jelölés módszerét használtuk ahhoz, hogy azonosítani tudjuk azokat a mikroszervezeteket, amelyek képesek a toluolt mikroaerob körülmények között is szén- és energiaforrásként is hasznosítani. Ehhez olyan toluolt adtunk egy magyarországi BTEX-szennyezett kárhelyről származó talajvíz üledékhez, amelynek mind a hét szénatomja a szén stabil, 13-as izotópja volt. A toluol mikroaerob körülmények közötti biodegradációja során DNS-t, illetve RNS-t izoláltunk a mikrokozmoszokból, majd ultracentrifugálással különítettük el a 13-as szénizotópot tartalmazó nukleinsav (DNS, illetve RNS) frakciókat. E jelölődött nukleinsav frakciók vizsgálatával állapítottuk meg azon mikroszervezetek körét, amelyek részt vettek a toluol mikroaerob lebontásában.

A mikroaerob és aerob összehasonlító dúsító tenyésztéseket mindig 3-3 párhuzamos szérumüvegben hoztuk létre, ásványi tápoldat segítségével. Szénforrásként benzolt, toluolt, BTEX-keveréket, vagy kőolaj/gázolaj keveréket alkalmaztunk a kísérletek során. A mikroaerob tenyészetek létrehozásakor a szeptummal és alumínium zárókupakkal hermetikusan lezárt üvegek folyadékterében karbogén gázkeveréket (N/CO₂ 80:20 v/v) áramoltattunk át 10 percen keresztül, hogy anaerob körülményeket alakítsunk ki. Ezt követően a 0,5 mg/L-es oldott oxigén koncentrációt sterilre szűrt levegő beinjektálásával állítottuk be. Az oldott oxigén

koncentrációját minden esetben nem-invazív módon, Fibox 3 trace v3 száloptikás mérőberendezés és az üvegek belső felszínére ragasztott PSt3 szenzor szpotok (PreSens, Németország) segítségével mértük. Az aerob dúsító tenyészetekben 6-8 mg/L oldott oxigén koncentrációt igyekeztünk fenntartani a kísérletek során.

A baktérium törzsek izolálása a környezeti mintákból, illetve a dúsító tenyészetekből minden esetben R2A táptalajon történt. Identifikációjukat a teljes 16S rRNS gén szekvenciájának elemzésével végeztük el. Az izolátumok aromás szénhidrogén-lebontó képességét hermetikusan lezárt szérumüvegekben vizsgáltuk, a gáztérből történő szilárd fázisú mikroextrakcióval, majd ezt követő GC-MS vizsgálattal. Az egyedi BTEX-komponenseket mindig kizárólagos szénforrásként alkalmaztuk ásványi tápoldatban.

Az új baktériumfajok tudományos leírása polifázikus úton történt. A metabolikus képességek feltárásához sztenderd laboratóriumi tesztek, illetve API tesztcsíkokat használtunk. A zsírsavprofil elemzést, DNS G + C arány meghatározást illetve, poláris lipidek vizsgálatát a németországi Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) végezte el számunkra szolgáltatási megbízás keretében.

A bakteriális teljes genomok megállapítása kétféle módon történt: egyrészt tenyésztésbe vont tiszta tenyészet DNS-ének *de novo* szekvenálásával Illumina platformon, illetve bin-genom építéssel, dúsító tenyészetből származó metagenom adatok segítségével.

3. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁS

3.1 Az *in situ* mikroba közösségek vizsgálata

A kutatás első szakaszában négy magyarországi BTEX-vegyületekkel szennyezett kárhely mikroba közösségeit tártuk fel. A 16S rRNS gén alapú diverzitás vizsgálatok minden esetben azt mutatták, hogy e kárhelyeken a felszín alatti közeg (talajvíz) mikroba közösségeit a Betaproteobacteria osztály (újabban Burkholderiales rend) képviselői dominálják. Ezen belül is a Comamonadaceae és a Rhodocyclaceae (újabban Zoogloeaceae) családok nemzetségei voltak a fő közösségalkotók. Ekkor még 16S rRNS gén alapú klóntárak segítségével olyan nemzetségek dominanciáját sikerült kimutatnunk, mint a *Rhodoferax*, *Dechloromonas*, *Malikia*, illetve *Acidovorax*. Sok esetben szinte ugyanazokat a 16S rRNS filotípusokat sikerült kimutatnunk, mint amelyeket más tanulmányok is leírtak szennyezett felszín alatti közegekből, a világ különböző pontjain. A legtöbb esetben egy máig kitenyésztetlen, *Rhodoferax*

nemzetségbeli mikroszervezet dominanciáját sikerült detektálni. Ehhez hasonló baktériumokat több európai és USA-beli kárhelyen is kimutattak („SIREN” kárhely, Egyesült Királyság; „Zeitz” kárhely, Németország; „Casper” kárhely, Wyoming, USA) (Alfreider és Vogt 2007; Callaghan és mtsai, 2010; Fahy és mtsai, 2006), emiatt már a kezdeti eredmények során felmerült a kérdés, hogy e baktériumok milyen szerepet játszhatnak a BTEX-vegyületek lebontásában. A *Dechloromonas* nemzetség egyes tagjairól (lásd pl. „*Dechloromonas aromatica*”) már ekkor ismert volt, hogy felszín alatti közegekben fontos BTEX-lebontók lehetnek, még hozzá nitrát-redukáló körülmények között. A *Malikia* nemzetség szerepe tisztázatlan maradt az *in situ* vizsgálatok során, habár a *Hydrogenophaga* nemzetség legközelebbi rokonaként valószínűsíthető BTEX-lebontó szerepét (Aburto és Ball 2009). Végül fontos megemlíteni az *Acidovorax* nemzetséget, amelynek egyes törzseiről ismert volt már ekkor is, hogy a klórbenzol aerob úton történő lebontására alacsony oldott oxigén koncentráció mellett is nagy hatékonysággal képesek (Balcke és mtsai, 2008). Az I.2.C-típusú *C23O* gének diverzitását mindegyik kárhelyen egy olyan PCR primerpár segítségével vizsgáltuk, amely elsősorban a Comamonadaceae család tagjai által kódolt szekvenciákat volt képes amplifikálni, ám már ennek segítségével is számtalan új genotípust sikerült kimutatnunk. A későbbiek során vizsgálati modell területté váló siklói kárhelyen azt is kimutattuk, hogy a domináns genotípusokról jelentős mennyiségű mRNS transzkriptum íródik át. Ezzel pedig bizonyítottuk azt, hogy a vizsgált I.2.C *C23O* gének szerepet játszanak legalább egyes BTEX-komponensek biodegradációjában. A siklói kárhelyen ráadásul a „csóva széle” koncepciót (plume fringe concept, Meckenstock és mtsai, 2015) is vizsgálni tudtuk. Ez a modell azt feltételezi, hogy a BTEX-vegyületek szignifikáns mértékű biodegradációjára csak a szennyezési csóva szélén van lehetőség, mivel a lebontáshoz szükséges elektron-akceptorok (oxigén, nitrát, szulfát) megfelelő koncentrációban csak itt állnak rendelkezésre. E zóna kiterjedése szélsőséges esetben pár centiméternyire korlátozódik csupán, míg a szennyezési csóva belső részén egy kiterjedt, erősen redukált zóna jön létre, amelyet vas-redukáló, illetve metanogén mikroszervezetek urálnak. Ez utóbbi mikroszervezetek csak erősen korlátozottan vesznek részt a szénhidrogének lebontásában, vagy kimondottan csak egy-egy komponens lebontására képesek (lásd például a toluol-lebontó *Geobacter metallireducens*), ami a természetes biodegradáció időtartamát emberi léptékben mérve beláthatatlan távra nyújtja el. Ha máshol nem is, a szennyezési csóva szélén, ahol szignifikáns lebontást feltételezünk, mindenképpen jelen kell lennie egy hipoxikus rétegnek, amelyet a mikroaerob lebontásra képes szervezetek uralhatnak. Eredményeink alapján egyértelműen megmutatkozott, hogy a siklói

kárhelyen is eltérő mikroba közösségekkel és I.2.C *C23O* genotípusokkal volt jellemezhető a szennyezési csóva széle, illetve annak középpontja.

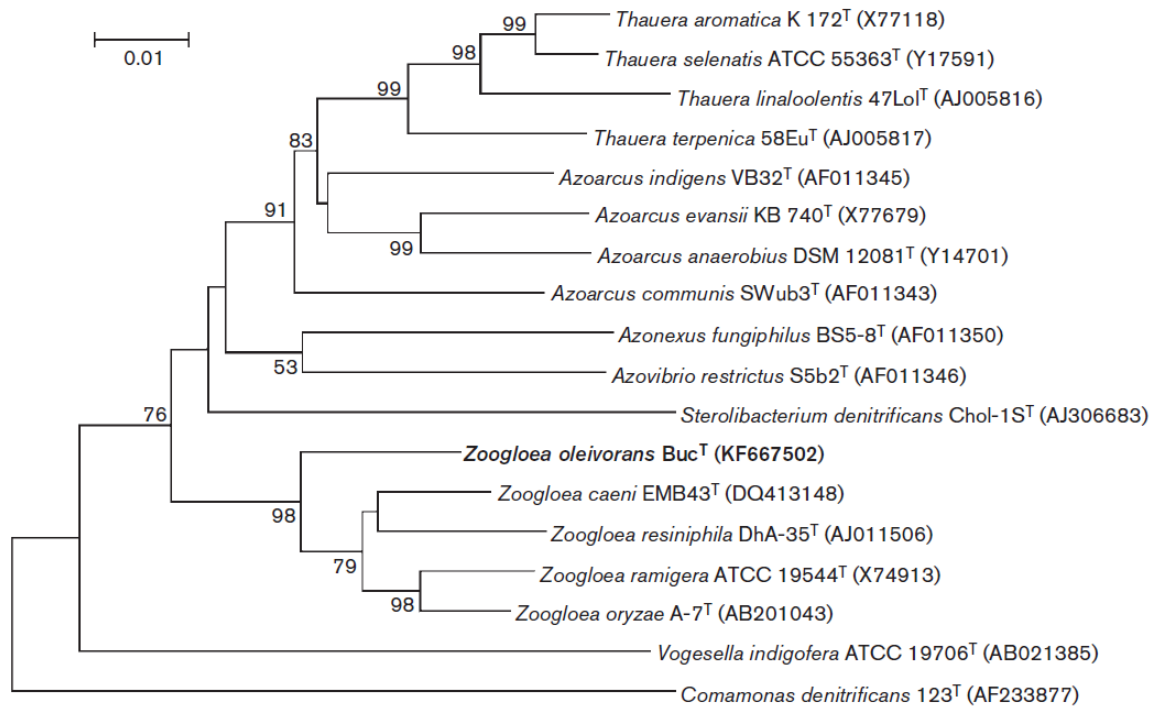
3.2 *In situ* mikroba közösség nyomon követése

Az *in situ* mikroba közösségek vizsgálata rávilágított ugyan arra, hogy az I.2.C *C23O* gének nagy diverzitással vannak jelen a BTEX-vegyületekkel szennyezett, felszín alatti közegekben, de többnyire nem kaptunk választ arra a kérdésre, hogy a közösség mely szereplői rendelkeznek e génekkel, mely mikroszervezetek a potenciális mikroaerob lebontók. Ahhoz, hogy erre a kérdésre választ kaphassunk, a siklósi BTEX-vegyületekkel szennyezett kárhely középpontját feltáró mintavételi kútban 13 hónapon át követtük nyomon a mikroba közösség összetételét RNS alapon, illetve monitoroztuk az I.2.C-típusú *C23O* gének expresszióját. A mikroba közösségek összetételét, valamint a *C23O* gének diverzitását klóntárak segítségével tártuk fel. Az I.2.C-típusú *C23O* gének diverzitásának feltárásához előzőleg egy új, csoportspecifikus PCR primerpárt terveztünk, amely nagyfokú specifitást mutatott, és segítségével hat különböző I.2.C *C23O* csoportot lehetett megkülönböztetni a mintákban. A bakteriális közösség dinamikáját 16S rDNS alapú T-RFLP segítségével követtük nyomon, míg a hat különböző I.2.C *C23O* csoport expressziós mintázatának monitorozásához egy másik fragment analízisen alapuló technikát, a „*single-nucleotide primer extension*” (SNuPE) módszert használtuk. A bakteriális közösség dinamikája, illetve az I.2.C *C23O* csoportok változó expressziós mintázata lehetővé tette, hogy statisztikai összefüggést keressünk egyes mikroszervezetek domináns jelenléte, illetve a funkciógén expressziós mintázatok között. Ennek eredményeképpen két taxont tudtunk azonosítani, amelyek lehetséges mikroaerob BTEX-lebontó mikroszervezetek lehettek a vizsgálat időtartama alatt. Egyikük az a *Rhodofera* nemzetségbe tartozó, máig kitenyésztetlen baktérium volt, amely gyakran mutatkozott dominánssnak a siklósi kárhely mikroba közösségében, illetve világszerte kimutatható volt BTEX-vegyületekkel szennyezett felszín alatti közegekből. A másik taxon egy szintén máig kitenyésztetlen bétaproteobaktérium volt, amelyre az adatbázisokban, illetve a szakirodalomban kitenyésztetlen Rhodocyclaceae családba tartozó baktériumként hivatkoznak. E taxont is szinte kizárólag BTEX-vegyületekkel szennyezett felszín alatti közegekből mutatták ki, ami tovább erősítette esetleges lebontó szerepét. A *Rhodofera* nemzetségbe tartozó baktérium szelektív dúsítására kísérletet tettünk négy, nitrogénforrást tekintve különböző tápoldat segítségével, azonban próbálkozásaink nem jártak sikerrel.

3.3 A szénhidrogén-lebontásra képes *Zoogloea oleivorans* Buc^T törzs új fajként történő leírása

Az *in situ* mikroba közösségek tisztán molekuláris módszereken alapuló vizsgálatai csak az I.2.C-típusú *C23O* gének diverzitásának feltárását engedték meg, míg az *e* génekkel rendelkező baktériumok diverzitása jórészt ismeretlen maradt. Emiatt szükséges volt a klasszikus, tenyésztésen alapuló módszereket is bevonni a vizsgálatokba. Ennek folyamányaként, a siklósi, illetve egy másik magyarországi kárhelyről származó mintákból folyamatosan végeztünk direkt, dúsítás nélküli baktériumtörzs izolálást. A törzsek 16S rDNS alapú azonosítása mellett minden esetben megvizsgáltuk, hogy az adott törzs rendelkezik-e I.2.C-típusú *C23O* génnel. Egy ilyen, 2013-ban történt kísérlet során sikerült egy olyan baktériumtörzset izolálni, amely a 16S rDNS szekvencia előzetes vizsgálata alapján a *Zoogloea* nemzetség új, még nem leírt tagjának tűnt, és egy korábban ismeretlen I.2.C-típusú *C23O* genotípussal rendelkezett. Habár a nemzetség képviselői elsősorban kommunális szennyvíztisztítói eleveniszapból mutathatóak ki, az izolálás időpontjában már ismert volt egyes törzseknek az aromás szénhidrogén-lebontási képessége is. Különösen Jechalke és munkatársainak vizsgálata keltette fel érdeklődésünket, mivel aerob benzol-lebontásban résztvevő *Zoogloea* populációt azonosítottak, stabil izotópos jelölés módszerének segítségével (Jechalke és mtsai, 2013).

A Buc^T laborjelű törzs szürkésfehér színű, kezdetben nyálkás, majd később viaszos állagú telepeket alkotott R2A tápagar felszínén, míg R2A táplevesben aránylag gyors flokkulumképződést mutatott. A fiatal, flokkulumot még nem képező 24-48 órás tenyészetek segítségével a sejtekről készült transzmissziós elektronmikroszkópi kép alapján látható volt, hogy a fiatal sejtek 2,5 – 3 µm hosszúak, míg átmérőjük 1,2 – 1,4 µm és egy poláris flagellummal rendelkeznek. A képeken megfigyelhető volt az is, hogy a sejteket vastag tok veszi körül. A 16S rDNS szekvencia-hasonlóság alapján a Buc^T legközelebbi rokonának a *Zoogloea caeni* adódott 97,2%-os homológiával. A nemzetség többi tagjával 96% alatti 16S rDNS hasonlóságot lehetett csak kimutatni. A Buc^T törzsnek a többi *Zoogloea* fajtól való filogenetikai elkülönülését a neighbor-joining módszerrel készült fa is jól mutatja (1. ábra). Sőt, a filogenetikai fa alapján elmondható, hogy valójában nem lehet egyértelműen megállapítani, hogy melyik *Zoogloea* faj a Buc^T törzs legközelebbi rokona, mivel annyira különálló ágon helyezkedik el (1. ábra).



1. ábra: A Buc^T törzs filogenetikai helyzetét bemutató, neighbor-joining módszerrel készült fa. (Farkas és mtsai, 2015 alapján).

A Buc^T törzs szénhidrogén-lebontási képességét első lépésben egyszerű gravimetriás módszerrel végeztük el. Ennek során egy kőolaj/gázolaj keverék lebontását vizsgáltuk, és a törzs $18,6 \pm 1,6\%$ -os bontási hatékonyságot mutatott a 120 órás vizsgálati időtartam végéig, szemben a referencia törzsként használt *Zoogloea caeni* EMB43^T-vel, amely egyáltalán nem mutatott szénhidrogén-lebontást. Később GC-MS vizsgálatok segítségével fény derült arra is, hogy a Buc^T-törzs képes aerob körülmények között a benzolt, a toluolt, valamint az etilbenzolt is egyedüli szén-, és energiaforrásként hasznosítani (nem publikált eredmény).

A Buc^T törzssel végzett fenotipikai, kemotaxonomiai, illetve molekuláris filogenetikai vizsgálatok eredményei alapján egyértelműen leírható volt a *Zoogloea* nemzetség új képviselőjeként. Mivel kőolajszármazékokkal szennyezett közegből került izolálásra, és képesnek bizonyult egyes kőolaj/gázolaj komponensek lebontására, a törzs a *Zoogloea oleivorans* nevet kapta. A típus törzs elhelyezésre került a németországi DSMZ törzsgyűjteményben (DSM 28387), valamint a magyarországi Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében (NCAIM B 02570).

3.4 Mikroaerob toluol-lebontó mikroszervezetek azonosítása stabil izotópos jelölés módszerével

Habár a klasszikus, tenyésztésen alapuló módszerekkel sikerült bővíteni ismereteinket az I.2.C C23O génnel rendelkező mikroszervezetek diverzitása terén, nyilvánvaló volt számunkra, hogy a potenciálisan mikroaerob BTEX-lebontásra képes baktériumok jelentős részének tenyésztése nehézségekbe ütközik (lásd a máig kitenyésztetlen *Rhodoferax* nemzetségbe tartozó baktériumok). Ahhoz tehát, hogy e baktériumoknak a mikroaerob körülmények közötti BTEX-lebontásban betöltött szerepét minden kétséget kizáróan tisztázhassuk, egy komplex környezeti mikrobiológiai vizsgálati módszer használatához kellett folyamodnunk. A stabil izotópos jelölés az egyik legelterjedtebb módszer, amellyel tenyésztés nélkül is képesek lehetünk mikroszervezetek bizonyos metabolikus képességeinek vizsgálatára. A módszert elsőként Radajewski és munkatársai írták le közel két évtizeddel ezelőtt (Radajewski és mtsai, 2000). Az alapelgondolás szerint olyan mesterségesen előállított szerves szubsztrátot adagolnak egy környezeti mintához (általában talaj vagy talajvíz üledék), amelyben a szénatomok közül legalább egy a szén stabil, 13-as izotópjaként van jelen (^{13}C). Azok a mikroszervezetek, amelyek a vizsgált körülmények között képesek a felkínált szubsztrátot szénforrásként hasznosítani, a nehéz szénizotópot beépítik a DNS-ükbe. Az így kezelt környezeti mintából izolált közösségi DNS-t izopiknikus grádiens centrifugálás alá vetik, amely során a nehéz izotópot tartalmazó DNS elkülöníthető és vizsgálható a jól ismert molekuláris ökológiai módszerekkel.

Ahhoz, hogy a siklósi kárhely esetében minden kétséget kizáróan meg tudjuk állapítani, hogy mely baktériumok képesek mikroaerob körülmények mellett is a monoaromás modellvegyületnek számító toluol lebontására, mikrokozmosz kísérletet végeztünk stabil szénizotópot tartalmazó toluol ($^{13}\text{C}_7$ -toluol) segítségével. A siklósi kárhely szennyezési csóvájának közepét feltáró ST2-es talajvízmintavételi kút aljáról vett üledékminta segítségével mikroaerob mikrokozmoszokat készítettünk. A mikrokozmoszokban a toluol koncentrációját GC-MS segítségével követtük nyomon, és az adatok értékelése alapján az inkubáció 3. és 7. napján izoláltunk DNS-t és RNS-t, majd izopiknikus grádiens centrifugálás segítségével frakcionáltuk a közösségi DNS-t, illetve RNS-t, ezután pedig T-RFLP, 16S rDNS amplikon piroszekvenálás és RNS-szekvenálás segítségével vizsgáltuk a DNS és RNS frakciókat. A vizsgálatok alapján három a Burkholderiales rendbe tartozó baktériumcsoportot azonosítottunk egyértelműen mikroaerob toluol-lebontóként, mivel DNS-ük és RNS-ük is a „nehéz” nukleinsav frakciókban dúsult fel. E baktériumok a következők voltak: *Quatrionicoccus australiensis*, *Zoogloea oleivorans* és egy kitenyésztetlen Rhodocyclaceae rokonsági körbe

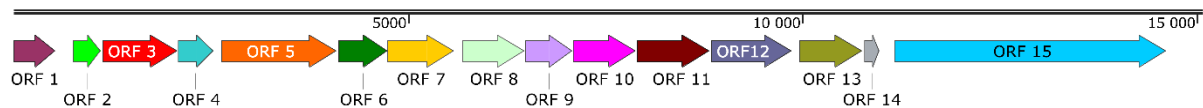
tartozó baktérium. Ez utóbbi mikroszervezet a 16S rRNS gén alapján megegyezett azzal a baktériummal, amelyet a korábbi monitoring vizsgálat eredményeképpen, statisztikai alapon, mint lehetséges mikroaerob lebontót azonosítottunk. A *Rhodofera* nemzetségbe tartozó mikroszervezet DNS-e az átmeneti frakcióban dúsult fel, így továbbra sem lehetett egyértelműen kijelenteni, hogy részt vett a toluol mikroaerob lebontásában. Ezen túlmenően viszont az RNS alapú vizsgálatok rámutattak arra, hogy egyes *Axonexus* és *Dechloromonas* nemzetségekbe tartozó baktériumoknak jelentős szerepük lehetett a lebontásban. Habár e mikroszervezetek DNS-e nem jelölődött oly mértékben, hogy a „nehéz” DNS frakcióban ki lehetett volna mutatni a feldúsulásukat, RNS szinten lebontókként voltak azonosíthatóak. Az mRNS szekvenciák elemzése alapján arra a megállapításra jutottunk, hogy a „nehéz” RNS frakcióban a katekol 2,3-dioxigenáz génekhez köthető transzkriptumok jelentős feldúsulása volt megfigyelhető a könnyű RNS frakcióhoz képest. E transzkriptumok többségét csak törzs (phylum) szinten lehetett baktérium csoporthoz kötni, de az elmondható, hogy a *C23O* transzkriptumok 16%-a *Zoogloea oleivorans* eredetű volt. Ez alapján pedig nyilvánvalóvá vált, hogy a *Zoogloea oleivorans* azért lehetett képes a toluolt mikroaerob körülmények között is szén- és energiaforrásként hasznosítani, mert rendelkezik olyan *C23O* génnel, amely a hipoxikus körülményekhez adaptálódott I.2.C-típusú katekol 2,3-dioxigenáz enzimet kódol.

3.5 A *Zoogloea oleivorans* Buc^T törzs teljes genom analízise: kulcs a mikroaerob toluol-lebontás útvonalának feltárásához

Miután a stabil izotópos kísérlet eredményei, azok közül is főleg az RNS alapúak rávilágítottak arra, hogy a *Zoogloea oleivorans* mikroaerob körülmények között is képes a toluol lebontására, az általunk izolált típus-törzs teljes genomszekvenciájának feltárása mellett döntöttünk. A Buc^T törzs teljes genomja 5 678 157 bázispár nagyságúnak adódott, 62,5%-os G+C tartalommal. A fehérje kódoló gének száma az annotáció alapján 5005 darab, amelyek közül legalább 66-ot lehet az aromás szénhidrogének lebontásához kötni.

Az I.2.C-típusú *C23O* gén egy olyan klaszterben foglalt helyet a genomban, amely csak egy részleges *meta*-gyűrűhasítási útvonalat kódolt (2. ábra). A gyűrűhasításhoz és a további lépések katalizálásához szükséges gének voltak csak megtalálhatóak ugyanis e klaszterben, míg a gyűrű aktiválásához szükséges gének hiányoztak. Ráadásul a klaszter mindkét végén transzpozonokat kódoló gének helyezkedtek el (Tn3 családba tartozó transzpozon „upstream” helyzetben, illetve egy pontosan nem kategorizálható transzpozon génje „downstream”

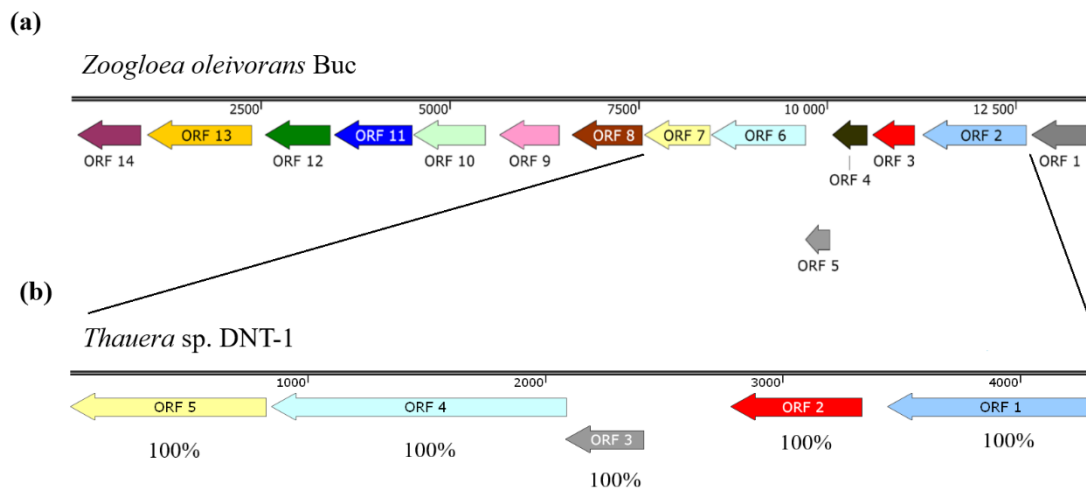
helyzetben). Ez arra utalt, hogy e génklasztert horizontális géntranszfer (HGT) útján szerezte a Buc^T törzs.



2. ábra: A *Zoogloea oleivorans* Buc^T törzs genomjában megtalálható, részleges meta-gyűrűhasító lebontási útvonalat kódoló génklaszter. ORF 1: Tn3 családba tartozó transzpozon; ORF 2: ferredoxin; ORF 3: I.2.C-típusú katekol 2,3-dioxigenáz; ORF 4: hem-kötő fehérje; ORF 5: 2-hidroximukonsav-félaldehid dehidrogenáz; ORF 6: glutation-S-transzferáz; ORF 7: 2-hidroximukonsav-félaldehid hidroláz; ORF 8: 2-oxopent-4-enoát hidratáz; ORF 9: hipotetikus fehérje; ORF 10: SDR-családba tartozó oxidoreduktáz; ORF 11: acetaldehid-dehidrogenáz; ORF 12: 4-hidroxi-2-oxovalerát-aldoláz; ORF 13: 2-oxo-3-hexéndisav dekarboxiláz; ORF 14: piruvát karboxiláz (Táncsics és mtsai. 2020 alapján).

Az I.2.C-típusú C23O gént tartalmazó klaszterben nem voltak megtalálhatóak olyan gének, amelyek a gyűrű aktivációját katalizáló enzimet kódoltak volna. Ennélfogva a genomban máshol ugyan, de kellett, hogy találjunk ilyen funkciójú géneket. Ma már ismert, hogy az aromás gyűrű aktivációját fenol-monooxigenáz enzim is el tudja végezni. Ez az enzim általában egy többkomponensű fenol-hidroxiláz rendszer részeként található meg az aromás szénhidrogének lebontására képes baktériumok genomjában. Ilyen fenol-hidroxiláz rendszert kódoló gének pedig a Buc^T törzs genomjában is megtalálhatóak voltak, méghozzá egy teljes meta-gyűrűhasítási útvonalat kódoló génklaszter részeként. Tovább vizsgálva a genomot, még egy klasztert találtunk, amelyben aromás gyűrű hidroxilációját végző enzimet kódoló gének voltak megtalálhatóak. Ez egy alapvetően bifenilek lebontásában szerepet játszó génklaszter volt (a továbbiakban bifenil-degradációs klaszter), és ezt is mobilis genetikai elemek határolták, tehát szintén HGT útján kerülhetett a Buc^T törzs genomjába. A klaszter egy része szinte teljes egyezést mutatott egy, a *Thauera* sp. DNT-1-es törzsben kimutatott DNS szakasszal, amely többek között toluol-dioxigenáz enzimet kódoló géneket tartalmazott (3. ábra). E baktérium törzsről ismert, hogy képes a toluolt aerob és anaerob úton is lebontani, és oxigén jelenlétében e toluol-dioxigenáz enzimet használja a toluol aromás gyűrűjének aktiválásához (Shinoda és mtsai, 2004). Sajnos Shinoda és munkatársai csak a klaszter egy részét tárták fel, de szinte biztosra vehető, hogy ugyanaz a bifenil-klaszter található meg mindkét baktérium törzsben. Az összehasonlítható szakaszokon öt-öt ORF található jól meghatározható funkcióval, illetve a Buc^T törzs esetében található még egy további ORF, amely azonban csak hipotetikus fehérjét

kódol. E hipotetikus fehérjét kódoló ORF csak részlegesen található meg a *Thauera* sp. DNT-1-es törzs esetében, ám ettől eltekintve 100%-os az egyezés a két DNS szakasz között.



3. ábra: A toluol dioxigenáz gént tartalmazó klaszterek a (a) *Zoogloea oleivorans* Buc^T (ORF 1: *GntR* családba tartozó transzkripciós regulátor; ORF 2: aromás gyűrű-hidroxiláló dioxigenáz enzim alfa alegysége; ORF 3: 3-fenilpropionát/fahéjsav dioxigenáz béta alegysége; ORF 4: hipotetikus fehérje; ORF 5: ferredoxin; ORF 6: piridin nukleotid-diszulfid oxidoreduktáz; ORF 7: *cis*-2,3-dihidrobifenil-2,3-diol dehidrogenáz; ORF 8: 2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenáz; ORF 9: 2-oxopent-4-enoát hidratáz; ORF 10: acetaldehid dehidrogenáz; ORF 11: 4-hidroxi-2-oxovalerát aldoláz; ORF 12: 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoát hidroláz; ORF 13: aromás szénhidrogén lebontásában résztvevő fehérje; ORF 14: alfa/béta hidroláz) és a (b) *Thauera* sp. DNT-1 (ORF 1 és ORF 2: terminális dioxigenáz vas-kén fehérje; ORF 3 ferredoxin; ORF 4: ferredoxin reduktáz; ORF 5: dehidrogenáz) törzsek esetében. Az azonos színnel jelölt ORF-ek azonos funkciójú enzimeket kódolnak. Az ORF-ek alatt feltüntetett százalékos értékek az egymásnak megfelelő ORF-ek hasonlósági értékeit mutatják. (Táncsics és mtsai. 2020 alapján)

A Buc^T törzs teljes genomszekvenciájának birtokában a stabil izotópos kísérletből származó metatranszkriptóma adatokat, azok közül is a nehéz RNS frakcióból származó mRNS szekvenciákat a genomra illesztettük. Ez a lépés lehetővé tette, hogy feltárjuk mely génklaszterek vettek részt a toluol mikroaerob körülmények közötti lebontásában. A részleges *meta*-gyűrűhasítási útvonalat kódoló génklaszter esetében azt találtuk, hogy mindegyik gén jelentős aktivitást mutatott, és különösen az I.2.C-típusú C23O, illetve a 2-hidroximukonsav-félaldehid dehidrogenáz gén esetében lehetett aránylag nagy mRNS számot megfigyelni. Másrészt viszont a fenol-hidroxiláz rendszert kódoló génklaszter esetében többnyire alacsony aktivitást tapasztaltunk. Ez alapján feltételezhető, hogy az e gének által kódolt extradiol dioxigenáz enzimek nem vettek részt a toluol gyűrűjének hasításában. A fenol-hidroxiláz kódoló gének alacsony aktivitása pedig arra engedett következtetni, hogy a toluol gyűrűjének hidroxilációja nem 2-hidroxitoluol (o-krezol) köztterméken keresztül történt. Kérdés maradt

tehát, hogy hogyan is történt a toluol gyűrűjének hidroxilációja mikroaerob körülmények között. A választ a bifenil-degradációs klaszter adta meg, ugyanis az itt található gének, de különösen a toluol-dioxigenáz-szerű enzimet kódoló két gén jelentős aktivitást mutatott. Ez alapján azt lehetett valószínűsíteni, hogy a 3-metilkatekol kialakulása toluol-cisz-dihidrodiol közti terméken keresztül történt. Az eredmények alapján látható, hogy ez a toluol-dioxigenáz enzim működőképes maradhatott mikroaerob körülmények között is. Ez szakirodalmi adatokkal is jól alátámasztható. A *P. putida* F1-es törzse esetében megfigyelték, hogy a toluol-dioxigenáz enzimet kódoló gének expressziójára, illetve az enzim életidejére nem volt hatással az oldott oxigén koncentrációjának csökkenése (Costura és Alvarez 2000). A *Thauera* sp. DNT-1-es törzs esetében, amely gyakorlatilag ugyanazt a toluol-dioxigenáz enzimet használja a toluol gyűrűjének aktiválásához, mint a *Z. oleivorans* Buc^T, kimutatták, hogy mikroaerob körülmények között is képes a toluol lebontására (Shinoda és mtsai, 2004).

A *Zoogloea oleivorans* Buc^T törzs genomjának vizsgálata rámutatott arra, hogy e törzs valóban azért volt képes a toluol mikroaerob körülmények közötti lebontására, mert rendelkezett olyan *C23O* génnel, amely I.2.C-típusú extradiol dioxigenáz enzimet kódolt. Emellett azonban legalább olyan fontos szerepe volt a folyamatban egy toluol-dioxigenáz aktivitással rendelkező enzimnek is, amely a toluol aromás gyűrűjének hidroxilációjáért volt felelős és szintén működőképes volt mikroaerob körülmények között. Kijelenthetjük tehát, hogy nem lehet egyetlen gén, vagy enzim jelenlétéhez, illetve működéséhez kötni az aromás szénhidrogének mikroaerob lebontását. Fontos megfigyelés továbbá, hogy mindkét kulcsfontosságú enzim olyan génklaszterben helyezkedett el, amelyeket mobilis genetikai elemek (transzpozonok) határoltak, tehát valószínűleg horizontális géntranszfer útján kerültek a Buc^T törzs genomjába.

3.5 Az *in vitro* feldúsított mikrobaközösségek vizsgálata: aerob és mikroaerob dúsító tenyészetek összehasonlító elemzése

Részben a stabil izotópos vizsgálatoknak is köszönhetően világossá vált előttünk, hogy az I.2.C-típusú *C23O* gén megléte nem ruházza fel automatikusan az adott baktériumot a mikroaerob BTEX-lebontás képességével. Ahhoz, hogy további ismereteket nyerjünk azon I.2.C *C23O* gének diverzitásáról, amelyek ténylegesen a mikroaerob lebontáshoz köthetőek, párhuzamos aerob és mikroaerob, aromás szénhidrogén-lebontó dúsító tenyészeteket hoztunk létre, majd vizsgáltuk a kialakult mikroba közösségeket. A vizsgálatokhoz egy közép-magyarországi, kőolajszármazékokkal szennyezett kárhelyről származó biofilmet használtunk

inokulumként a dúsító tenyészetekben. A biofilm egy „pump-and-treat” kármentesítő rendszer részeként működő búvárszivattyú rozsdamentes acél felszínén alakult ki. A dúsítási kísérleteket három lépésben hajtottuk végre, 100 mL-es, légmentesen zárható laboratóriumi szérumüvegekben aerob (7-8 mg/L oldott oxigén), illetve mikroaerob (0-0,5 mg/L oldott oxigén) körülmények között (4. ábra).



4. ábra: A dúsító tenyésztésekhez használt, hermetikusan lezárt szérumüveg. Az üveg belső oldalán jól látható az oldott oxigén koncentrációjának méréséhez szükséges szpot.

Az első dúsító kísérlet célja az volt, hogy általános képet kapjunk arról, hogy milyen hatással van az oxigén-limitáció a BTEX-lebontás során feldúsuló bakteriális közösség összetételére. Érdekes módon, mind aerob, mind pedig mikroaerob körülmények között a Comamonadaceae családba (Burkholderiales rend) tartozó nemzetségek váltak dominánssá. Azonban míg aerob körülmények között a *Malikia* nemzetség volt uralkodó a közösségekben, addig mikroaerob körülmények között az *Acidovorax* nemzetség volt a legdominánsabb. Ez a nagyfokú eltérés az I.2.C-típusú *C230* gének diverzitásának vizsgálatakor is megmutatkozott. A mikroaerob dúsítókban egy korábban izolált *Acidovorax* nemzetségbeli baktériumtörzshöz lehetett kötni a domináns I.2.C *C230* genotípust, míg az aerob dúsítókban egy addig ismeretlen genotípus dominált, amit nem lehetett ismert baktériumhoz kötni. Mivel azonban az aerob dúsítókban a *Malikia* nemzetség dominált, felmerült bennünk, hogy e baktériumok

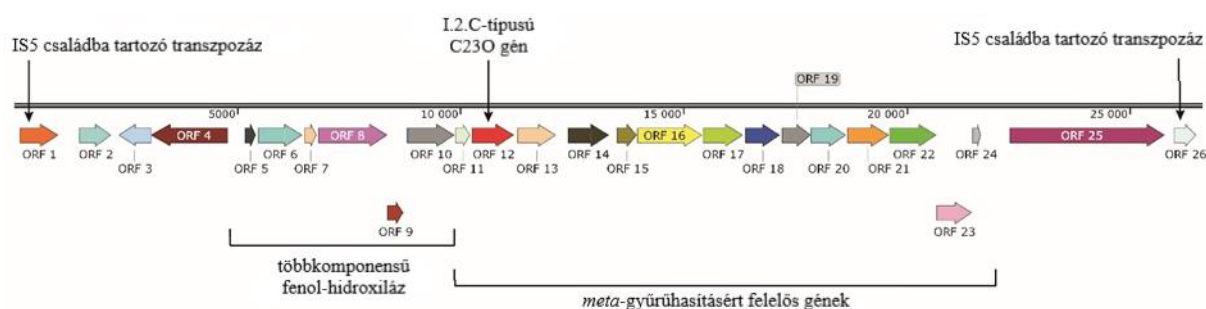
rendelkeznek az új I.2.C *C23O* genotípussal. A dúsító tenyészetekből történt törzsiszolálás során a *Malikia* nemzetség képviselőit nem sikerült izolálnunk, így feltevésünket nem tudtuk igazolni.

A második dúsítási kísérletünk során nem BTEX-keveréket, hanem vagy csak benzolt, vagy csak toluolt tartalmaztak a mikrokozmoszok, mint elérhető szén-, és energiaforrás. A célunk e kísérlettel az volt, hogy megvizsgáljuk, mennyire fednek át a mikroaerob benzol és toluol-lebontó bakteriális közösségek, emellett mikroaerob benzol- és/vagy toluol-lebontó baktériumtörzseket izoláljunk, továbbá izolálás céljából újra feldúsítsuk a *Malikia* nemzetség képviselőit. Mivel a *Malikia* nemzetség legközelebbi rokona a *Hydrogenophaga* nemzetség, amelynek képviselőit gyakran mutatják ki benzollal szennyezett felszín alatti közegekből, feltételeztük, hogy elsősorban a benzol biodegradációjára lehetnek képesek. E feltételezésünk végül be is igazolódott, mivel az aerob benzol-lebontó dúsító tenyészetekben e nemzetség képviselői váltak egyeduralmukodóvá, és két képviselőjüket izolálnunk is sikerült. E törzsek a *Malikia spinosa* fajjal mutattak rokonságot és mindkettő rendelkezett azzal az I.2.C *C23O* genotípussal, amelyet az előző dúsítási kísérletben az aerob mikrokozmoszokban dominánsként mutattunk ki. E törzsek egyikét (*M. spinosa* AB6-os laborjelű törzs) tovább vizsgálva kimutattuk, hogy a benzol mellett képes a toluolt és az etilbenzolt is egyedüli szén-, és energiaforrásként hasznosítani. A törzs teljes genomszekvenciájának feltárása rávilágított arra, hogy az I.2.C *C23O* gén egy fenol lebontásért felelős klaszterben helyezkedik el, amelyet mobilis genetikai elemek határolnak (5. ábra). Mivel a genomban nem találtunk kifejezetten benzol/toluol mono- vagy dioxigenázt, valószínűsíthető, hogy e génklaszter a felelős mind a benzol, mind pedig a toluol lebontásáért. Hasonló megfigyelést tettek az ugyancsak Comamonadaceae családba tartozó *Alicyclophilus denitrificans* benzol- és toluol-lebontó törzsei esetében (Oosterkamp és mtsai, 2013). Megjegyzendő továbbá, hogy a benzol aromás gyűrűjének phenol monooxigenázok általi hidroxilációja egy részletesen leírt folyamat (Pérez-Pantoja és mtsai, 2010), és a toluol-lebontásban betöltött szerepük is jól ismert (Cafaro és mtsai, 2004; Martínez-Lavanchy és mtsai, 2015). Kérdés maradt ugyanakkor, hogy az etilbenzol lebontására milyen metabolikus útvonalat használ az AB6-os törzs. A legkézenfekvőbb az volt, hogy etilbenzol dioxigenáz enzimet kódoló gént keressünk a genomjában, azonban ilyen funkcióval bíró gént nem találtunk. Ismert ugyanakkor, hogy az etilbenzol lebontása nem csak az aromás gyűrű oxidációján keresztül, hanem az etil-csoport oxidációjának útján is lebontásra kerülhet. Ez utóbbi lépést a naftalin dioxigenáz enzim képes katalizálni (Lee és Gibson 1996; Lee és mtsai, 2019). Ennek okán naftalin dioxigenázt kódoló géneket kerestünk a genomban, amelyeket meg is találtunk, még hozzá egy teljes *nag* operonban elhelyezkedve. Ez az operon tartalmazta a szalicilát-5-hidroxiláz és a gentizát 1,2-dioxigenáz enzimeket kódoló géneket is,

amelyek kulcsszerepet játszanak naftalin biodegradációjában (Park és mtsai, 2007; Pumphrey és Madsen 2007; Zhou és mtsai, 2001). Ez alapján pedig valószínűsíthető, hogy az AB6-os törzs a naftalin lebontására is képes.

E dúsítási kísérlet újabb bizonyítékot szolgáltatott arra is, hogy az I.2.C-típusú C23O gén meglepte önmagában még nem jelenti azt, hogy az adott baktérium képes egyes aromás szénhidrogéneket mikroaerob körülmények között lebontani. Ahhoz ugyanis olyan, az aromás gyűrűt hidroxilálni képes enzimmel is rendelkeznie kell, amely szintén működőképes alacsony oldott oxigén koncentráció mellett is, mint ahogy azt a *Z. oleivorans* Buc^T esetében láthattuk. Ilyennel azonban a *M. spinosa* AB6 feltehetőleg nem rendelkezett.

A kísérlet másik célját, hogy olyan baktériumtörzseket izoláljunk, amelyek mikroaerob benzol-és/vagy toluol-lebontásra képesek, nem sikerült teljesítenünk, mivel e mikrokozmoszokból kizárólag a *Pseudomonas veronii/extremaustralis* leszármazási vonalhoz tartozó törzseket tudtunk izolálni, amelyek nem rendelkeztek I.2.C C23O génnel. Ráadásul a benzolt tartalmazó mikroaerob dúsító tenyészetben a dúsítás ötödik hetében már nem lehetett benzol-lebontást megfigyelni. Habár a toluolt tartalmazó mikroaerob dúsító tenyészetekben a végponti dúsítók esetében 30-40%-os toluol-lebontást lehetett detektálni, ez jelentősen elmaradt attól, mint amit az aerob mikrokozmoszok esetében tapasztaltunk. Ez az eredmény rávilágított arra, hogy az egyedi BTEX komponensekkel, mikroaerob körülmények között történő dúsító tenyésztés alacsony diverzitású közösségek feldúsulásához vezethet, amennyiben a közösség nem tartalmaz kimondottan mikroaerob lebontásra képes mikroszervezetet.



5. ábra: A *M. spinosa* AB6 genomjában kódolt fenol-lebontási klaszter sematikus ábrája. (Révész és mtsai, 2020a alapján)

A harmadik dúsítási kísérlet során egy valós szennyezéshez jobban közelítő beállítást próbáltunk vizsgálni, és nem kizárólag aromás komponenseket adtunk a mikrokozmoszokhoz szénforrásként, hanem egy kőolaj/gázolaj keveréket. E kísérlet során tehát főleg az alifás szénhidrogének jelentették a szénforrást, így az e vegyületek aerob úton történő lebontásában

szerepet játszó alkán 1-monooxigenáz (*alkB*) enzimeket kódoló gének diverzitását vizsgáltuk aerob és mikroaerob körülmények között. Akárcsak az előző kísérletek során, itt is jelentős különbségeket tártunk fel az aerob és a mikroaerob körülmények között feldúsított mikroba közösségek összetétele között. Az aerob dúsító tenyészetek esetében a *Polaromonas* és a *Pseudomonas* nemzetségek képviselői voltak a legdominánsabbak, de jelentős számban tudtuk kimutatni a kiváló alifás szénhidrogén-lebontó *Rhodococcus* nemzetség képviselőit is. (Martinková és mtsai, 2009; Zampolli és mtsai, 2019). Megjegyzendő, hogy e nemzetség szinte összes képviselője esetében kimutatható az alkán-1 monooxigenáz gén(ek) jelenléte a genomjukban (Táncsics és mtsai, 2015). Nem véletlen tehát, hogy egyes *Rhodococcus* fajokat, de különösen az úgynevezett „erythropolis” klád tagjait szénhidrogénekkal szennyezett közegek generalista fajaiként tartanak számon (Hamamura és mtsai, 2006; Hamamura és mtsai, 2013). Meglepő módon, a *Candidatus Saccharibacteria* törzshöz tartozó szekvenciák is jelentős abundanciával voltak jelen az AER2-es aerob dúsítót tenyészetben. E törzset egészen a közelmúltig kizárólag molekuláris szinten ismerték, de még napjainkban is csak egyetlen tenyésztésbe vont képviselője ismert, emiatt, mint a „mikrobiális sötét anyag” tagjai hivatkoznak a szakirodalomban e baktériumokra (He és mtsai, 2015). Habár e baktériumok diverz ökoszisztémákból mutathatóak ki, egy bizonyos csoportjuk (3. szubdivízió) jellemzően szénhidrogénekkal szennyezett közegekben van jelen. Winsley és munkatársai (2014) gázolajjal szennyezett talajból mutatták ki, míg egyes stabil izotópos kísérletek eredményei azt feltételezik, hogy szerepük lehet a benzol és a toluol lebontásában (Luo és mtsai, 2009; Xie és mtsai, 2011). Ami az *alkB* gének diverzitását illeti, az aerob dúsítók közül kettőben egy addig ismeretlen genotípus volt a meghatározó, amit nem tudtunk ismert baktériumhoz kötni. Mellette főleg *Rhodococcus*, illetve *Pseudomonas* eredetű *alkB* gének voltak kimutathatóak. A mikroaerob dúsító tenyészetekben a *Rhodococcus* nemzetség képviselői jóval kisebb abundanciával voltak jelen, ami azt mutatja, hogy e baktériumok magasabb oldott oxigén koncentrációt igényelnek ahhoz, hogy alkán-lebontó képességüket ki tudják fejteni. Ezzel szemben az *Acinetobacter* nemzetség képviselői szinte egyeduralkodóvá váltak, a *Pseudomonas* nemzetség képviselőivel egyetemben. Mellettük olyan nemzetségek jelenlétét tudtuk még jelentősebb mértékben kimutatni, mint a Burkholderiales rendbe tartozó *Acidovorax*, *Variovorax* és *Simplicispira* nemzetségek, amelyeket korábban a mikroaerob úton történő BTEX-lebontáshoz tudtunk kötni. E mikrokozmoszokban az *alkB* gének nagy részét egy *Pseudomonas veronii* és egy *Acinetobacter calcoaceticus* törzshöz lehetett kötni. Az *Acinetobacter* nemzetség számos képviselőjéről ismert, hogy képesek az alkánok és az aromás szénhidrogének lebontására, ráadásul egyes törzseik kifejezetten a hosszú szénláncú alkánok

degradációjához adaptálódtak (Lal és Khanna 1996; Di Cello és mtsai, 1997; Tani és mtsai, 2001). Annak a ténynek a tükrében, hogy e nemzetség vált dominánssá mikroaerob körülmények között, talán jobban érthetővé válik, hogy miért lehetnek abundánsak az *Acinetobacter* nemzetségbe tartozó baktériumok a mélyen fekvő kőolaj rezervoárookban, ahová minden bizonnyal a kitermelés során beinjektált vízzel jutnak (Orphan és mtsai, 2000; Zhao és mtsai, 2012). A kőolaj rezervoárok esetében elsősorban az anaerob alkán lebontás jöhet szóba, mint domináns folyamat, ám a kis mélységben fekvő rezervoárok nem tekinthetők feltétlenül teljesen anaerobnak, lévén a csapadék útján lehet némi oxigén utánpótlásuk (Jones és mtsai, 2007). Emellett a mélyebben fekvő rezervoárokba is juthat oxigén a kitermelés során beinjektált vízzel. Ennek megfelelően a kőolaj rezervoárookban kialakulhatnak olyan mikronichek, ahol, ha csak nyomnyi mennyiségben is, de megtalálható oxigén. Mindezeket összegezve azt lehet feltételezni, hogy az *Acinetobacter* nemzetség egyes képviselői alkalmazkodhattak az alkánok mikroaerob körülmények közötti lebontásához. A *Pseudomonas* nemzetség esetében meg kell megemlíteni, hogy a közelmúltban került leírásra egy *Pseudomonas extremaustralis* törzs, amely kizárólag mikroaerob körülmények között képes az alkánok biodegradációjára (Tribelli és mtsai, 2018). A *P. extremaustralis* legközelebbi rokona a *P. veronii*, amelyről a korábbi dúsító tenyésztések során is láthattuk, hogy alapvetően mikroaerob körülmények között vált dominánssá.

E kísérletek elvégzése után két nyitott kérdés maradt az aerob dúsító tenyészeteket illetően. Egyrészt szeretnénk volna megválaszolni, hogy a két aerob dúsítóban is dominánsan jelenlévő, eddig ismeretlen *alkB* genotípus milyen baktériumhoz köthető, illetve szeretnénk volna feltárni, hogy a *Candidatus Saccharibacteria* törzsbe tartozó mikroszervezetek milyen szerepet játszottak a közösségekben, szénhidrogén-lebontó baktériumokként azonosíthatóak-e. Ahhoz, hogy e kérdéseket megválaszolhassuk, megkíséreltük a rendelkezésünkre álló metagenom adatokból felépíteni e baktériumok genomjait. Eredményeink alapján az újonnan kimutatott *alkB* gént egy Gammaproteobacteria osztályba, azon belül is a Moraxellaceae családba tartozó baktériumhoz lehetett kötni. A genom közel teljes összeszerelése sikerült (>99%), ugyanakkor 16S rRNS gént nem sikerült hozzárendelnünk. A baktérium filogenetikai helyzetét 16S rRNS gén hiányában a riboszómális fehérjék alapján állapítottuk meg. E szerint a legközelebbi rokona az *Agitococcus lubricus*, amelyet tévesen a Firmicutes törzsbe sorolnak jelenleg. Valójában a teljes genom alapján a Gammaproteobacteria osztály Moraxellaceae családjába tartozik mindkét baktérium (akárcsak az *Acinetobacter* nemzetség). Az *alkB* gént tartalmazó gén klaszter vizsgálata megmutatta, hogy az *alkB* géntől upstream helyzetben, ellentétes orientációval megtalálható egy AraC családba tartozó transzkripciós regulátort kódoló gén is.

E gént *alkR* néven írták le az *Acinetobacter* sp. ADP1-es törzs esetében, és azt találták, hogy jelenléte esszenciális fontosságú az alkán-lebontás képességéhez (Ratajczak és mtsai, 1998). Ez alapján joggal feltételezhetjük, hogy az AER2_Gammaproteobacteria_44_116-jelű baktérium egy jelentős alkán-lebontó baktérium szerepét töltötte be az aerob dúsító tenyészetben.

Ahogy azt feljebb láthattuk, a vizsgált aerob dúsító tenyészet mikroba közösségben jelentős abundanciával lehetett kimutatni *Candidatus* Saccharibacteria törzshöz (*phylum*) köthető mikroszervezetet. Ebből, illetve bizonyos szakirodalmi adatokból akár arra is lehetne következtetni, hogy e baktériumok szerepet játszottak egyes szénhidrogének lebontásában a kísérletünk során. Ismert, hogy e baktériumok egy csoportját jellemzően szénhidrogénekkal szennyezett talajokból lehet kimutatni (Winsley és mtsai, 2014), míg stabil izotópos kísérletek eredményei alapján benzol és toluol-lebontó képességüket feltételezték (Luo és mtsai, 2009; Xie és mtsai, 2011). Környezeti szerepüket azért is nehéz feltárni, mivel e törzsnek mindössze egy-két képviselőjét sikerült eddig tenyésztésbe vonni, jellemzően humán szájüregi mintákból (He és mtsai, 2015; Collins és mtsai, 2019; Murugkar és mtsai, 2019). Ráadásul az izolátumok genomjának meglehetősen kis mérete (<0,9 Mbp) parazita életmódja ellentmond annak a feltételezésnek, hogy e törzs képviselőinek szerepük lehetne a szénhidrogének biodegradációjában.

A metagenom adatokból egy ezidáig ismeretlen, Saccharibacteria törzsbe tartozó baktérium faj két törzsének a genomját sikerült rekonstruálnunk. A genommeretük 1,06 Mbp nagyságú volt, ami tehát hasonló, mint a korábban feltárt Saccharibacteria genomok esetében tapasztalható volt. A metabolikus potenciált tekintve e baktériumok nem lehettek képesek a zsírsavak, nukleotidok és aminosavak *de novo* bioszintézisére, mivel az ezekhez szükséges gének többsége hiányzott a genomjukból. E tény mellett más eredmények is arra utaltak, hogy az életfolyamataikhoz szükséges szerves szén, illetve molekuláris építőelemek a környezetükből, méghozzá más mikroszervezetekből származnak. A genomjukban proteáz, aminopeptidáz, karboxipeptidáz és metalloproteáz enzimek génjeit lehetett megtalálni, illetve olyan transzport fehérjék génjeit, amelyek aminosavak és oligopeptidek felvételét teszik lehetővé. Ezzel szemben nem találtunk olyan gént a genomban, amely szénhidrogének lebontásához lett volna köthető, sőt, a trikarbonsav (TCA) ciklus szinte összes génje hiányzott a genomból. Az eredmények alapján tehát egyértelmű, hogy a *Candidatus* Saccharibacteria törzs képviselői az aerob dúsító tenyészetben nem vettek részt a szénhidrogének lebontásában, hanem egyszerűen szén elnyelőként funkcionáltak. Valószínűsíthető, hogy azokban a talajokban is, ahol Winsley és munkatársai (2014) gázolajszennyezés mellett találták abundánsnak e baktériumokat, hasonló szerepük volt a közösségen belül. A stabil izotópos

kísérletekben (Luo és mtsai, 2009; Xie és mtsai, 2011) pedig egyszerűen a valódi lebontó szervezeteket parazitálva juthattak hozzá az izotóposan jelölt nukleotidokhoz, így klasszikus keresztjelölődés (*cross-feeding*) miatt tűnhettek benzol, vagy toluol-lebontó mikroszervezeteknek, miközben a lebontásban ők maguk egyáltalán nem vettek részt.

4. A DOLGOZAT ÚJ EREDMÉNYEINEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A fentiekben bemutatott több mint tíz évet felölelő kutatómunka eredményeként sikerült rávilágítani a szénhidrogénekkal szennyezett felszín alatti közegekben történő mikroaerob lebontási útvonalak létezésére. A kezdeti lépések során megerősítést nyert, hogy e szennyezett közegek hipoxikus/mikroaerob régióiban a Burkholderiales rend képviselői dominálják a bakteriális közösségeket. Ezen belül is a Comamonadaceae és a Rhodocyclaceae (újabban Zoogloeaceae) családok nemzetségei a fő közösségalkotók (*Rhodoferax*, *Dechloromonas*, *Malikia*, illetve *Acidovorax*). Már az első eredmények értékelése során bizonyítást nyert, hogy a főleg bétaproteobaktériumok által hordozott, I.2.C-típusú exradiol dioxigenáz enzimet kódoló *C23O* gének jelentős diverzitással vannak jelen a vizsgált közegekben (Táncsics és mtsai., 2010). Megállapítható volt ugyanakkor az is, hogy a kimutatott genotípusok jelentős része nem köthető ismert, tenyésztésbe vont baktérium törzshöz, vagy akár csak nemzetséghez. Később, a további kutatások alapjául szolgáló siklói kárhelyen igazolást nyert, hogy e gének *in situ* expressziója kimutatható, így minden bizonnyal szerepet játszanak a BTEX-vegyületek lebontásában (Táncsics és mtsai, 2012). Sikerült azt is bizonyítanunk, hogy a Sei és munkatársai (1999) által tervezett, és a szakirodalomban a *C23O* gének általános kimutatására használt PCR primerek nem alkalmasak arra, hogy a siklói talajvíz mikroba közösségeiben jelenlévő I.2.C-típusú *C23O* géneket amplifikálják. Szükségessé vált tehát, hogy e gének szélesebb körű kimutatásához új PCR primereket tervezzünk. A primertervezés eredményeképpen egy többszörösen degenerált primer párt alkottunk, majd ezzel folytattuk tovább vizsgálatainkat a kárhelyen. Ennek eredményeképpen addig ismeretlen genotípusokat sikerült feltárnunk, és kijelenthettük, hogy sikerült egy jól működő, csoportspecifikusnak nevezhető primerpárt alkotni (Táncsics és mtsai, 2013). E primerpár segítségével 13 hónapon át RNS alapon monitoroztuk a siklói kárhely középpontjában a mikroba közösség összetételét és az I.2.C-típusú *C23O* gének aktivitását. A kimutatott *C23O* genotípusokat hat jól elkülönülő csoportba lehetett sorolni, ami lehetőséget biztosított arra, hogy az egyes csoportok aktivitását külön-külön vizsgáljuk. Ehhez egy fragment-analízis alapú módszert, a „Single Nucleotide Primer

Extension” (SNuPE) technikát választottuk. Köszönhetően annak, hogy e módszer is a fragment-analízis elvein alapszik, a kapott eredményeket párhuzamba lehetett állítani a 16S rRNS gén alapú T-RFLP vizsgálatok eredményeivel és statisztikai összefüggéseket lehetett közöttük keresni. Az így kapott eredmények alapján két taxont tudtunk azonosítani, amelyek a monitoring időszak alatt részt vehettek a BTEX-vegyületek lebontásában és I.2.C-típusú *C23O* génnel rendelkezettek. E két taxon egyike egy olyan, máig kitenyésztetlen, Rhodocyclaceae családba tartozó mikroszervezet, amely egyértelműen BTEX-vegyületekkel szennyezett felszín alatti közegből mutatható ki. A másik taxon egy szintén máig kitenyésztetlen mikroszervezet, amely minden bizonnyal a *Rhodoferax* nemzetség tagja, de legalább is annak egyik nagyon közeli rokona. E taxonok kitenyésztetlen volta azonban meggátolta azt, hogy minden kétséget kizáróan mikroaerob lebontókként azonosíthassuk őket, és I.2.C *C23O* genotípust kössünk hozzájuk (Táncsics és mtsai, 2013).

A folyamatos törzsizolálások során egy közép-magyarországi kárhely biofilm mintájából nyert, viaszszerű telepeket fejlesztő, „Buc” laborjelű törzs alapos vizsgálata szolgáltatott értékes új eredményt. A törzs 16S rDNS szekvenciájának filogenetikai vizsgálata azt mutatta, hogy e törzs a *Zoogloea* nemzetségbe tartozhat, ráadásul I.2.C-típusú *C23O* gént is sikerült kimutatnunk a genomjából. Ez az eredmény azért volt váratlan, mert a *Zoogloea* nemzetség képviselőit elsősorban szennyvíztisztítói eleveniszapokból izolálják és alapvetően, mint flokkulumképző baktériumok tekintünk rájuk e közegekben. Felszín alatti közegekben való előfordulásuk és ott betöltött szerepük még ma is kevésbé feltárt. A Buc törzs szénhidrogén-lebontó képességét először egyszerű gravimetriás módszerrel vizsgáltuk meg, amely bizonyította, hogy képes lehet egyes kőolajkomponensek biodegradációjára. Mivel a Buc törzs a *Zoogloea* nemzetség egy meglehetősen különálló leszármazási vonalát képviselte, új fajként írtuk le és a *Zoogloea oleivorans* nevet adtuk neki (Farkas és mtsai, 2015).

A stabil izotópos jelölés módszerével a siklói BTEX szennyezett talajvíz, illetve ez esetben a mintavételi kút alján lévő üledék mikrobaközösségét kíséreltük meg vallatóra fogni és kimutatni azokat a mikroszervezeteket, amelyek mikroaerob körülmények között is képesek a toluol lebontására. Már a kiindulási üledék mikroba közösségének vizsgálata is újabb értékes eredménnyel szolgált, hiszen itt is megtaláltuk a közösségben a *Zoogloea oleivorant* és az általa hordozott I.2.C-típusú *C23O* gént. A stabil C-izotópot (C_{13}) tartalmazó toluollal történő, mikroaerob körülmények közötti inkubációt követően DNS és RNS alapon kíséreltük meg azonosítani azokat a taxonokat, amelyek részt vehettek a lebontásban. A DNS alapú eredmények három taxon szerepét igazolták a folyamatban (Táncsics és mtsai, 2018). A jelölődött DNS jelentős része a *Quatrionococcus* nemzetséghez tartozott. A második taxon a

Zoogloea volt, egészen pontosan az általunk leírt *Z. oleivorans*. A harmadik taxon pedig az általunk már korábban is kimutatott (Táncsics és mtsai, 2013), máig kitenyésztetlen, Rhodocyclaceae családba tartozó mikroszervezet volt. Az RNS alapú vizsgálatok részben megerősítették a DNS alapú vizsgálatok eredményeit, részben pedig új információval is szolgáltak. A három fő taxon (*Quatronicoccus*, *Zoogloea*, kitenyésztetlen Rhodocyclaceae) mellett újabbakat sikerült azonosítani, amelyek minden bizonnyal részt vettek a toluol mikroaerob körülmények közötti lebontásában, ám talán lassabb növekedésük miatt csak RNS alapon lehetett őket azonosítani. E taxonok voltak a *Dechloromonas*, illetve az *Azonexus* (Bradford és mtsai, 2018). Köszönhetően annak a szerencsés körülménynek, hogy a mikrokozmoszainkban a *Z. oleivorans* nagyon aktív mikroaerob toluol-lebontónak bizonyult, a „nehéz” RNS frakcióból nyert transzkriptómot fel lehetett használni arra, hogy megkíséreljünk feltárni a lebontási útvonalat e baktérium esetében. Ehhez első lépésként elvégeztük a típus törzs *Z. oleivorans* Buc^T teljes genomjának szekvenálását, majd ráillesztettük a transzkriptómból származó szekvenciákat. Ezzel sikerült feltárnunk, hogy az I.2.C-típusú C23O gén mellett egy hipoxikus körülmények között is aktív toluol-dioxigenáz enzim is szerepet játszott a mikroaerob körülmények közötti lebontásban (Táncsics és mtsai, 2020). Ráadásul mindkét gén olyan klaszterekben foglalt helyet a genomban, amelyeket mobilis genetikai elemek fogtak közre, tehát minden bizonnyal horizontális géntranszferek útján kerültek a Buc^T törzs genomjába. Ily módon tehát bizonyítottuk, hogy egyrészt az I.2.C-típusú C23O gén tényleg előfeltétele a mikroaerob toluol-lebontás képességének, de az is bizonyítást nyert, hogy nem elégséges feltétele. Mindenképpen szükség van ugyanis olyan enzim közreműködésére is, amely mikroaerob körülmények között is képes az aromás gyűrű aktiválására, jelen esetben hidroxilációjára.

A kutatásaink során már a stabil izotópos vizsgálat eredményei is azt mutatták, hogy nem lehet minden I.2.C-típusú C23O genotípust automatikusan a mikroaerob BTEX-lebontáshoz kötni. Ahhoz, hogy ezt a kérdést tovább vizsgáljuk, egyszerű dúsítási kísérleteket végeztünk, amelyek során párhuzamosan próbáltunk aerob és mikroaerob körülmények között szénhidrogén-lebontó baktérium közösségeket feldúsítani, majd feltárni. Az első dúsítási kísérlet során BTEX-keverék lebontása során vizsgáltuk a kialakuló mikroba közösségeket aerob, illetve mikroaerob körülmények között. Eredményeink újra alátámasztották, hogy nem lehet minden I.2.C C23O gént a mikroaerob BTEX-lebontáshoz kötni, hiszen teljesen más genotípusok lettek dominánsak aerob, illetve mikroaerob körülmények között. A mikroaerob mikrokozmoszokban az *Acidovorax* nemzetség képviselői voltak a legdominánsabbak, mind 16S rRNS gén, mind pedig I.2.C C23O gén alapján, míg ezzel szemben az aerob

mikrokozmoszokban a *Malikia* nemzetség képviselői, illetve egy addig ismeretlen I.2.C C23O genotípus domináltak. A második dúsító kísérlet során, amikor is csak benzolt vagy toluolt tartalmaztak szénforrásként a dúsító tenyészetek, az aerob benzol-lebontó tenyészetből sikerült izolálnunk a *Malikia spinosa* két példányát és igazolnunk, hogy e mikroszervezetek hordozzák az addig ismeretlen I.2.C-típusú C23O gént. A *M. spinosa* AB6-os törzs teljes genomszekvenciájának feltárása megmutatta, hogy miként lehet képes e törzs a benzol, a toluol és az etilbenzol lebontására, és hogy miért csak aerob körülmények között válik jelentős közösségalkotóvá (Révész és mtsai, 2020a). A harmadik dúsítási kísérlet során a való élethez jobban igazodó vizsgálatot végeztünk el, ugyanis az aerob és mikroaerob dúsító tenyészetek ez esetben kőolaj/gázolaj keveréket tartalmaztak. Sikerült bemutatnunk, hogy az oxigén-limitáció nem csak az aromás szénhidrogén-lebontó mikrobaközösség struktúrájára van jelentős hatással, hanem az alifás alkánok lebontásában résztvevő baktériumokéra is. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy az aerob körülmények között kiváló alkánlebontó *Rhodococcus* nemzetség képviselői jelentősen visszaszorulhatnak alacsony oldott oxigén koncentráció mellett, amikor is az *Acinetobacter* nemzetség képviselői, illetve a *Pseudomonas extremaustralis/veronii* leszármazási vonal dominálják e közösségeket (Révész és mtsai, 2020b). Érdekes eredménye volt e dúsítási kísérletnek, hogy az aerob dúsító tenyészetek közül kettőben egy olyan alkán-1 monooxigenáz gén volt a domináns, amelyet nem lehetett ismert baktériumhoz kötni. Metagenom szekvenálással kapott adatok bioinformatikai elemzésével azonban sikerült felépíteni egy még kitenyésztetlen, Moraxellaceae családba tartozó baktérium genomját, amely magában hordozta ezt a gént. Így újgenerációs szekvenálási módszer, illetve bioinformatikai alkalmazások segítségével, tenyésztés nélkül sikerült egy addig ismeretlen alkán lebontó baktériumot azonosítanunk. Később a metagenom adatok további vizsgálata segített abban is, hogy a szénhidrogén-lebontásban közvetlenül részt nem vevő, de abundáns, ugyanakkor tenyésztésbe nem vont mikroszervezeteknek (lásd *Candidatus Saccharibacteria* törzsbe tartozó baktériumok) a közösségben betöltött szerepére is rávilágítsunk (Figueroa-Gonzalez és mtsai, 2020).

5. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK

1. **Táncsics A**, Szabó, I, Baka E, Szoboszlay S, Kukolya J, Kriszt B, Márialigeti K (2010) Investigation of catechol 2,3-dioxygenase and 16S rRNA gene diversity in hypoxic, petroleum hydrocarbon contaminated groundwater. *Syst Appl Microbiol* 33: 398-406.
IF: 3.075
2. **Táncsics A**, Szoboszlay S, Szabó I, Farkas M, Kovács B, Kukolya J, Mayer Z, Kriszt B (2012) Quantification of subfamily I.2.C catechol 2,3-dioxygenase mRNA transcripts in groundwater samples of an oxygen-limited BTEX-contaminated site. *Environ Sci Technol* 46:232-240.
IF: 5.257
3. **Táncsics A**, Farkas M, Szoboszlay S, Szabó I, Kukolya J, Vajna B, Kovács B, Benedek T, Kriszt B (2013) One-year monitoring of *meta*-cleavage dioxygenase gene expression and microbial community dynamics reveals the relevance of subfamily I.2.C extradiol dioxygenases in hypoxic, BTEX-contaminated groundwater. *Syst Appl Microbiol* 36:339-350.
IF: 3.310
4. Farkas M, **Táncsics A**, Kriszt B, Benedek T, Tóth EM, Kéki Z, Veres PG, Szoboszlay S (2015) *Zoogloea oleivorans* sp. nov., a floc-forming, petroleum hydrocarbon-degrading bacterium isolated from biofilm. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:274-279.
IF: 2.439
5. Benedek T, **Táncsics A**, Szabó I, Farkas M, Szoboszlay S, Fábrián K, Maróti G, Kriszt B (2016) Polyphasic analysis of an *Azoarcus*-*Leptothrix*-dominated bacterial biofilm developed on stainless steel surface in a gasoline-contaminated hypoxic groundwater. *Environ Sci Pollut Res* 23:9019-9035.
IF: 2.741
6. Farkas M, Szoboszlay S, Benedek T, Révész F, Veres PG, Kriszt B, **Táncsics A** (2017) Enrichment of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria from groundwater of the Siklós BTEX-contaminated site (Hungary). *Folia Microbiol* 62:63-71.
IF: 1.311

7. **Táncsics A**, Szalay AR, Farkas M, Benedek T, Szoboszlay S, Szabó I, Lueders T (2018) Stable isotope probing of hypoxic toluene degradation at the Siklós aquifer reveals prominent role of Rhodocyclaceae. *FEMS Microbiol Ecol* 94:fiy088.
IF: 4.098
8. Bradford LM, Vestergaard G, **Táncsics A**, Zhu B, Schloter M, Lueders T (2018) Transcriptome-stable isotope probing provides targeted functional and taxonomic insights into microaerobic pollutant-degrading aquifer microbiota. *Front Microbiol* 9:2696.
IF: 4.259
9. Benedek T, Szentgyörgyi F, Szabó I, Kriszt B, Révész F, Radó J, Maróti G, **Táncsics A** (2018) Aerobic and oxygen-limited enrichment of BTEX-degrading biofilm bacteria: dominance of *Malikia* versus *Acidovorax* species. *Environ Sci Pollut Res* 25:32178-32195.
IF: 2.914
10. **Táncsics A**, Farkas M, Horváth B, Maróti G, Bradford LM, Lueders T, Kriszt B (2020) Genome analysis provides insights into microaerobic toluene-degradation pathway of *Zoogloea oleivorans* Buc^T. *Arch Microbiol* 202:421-426.
IF (2019): 1.884
11. Révész F, Farkas M, Kriszt B, Szoboszlay S, Benedek T, **Táncsics A** (2020) Effect of oxygen limitation on the enrichment of bacteria degrading benzene or toluene and the identification of *Malikia spinosa* (Comamonadaceae) as prominent aerobic benzene-, toluene-, and ethylbenzene-degrading bacterium: enrichment, isolation and whole-genome analysis. *Environ Sci Pollut Res* 27: 31130-31142.
IF (2019): 3.056
12. Révész F, Figueroa-Gonzalez PA, Probst AJ, Kriszt B, Banerjee S, Szoboszlay S, Maróti G, **Táncsics A** (2020) Microaerobic conditions caused the overwhelming dominance of *Acinetobacter* spp. and the marginalization of *Rhodococcus* spp. in diesel fuel/crude oil mixture-amended enrichment cultures. *Arch Microbiol* 202:329-342.

IF (2019): 1.884

13. Figueroa-Gonzalez PA, Bornemann TLV, Panagiotis A, Révész F, von Hagen CA, **Táncsics A**, Probst AJ (2020) Saccharibacteria as organic carbon sinks in hydrocarbon-fueled communities. *Front Microbiol* 11:587782.

IF (2019): 4.235

6. AZ ÉRTEKEZÉS FEJEZETEIHEZ SZOROSAN KAPCSOLÓDÓ EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

1. **Táncsics A**, Benedek T, Szoboszlay S, Veres PG, Farkas M, Máthé I, Márialigeti K, Kukolya J, Lányi S, Kriszt B (2015) The detection and phylogenetic analysis of the alkane 1-monooxygenase gene of members of the genus *Rhodococcus*. *Syst Appl Microbiol* 38:1-7.

IF: 3.691

2. Révész F, Tóth EM, Kriszt B, Bóka K, Benedek T, Sárkány O, Nagy Z, **Táncsics A** (2018) *Sphingobium aquiterrae* sp. nov., a toluene, *meta*- and *para*-xylene-degrading bacterium isolated from petroleum hydrocarbon contaminated groundwater. *Int J Syst Evol Microbiol* 68:2807-2812.

IF: 2.166

7. IRODALOMJEGYZÉK

Aburto A, Ball AS (2009) Bacterial population dynamics and separation of active degraders by stable isotope probing during benzene degradation in a BTEX-impacted aquifer. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25: 147-156.

Alfreider A, Vogt C (2007) Bacterial diversity and aerobic biodegradation potential in a BTEX-contaminated aquifer. *Water Air Soil Pollut* 183:415-426.

Balcke GU, Wegener S, Kiesel B, Benndorf D, Schlömann M, Vogt C (2008) Kinetics of chlorobenzene biodegradation under reduced oxygen levels. *Biodegradation* 19:507-518.

- Bradford LM, Vestergaard G, Táncsics A, Zhu B, Schloter M, Lueders T (2018) Transcriptome-stable isotope probing provides targeted functional and taxonomic insights into microaerobic pollutant-degrading aquifer microbiota. *Front Microbiol* 9:2696.
- Cafaro V, Izzo V, Scognamiglio R, Notomista E, Capasso P, et al. (2004) Phenol hydroxylase and toluene/*o*-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1: interplay between two enzymes. *Appl Environ Microbiol* 70: 2211–2219.
- Callaghan AV, Davidova IA, Savage-Ashlock K, Parisi VA, Gieg LM, Suflita JM, Kukor JJ, Wawrik B (2010) Diversity of benzyl- and alkylsuccinate synthase genes in hydrocarbon-impacted environments and enrichment cultures. *Environ Sci Technol* 44:7287-7294.
- Collins AJ, Murugkar PP, Dewhirst FE (2019) Complete genome sequence of strain AC001, a novel cultured member of the human oral microbiome from the candidate phylum *Saccharibacteria* (TM7). *Micobiol Resour Announc* 8:e01158-19.
- Costura RK, Alvarez PJJ (2000) Expression and longevity of toluene dioxygenase in *Pseudomonas putida* F1 induced at different dissolved oxygen concentrations. *Water Res* 34:3014-3018.
- Di Cello F, Pepi M, Baldi F, Fani R (1997) Molecular characterization of an n-alkane-degrading bacterial community and identification of a new species, *Acinetobacter venetianus*. *Res Microbiol* 148:237-249.
- He X, McLean JS, Edlund A, Yooseph S, Hall AP, Liu SY, Dorrestein PC, Esquenazi E, Hunter RC, Cheng G, Nelson KE, Lux R, Shi W (2015) Cultivation of a human-associated TM7 phylotype reveals a reduced genome and epibiotic parasitic lifestyle. *PNAS* 112:244-249.
- Hendrickx B, Junca H, Vosahlova J, Lindner A, Ruegg I, Bucheli-Witschel M, Faber F, Egli T, Mau M, Schlömann M, Brennerova M, Brenner V, Pieper DH, Top EM, Dejonghe W, Bastiaens L, Springael D (2006) Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. *J Microbiol Methods* 64: 250-265.
- Eltis LD, Bolin JT (1996) Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases. *J Bacteriol* 178:5930-5937.
- Fahy A, McGenity TJ, Timmis KN, Ball AS (2006) Heterogeneous aerobic benzene-degrading communitites in oxygen-depleted groundwaters. *FEMS Microbiol Ecol* 58:260-270.

- Farkas M, Táncsics A, Kriszt B, Benedek T, Tóth EM, Kéki Z, Veres PG, Szoboszlay S (2015) *Zoogloea oleivorans* sp. nov., a floc-forming, petroleum hydrocarbon-degrading bacterium isolated from biofilm. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:274-279.
- Hamamura N, Olson SH, Ward DM, Inskeep WP (2006) Microbial population dynamics associated with crude-oil biodegradation in diverse soils. *Appl Environ Microbiol* 72:6316-6324.
- Hamamura N, Ward DM, Inskeep WP (2013) Effects of petroleum mixture types on soil bacterial population dynamics associated with the biodegradation of hydrocarbons in soil environments. *FEMS Microbiol Ecol* 85:168-178.
- Jechalke S, Franchini AG, Bastida F, Bombach P, Rosell M, Seifert J, von Bergen M, Vogt C, Richnow HH (2013). Analysis of structure, function, and activity of a benzene-degrading microbial community. *FEMS Microbiol Ecol* 85:14—26.
- Kukor JJ, Olsen RH (1996) Catechol 2,3-dioxygenases functional in oxygen-limited (hypoxic) environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1728–1740.
- Lal B, Khanna S (1996) Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*. *J Appl Microbiol* 81:355-362.
- Lee K, Gibson DT (1996) Toluene and ethylbenzene oxidation by purified naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816-4. *Appl Environ Microbiol* 62:3101-3106.
- Lee Y, Lee Y, Jeon CO (2019) Biodegradation of naphthalene, BTEX, and aliphatic hydrocarbons by *Paraburkholderia aromaticivorans* BN5 isolated from petroleum-contaminated soil. *Sci Rep* 9:860.
- Luo C, Xie S, Sun W, Li X, Cupples AM (2009) Identification of a novel toluene-degrading bacterium from the Candidate Phylum TM7, as determined by DNA stable isotope probing. *Appl Environ Microbiol* 75:4644-4647.
- Martínez-Lavanchy PM, Chen Z, Lünsmann V, Marin-Cevada V, Vilches-Vargas R, Pieper DH, Reiche N, Kappelmeyer U, Imperato V, Junca H, Nijenhuis I, Müller JA, Kusch P, Heipieper HJ (2015) Microbial toluene removal in hypoxic model constructed wetlands occurs predominantly via the ring monooxygenation pathway. *Appl Environ Microbiol* 81:6241-6252.
- Martínková L, Uhnáková B, Pátek M, Nesvera J, Kren V (2009) Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environ Int* 35:162-177.
- Meckenstock RU, Elsner M, Griebler C, Lueders T, Stumpp C, Aamand J, Agathos SN, Albrechtsen HJ, Bastiaens L, Bjerg PL, Boon N, Dejonghe W, Huang WE, Schmidt SI,

- Smolders E, Sorensen SR, Springael D, van Breukelen BM (2015) Biodegradation: updating the concepts of control for microbial cleanup in contaminated aquifers. *Environ Sci Technol* 49:7073-7081.
- Murugkar PP, Collins AJ, Dewhirst FE (2019) Complete genome sequence of strain PM004, a novel cultured member of the human oral microbiome from the candidate phylum *Saccharibacteria* (TM7). *Micobiol Resour Announc* 8:e01159-19.
- Oosterkamp MJ, Veuskens T, Saia FT et al. (2013) Genome analysis and physiological comparison of *Alicyclophilus denitrificans* strains BC and K601^T. *PLoS One* 8:e66971.
- Orphan VJ, Taylor LT, Hafenbradl D, Delong EF (2000) Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. *Appl Environ Microbiol* 66:700-711.
- Park M, Jeon Y, Jang HH, Ro HS, Park W, Madsen EL, Jeon CO (2007) Molecular and biochemical characterization of 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase from *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2. *Appl Environ Microbiol* 73:5146–5152.
- Pérez-Pantoja D, González B, Pieper DH (2010) Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons. In: Timmis KN, editor. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Berlin, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 799–837.
- Pumphrey GM, Madsen EL (2007) Naphthalene metabolism and growth inhibition by naphthalene in *Polaromonas naphthalenivorans* strain CJ2. *Microbiology* 153:3730–3738.
- Radajewski S, Ineson P, Parekh NR, Murrell JC (2000) Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* 403:646-649.
- Ratajczak A, Geissdörfer W, Hillen W (1998) Alkane hydroxylase from *Acinetobacter* sp. strain ADp1 is encoded by alkM and belongs to a new family of bacterial integral-membrane hydrocarbon hydroxylases. *Appl Environ Microbiol* 64:1175-1179.
- Révész F, Farkas M, Kriszt B, Szoboszlay S, Benedek T, Tánicsics A (2020a) Effect of oxygen limitation on the enrichment of bacteria degrading benzene or toluene and the identification of *Malikia spinosa* (Comamonadaceae) as prominent aerobic benzene-, toluene-, and ethylbenzene-degrading bacterium: enrichment, isolation and whole-genome analysis. *Environ Sci Pollut Res* 27:31130-31142.
- Révész F, Figueroa-Gonzalez PA, Probst AJ, Kriszt B, Banerjee S, Szoboszlay S, Maróti G, Tánicsics A (2020b) Microaerobic conditions caused the overwhelming dominance of *Acinetobacter* spp. and the marginalization of *Rhodococcus* spp. in diesel fuel/crude oil mixture-amended enrichment cultures. *Arch Microbiol* 202:329-342.

- Sei K, Asano K, Tateishi N, Mori K, Ike M, Fujita M (1999) Design of PCR primers and gene probes for the general detection of bacterial populations capable of degrading aromatic compounds via catechol cleavage pathways. *J. Biosci. Bioeng.* 88:542-550.
- Shinoda Y, Sakai Y, Uenishi H, Uchihashi Y, Hiraishi A, Yukawa H, Yurimoto H, Kato N (2004) Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera* sp. strain DNT-1. *Appl Environ Microbiol* 70:1385-1392.
- Tani A, Ishige T, Sakai Y, Kato N (2001) Gene structures and regulation of the alkane hydroxylase complex in *Acinetobacter* sp. strain M-1. *J Bacteriol* 183:1819-1823.
- Táncsics A, Benedek T, Szoboszlay S, Veres PG, Farkas M, Máthé I, Márialigeti K, Kukolya J, Lányi S, Kriszt B (2015) The detection and phylogenetic analysis of the alkane 1-monooxygenase gene of members of the genus *Rhodococcus*. *Syst Appl Microbiol* 38:1-7.
- Táncsics A, Farkas M, Horváth B, Maróti G, Bradford LM, Lueders T, Kriszt B (2020) Genome analysis provides insights into microaerobic toluene-degradation pathway of *Zoogloea oleivorans* Buc^T. *Arch Microbiol* 202:421-426.
- Táncsics A, Farkas M, Szoboszlay S, Szabó I, Kukolya J, Vajna B, Kovács B, Benedek T, Kriszt B (2013) One-year monitoring of meta-cleavage dioxygenase gene expression and microbial community dynamics reveals the relevance of subfamily I.2.C extradiol dioxygenases in hypoxic, BTEX-contaminated groundwater. *Syst Appl Microbiol* 36:339-350.
- Táncsics A, Szabó I, Baka E, Szoboszlay S, Kukolya J, Kriszt B, Márialigeti K (2010) Investigation of catechol 2,3-dioxygenase and 16S rRNA gene diversity in hypoxic, petroleum hydrocarbon contaminated groundwater. *Syst Appl Microbiol* 33: 398-406.
- Táncsics A, Szalay AR, Farkas M, Benedek T, Szoboszlay S, Szabó I, Lueders T (2018) Stable isotope probing of hypoxic toluene degradation at the Siklós aquifer reveals prominent role of Rhodocyclaceae. *FEMS Microbiol Ecol* 94:fiy088.
- Táncsics A, Szoboszlay S, Szabó I, Farkas M, Kovács B, Kukolya J, Mayer Z, Kriszt B (2012) Quantification of subfamily I.2.C catechol 2,3-dioxygenase mRNA transcripts in groundwater samples of an oxygen-limited BTEX-contaminated site. *Environ Sci Technol* 46:232-240.
- Tribelli PM, Rossi L, Ricardi MM, Gomez-Lozano M, Molin S, Raiger Iustman LJ, Lopez NI (2018) Microaerophilic alkane degradation in *Pseudomonas extremaustralis*: a transcriptomic and physiological approach. *J Ind Microbiol Biotechnol* 45:15-23.

- Winsley TJ, Snape I, McKinlay, Stark J, van Dorst JM, Ji M, Ferrari BC, Siciliano SD (2014) The ecological controls on the prevalence of candidate division TM7 in polar regions. *Front Microbiol* 5:345.
- Xie, S., Sun, W., Luo, C., Cupples, AM. (2011) Novel aerobic benzene degrading microorganisms identified in three soils by stable isotope probing. *Biodegradation* **22**: 71-81.
- Zampolli J, Zeaiter Z, Di Canito A, Di Gennaro P (2019) Genome analysis and -omics approaches provide new insights into the biodegradation potential of *Rhodococcus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:1069-1080.
- Zhao L, Ma T, Gao M, Gao P, Cao M, Zhu X, Li G (2012) Characterization of microbial diversity and community in water flooding oil reservoirs in China. *W J Microbiol Biotechnol* 28:3039-3052.
- Zhou NY, Fuenmayor SL, Williams PA (2001) nag genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. *J Bacteriol* 183:700–708.