

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

Doktori értekezés tézisei

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

Bevezetés

A gépjárművek számának rohamos emelkedése világszerte egyre fokozódó üzemanyag felhasználást eredményez. A benzin fizikai és kémiai tulajdonságainak javítása érdekében különböző adalékanyagokat szükséges juttatni az üzemanyagokhoz. A korábban használt, mára már törvényi szabályozással betiltott ólom-tetraetil kiváltásának következtében, továbbá az oktánszám növelésének, illetve az üzemanyagok tökéletesebb égésének biztosítása érdekében széles körben elterjedt az üzemanyag-oxigenátok adalékanyagként történő felhasználása.

Ezek a vegyületek számos előnyüknek köszönhetően gyorsan meghódították a piacot. Rövid időn belül azonban világhosszá vált, hogy sajátságos kémiai szerkezetük következtében az éter típusú oxigenátok a környezetbe kikerülve rendkívül ellenállóak mind a természetes fizikai-kémiai, mind pedig a biológiai lebontó folyamatoknak, ráadásul evolúciós léptékben mérve a mikroorganizmusoknak csak meglehetősen csekély idő állt rendelkezésükre az adaptációhoz. Minthogy jól oldódnak vízben, így könnyen kiterjedt szennyezést okozhatnak, ezáltal veszélyeztetve az ivóvízbázisokat. Habár jelenleg a legelterjedtebb a metil-*terc*-butil-éter (MTBE), azonban az utóbbi években egyre szélesebb körben teret nyertek az egyéb üzemanyag-oxigenátok is, különös tekintettel a bio-üzemanyag adalékok közé sorolható etil-*terc*-butil-éterre (ETBE), mely jelenleg hazánkban is a legnagyobb mennyiségben alkalmazott oxigenát benzinekből. Továbbá széles körben használják még a *terc*-amil-metil-étert (TAME) is, illetve idővel a diizopropil-éter (DIPE) és a *terc*-amil-etil-éter (TAEE) használatának elterjedése is joggal valószínűsíthető.

Mivel az üzemanyag-oxigenátok iránti kereslet az elkövetkező évtizedekben várhatóan tovább fog emelkedni, így feltehetőleg az éter típusú oxigenátokkal szennyezett területek száma is tovább növekszik. A kontaminált területek kármentesítéséhez a legésszerűbb, leghatékonyabb, költséghatékonysági és környezetvédelmi szempontból is legmegfelelőbb választás a bioremediáció. Az MTBE globális használatának és a szennyezett területek jelentős számának következtében az MTBE biológiai lebontása széles körben tanulmányozott. Azonban mivel napjainkban még lényegesen kisebb az ETBE-vel és a DIPE-vel terhelt közegek kiterjedése és száma, így az ezeket a vegyületeket lebontó mikroorganizmusok izolálása és jellemzése komoly feladat elé állítja a kutatókat. Munkám során célt volt egy olyan baktériumtörzs izolálása és mélyreható jellemzése, amely képes az ETBE és a DIPE hatékony biológiai lebontására.

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

Alkalmazott módszerek

1. A DIPE bontására képes egyedi baktériumtörzs izolálása egyedüli szén- és energiaforrásként történő dúsítással minimál tápoldat (DM) és táplemez (DMA) használatával.
2. A DIPE-degradáló mikroorganizmus *de novo* genomszekvenálásából származó adatok elemzése, és a baktériumtörzs 16S rDNS, illetve teljes genomszekvencia alapján történő azonosítása és törzsfán való elhelyezése.
3. Az izolált baktérium szubsztrát spektrumának meghatározása.
4. Az izolátum környezeti és kármentesítési szempontból releváns tulajdonságainak megismerése, többek között a hőmérséklet- és pH-tűrés, illetve -optimum, továbbá az izolátum sótűrő képességének felmérése.
5. A DIPE biodegradációja során keletkező intermedierek gázkromatográffal kapcsolt tömegspektrométerrel (GC-MS) történő nyomon követése.
6. A DIPE-bontás sebességének meghatározása „resting cell” (nyugvó sejt) kísérlet segítségével.
7. Különböző koncentrációjú DIPE-vel mesterségesen szennyezett talajvizekből összeállított mikrokozmosz kísérletek folytatása, melyekkel alátámasztható a törzs DIPE-bontó potenciálja. A kísérletek során keletkező intermedierek GC-MS-sel történő nyomon követése.
8. A CH28 jelű izolátum az ETBE-t TBA köztitermékig tudja bontani. Az ETBE teljes mineralizációjának eléréséhez szükséges mesterséges konzorcium létrehozása az általunk korábban izolált TBA-bontó *Hydrogenophaga* sp. T4 törzssel.
9. A CH28 törzs kometabolikus képességeinek vizsgálata, különös tekintettel az éter típusú oxigenátokra.
10. Oszlopkísérletek lefuttatása a CH28 törzs DIPE-bontó, illetve a mesterséges konzorcium ETBE-mineralizációs képességeinek megismerése érdekében.
11. Az oszlopkísérletek során a CH28 és a T4 folyamatos jelenlétének nyomon követése lemezeléses módszerrel, denaturáló grádiens gél elektroforézissel (DGGE) és kolónia polimeráz láncreakcióval (PCR).

Eredmények:

1. Egy budapesti gyógyszergyár területén található monitoring kútból származó talajvízből laboratóriumi dúsítási eljárások során sikeresen izoláltam egy, a DIPE és az ETBE bontására képes mikroorganizmust.
2. A törzs genomjában azonosítottam az *ethRABCD* gén klasztert. Az operonban található *ethB* gén 99%-os hasonlóságot mutat a *Rhodococcus ruber* IFP 2001 és az *Aquicola tertiaricarbonis* L108 *ethB* génjeivel. Az *ethB* egy citokróm P450 monooxygenáz enzimet kódol, amely bizonyítottan felelős a DIPE, az ETBE és más dialkil-éterek biodegradációjáért.
3. Az izolált törzs 16S rDNS szekvenciája, továbbá a teljes genomszekvenciák összehasonlító analíziseinek eredményeiből valószínűsíthető, hogy az általam izolált törzs új fajnak tekinthető.
4. A törzset *Mycolicibacterium* sp. CH28 néven, NCAIM B.02558 azonosító alatt elhelyeztük a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében.
5. Részletesen megvizsgáltam a CH28 jelű izolátum által hasznosítható szubsztrátok spektrumát, mely során megállapítottam, hogy a törzs rendkívül széles szubsztrát-spektrummal rendelkezik. A CH28 képes a normál alkánokat, monoaromás vegyületeket, elágazó láncú szénhidrogéneket, dialkil-étereket, egyszénatomos vegyületeket, továbbá számos rövid szénláncú alkoholt és szerves savat egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítani.
6. Megfigyeltem, hogy a törzs 10-35 °C közötti hőmérséklet-tartományban mutat növekedést, továbbá meghatároztam, hogy a baktérium számára optimális hőmérséklet 30-32 °C között van.
7. Megállapítottam, hogy a CH28 jelű izolátum a pH=3,5-8,5 tartományban képes a növekedésre, azonban enyhén savas környezetben jobban képes növekedni: a törzs számára az optimális pH-tartomány pH=5,0-6,0 közötti.
8. A törzs antibiotikum-toleranciájának és -rezisztenciájának vizsgálati eredményei alapján elmondható, hogy a törzs kismértékű toleranciát mutat a tobramicinnel szemben, továbbá rezisztens a karbenicillinre.
9. GC-MS mérések segítségével sikeresen azonosítottam a DIPE biodegradációja során keletkező 2-propanolt, acetont és ecetsavat, mint a CH28 lebontási közttermékeit. A 2-propanol és az ecetsav kimutatása jelentős eredmény, hiszen a DIPE biológiai

lebomlása közben korábban még nem detektálták ezeket a vegyületeket. Az azonosított intermedierek felhasználásával felrajzoltam a DIPE lebontási útvonal felső szakaszát.

10. „Resting cell” kísérlettel meghatároztam a CH28 jelű izolátum DIPE-bontó sebességét, amely nagyságrendileg megegyezett a *Rhodococcus ruber* IFP 2001 és az *Aquincola tertiarycarbonis* L108 törzsek bontási rátájával. Annak ellenére, hogy a három mikroorganizmus közül az L108 törzs degradálja a leggyorsabban a DIPE-t, a törzs nem képes a DIPE mineralizációjára, mivel a biodegradáció során aceton halmozódik fel. Ezzel szemben a CH28-as törzs az acetont kiválóan tudja egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítani.
11. DIPE-vel (75 mg/l és 300 mg/l) mesterségesen szennyezett talajvizekkel összeállított mikrokozmosz kísérletekkel alátámasztottam a CH28 jelű izolátum DIPE-mineralizáló képességét, továbbá a lebontás során keletkező 2-propanol és aceton, mint intermedierek keletkezését. Annak ellenére, hogy a törzs képes volt a magasabb (300 mg/l) koncentrációjú DIPE lebontására, továbbá még 975 mg/l DIPE koncentráció mellett is képes nőni, azonban az alacsonyabb (75 mg/l) DIPE koncentrációjú rendszerben gyorsabbnak bizonyult a DIPE biodegradációja. Legjobb tudásom szerint ezek a rendszerek voltak az elsőként publikált DIPE-s mikrokozmosz kísérletek.
12. Mesterséges konzorciumot hoztam létre a CH28 jelű izolátum és egy általunk korábban izolált TBA-bontó baktérium, a *Hydrogenophaga* sp. T4 felhasználásával. A konzorcium képes volt az ETBE hatékony mineralizációjára. A T4 jelű törzset NCAIM B.02575 azonosító alatt elhelyeztük a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében.
13. A CH28 jelű izolátum egyedül nem képes véghezvinni az ETBE mineralizációját, a lebontási folyamat megáll TBA-nál. ETBE-vel mesterségesen szennyezett talajvizekből összeállított rendszerekben bizonyítottam, hogy amennyiben a helyi mikroba populáció nem képes az ETBE biológiai lebontására, de a TBA-éra már igen, akkor a CH28 törzs segítségével a szennyezett közegben megvalósítható az ETBE teljes biodegradációja.
14. A mesterséges konzorcium az ETBE-t rendkívül gyorsan bontotta: 200 mg/l ETBE teljes mineralizációjához elegendő volt 60 óra. Eredményeim alapján elmondható, hogy a CH28 és a T4 törzsek kombinációja a szakirodalomban mindeddig publikált hasonló konzorciumoknál lényegesen hatékonyabb ETBE-bontásra képes.

15. Minimál tápközegben összeállított mikrokozmosz kísérletek segítségével alátámasztottam, hogy habár a CH28 jelű izolátum nem képes az MTBE és a TAME egyedüli szén- és energiaforrásként történő hasznosítására, azonban DIPE-vel indukálva a törzs degradálni tudta ezt a két üzemanyag-oxigenátot is. A lebontás során az MTBE esetében *terc*-butil-alkohol (TBA), míg a TAME biodegradációjakor *terc*-amil-alkohol (TAA) akkumulálódott. Legjobb tudásom szerint először nekem sikerült leírni DIPE-vel indukált MTBE- és TAME-kometabolizmust.
16. Az oszlopkísérletek során sikerült két olyan töltetet (perlit-tőzeg 1:4 arányú keveréke, agyaggranulátum) is találnom, melyeken a CH28 jelű izolátum sikeresen meg tudott tapadni és el tudott szaporodni. Ez a későbbiekben, pl. egy permeábilis reaktív gát (PRB) kialakítása során kulcsfontosságú szerepet tölthet be.
17. A DIPE-vel, mint szennyezőanyaggal működtetett oszlopreaktorok több mint négy héten keresztül hatékonyan működtek. A lebontás során intermediereket (2-propanolt, acetont) csak a kimutatási határérték (<200 µg/l) közelében detektáltam. Ez kedvezőnek tekinthető, hiszen feltételezhetően egy *in situ* kármentesítési eljárás során sem fognak akkumulálódni ezek a közttermékek.
18. Az oszlopkísérletek során optimalizáltuk a DM minimál tápoldatot a CH28 jelű izolátum számára (MDM tápoldat).
19. Az ETBE-vel, mint szennyezőanyaggal működtetett, perlit-tőzeg 1:4 arányú keverékével töltött oszlopreaktor több mint három hónapon át hatékonyan működött az általunk létrehozott mesterséges konzorciummal. A konzorcium tagjai (a CH28 és T4 jelű törzsek) a kísérlet teljes időtartama alatt azonosíthatóak voltak az oszlopról lefolyó vízből, mely alátámasztja azt, hogy a bontási folyamatokat valóban az általam beoltott mikroorganizmusok hajtották végre.
20. A szakirodalomban nem találtam példát sem DIPE-vel, sem pedig ETBE-vel hatékonyan működtetett oszlopkísérletekre, így kísérleteim újszerűnek tekinthetők.
21. Eredményeim tekintetében bátran kijelenthető, hogy a CH28 jelű izolátum egy olyan mikroorganizmus, mely igen komoly bioremediációs potenciállal rendelkezik, mind az üzemanyag-oxigenátok, mind pedig kevert szennyezések esetében.

Tudományos publikációk:

MTMT azonosító: 10077832

Impakt faktor: 1,724

A dolgozat alapját képező közlemények:

1. **Ingrid Zsilinszky**, Balázs Fehér, István Kiss, Attila Komóczi, Péter Gyula, Zsolt Szabó (2021) **Biodegradation of diisopropyl ether, ethyl tert-butyl ether, and other fuel oxygenates by *Mycolicibacterium* sp. strain CH28.** *Bioremediation Journal*, DOI:10.1080/10889868.2021.1911924
IF: 1,724
2. **Ingrid Zsilinszky**, Péter Gyula, Zoltán Bihari, Balázs Fehér, Zsolt Szabó (2019) **Draft genome sequence of *Mycolicibacterium* sp. strain CH28, a potential degrader of diisopropyl ether, isolated from pharmaceutical wastewater.** *Microbiology Resource Announcements* 37 DOI: 10.1128/MRA.00682-19

Egyéb közlemények:

3. Balázs Fehér, **Ingrid Zsilinszky** (2020) **Intelligens kármentesítés.** *inGreen*, 2020. őszi lapszám

Posztterek:

1. **Ingrid Zsilinszky**, István Kiss, Sándor Mészáros, Balázs Fehér **Laboratory microcosm study of a polluted groundwater.** *Proceedings of the 25th International Symposium on Analytical and Environmental Problems*, 2019. október 7-8. Magyarország, Szeged, ISBN 978-963-306-702-4