

**Éter típusú üzemanyag-adalékok mikrobiális bontása:
a *Methylibium* sp. T29 jelű, új MTBE-bontó törzs
izolálása és jellemzése**

Doktori értekezés

Szabó Zsolt

Témavezető: Dr. Bihari Zoltán

vezető kutató

Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közhasznú Nonprofit Kft.

Biotechnológiai Divízió (BAY-BIO)

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Környezettudományi Doktori Iskola



Szeged

2015

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1 Az éter típusú üzemanyag-adalékok bevezetésének előzményei, körülményei és hatásai.....	8
2.2 Az éter típusú üzemanyag-adalékok termelésének és felhasználásának alakulása Európában	9
2.3 Az éter típusú üzemanyag-adalékok jellemző forrásai az egyes környezeti elemekben..	12
2.4 Az éter típusú üzemanyag-adalékok sorsa és transzportja a talajban és a talajvízben.....	14
2.5 Az éter típusú üzemanyag-adalékok előfordulása az európai környezetben.....	16
2.6 Az éter típusú üzemanyag-adalékokat érintő szabályozások Európában és hazánkban ..	18
2.7 Az éter típusú üzemanyag-adalékok ökotoxikológiai és humán egészségügyi vonatkozásai	18
2.8 Az éter típusú üzemanyag-adalékok mikrobiális bontása	20
2.8.1 Az éterkötést tartalmazó vegyületek mikrobiális bontása.....	20
2.8.2 Az éter típusú üzemanyag-adalékok anaerob biodegradációja.....	21
2.8.3 Az éter típusú üzemanyag-adalékok aerob biodegradációja	23
2.8.3.1 Az éter típusú üzemanyag-adalékok aerob biodegradációjának általános jellemzői	23
2.8.3.2 Az éter típusú üzemanyag-adalékok kometabolikus bontása	25
2.8.3.3 Az éter típusú üzemanyag-adalékok egyedüli szén- és energiaforrásként történő hasznosítása	28
2.9 A <i>Methylibium</i> nemzetség általános jellemzése.....	35
3. CÉLKITŰZÉSEK	38
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	39
4.1 MTBE-bontó konzorciumok izolálása talajvízmintákból	39
4.2 MTBE-bontó konzorciumok mikrobiális összetételének meghatározása piroszekvenálással.....	39
4.3 MTBE-bontásra képes egyedi baktériumtörzsek izolálása az MTBE-bontó konzorciumokból.....	40

4.4 Az izolált MTBE- vagy TBA-bontásra képes egyedi baktériumtörzsek azonosítása	41
4.5 Az MTBE- és az ETBE-bontásban részt vevő ismert gének PCR-alapú kimutatási tesztjei a konzorciumokban és két egyedi izolátumban	42
4.6 A T29 jelű izolátum növekedési tesztjei különböző szubsztrátokon és szubsztrát keverékeken.....	42
4.7 A T29 jelű izolátum MTBE-bontási sebességének összehasonlítása a <i>Methylibium</i> <i>petroleiphilum</i> PM1-ével	44
4.8 Az MTBE lebontási útvonalában szereplő intermedierek azonosítása a T29 jelű izolátumban.....	44
4.9 Az analitikai mérések módszertani leírása	45
4.9.1 Nagy koncentrációjú MTBE, ETBE, TAME, DIPE és TBA mennyiségi meghatározása	45
4.9.2 Az MTBE lebontás lehetséges intermediereinek analitikai vizsgálata.....	45
4.9.3 Nagy koncentrációjú <i>n</i> -alkánok és BTEX komponensek mennyiségi meghatározása.....	46
4.10 <i>Methylibium</i> izolátumok antibiotikum rezisztenciájának vizsgálata.....	46
4.11 <i>Methylibium</i> izolátumok higany rezisztenciájának vizsgálata	47
4.12 <i>Methylibium</i> izolátumok genomjának összehasonlítása pulzáló mezejű gélelektroforézis (PFGE) vizsgálattal	47
4.13 Plazmid detektálás és izolálás a <i>Methylibium</i> izolátumokból	48
4.14 A T29 és a T29-B törzsek <i>de novo</i> genomszekvenálása, illetve a pT29A és pT29B jelű plazmidok <i>de novo</i> szekvenálása	49
4.15 A T29 jelű izolátum transzformációs hatékonyságának összehasonlítása a <i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1-ével kétféle protokoll szerint.....	50
4.16 MTBE-bontásra képtelen inszerciós <i>mdpA</i> knockout mutáns vonalak előállítása a T29 jelű izolátumból	51
4.17 Az <i>mdpA</i> knockout mutáns T29 vonalak növekedésének vizsgálata MTBE-n, TAME-n, TBA-n és 2-HIBA-n	52
5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK.....	53
5.1 MTBE-bontó konzorciumok izolálása talajvízmintákból és mikrobiális összetételük meghatározása	53
5.2 MTBE/TBA-bontásra képes egyedi baktériumtörzsek izolálása az MTBE-bontó konzorciumokból.....	58
5.3 A T29 jelű izolátum növekedésének és növesztésének általános jellemzői	60

5.4 A <i>Methylibium</i> sp. T29 növekedése különböző szubsztrátokon és szubsztrát keverékeken.....	63
5.5 A <i>Methylibium</i> sp. T29 és a <i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1 MTBE-bontási sebességének összehasonlítása.....	64
5.6 Az MTBE lebontási folyamatában szereplő intermedierek azonosítása a <i>Methylibium</i> sp. T29-ben és az MTBE biodegradációjának valószínűsíthető útvonala a törzsben	66
5.7 <i>Methylibium</i> izolátumok antibiotikum és nehézfém rezisztenciájának összehasonlító vizsgálata.....	67
5.8 <i>Methylibium</i> törzsek genomjának összehasonlítása pulzáló mezejű gélelektroforézis (PFGE) vizsgálattal	69
5.9 Természetes mutáns vonalak izolálása a <i>Methylibium</i> sp. T29-ből és a <i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1-ből.....	69
5.10 Plazmid detektálás és izolálás a <i>Methylibium</i> sp. T29 és a <i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1 vad típusú és természetes mutáns vonalaiból, valamint a <i>Methylibium</i> sp. M28-ből	73
5.11 A <i>Methylibium</i> sp. T29 és T29-B törzsek <i>de novo</i> genomszekvenálása, valamint a pT29A és pT29B jelű plazmidok <i>de novo</i> szekvenálása.....	75
5.12 A <i>Methylibium</i> sp. T29 transzformációs hatékonyságának összehasonlítása a <i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1-ével kétféle protokoll szerint.....	85
5.13 A <i>Methylibium</i> sp. T29 <i>mdpA</i> knockout mutáns vonalainak növekedési tulajdonságai	87
6. ÖSSZEFOGLALÁS	90
7. SUMMARY	95
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	100
9. FELHASZNÁLT IRODALOM	101
10. TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK.....	116

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2-HIBA	2-hidroxiizobutirát (2-hidroxi-2-metilpropánsav) [<i>2-hydroxyisobutyric acid</i>]
BLAST	[<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>]
BTEX	benzol, toluol, etil-benzol, xilolok
CFU	telepképző egység [<i>Colony Forming Unit</i>]
COG	[<i>Clusters of Orthologous Groups</i>]
CSIA	komponens-specifikus stabil izotóp analízis [<i>Compound-specific Stable Isotope Analysis</i>]
DEE	dietil-éter
DIPE	diizopropil-éter
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav [<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>]
ETBE	etil- <i>terc</i> -butil-éter
GC-MS	gázkromatográfia-tömegspektroszkópia [<i>Gas Chromatography-Mass Spectroscopy</i>]
GEO	éter típusú üzemanyag-oxigenát [<i>Gasoline Ether Oxygenate</i>]
Hcm	2-hidroxiizobutiril-KoA mutáz [<i>2-hydroxyisobutyryl-CoA mutase</i>]
HS	[<i>headspace</i>]
K _{oc}	talaj szerves szén-víz megoszlási hányados [<i>Soil Organic Carbon - Water Partitioning Coefficient</i>]
K _{ow}	oktanol-víz megoszlási hányados [<i>Octanol - Water Partitioning Coefficient</i>]
LMP	alacsony olvadáspontú [<i>Low Melting Point</i>]
LNAPL	könnyű, nem vizes fázisú folyadék [<i>Light Non-Aqueous Phase Liquid</i>]
MPD	2-metilpropán-1,2-diol
MSA	minimál táptalaj [<i>Mineral Salts Agar</i>]
MSM	minimál tápoldat [<i>Mineral Salts Medium</i>]
MTBE	metil- <i>terc</i> -butil-éter
NA	nutrient táptalaj [<i>Nutrient Agar</i>]
NB	nutrient tápoldat [<i>Nutrient Broth</i>]
OTU	taxonómiai alapegység [<i>Operational Taxonomic Unit</i>]
PFGE	pulzáló mezejű gélelektroforézis [<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>]
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid [<i>Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride</i>]
RT-PCR	valós idejű polimeráz láncreakció [<i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>]
SDS	nátrium-dodecil-szulfát [<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>]
SIP	stabil izotópos vizsgálat [<i>Stable Isotope Probing</i>]
TAA	<i>terc</i> -amil-alkohol
TBAc	<i>terc</i> -butil-acetát
TBF	<i>terc</i> -butil-formiát
TAEE	<i>terc</i> -amil-etil-éter
TAME	<i>terc</i> -amil-metil-éter
TBA	<i>terc</i> -butil-alkohol
TSA	tripton-szója táptalaj [<i>Tryptic Soy Agar</i>]
TSB	tripton-szója tápoldat [<i>Tryptic Soy Broth</i>]
(US)EPA	az Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala [<i>(United States) Environmental Protection Agency</i>]
VOC	illékony szerves anyag [<i>Volatile Organic Compound</i>]

1. BEVEZETÉS

Korunk emberének élete teljesen elképzelhetetlen a mobilitás, a különböző közlekedési eszközök használata nélkül. Az elmúlt években az autógyártás lendülete töretlenül növekedett, a világ útjain közlekedő járművek száma 2010-ben elérte az egy milliárdot (<http://wardsauto.com/>). Ugyanezen évben a világon egy nap alatt felhasznált motorhajtóanyagok mennyisége meghaladta a 22 millió barrelt (hozzávetőlegesen 3,5 milliárd liter) (International Energy Statistics; <http://www.eia.gov/>).

A növekvő igények kielégítése mellett az üzemanyagoknak szigorú minőségi kritériumoknak is meg kell felelniük. A különféle üzemanyagok fizikai és kémiai tulajdonságainak javítása, a motorok teljesítményének optimalizálása és élettartamának növelése, valamint a vonatkozó környezetvédelmi és egészségügyi rendelkezések irányelveinek teljesítése érdekében számos adalékanyagot kevernek a motorhajtóanyagokhoz. Közéjük tartoznak a különböző oktánszámnövelő adalékok és az üzemanyagok tökéletesebb égését biztosító oxigenátok. Az éter típusú üzemanyag-adalékok olyan vegyületek, melyek mindkét szerepet be tudják tölteni.

A világ üzemanyag-éter szükséglete 2009-ben 16,5 millió tonna volt, amelynek 78%-át tette ki az MTBE, a fennmaradó részen az ETBE, a TAME és a TAEE osztozott (The European Fuel Oxygenates Association; <http://www.efoa.eu/>). A 2009 és 2015 közötti időszakban az igények további, évenkénti 1,8 millió tonnával történő növekedésével számoltak a szakemberek. Az újabb előrejelzések szerint az éterek iránti kereslet várhatóan stabil marad a következő évtizedekben is, ugyanakkor a szakértők az ETBE és a TAEE piacának növekedését, ezzel párhuzamosan pedig az MTBE-ének a csökkenését valószínűsítik.

A fentiekben vázolt tendenciák alapján biztosra vehető, hogy a közeljövőben a környezet üzemanyag-éterek általi terhelése jelentősen növekszik majd. Az utóbbi években hazánkban is egyre több MTBE-vel szennyezett terület vált ismertté, mely szennyezések döntően üzemanyag eredetűek. Minthogy az éter típusú oxigenátok meglehetősen ellenállóak a természetes fizikai-kémiai és biológiai degradációs folyamatokkal szemben, így a környezetből való eltávolításuk legtöbbször remediációs beavatkozást igényel. Az irodalmi adatok alapján a bioaugmentációs eljárások megfelelő választást jelenthetnek, amelyekben egy előzetesen szelektált és felszaporított mikroorganizmus tenyészetét alkalmazzák, amely a szennyezőanyag gyors és hatékony lebontására képes.

A dolgozat témája egy új MTBE-bontó baktérium izolátum részletes bemutatása, amely a laboratóriumi eredmények fényében komoly potenciált hordoz magában, és a szennyezett közegek kármentesítése alkalmával a közeljövőben terepi beavatkozások során is bevetésre kerülhet.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Az éter típusú üzemanyag-adalékok bevezetésének előzményei, körülményei és hatásai

Alkilezett ólomszármazékokat az 1920-as évektől kezdve adagoltak az üzemanyagokhoz a kopogásos égés kiküszöbölésére [1]. A kopogásos égés kialakulása elsősorban az üzemanyag összetételével és ezáltal oktánszámával áll összefüggésben. A motorok működése szempontjából ideális oktánszámok beállítására több lehetséges alternatíva közül az ólom-tetraetil rendszeresítették, elsősorban hatékonysága és alacsony előállítási költségei miatt. A benzin iránti igény világméretű növekedésével és ezáltal az ólmozott üzemanyagok elégetéséből származó károsanyag-kibocsátás emelkedésével az ólomszennyezettség mértéke drasztikusan megnőtt, hovatovább a közlekedés vált az ólomszennyezés legjelentősebb forrásává [2]. Az 1970-es évek során a járművekből származó ólomkibocsátás egészségre gyakorolt sokrétű, káros hatása világméretű problémává nőtte ki magát. Számos tanulmány demonstrálta a környezetbe ily módon kikerülő ólomnak a természetre és az emberi egészségre gyakorolt destruktív hatásait, elsősorban a központi idegrendszert, a hem szintézist és a szaporító szervrendszert érintő, valamint a különböző pszichológiai és idegi-viselkedési problémákat [3-7]. Az ólom-tetraetil kiváltása ezen felül azért is szükséges volt, mivel az ólmozott üzemanyagok égése nyomán a háromutas katalitikus konverterekkel szerelt modern gépjárművekben ólomtartalmú bevonat alakult ki a katalizátor felületén, ami rövidtávon csökkentette annak hatásfokát, hosszabb távon pedig tönkre is tette azt. Mindezen negatív hatások nyomán az alkilezett ólomszármazékokat az 1980-as évek során fokozatosan lecserélték, és az 1990-es évekre a legtöbb Európában forgalmazott üzemanyagból eltűntek. Hazánkban 1999. április 1-től nem forgalmaznak ólmozott benzint.

Az ólom-tetraetil kiváltására szánt éter típusú vegyületek előállítása az 1970-es években indult meg. Ezek az anyagok az oktánszám növelésén túlmenően, az üzemanyagok oxigéntartalmának növelésén keresztül („oxigenát”), azok tökéletesebb égését is biztosították, ami pedig hozzájárult a káros kibocsátások csökkenéséhez és ezáltal a levegőminőség javulásához is. Európában az MTBE gyártása 1973-ban, Olaszországban kezdődött el, piaca lendületesen fejlődött, kiváltképp az 1990-es évek óta, az előállított

MTBE több mint 98%-át üzemanyag-adalékként használták fel [8]. Az ETBE-t először 1992-ben Franciaországban alkalmazták üzemanyag-oxigenátként, azóta viszont széles körben elterjedt az Európai Unió területén.

A GEO vegyületek oktánszámnövelőként történő alkalmazásának gyors elterjedésével az ólomszennyezettségnek való kitettség lényegében egy évtizeden belül megszűnt, ez pedig magával hozta az általános egészségi állapot rohamos javulását is. Egy közelmúltbeli tanulmány statisztikailag is értékeli az ólmozott benzin kivonásával együtt járó pozitív egészségügyi hatásokat, bemutatja az ólomkoncentráció drasztikus csökkenését a vérben (20 $\mu\text{g}/\text{dl}$ -ről 3 $\mu\text{g}/\text{dl}$ -re) és számos, az ólmozott benzin alkalmazásával összefüggésbe hozható betegség standardizált halálozási arányának változását is szemlélteti az adott időszakban (1981-2007) [9]. Elmondható tehát, hogy az alkilezett ólomszármazékok GEO vegyületek általi kiváltása nagymértékben hozzájárult az emberi egészség megőrzéséhez és javításához.

2.2 Az éter típusú üzemanyag-adalékok termelésének és felhasználásának alakulása Európában

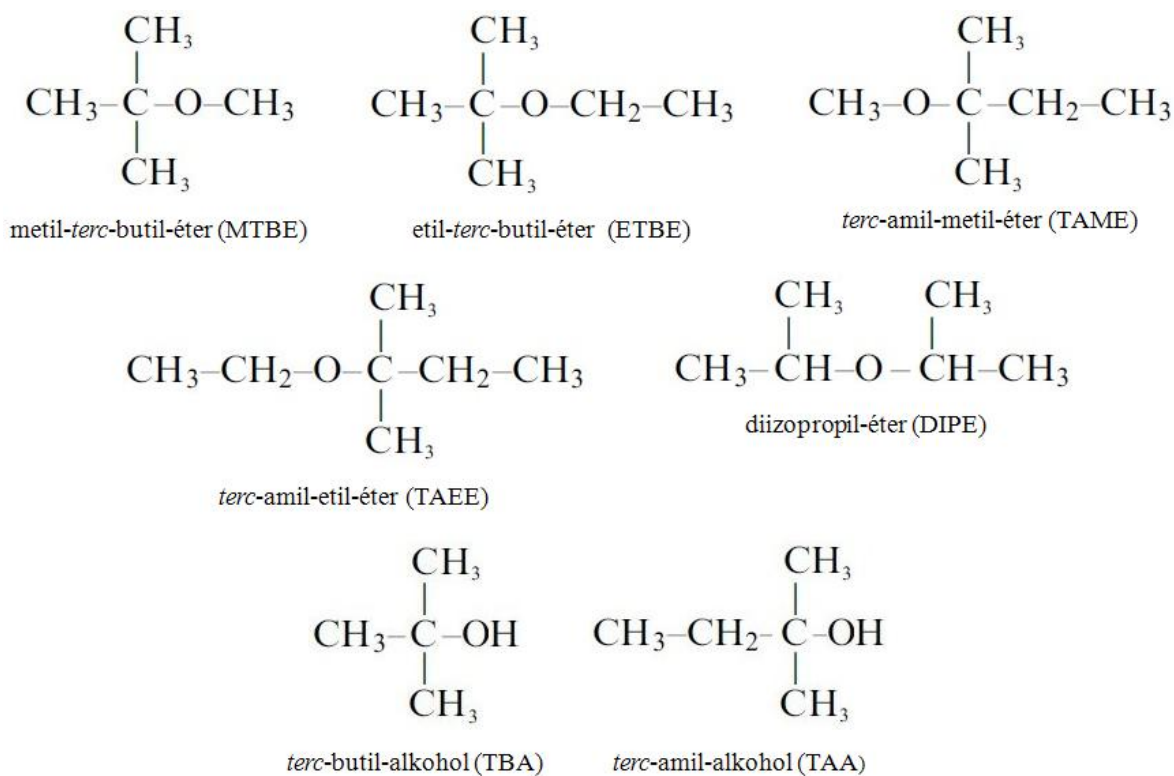
2010-ben mintegy 55, MTBE-t, ETBE-t és/vagy TAME-t előállító ipari létesítmény működött az EU területén [8]. A teljes európai termelés 50%-a Németországban, Franciaországban és Hollandiában lokalizálódott. Ugyanakkor DIPE és TBA üzemanyag-adalékként történő felhasználásáról nincsenek adatok Európából. Míg MTBE gyártás Európa számos országában folyik, addig ETBE-t legnagyobb mennyiségben Németországban, Franciaországban és Spanyolországban, TAME-t és TAE-t pedig Finnországban, Németországban, Olaszországban és Görögországban állítanak elő. Az előállított GEO (MTBE, ETBE, TAME) összes mennyisége Európában a 2002-es 4108 kilotonnás értékről 2010-re 6049 kilotonnára nőtt. Ezzel párhuzamosan az ETBE piaci részesedése ugyanebben az időszakban 15%-ról körülbelül 60%-ra emelkedett, az MTBE-é 80%-ról 30%-ra csökkent, a TAME és a TAE együttesen pedig konstans 10% körüli piaci részesedéssel állt. Hazánkban a 2010-es termelési adatok szerint Százhalombattán 55 kilotonna ETBE-t és 53 kilotonna MTBE-t, Tiszaújvárosban pedig 31 kilotonna MTBE-t állítottak elő [8].

Az MTBE-t az oktánszám növelésére eleinte viszonylag alacsony, 2-5%-os koncentrációban (m/m) keverték a különféle üzemanyagokhoz. Később már, azért, hogy az

üzemanyagok égésének hatásfokát is növeljék, lényegesen nagyobb, 11-15%-os (V/V) koncentrációkat alkalmaztak nemcsak Európa egyes részein, hanem Észak-Amerikában is. A GEO vegyületeket az egyes motorbenzin típusoktól függően különböző koncentrációban adják hozzá az üzemanyagokhoz. Ezen felül az alkalmazott oxigenát típusa és koncentrációja földrajzi régióként és időszakonként (évszakonként) is eltérő lehet. Jelenleg az EU területén az éter típusú oxigenátoknak az üzemanyagokban megengedett legnagyobb koncentrációja 15% (V/V) [8].

Az éter típusú üzemanyag-adalékok (**1. ábra**) számos nyersanyagtípusból kiindulva előállíthatóak vegyipari szintézissel. MTBE-t leggyakrabban földgáz eredetű metanolból, ETBE-t pedig kukoricából vagy más mezőgazdasági biomasszából fermentáció révén nyert etanolból gyártanak. Az MTBE és az ETBE előállításához egyaránt felhasznált izobutilént vagy földgázból nyerik vagy pedig a kőolajfinomítás során képződik melléktermékként. Jól látható tehát az, hogy az előállítást végző ipari létesítmények minden különösebb nehézség nélkül tudnak átváltani MTBE és ETBE termelés között. A TAME előállítása során izoamilének keverékét (2-metil-but-1-én és 2-metil-but-2-én) reagáltatják metanollal [10].

Hosszú távon az Európai Unió területén a felhasznált motorbenzin mennyiségének stabilizálódása vagy csökkenése várható, köszönhetően a dízel üzemű járművek növekvő térhódításának, illetve a benzinmotorok növekvő hatékonyságának [8,11]. A GEO vegyületek iránti igény várhatóan kisebb mértékben fog csökkenni, mint a motorbenzinek iránti általános kereslet, köszönhetően az EU bioüzemanyag direktívájának. Ennek értelmében ugyanis a megújuló forrásból származó komponensek részarányát növelni kell az üzemanyagokban. Ez az érték 2005-ben 2%, 2010-ben 5,75% volt, 2020-ra pedig a 8%-os részarány elérése van előirányozva. Ez a tény pedig tovább növelheti az ETBE térnyerését az MTBE-hez képest, lévén a bioetanolból előállított, így részben megújuló forrásból származó ETBE bioüzemanyag-komponensnek minősül. MTBE esetében a biometanolból történő előállítás kaphat nagyobb szerepet. Az előbbi tendencia hazánkban is megfigyelhető: a MOL Nyrt. Dunai Finomítója 2005. július 1. óta, a meglévő MTBE üzem átalakításával a korábbi technológiában alkalmazott metanol helyett, biológiai eljárással nagy cukortartalmú növényi alapanyagokból gyártott bioetanolra dolgoz fel. Az így előállított ETBE alkalmazástechnikai tulajdonságai megegyeznek a korábban megszokott MTBE tulajdonságaival, ezért a gépjárművek számára a biológiai eredetű ETBE semmilyen kockázattal nem jár. A MOL Nyrt. 2006-tól Szlovákiában (Slovnaft), majd 2007-től Tiszaújvárosban folytatta az ETBE gyártó kapacitás kiegészítését.



1. ábra Az éter típusú üzemanyag-adalékok legelterjedtebb képviselői és a belőlük származtatható legfontosabb alkoholok.

Noha az ólomtartalmú adalékok kiváltása éter típusú vegyületekkel egyértelműen jótékonyan hatott a levegő minőségére és a lakosság általános egészségügyi állapotára is, új környezeti problémákat hozott magával. A többi üzemanyag-komponenssel összehasonlítva ugyanis, e vegyületek sokkal jobb vízzoldhatóságot mutatnak, és döntően kémiai szerkezetükből adódóan, lényegesen jobban ellenállnak a biológiai lebontó folyamatoknak, tartós vízszennyezéseket okozva ezáltal. Széleskörű használatának következtében az MTBE, főleg az USA-ban, ahol 1979 óta van használatban, az egyik leggyakrabban kimutatott szennyezőjévé vált a talajvizeknek és a felszíni vizeknek egyaránt, elsősorban a városi területeken [12,13]. Ezenfelül a GEO vegyületek rendkívül alacsony organoleptikus (szag és íz) küszöbkoncentrációkkal rendelkeznek, így minimális mennyiségben (akár már 2 µg/l koncentrációban) is ihatatlanná tudják tenni az ivóvizet.

Jelenleg is folynak kutatások és vizsgálatok az MTBE kiváltására alkalmas, új éter típusú vegyületek bevezetését illetően. A lehetséges alternatívák között nagyobb szénatomszámú, ezáltal kevésbé vízzoldékony és kevésbé illékony vegyületeket találunk. Ilyen magasabb rendű éter típusú oxigenát jelöltek a következők: *terc*-hexil-etil-éter (THxEE), *terc*-hexil-metil-éter (THxME), *terc*-heptil-etil-éter (THpEE), *terc*-heptil-metil-

éter (THpME) és a *terc*-oktil-metil-éter (TOcME) [14-16]. Ezen vegyületekről és lehetséges környezeti kockázataikról azonban még meglehetősen hiányosak az adatok, így széles körű elterjedésükre még várni kell.

2.3 Az éter típusú üzemanyag-adalékok jellemző forrásai az egyes környezeti elemekben

Az éter típusú üzemanyag-adalékok mindegyike szintetikus vegyület, melyek jelenlegi ismereteink szerint természetes úton nem képződnek, a környezetbe minden esetben emberi tevékenység révén kerülnek ki. Az egyes környezeti elemek GEO vegyületek általi szennyezése származhat tiszta GEO vegyületekből és GEO tartalmú üzemanyagokból egyaránt. A gyakorlati tapasztalatok azonban azt mutatják, hogy a szennyezések döntő többsége üzemanyag eredetű. Fizikai és kémiai tulajdonságaiknak köszönhetően ezek a vegyületek a környezeti elemekbe kikerülve könnyen átkerülnek az üzemanyagokból a vizes vagy a gőz fázisba, ami nagymértékben hozzájárul gyors terjedésükhöz, akár nagy távolságokra is. Közülük is a vizes fázisban megjelenő GEO vegyületeknek van nagyobb jelentősége, köszönhetően a GEO vegyületek kiváló vízdoldhatóságának és mobilitásának, a vízi környezet korlátozott visszatartó képességének, továbbá mivel a légnemű fázissal összehasonlítva a különböző degradációs folyamatok itt lényegesen lassabban mennek végbe.

Az atmoszférában megjelenő GEO vegyületek leggyakrabban ipari kibocsátásokból, üzemanyagtöltő állomásokon keletkező véletlenszerű kiömlésekből, valamint az üzemanyagok nem tökéletes égésének vagy a katalitikus konverter csökkent hatásfokának köszönhetően a gépjárművek kipufogó gázaiból származnak. A GEO vegyületek féléletideje a légkörben meglehetősen alacsony, MTBE esetében mindössze 3-7 nap [17,18], elsősorban a levegőben jelen lévő fotoindukált hidroxil gyökök koncentrációja határozza meg, melyek elsődlegesen részt vesznek lebontásukban.

Tekintettel a GEO vegyületek légköri jelenlétére, könnyen belátható, hogy ezek az anyagok jelen vannak a különböző csapadékformákban is [19]. Több tanulmány arról számol be, hogy szoros kapcsolat figyelhető meg a GEO vegyületek csapadékban történő eloszlása és a különböző területhasználati típusok között a vidéki és a városi vagy ipari területek vonatkozásában [20,21]. Ezen túlmenően évszakonkénti tendenciák is megfigyelhetők, például a téli időszakban növekedés tapasztalható a csapadék GEO

koncentrációjában a városi területeken. Az elfolyó csapadékvízben fellelhető GEO tartalom, különösen a városi területeken, mintegy 80%-ban a jármű eredetű kibocsátások direkt felvételéből származik egy-egy esőzés alkalmával, és csak körülbelül 20% az a mennyiség, ami a légköri GEO vegyületek beoldódásából ered [18,20].

A folyók és tavak esetében a GEO vegyületek kisebb mértékben a csapadékból, az utakról lefolyó eső- és olvadékvízből, a szennyvíztisztító telepekről kikerülő tisztított vizekből, illetve az összegyűjtött csapadékvíz és a szennyvíz direkt bevezetéséből származnak. Hasonlóan a csapadékvíz esetében ismertetett tendenciával, a felszíni vizek városi területeken szintén nagyobb GEO koncentrációkkal terheltek, mint a vidéki körzetek esetében [22]. Nagyobb mennyiségben ezek az anyagok elsősorban pontszerű forrásokból jutnak be a felszíni vizekbe, így például üzemanyag kiömlésekből és szivárgásokból (gépjárművekből, üzemanyagtöltő állomásokról, üzemanyagtároló tartályokból), ipari kibocsátásokból vagy vízi járművekből [18]. Az MTBE féléletidejét folyókban 30 perctől 52 napig, tavakban 10 naptól 193 napig terjedő időintervallumban adják meg [18].

A GEO vegyületek a talajvízbe legnagyobb részben pontszerű forrásokból jutnak. Ez magában foglalja a szivárgó tároló tartályokat, az előállítás, tárolás, szállítás során, illetve az üzemanyagtöltő állomásokon és a finomítók területén bekövetkező véletlenszerű kiömléseket és a közúti baleseteket [18]. Amikor a talajba jutott üzemanyag eléri a telítetlen zónát, majd a talajvíztestet, általában bekövetkezik a GEO vegyületek elkülönülése az üzemanyag többi komponensétől. Ennek oka az, hogy az alkil éterek az üzemanyagokban található vegyületek döntő többségéhez képest lényegesen jobb vízzoldhatósággal rendelkeznek, így a helyi viszonyoktól függően akár különálló GEO csóva is létrejöhet, ami gyakorlatilag a talajvíz terjedési sebességével halad [8]. Az MTBE féléletidejét a talajvízben 2-3 évre becsülik [23]. Összehasonlításképpen a BTEX vegyületek esetében, melyek az üzemanyagok legvízzoldékonyabb szénhidrogén komponensei, ez az időtartam 2-3 hónapra tehető [24].

A GEO vegyületeket tartalmazó esővíz, illetve az utakról és autópályákról lefolyó csapadékvíz- és olvadékvíz-többlet beszivárgása a talajba, elsősorban a városi területeken, diffúz, nem pontszerű forrásként jelenik meg, ami viszonylag nagy területen okozhat alacsony, de kimutatható szennyezést.

Általánosságban véve elmondható, hogy szoros összefüggés figyelhető meg a talajvízben jelen lévő GEO vegyületek mennyisége, valamint a területhasználat, a népsűrűség és az üzemanyagokban alkalmazott GEO koncentrációk között [20]. Mivel a TAME és a DIPE az MTBE-hez és az ETBE-hez képest lényegesen kevésbé elterjedten

alkalmazott oxigenát, így ezeket a vegyületeket jóval ritkábban mutatják ki a talajvízből szennyezőként.

2.4 Az éter típusú üzemanyag-adalékok sorsa és transzportja a talajban és a talajvízben

A GEO vegyületek felszín alatti transzportfolyamatait az egyes vegyületek fizikai és kémiai tulajdonságai (**1. táblázat**), az adott közeg hidrogeológiai és geokémiai viszonyai, valamint a környezetbe való kijutás adott területre jellemző módja együttesen határozza meg. A telítetlen zónában a GEO vegyületek elsősorban lefelé irányuló mozgást végeznek, de a geológiai tulajdonságok változása nyomán (pl.: alacsony áteresztőképességű rétegek vagy törések) oldalirányban is terjednek, mozgásukat alapvetően a gravitáció és a kapilláris erők gradiensei határozzák meg. A GEO vegyületek a telítetlen zónában négy különböző fázisban lehetnek jelen: gáz (gőz), vízben oldott, talaj vagy üledék felületéhez szorpcióval kötődött és önálló szerves folyadék fázis formájában (LNAPL). A telített zónában a GEO vegyületek vándorlása főleg vízszintes (oldalirányú), mozgásukat alapvetően a talajvíz mozgás- és nyomásviszonyai alakítják. A GEO vegyületek a telített zónában három különböző fázisban lehetnek jelen: vízben oldott, talaj vagy üledék felületéhez szorpcióval kötődött és LNAPL fázisként. Amikor az LNAPL fázis (tisztá GEO vegyület vagy üzemanyag) eléri a talajvíztestet, megkezdődik a vízőldékony komponensek beoldódása és oldott szennyezőanyag-csóva kifejlődése.

A telítetlen zónában a GEO vegyületek transzportját alapvetően a diffúzió határozza meg. A szorpciós folyamatok hatása a GEO vegyületek felszín alatti transzportjára általában alacsony és a GEO vegyületek jellemzően a felszín alatti közeg számottevő visszatartó hatása nélkül transzportálódnak a talajvízben [19]. A TAME és a THxEE kivételével valamennyi GEO vegyület (az ETBE, TAEE, THxME, DIPE, MTBE, TBA csökkenő sorrend szerint) a benzollal összehasonlítva kevésbé hajlamos a szorpcióra, ezért jóval mobilisebbek a talajvízben [8]. A szorpciónak a GEO transzportra gyakorolt hatását az ún. késleltetési vagy más néven retardációs (R) faktor jellemzi. Ez egy dimenzió nélküli mennyiség, melyet megkapunk, ha a talajvíz áramlási sebességét elosztjuk a szennyezőanyag terjedési sebességével. Ez az érték MTBE esetében 1,1 körül van [23], ami azt jelenti, hogy gyakorlatilag a talajvíz-fronttal együtt terjed. Benzol esetében 1,6 körüli értéket mértek hasonló körülmények között [25], tehát hozzávetőlegesen másfélszer

lassabban terjed a talajvízben. A volatilizáció hatása a GEO vegyületek felszín alatti transzportjában általában alacsony és a GEO vegyületek általában nehezen mennek át a vizes fázisból a gáz (gőz) fázisba [8]. A GEO vegyületek mindegyike az illékony szerves vegyületek (VOC) közé tartozik, közülük is az MTBE rendelkezik a legnagyobb gőznyomással. Az MTBE, a DIPE és az ETBE gőznyomása nagyobb, mint a benzol és általában a GEO vegyületek könnyen átmennek egy LNAPL fázisból a gáz (gőz) fázisba [8].

Tulajdonság	MTBE	ETBE	TAME	TAEF	DIPE	TBA	benzol
Összegképlet	C ₅ H ₁₂ O	C ₆ H ₁₄ O	C ₆ H ₁₄ O	C ₇ H ₁₆ O	C ₆ H ₁₄ O	C ₄ H ₁₀ O	C ₆ H ₆
Moláris tömeg (g/mol)	88,15	102,18	102,18	116,20	102,18	74,12	78,11
Sűrűség (g/cm ³)	0,740	0,736	0,770	0,761	0,725	0,775	0,874
Vízoldhatóság (mg/l)	48000	12000	11500	4000	2000	elegyedik	1780
Gőznyomás (Hgmm)	245	130	75	50	159	42	76
Henry-állandó (dimenzió nélküli)	0,027	0,110	0,081	n. a.	0,199	0,00048	0,22
log K _{oc}	1,035	0,95	1,27	n. a.	1,46	1,57	1,83
log K _{ow}	0,94	1,74	1,55	n. a.	1,52	0,35	2,13
Kísérleti oktánszám	118	118	112	105	110	109	123

1. táblázat A legfontosabb GEO vegyületek néhány környezeti szempontból is releváns fizikai-kémiai tulajdonsága (25 °C-on) összehasonlítva a TBA és a benzol megfelelő adataival ([26] alapján).

Amikor egy GEO tartalmú LNAPL fázis kapcsolatba kerül a talajvízzel, megkezdődik a vízoldékony komponensek beoldódása a talajvízbe. A GEO vegyületek LNAPL fázisból történő beoldódása a talajvízben található GEO vegyületek legfőbb forrása. A GEO vegyületek vízoldhatósága körülbelül 2000 mg/l-től (DIPE) mintegy 50 000 mg/l-ig (MTBE) terjed 25 °C-on. A TBA gyakorlatilag minden arányban elegyedik a vízzel. Az összes GEO vegyület vízoldhatósága nagyobb, mint a benzol (1800 mg/l) [8]. A talajvízben az MTBE képes meglehetősen nagy csóvákat létrehozni, melyek általában kiterjedtebbek, mint a benzol esetében [27]. A GEO vegyületek meglehetősen magas vízoldhatósága szolgál magyarázattal arra, hogy a GEO vegyületek gyorsabban elhagyják az LNAPL fázist és nagyobb csóvákat képeznek magasabb koncentrációkkal, mint más benzin komponensek (pl.: BTEX vegyületek) [8].

2.5 Az éter típusú üzemanyag-adalékok előfordulása az európai környezetben

A talajvíz esetében meglehetősen nagy mennyiségű ismeretanyag áll rendelkezésre a GEO vegyületek előfordulását illetően, elsősorban az észak- és nyugat-európai viszonyokról [8,28-30]. Az adatok alapján az MTBE a leginkább vizsgált GEO vegyület az európai talajvizekben, melyről mind térbeli, mind pedig időbeli vonatkozásban a legtöbb adat elérhető. Az előállítást végző ipari létesítmények, tankautótöltő és üzemanyagtöltő állomások, valamint üzemanyag lerakatok és raktárak környékén találjuk a legmagasabb szennyezési értékeket a talajvízben. Alacsony, ún. háttér MTBE koncentrációk megtalálhatóak városi és vidéki területeken egyaránt, gyakoriságuk azonban jelentősen eltér. Városi vagy ipari területeken 40-60% a detektálási gyakoriság, míg vidéki vagy mezőgazdasági területeken csak 10-20%. Ezeken a területeken tipikusan 0,01-1 µg/l MTBE koncentrációkat találunk, azaz lényegesen a szag, íz és egészségügyi határértékek alatti mennyiségeket. Az 1 µg/l-t meghaladó koncentrációk esetében feltételezhető egy pontszerű MTBE-forrás közelsége.

Az ivóvíz minőségét Európában nagyon szigorú előírások szabályozzák. Az USA Környezetvédelmi Hivatala (USEPA) által az MTBE-re javasolt szag küszöbértéket (20 µg/l) meghaladó koncentrációt sehol sem detektáltak az ivóvízmintákban, a kevés számú pozitív mintában jellemzően nyomnyi mennyiségben volt MTBE kimutatható (0,01-0,2 µg/l). Összehasonlítva a talajvíz és a felszíni vizek esetében rendelkezésre álló adatmennyiséggel, az ivóvíz esetében fellelhető, GEO vegyületekre vonatkozó ismeretanyag meglehetősen kevés, és zömmel szintén Észak- és Nyugat-Európára szorítkozik [8,28,29,31,32]. A kimutatási gyakoriság mintegy 30%-tól (Hollandia) körülbelül 40%-ig (Németország) terjed. Jellemzően az ivóvízben esetlegesen jelen lévő MTBE legfőbb forrása az előállításához felhasznált felszíni víz.

A felszíni vizek esetében az irodalmi adatok többsége a nagyobb folyókra és főbb mellékfolyókra vonatkozóan, elsősorban néhány nyugat-európai országot illetően áll rendelkezésre [8,22,33], tavak esetében lényegesen kevesebb információ érhető el [8,30]. A vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a felszíni vizekben fellelhető GEO háttér koncentráció értéke a kimutatási határtól körülbelül 0,5 µg/l-ig terjed, és szignifikáns különbség figyelhető meg a városi és a vidéki területek esetében, illetve szezonális hatások is jelentkeznek (motorcsónak használat, vízszint változásai). Az átlagosnál lényegesen

magasabb értékek háttérében legtöbbször valamilyen pontszerű forrás, például vízi járműből, tankhajóból vagy ipari létesítményből származó kibocsátás áll.

Az utakról és autópályákról lefolyó esővíztöbblet GEO tartalmáról nagyon szórványosak az adatok, mindössze Svájc és Németország, illetve az USA területéről ismertek információk ezt illetően [8,20,34]. Ezeken a helyeken MTBE-t, TAME-t és DIPE-t sikerült kimutatni, ETBE-t nem. A mért koncentrációk értéke nagymértékben függött az eső intenzitásától és a környék területhasználatától, a detektált koncentrációk jellemzően a 0,05-1 $\mu\text{g/l}$ tartományban mozogtak. Feltételezhetően, különösen a nagy forgalmú területeken, az elfolyó csapadékvíz-többlet a GEO vegyületek számottevő forrásának minősül.

A GEO vegyületek különféle csapadékformákban való jelenlétét kiterjedten csak Németországban vizsgálták, ott is csak MTBE-re vonatkozóan [8,20,21,29]. A kimutatási gyakoriság az esővízminták esetében sokkal nagyobb volt a városi területeken (86%), mint a vidéki körzetekben (18%), de mindenütt 0,1 $\mu\text{g/l}$ alatti koncentrációkat mértek. Hóminták esetében nem volt megfigyelhető ekkora eltérés a városi és a vidéki területek vonatkozásában, a detektált MTBE koncentrációk általában magasabbak voltak, mint az esővízben mértek, a kimutatási gyakoriság pedig 65% körüli volt. Ezekből arra lehet következtetni, hogy a hó vélhetően hatékonyabban veszi fel az MTBE-t a légkörből, mint az esővíz.

A levegőben jelen lévő GEO koncentrációkra vonatkozó információk rendkívül korlátozottak, így általános tendenciákat nem lehet erre vonatkozóan felállítani. Mindössze Finnországban, Németországban és Belgiumban végeztek méréseket ebben a témában [8,20,35-37]. Egy Finnországban végzett felmérés eredményei azt mutatták, hogy a városi területek levegőjében lényegesen nagyobb MTBE koncentrációk voltak jelen (1,1-2,8 $\mu\text{g/m}^3$), mint a vidéki területek esetében (0,08-0,15 $\mu\text{g/m}^3$). Benzinkutakon és közvetlen közelükben alkalmanként a fentieknél lényegesen nagyobb értékeket is detektáltak.

A talajok esetében rendelkezésre álló adatok arra engednek következtetni, hogy a GEO vegyületek nem rendelkeznek általános háttér koncentrációkkal az európai talajokban, ugyanakkor a városi területeken előfordulhatnak a kimutatási határt meghaladó GEO koncentrációk pontszerű forrásoktól távolabb is [8].

2.6 Az éter típusú üzemanyag-adalékokat érintő szabályozások Európában és hazánkban

Európában a GEO vegyületekre vonatkozó szabályozások nem nevezhetők következetesnek és az egyes környezeti elemeket illetően esetenként hiányosak is. Az EU törvényhozása sem támaszt általános követelményeket ezt illetően, így csak néhány küszöbérték és irányelv van használatban az MTBE-re vonatkozóan az ivóvíz és a talajvíz esetében. Az általános, egészségügyi alapú küszöbkonzentrációk hiányának egyik oka az, hogy szaglás és ízlelés útján az MTBE akár már 4-5 nagyságrenddel alacsonyabb koncentrációban is érzékelhető, mint a toxikológiai vizsgálatok alapján az emberi egészségre ártalmasnak adódott koncentrációk. Dánia az elsők között volt, ahol kivonták a forgalomból az MTBE-t, mivel ivóvizének 98%-át a talajvízből nyeri. Ezen felül az ivóvíz esetében törvényi úton 5 µg/l-ben megállapított határértéket is bevezettek rá vonatkozóan. Az MTBE esetében érvényes szag és íz küszöbértékeket az ivóvízben az Egészségügyi Világszervezet (WHO) 15 µg/l-ben, az USEPA pedig 20, illetve 40 µg/l-ben határozta meg [8].

Hazánkban a jelenleg érvényes rendeletben (6/2009. (IV.14.) KvVM-EüM-FVM együttes rendelet a földtani közeg és a felszín alatti víz szennyezéssel szembeni védelméhez szükséges határértékekről és a szennyezések méréséről) az MTBE nem szerepel, így nincs „B” szennyezettségi határérték érvényben Magyarországon erre a vegyületre. Ennek ellenére már egyre több környezetvédelmi felügyelőség elrendeli az MTBE vizsgálatát is egy-egy tényfeltárás alkalmával és egyedi „D” kármentesítési határértékeket határoznak meg, többnyire a területen elvégzett kockázatfelmérés alapján. Az utóbbi időszakban 40-200 µg/l MTBE koncentrációkra adtak meg egyedi határértéket.

2.7 Az éter típusú üzemanyag-adalékok ökotoxikológiai és humán egészségügyi vonatkozásai

Az éter típusú oxigenátoknak az élővilágot és az emberi egészséget érintő esetleges negatív hatásait kiterjedten vizsgálták, különösen az MTBE esetében. Számos, olykor egymásnak ellentmondó eredmény látott napvilágot a témában, melyek időnként heves vitákat váltottak ki a szakértők körében.

A GEO vegyületek kiváló vízdoldhatóságuknak köszönhetően, a környezetbe kikerülve, nagy valószínűséggel valamilyen vizes fázisban (felszíni víz, talajvíz) jelennek meg. Egy számos élőlénycsoportot (baktériumok, algák, rákok, halak, kételtűek) érintő áttekintés arra a következtetésre jutott, hogy a felszíni vizekben jelen lévő átlagos MTBE koncentrációk ($<0,1$ mg/l) akut módon nem toxikusak az édesvízi élőlényekre [38]. A vízszennyezésekre kimondottan érzékeny szivárványos pisztráanggal végzett kísérletek eredményei azt mutatták, hogy az MTBE alacsony toxicitással rendelkezik a pisztráng esetében [39]. Egy másik vizsgálatban azonban, amelyben az MTBE-nek néhány kultúrnövény (búza, fejes saláta, kukorica, zab) csírázására, valamint hajtás- és gyökérfejlődésére gyakorolt hatását tanulmányozták, azt tapasztalták, hogy mindegyik vizsgált növényfaj esetében visszaesés volt megfigyelhető az MTBE-vel kezelt talajokban [40]. *Salmonella typhimurium* törzsek esetében MTBE-vel és TBA-val végzett mutagenitási tesztek során nem kaptak szignifikáns mutációs választ, így a szerzők arra következtettek, hogy ezek a vegyületek nem mutagének baktériumokban [41].

Az egyes élőlénycsoportokban elvégzett vizsgálatok alapján károsnak bizonyult koncentrációk a legtöbb esetben olyan magas értékek voltak (több száz vagy több ezer mg/l MTBE koncentráció), melyek az egyes környezeti elemekben egyáltalán nem tekinthetők gyakorinak vagy általánosnak, hanem csak a pontszerű szennyező források közvetlen közelében találhatók meg.

Az emberek többsége passzív módon, a levegő vagy az ivóvíz révén kerül kapcsolatba az MTBE-vel. Azt a légköri MTBE koncentrációt, mellyel a társadalom döntő hányada érintkezik, $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ -re teszik [42]. Ennél lényegesen nagyobb koncentrációknak vannak kitéve az üzemanyagokat előállító vagy tároló létesítményekben és a benzinkutakon vagy ezek közelében tartózkodó személyek. Emberek esetében az MTBE toxikokinetikai profilja hasonló képet mutat belégzés és lenyelés esetén [43]. A szervezetbe kerülő MTBE gyorsan a véráramba jut, majd a májban citokróm P450 típusú enzimek (CYP2A6 és CYP2E1) TBA-vá alakítják [44]. A további intermedierek megegyeznek a mikrobiális lebontási útvonalakban azonosított metabolitokkal: 2-metilpropán-1,2-diol (MPD), 2-hidroxiizobutirát (2-HIBA) [45], formaldehid, metanol és hangyasav [43]. A TBA átalakítását katalizáló enzimeket még nem sikerült azonosítani. Míg a lebomlás több közttermékének (formaldehid, metanol, hangyasav) ismertek a toxikus hatásai, addig a TBA, az MPD és a 2-HIBA esetében nem állnak rendelkezésre információk erre vonatkozóan. Az egyes metabolitok a kilélegzett levegővel vagy a vizelet útján távoznak. Az MTBE kis hányada ($<1\%$ -a) átalakulás nélkül ürül ki a szervezetből

[43]. A TBA, az MPD és a 2-HIBA tartózkodási ideje a szervezetben körülbelül 8-34 óra [45]. Köszönhetően kisebb illékonyságának, nagyobb féléletidejének és alacsonyabb kimutathatósági határának a TBA pontosabb markere lehet az MTBE-vel való érintkezésnek, mint maga az MTBE [46].

Az MTBE-nek az emberi egészségre gyakorolt állítólagos káros hatásait a mai napig nagy viták övezik. A korai, módszertanilag nem maradéktalanul korrekt tanulmányok MTBE akut hatásaként enyhe, rövid ideig tartó, nem specifikus tüneteket említettek: nyálkahártya irritációt, fejfájást, szédülést. Későbbi, laboratóriumban, kontrollált körülmények között megismételt vizsgálatok ezeket a tüneteket nem erősítették meg [43]. Patkányokban, egerekben és nyulakban is vizsgálták az MTBE élettani hatásait eltérő elrendezésű és különböző ideig tartó kezelések során. Belégzés esetén akut tünetekként neurotoxikus hatást, az autonóm idegrendszert és a légzőrendszert érintő problémákat észleltek. Szubkrónikus belégzés során a fenti tüneteken kívül, szöveti elváltozásokat is tapasztaltak, főleg a májban és a vesékben. Krónikus, szájon át történő adagolás esetén tumorok kialakulását diagnosztizálták a májban, a vesékben és a herékben [43]. Az állatkísérletek eredményei alapján az USEPA a lehetséges humán karcinogén anyagok közé sorolta az MTBE-t.

Noha a jelenleg elfogadott nézet szerint a társadalom döntő többségét a belélegzett levegő és/vagy az ivóvíz révén érő MTBE-koncentrációk mellett jellemzően nem kell komolyabb egészségügyi problémáktól tartani, fontos megjegyezni, hogy az ivóvízzel a szervezetbe kerülő MTBE krónikus hatásait emberben mindeddig még nem vizsgálták.

2.8 Az éter típusú üzemanyag-adalékok mikrobiális bontása

2.8.1 Az éterkötést tartalmazó vegyületek mikrobiális bontása

Az éterkötést tartalmazó vegyületek meglehetősen gyakoriak a természetben (pl.: lignin), ebből következően pedig a környezetben megtalálhatóak az éterkötés hasítására képes mikroorganizmusok is. Emberi tevékenység révén szintén sokféle éter típusú vegyület kerül ki a környezetbe, így fenoxi-alkanoátok és difenil-éterek (herbicidek), alkohol- és alkilfenol-etoxilátok (detergensok) és különböző poliéterek (polietilén- és polipropilén-glikolok). Az éterkötés felnyitásának biokémiai hátterét kiterjedten vizsgálták

baktériumokban [47], a kapott eredmények pedig a GEO vegyületek biodegradációja szempontjából is relevánsnak bizonyultak. A dialkil éterek aerob lebontási útvonalának kezdő lépését a legtöbb esetben egy oxigenáz enzim katalizálja, mely hidroxilálja az éterkötésben részt vevő $-CH_2$ vagy $-CH_3$ csoportot, és ezáltal a stabil éter vegyületből egy instabil hemiacetál jön létre, mely általában spontán diszmutációval aldehidre és alkoholra esik szét. A GEO vegyületek mikrobiális bontását a stabil és kevésbé reaktív éterkötés jelenlétén túlmenően tovább nehezíti a terciér szénatomot tartalmazó, elágazó szerkezetű *terc*-butil vagy *terc*-amil csoport is, melyek sztérikus gátlást jelentenek a katabolikus enzimek számára. Emiatt sokáig azt gondolták, hogy ezek az anyagok perzisztensek lesznek az egyes környezeti elemekben. Noha a GEO vegyületek csak mintegy 40 éve vannak jelen a környezetben, mára több mikrobiális konzorcium és egyedi izolátum vált ismertté, mely hatékony bontásukra képes anaerob vagy aerob körülmények között.

2.8.2 Az éter típusú üzemanyag-adalékok anaerob biodegradációja

A felszín alatti régiókban az abiotikus folyamatoknak elhanyagolható szerepe van a GEO vegyületek lebontásában [8]. Itt már a különböző mikrobiális lebontó folyamatok a legjelentősebb csökkentői az egyes szennyező anyagok koncentrációinak. Ahogyan azt már korábban említettük, a GEO vegyületek a legtöbb esetben kevert szennyezések formájában, jellemzően az üzemanyagok komponenseiként kerülnek ki a környezetbe. Miközben ezek az összetett szennyezések a telítetlen zónán keresztül a talajvíztest felé vándorolnak, kapcsolatba kerülnek a talaj mikroflórájával. Az aerob mikrobák a vizes fázisban oldott oxigént meglehetősen gyorsan elhasználják a könnyebben metabolizálható szénforrások (alkánok, BTEX vegyületek) hasznosításához, ezáltal pedig anaerob viszonyok állnak elő. Ennek következtében az anaerob biodegradációs folyamatoknak fontos szerepe van a GEO vegyületek koncentrációinak csökkentésében az üzemanyagokkal szennyezett felszín alatti régiókban.

Termodinamikai számítások szerint mind az MTBE, mind pedig a TBA biodegradációja lejátszódhat nemcsak aerob körülmények között, hanem elméletileg bármely, környezeti szempontból releváns standard redox állapot mellett is [48]. Ugyanakkor a tapasztalatok szerint a GEO vegyületek anaerob körülmények közötti bonthatósága nagymértékben területspecifikus [49], hiszen számos tanulmány nem tudott

számottevő biodegradációt kimutatni [50,51], míg más szerzők hasonló anaerob viszonyokkal jellemezhető területekről hatékony lebontásról számoltak be [52,53].

Számos vizsgálat igazolta az MTBE biodegradációját nitrátredukáló [54,55], szulfátredukáló [55,56], Fe(III)-redukáló [55,57,58] és metanogén [55,59-62] körülmények között, máskor viszont nem tapasztaltak lebontást anaerob viszonyok mellett [56,59,63-66]. Egyes esetekben az MTBE teljes, CO₂-ig történő lebontását figyelték meg [54,55], máskor viszont TBA-ban végződő, részleges átalakítását [56]. TBA esetében nitrátredukáló, szulfátredukáló, Mn(IV)-redukáló és metanogén körülmények között figyelték meg anaerob mikrobiális lebontást [62,64,67]. ETBE esetében egyetlen alkalommal számoltak be számottevő anaerob lebontásról [67], egy másik esetben pedig, felszíni vízi üledékekkel végzett kísérletek során nem tudtak kimérni ETBE fogyást nitrát-, szulfát- és Fe(III)-redukáló, valamint metanogén körülmények között [56]. TAME anaerob biodegradációját leírták felszíni vízi üledékekben szulfátredukáló [56] és általános anaerob körülmények között [68], továbbá egy másik vizsgálat során nem tapasztaltak lebontást nitrát- és Fe(III)-redukáló, valamint metanogén körülmények között szintén felszíni vízi üledékekben [56].

Általában a GEO vegyületek anaerob biodegradációjának sebessége sokkal kisebb, mint ugyanazon átalakulás aerob körülmények között mért értéke [61,65]. Valamennyi vizsgált anaerob körülmény közül metanogén viszonyok mellett kapták a legmagasabb biodegradációs sebesség értékeket. MTBE esetében a terepi viszonyok között, metanogén körülmények mellett mért biodegradációs sebesség értékek a természetes aerob lebontási folyamatok sebességének tartományában vannak. Hasonló redox körülmények között a TBA esetében tapasztalt biodegradációs sebesség értékek nagyobbak, mint az MTBE esetében mértek [8].

Az MTBE és a TBA, valamint általában a GEO vegyületek anaerob lebontási útvonalairól kevés információ áll rendelkezésre, mivel eddig még nem sikerült egyedi bontóképes anaerob törzseket izolálni. A meglévő adatok mindegyike bakteriális konzorciumokkal végzett kísérletekből ered. Metanogén [69] és szulfátredukáló [61,70] mikrokozmosz rendszerekből származó stabil izotópos vizsgálati eredmények arra engednek következtetni, hogy az MTBE lebontása az oxigénatom és a metil csoport szénatomja közötti kötés hasításával kezdődik. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, miszerint ezekben a rendszerekben az MTBE és a TAME bontása során sztöchiometrikus mennyiségben TBA, illetve TAA keletkezik és halmozódik fel [56]. Leírták továbbá, hogy a metanogén és a szulfátredukáló folyamatok specifikus inhibitorainak (2-

brómetánszulfonsav, ill. nátrium-molibdenát) alkalmazása nyomán az MTBE-bontó aktivitás nem szűnt meg, valamint metoxi csoportot tartalmazó aromás vegyületek (aromás metil éterek) koszubsztrátként történő adagolása növelte az MTBE-bontás sebességét [53]. Ezek alapján feltételezik, hogy a GEO vegyületek anaerob lebontásának kezdő lépését acetogén baktériumok végzik, melyekről korábban leírták, hogy aromás éterek demetilezésére képesek. MTBE-bontó anaerob bakteriális közösségek mikrobiális összetételének vizsgálata során a filogenetikai analízis három domináns törzs tagjait mutatta ki: *Deltaproteobacteria*, *Firmicutes* és *Chloroflexi* [71]. Közülük a *Firmicutes* törzsből már leírtak aromás éterek demetilezésére képes acetogén izolátumokat. TBA-bontó anaerob bakteriális konzorciumok mikrobiális összetétel-vizsgálata nyomán molekuláris biológiai módszerekkel azonosítottak egy domináns klónt, melynek mennyisége jól korrelált a TBA-bontó aktivitással, és a legközelebbi rokonságot egy *Ochrobactrum* nemzetséghez tartozó izolátummal mutatta [72]. Az *Ochrobactrum* törzsek általában aerobok, bár denitrifikáló izolátumok is ismertek [73], továbbá egy aerob törzsükről leírták, hogy MTBE bontására képes [74].

2.8.3 Az éter típusú üzemanyag-adalékok aerob biodegradációja

2.8.3.1 Az éter típusú üzemanyag-adalékok aerob biodegradációjának általános jellemzői

Amikor a GEO vegyületek az üzemanyagok komponenseiként vándorolnak a felszín alatti közegben, általában a szennyezés (telítetlen zóna) vagy a szennyezőanyag-csóva (telített zóna) frontjában vannak jelen, köszönhetően kiváló vízdoldhatóságuknak, nagy gőznyomásuknak és a talajmátrix csekély mértékű visszatartó képességének. Emiatt a telítetlen zónában lefelé haladó komplex LNAPL fázisban a GEO vegyületek érintkezhetnek leginkább az oxigénnel és ezáltal aerob biodegradációjuk lehetségessé válik [8]. A telítetlen zónában lejátszódó aerob lebontó folyamatok akkor tudnak igazán hatékonyan működni, ha a légkör felől biztosított az oxigén folyamatos utánpótlása [75]. Mivel azonban az aerob mikrobák képesek gyorsan elhasználni a vizes fázisban oldott oxigént a könnyebben hasznosítható szénforrások (alkánok, BTEX vegyületek) lebontásához, a talaj mélyebb régióiban jellemzően anaerob viszonyok uralkodnak, az aerob viszonyok meglehetősen ritkák [8].

1988-ban egy terepi kísérlet során, Kanadában vizsgálták először részletesen az MTBE *in situ* degradációját egy sekély, aerob viszonyokkal jellemezhető talajvíz zónában [8]. Az első adatsorok kiértékelése azt mutatta, hogy az MTBE meglehetősen ellenáll a különböző lebontó folyamatoknak. Emiatt néhány évig azt gondolták, hogy az MTBE perzisztensen jelen van a talajvízben. A korábban vizsgált helyről 1995-ben történt újabb mintavételezés eredménye azonban azt mutatta, hogy a korábban detektált értéknek mindössze 3%-a volt már csak jelen a területen [76,77]. Ezt követően a laboratóriumi vizsgálatok megerősítették, hogy a csökkenés legnagyobb részben aerob biodegradációs folyamatoknak volt köszönhető. A továbbiakban számos terepi vizsgálat bizonyította, hogy az MTBE és a TBA aerob biodegradációjára való képesség területről területre változik, ahogyan az az anaerob biodegradáció esetében is megfigyelhető [8]. Egy adott terület endemikus mikroflórájának az MTBE biodegradációjára való képessége nagymértékben függ a szennyezés korától, vagyis, hogy az endogén mikrobák számára mennyi idő állt rendelkezésre az alkalmazkodáshoz [8]. A későbbiekben számos tanulmány beszámolt MTBE és TBA aerob biodegradációjáról terepi körülmények között, valamint laboratóriumban talaj-, talajvíz-, iszap- vagy üledékmintákból összeállított mikrokozmosz rendszerekben egyaránt [65,78-84]. TAME és ETBE aerob lebontására képes mikrobiális konzorciumokat is leírtak [65,85-87].

Az MTBE és a TBA aerob biodegradációs sebességeinek összehasonlításakor kiderül, hogy a TBA esetében jellemzően magasabb értékek figyelhetők meg [8]. Az MTBE biodegradációja során a TBA esetleges akkumulációjára vonatkozóan nem lehet általános érvényű megállapításokat tenni. TBA átmeneti akkumulációja megfigyelhető volt számos esetben szigorúan anaerob körülmények között [79,81,88], de miután aerob körülmények alakultak ki, a TBA teljes biodegradációja lejátszódott. TBA esetében mindeddig még nem írták le, hogy aerob körülmények között mikrokozmosz rendszerekben perzisztensen felhalmozódott volna [48,64]. A GEO vegyületek leggyakrabban összetett szennyezések formájában, legtöbbször alkánokkal és BTEX vegyületekkel együtt fordulnak elő a különböző környezeti elemekben. Rajtuk kívül más egyszerű vegyületek, cukrok, alkoholok, szerves savak is jelen lehetnek a szennyezett felszín alatti közegben, sokszor a szennyezés nem GEO komponenseinek lebontási köztitermékeiként. Ezek a vegyületek gyakran eltérő módon hatnak a GEO vegyületek biodegradációjára. Leírták, hogy egyes könnyen hasznosítható szénforrások (cukrok, alkoholok, szerves savak) gátolhatják az MTBE és a BTEX vegyületek biodegradációját aerob és anaerob körülmények között is [67,89]. Egyes esetekben a BTEX vegyületek

gátolták (etil-benzol, xilolok) vagy nagymértékben lassították (benzol, toluol) az MTBE és a TBA aerob biodegradációját [90], máskor viszont nem volt kimutatható gátló hatásuk, sőt olykor még növelték is az MTBE és a TBA biodegradációjának sebességét [91,92]. Megmutatták azt is, hogy alkánok, alkoholok és BTEX vegyületek bizonyos esetekben növekedési szubsztrátként hasznosulhatnak aerob kometabolikus MTBE-bontás során [93]. Kimutatták továbbá, hogy a TAME jelenléte nem befolyásolja az MTBE aerob biodegradációjának sebességét, és a két vegyület egymás mellett egyidejűleg bontható [65].

2.8.3.2 Az éter típusú üzemanyag-adalékok kometabolikus bontása

Kometabolizmus során egy szén- és energiaforrásként hasznosuló vegyület lebontásával kapcsolatban egy másik molekula átalakítása is megtörténik, melyet a növekedési szubsztrát által indukált enzim(ek) katalizál(nak). Ennek az ún. kosubsztrátnak az egyedüli szén- és energiaforrásként történő hasznosítására a mikroba nem képes, kometabolikus átalakítása nem jár energianyereséggel a sejt számára, továbbá a növekedési szubsztrát egyidejű jelenléte vagy azon történő előnövesztés nélkül átalakulása nem játszódik le. A GEO vegyületek, különösen az MTBE vonatkozásában számos esetben leírtak kometabolikus átalakítást.

A propánon előnövesztett *Nocardia* sp. ENV425 jelű izolátum az MTBE, az ETBE és a TAME hatékony kometabolikus bontására volt képes [94]. Az MTBE és az ETBE átalakítása során közel sztöchiometrikus mennyiségben TBA, TAME esetében pedig TAA keletkezett. Az MTBE metoxi metil csoportját formaldehiden keresztül, a TBA-t pedig MPD-n és 2-HIBA-n át szén-dioxiddá oxidálta a törzs, ugyanakkor ezen utóbbi intermedierek egyike sem bizonyult hatékony növekedési szubsztrátnak. A TBA átalakítása lényegesen lassabb volt, mint az MTBE-é, és mindaddig nem indult meg, amíg MTBE jelen volt a rendszerben. Igazolták, hogy az MTBE és a TBA oxidációját egyaránt egy szolubilis, citokróm P450 típusú monooxygenáz enzim katalizálta, minden valószínűség szerint az az enzim, amely a propán oxidációjáért is felelős (propán monooxygenáz). A kámforon előnövesztett *Pseudomonas putida* CAM (ATCC 17453) törzs az MTBE-t sztöchiometrikusan szintén TBA-vá alakította citokróm P450_{cam} enzimének segítségével.

A *Graphium* sp. ATCC 58400 jelű fonalas gomba törzs esetében leírták, hogy a DEE-n és a *n*-butánon előnövesztett micéliumai egyaránt kometabolikus MTBE-bontást végeznek [95,96]. Az átalakulás TBF-en keresztül történik, mely abiotikus vagy biotikus hidrolízis nyomán TBA-vá alakul, ami akumulálódik a rendszerben. A DEE és az MTBE oxidációját ennél a törzsnél is citokróm P450 típusú monooxygenáz végzi.

A *Gordonia terrae* IFP 2007 jelű izolátum, etanol, mint növekedési szubsztrát jelenlétében az MTBE-t és a TAME-t kometabolikusan oxidálta [97]. A reakciót ebben az esetben is citokróm P450 monooxygenáz katalizálta, sztöchiometrikus mennyiségben TBA, ill. TAA keletkezett, továbbá mindkét szubsztrát esetében intermediereként hangyasavat is sikerült azonosítani.

Az *Arthrobacter* sp. ATCC 27778 jelű izolátum *n*-butánon nőtt tenyészetében az MTBE és a TBA hatékony oxidációjára volt képes [98]. Az MTBE oxidációja során TBA köztiterméket azonosítottak, vélhetően mind az MTBE, mind pedig a TBA átalakítását a butánt is oxidáló enzim (alkán monooxygenáz) katalizálta.

A *Mycobacterium vaccae* JOB5 propánon előnövesztett tenyészetében az MTBE-t oxidálta, a két domináns intermedier, a TBF és a TBA extracellulárisan kimutatható volt [99]. A törzs propánon történő előnövesztés után a TBA-t is oxidálta, de ennek a folyamatnak a köztitermékeit nem sikerült azonosítani. Mind az MTBE, mind pedig a TBA oxidációját gátolta az acetilén vagy a propán jelenléte. Ebből arra következtettek, hogy mindkét átalakítást a propán oxidációjáért is felelős, rövid láncú alkán monooxygenáz enzim katalizálta. Megfigyeléseik és a korábbi irodalmi adatok alapján javaslatot tettek az MTBE-lebontás útvonalának kezdeti lépéseire. Eszerint az MTBE-ből alkán monooxygenáz enzim révén, vélhetően egy hemiacetál típusú instabil vegyület (*tert*-butoxi-metanol) képződik, ami vagy spontán diszmutáció révén TBA-ra és formaldehidre bomlik, vagy pedig feltételezhetően egy alkohol dehidrogenáz aktivitású enzim TBF-é alakítja, amit egy észteráz enzim TBA-ra és hangyasavra hasít el. A keletkezett TBA-t az alkán monooxygenáz enzim MPD-vé oxidálja. Később leírták, hogy a JOB5 esetében az MTBE önmaga is képes indukálni azokat a géneket, melyek kometabolikus bontásához szükségesek [100]. Megfigyelték ugyanis, hogy egyszerű, nem alkán szénforrásokon (glicerin, cukrok, szerves savak), mint növekedési szubsztrátokon MTBE jelenlétében növesztett JOB5 tenyészetekben MTBE-fogyás, ill. lebontási intermedierek (TBF, TBA) megjelenése volt kimutatható.

Pseudomonas mendocina KR-1 rövid láncú *n*-alkánokon (C₅-C₈) nőtt tenyészetében az MTBE-t nagy hatékonysággal TBA-vá alakították [101]. TBF köztiterméket nem tudtak

kimutatni a folyamat során. A törzs *n*-pentánon nőtt tenyésztete sem a TBF-et, sem a TBA-t nem tudta továbbalakítani, viszont az MTBE dealkilezése során képződő formaldehidet gyorsan hasznosította. Az MTBE oxidációját ebben az esetben is egy indukálható alkán monooxygenáz enzim végezte.

Pseudomonas putida GPo1 gazdag tápoldaton alkán hidroxiláz enzim inducer (diciklopropilketon [DCPK]) jelenlétében, valamint *n*-oktánon nőtt tenyésztetei az MTBE-t oxidálták és sztöchiometrikus mennyiségben TBA keletkezett, TBF-et nem tudtak kimutatni [102]. A DCPK jelenlétében előnövesztett tenyészet TAME oxidációjára is képes volt, de ETBE, TBF, TBA és TAA bontására nem, az MTBE és a TAME demetilezése során képződő formaldehidet viszont gyorsan lebontotta. Igazolták, hogy az MTBE oxidációját az OCT plazmidon kódolt alkán hidroxiláz (AlkB) enzim végezte.

Pseudonocardia sp. ENV478 tetrahydrofuranon nőtt tenyésztete az MTBE-t TBA-vá oxidálta [103]. A reakciót valószínűleg a törzs tetrahydrofuran monooxygenáz enzime katalizálta, mely az alkán hidroxilázok rokonsági körébe tartozik.

Pseudonocardia tetrahydrofuranooxydans K1 tetrahydrofuranon nőtt sejtjei az MTBE-t, az ETBE-t és a TAME-t tercier alkoholokká oxidálták kometabolikusan, de a keletkezett TBA-t és TAA-t már nem tudták továbbalakítani [104,105]. Az oxidációs reakciókat ebben az esetben is vélhetően a tetrahydrofuran monooxygenáz enzim katalizálta.

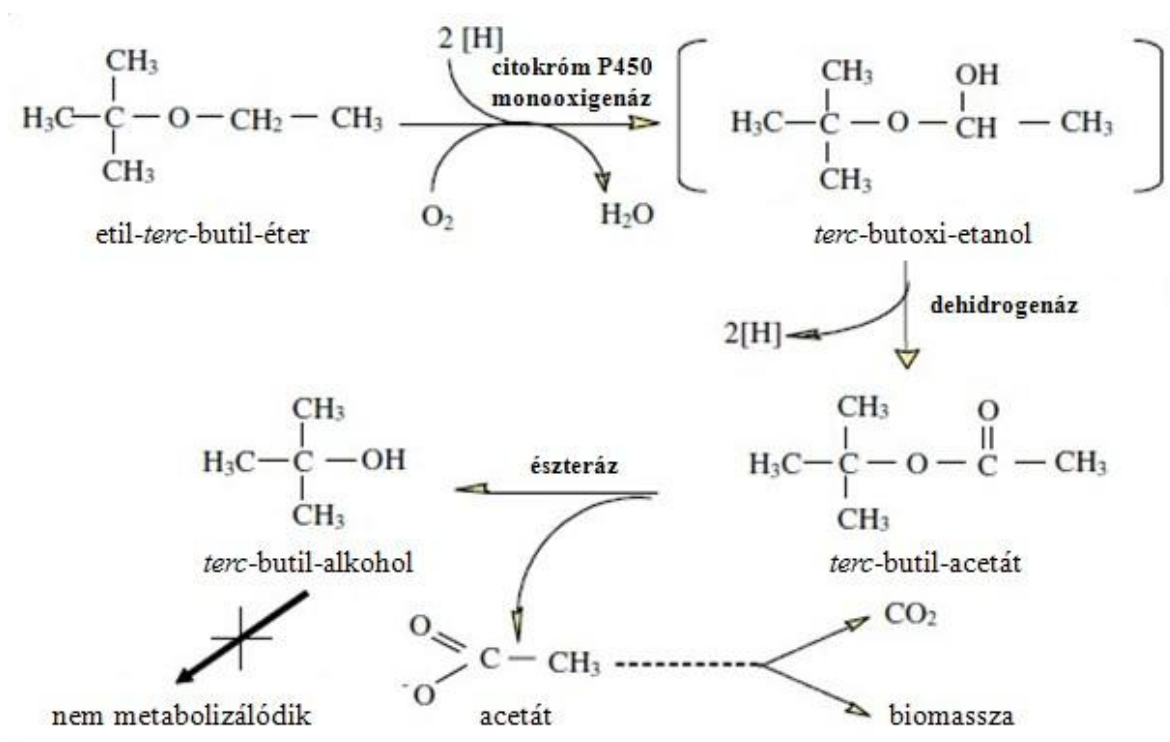
A kometabolikus MTBE-bontásra képes mikrobákat tehát alapvetően két csoportba sorolhatjuk az MTBE-bontás mértéke és a keletkezett intermedierek alapján. Az egyik csoport tagjai az MTBE-t egy rövid láncú alkán(ok) által indukálható alkán hidroxiláz enzimükkel TBA-vá alakítják formaldehid képződése mellett, TBF köztitermék viszont nem keletkezik. A TBA-t azonban nem tudják tovább bontani, így az felhalmozódik. Ebbe a kategóriába tartoznak a fent említett *Pseudomonas* izolátumok, bár újabban leírták olyan törzseiket is, melyeknél nincs TBA akkumuláció, hanem teljes, CO₂-ig menő kometabolikus lebontás történik [106]. A másik csoportba tartozó izolátumok az MTBE átalakítása során TBF-et képeznek, amit egy észteráz enzim TBA-ra és hangyasavra bont el. Az így keletkezett TBA-t ugyanaz az alkán monooxygenáz enzim alakítja tovább MPD-vé, ami az MTBE oxidációját is végzi. Ide tartozik a *Mycobacterium vaccae* JOB5, az *Arthrobacter* sp. ATCC 27778 és részben a *Graphium* sp. ATCC 58400 is, bár ez utóbbinál a TBA átalakítása meglehetősen csekély mértékű.

2.8.3.3 Az éter típusú üzemanyag-adalékok egyedüli szén- és energiaforrásként történő hasznosítása

Az első MTBE- és TBA-bontásra képes izolátumokat aktív iszapból és páfrányfenyő (*Ginkgo biloba*) magköpenyéről izolálták [107]. A *Methylobacterium*, *Rhodococcus* és *Arthrobacter* nemzetségekbe tartozó törzsek az MTBE-t meglehetősen alacsony növekedési sebesség mellett hasznosították és a biomassa termelésük is alacsony volt, amiből arra következtettek, hogy az MTBE gyenge szén- és energiaforrásnak minősül. Leírták, hogy az összetett bakteriális konzorciumok, összehasonlítva az egyedi bontóképes izolátumokkal, hatékonyabb bontásra és nagyobb biomassa hozamra voltak képesek MTBE-n, mint egyedüli szén- és energiaforráson. Megfigyelték továbbá, hogy könnyen bontható, egyszerű szénforrások (pl.: aceton, piruvát) egyidejű jelenléte visszavetette az MTBE-bontás sebességét.

A *Rhodococcus ruber* IFP 2001 (korábban *Gordonia terrae* IFP 2001) jelű törzs hatékony ETBE-bontásra képes, viszont MTBE, TAME és tercier alkoholok (TBA, TAA) egyedüli szén- és energiaforrásként történő hasznosítására nem [97]. Az ETBE oxidációját citokróm P450 típusú monooxygenáz végzi, és sztöchiometrikus mennyiségben TBA keletkezik, ami extracellulárisan felhalmozódik. Az átalakulás kezdő lépésében az ETBE etoxi csoportja szubterminális pozícióban oxidálódik és feltételezhetően egy instabil, hemiacétál típusú intermediér (*terc*-butoxi-etanol) képződik, amit egy még ismeretlen, dehidrogenáz aktivitású enzim TBAC-vé alakít, melyet egy észteráz enzim TBA-ra és acetátra hasít el (**2. ábra**). Leírták, hogy az ETBE-n előnövesztett tenyészet MTBE és TAME bontására is képes, és szintén sztöchiometrikus arányban TBA, ill. TAA keletkezik. Az IFP 2001 jelű törzsben az ETBE-bontó képesség indukálható jelleget mutat, de sikerült izolálni egy konstitutívan expresszáló vonalat is (IFP 2007) az IFP 2001 ismételt átoltásával ETBE-n, mint egyedüli szénforráson. Leírták, hogy a törzs könnyen elveszíti ETBE-bontó képességét, ami együtt jár egy 14,3 kb méretű kromoszómális DNS darab spontán deléciójával, amely az *ethRABCD* operont hordozza [108]. Ennek tagjai az ETBE-bontás kezdő lépésében közreműködő fehérjéket kódolják: a ferredoxin reduktázt (*ethA*), a citokróm P450 monooxygenázt (*ethB*), a ferredoxint (*ethC*), egy 10 kDa méretű, egyelőre ismeretlen funkciójú fehérjét (*ethD*), valamint egy feltételezett pozitív transzkripciósz regulátort (*ethR*). Az operont mindkét oldalról egy-egy 5,6 kb méretű, azonos, direkt repeat szekvencia határolja, amelyek a II-es osztályba tartozó transzpozonok, és egy TnpA transzpozázt, a TnpR rekombinázt egy csonkolt formáját, valamint egy 38 bp méretű

terminális fordított repeat szekvenciát hordoznak. Valószínű, hogy az ETBE-bontás elvesztésével járó spontán deléció a két azonos direkt repeat szekvencia közötti homológ rekombináció révén megy végbe, jellemzően nem szelektív növesztési körülmények között. Nagyon hasonló felépítésű *eth* operonokat találtak két másik ETBE-bontó törzsben is (*Rhodococcus zopfii* IFP 2005 és *Mycobacterium* sp. IFP 2009), melyekben szintén meglehetősen instabil volt az ETBE-bontásra való képesség [109]. Megfigyelték, hogy az egyébként meglehetősen konzervált *eth* operonok a három törzs esetében különböző, egymással nem rokon szekvenciák között helyezkedtek el, ami fajok közötti horizontális géntranszferre utalhat, melynek során az újonnan szerzett gének eltérő genomi környezetbe integrálódtak a kromoszómán.



2. ábra Az ETBE metabolikus útvonala a *Rhodococcus ruber* IFP 2001-ben ([110] alapján).

A hidrogénoxidáló *Hydrogenophaga flava* ENV735 jelű izolátum lassú növekedésre volt képes MTBE-n és TBA-n egyaránt, de már kis mennyiségű élesztőkivonat adagolása is nagymértékben növelte a lebontás sebességét, ugyanakkor H_2 hozzáadása nem befolyásolta számottevően a biodegradációt [111]. Az MTBE-oxidáló aktivitás konstitutívan jelen volt a törzsben, a TBA-bontás viszont indukálható jelleget mutatott. Emiatt, valamint a két reakció inhibitorokkal szemben történő eltérő viselkedése miatt,

valószínűsíthető, hogy az MTBE és a TBA oxidációját különböző enzimek katalizálják az ENV735-ben, melyek génjei egymástól függetlenül szabályozódnak. Az MTBE bontása során TBA és 2-HIBA intermediereket tudtak kimutatni, TBF-et viszont nem, ami arra utal, hogy a *terc*-butoxi-metanol spontán diszmutáció révén alakul tovább a törzsben. Ezt támasztja alá az is, hogy az ENV735 nő formaldehid, mint egyedüli szénforráson.

A *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012 jelű törzset TBA-bontóként izolálták, de a későbbiekben igazolták, hogy MTBE, TAME és TAA bontására is képes, ETBE-n viszont gyengén nő [112]. Az MTBE lebontási köztitermékei közül a TBF-et, a TBA-t, az MPD-t, a 2-HIBA-t és az acetont azonosították. A kísérleti eredmények alapján a törzsben az MTBE és a TBA oxidációját minden valószínűség szerint ugyanaz az alkán monooxygenáz enzim végzi, citokróm P450 típusú oxygenázt nem találtak az IFP 2012-ben. Az MTBE lebontása során az egyes átalakításokat katalizáló enzimek és a keletkező intermedierek között összetett, kompetíción és inhibíción alapuló szabályozási rendszert tártak fel [113,114]. Az MTBE/TBA monooxygenáznak alacsony az affinitása a TBA irányába, emiatt az MTBE bontása során a TBA felhalmozódik és csak azután alakul tovább, miután az MTBE elfogyott a rendszerből. A TBF az MTBE/TBA monooxygenáz működését, a TBA pedig a TBF-et bontó észteráz működését szabályozza negatív visszacsatolással. A TBF kis részben spontán hidrolízis révén is bomlik. Mivel az IFP 2012 metilotróf izolátum, ezért a TBF hidrolízise nyomán keletkező formiátot is képes hasznosítani. Az aceton továbbalakítását vélhetően katalizáló monooxygenáz enzim nem azonos az MTBE/TBA monooxygenázzal, így az aceton nem befolyásolja annak működését kompetíció révén. A 2-HIBA átalakítását egy, a működéséhez Co^{2+} ionokat igénylő dekarboxiláz aktivitású enzim végzi, a reakció során 2-propanol keletkezik, amit egy dehidrogenáz alakít acetonná. Az MTBE-, a TBA- és a 2-HIBA-bontó aktivitások indukálható jelleget mutattak az IFP 2012-ben. Az MTBE és a TBA indukálták ezeket az aktivitásokat, a TBA jobb inducernek bizonyult, mint maga az MTBE.

A *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2015 jelű izolátumot, az előzőekben bemutatott IFP 2012 törzs közeli rokonát, nagymértékben hasonló tulajdonságok jellemzik [115]. Degradációs profiljuk megegyezik (MTBE, TAME, ETBE), lényeges különbség viszont, hogy az IFP 2015 sokkal hatékonyabban nő ETBE-n. Az MTBE katabolikus útvonala is jó egyezést mutat, hiszen ugyanazokat a lebontási intermediereket azonosították itt is (TBF, TBA, MPD, 2-HIBA, aceton), mint az IFP 2012 esetében. Ezenfelül az IFP 2015 is fakultatív metilotróf, metanolon és hangyasavon, mint egyedüli szénforrásokon is nő.

Leírták, hogy a fenti két *Mycobacterium austroafricanum* törzs jól nő C₂-C₁₆ *n*-alkánokon is [116]. Az alkán hidroxiláz enzimet (AlkB) kódoló *alkB* gén mindkét izolátumban jelen volt egy-egy kópiában. RT-PCR vizsgálatokkal sikerült igazolni, hogy az *alkB* gén nagymértékben indukálódott nemcsak *n*-alkánokon, hanem TBA-n történő növesztés során is. Ezenfelül a különböző *n*-alkánokon előnövesztett IFP 2012 és IFP 2015 sejtek hatékony TBA-bontásra voltak képesek. Mindebből arra lehetett következtetni, hogy a TBA oxidációját ezekben a törzsekben az *alkB* gén terméke végzi, amiből egyúttal az is következett, a korábban említett megfigyelések alapján, hogy az MTBE oxidációjáért is az AlkB felelős az IFP 2012-ben és az IFP 2015-ben. Az MTBE lebontása során az MPD → 2-HIBA átalakulás enzimatis és genetikai hátterét is feltárták az IFP 2012-ben [117]. A két lépésben történő átalakítás első reakcióját egy alkohol dehidrogenáz aktivitású enzim (MpdB) katalizálja, és hidroxiiizobutiraldehid (2-hidroxi-2-metilpropanal) keletkezik, mely intermediert mindeddig még nem sikerült kimutatni. A második lépésben egy aldehid dehidrogenáz aktivitású enzim (MpdC) 2-HIBA-t állít elő az aldehidsből. A két dehidrogenáz enzimet kódoló gén (*mpdB* és *mpdC*) az *mpd* génklaszter részét képezi, melynek működését feltételezhetően az *mpdR* gén szabályozza.

Az L10 és L108 [118], valamint a CIP I-2052 [119] jelű izolátumokat MTBE-vel szennyezett talajvízből, illetve aktív iszapból izolálták. Kemotaxonómiai, fiziológiai és DNS-alapú vizsgálatok alapján a három törzs ugyanabba a fajba, az *Aquincola tertiaricarbonis*-ba tartozik [120]. Az ismert mikrobák közül az *Aquincola tertiaricarbonis* L108 rendelkezik a legnagyobb potenciállal az éter típusú üzemanyag-adalékok lebontásában, lévén az MTBE, az ETBE, a TAME, a TAEE és a DIPE, valamint legfontosabb metabolitjaik, a TBA, a TAA és a 2-HIBA nagy hatékonyságú degradációjára képes az abiotikus környezeti tényezők (hőmérséklet, pH) széles tartományában [121,122]. A *terc*-butil csoportot tartalmazó vegyületek hasznosításához a törzsnek kobaltra van szüksége Co²⁺ vagy kobalamin (B₁₂-vitamin) formájában [118]. Az L108 esetében az alkil éterek biodegradációs útvonalában három lépésnek ismert az enzimatis és a genetikai háttere. A lebontás kezdő lépését egy citokróm P450 típusú monooxigenáz (EthB) katalizálja, melyet a hozzá kapcsolódó, elektrontranszferben szerepet játszó fehérjékkal együtt az *ethABCD* gének kódolnak, a *Rhodococcus ruber* IFP 2001 esetében megismert elrendezés szerint, azzal a lényeges különbséggel, hogy az L108-ból hiányzik az *ethR* regulátor gén, így a génklaszter tagjai konstitutívan expresszálódnak [122]. A TBA oxidációját vélhetően egy két alegységből álló fehérje végzi, amely szekvencia homológia alapján egy ftalát-4,5-dioxigenáz enzimmal mutatja a legközelebbi rokonságot [123]. A

fehérje egy 55 kDa-os, hidroxiláz aktivitású (MdpJ), és egy 38 kDa-os oxidoreduktáz aktivitású alegységből (MdpK) épül fel. A 2-HIBA-t, a működéséhez kobalamint igénylő, 2-hidroxiizobutiril-KoA mutáz (Hcm) enzim (S)-3-hidroxiizobutiril-KoA-vá alakítja reverzibilis reakcióban, ami azután a központi anyagcsere-útvonalakon keresztül alakul tovább [124]. A két alegységes enzim egy nagyobb, szubsztrátkötő (HcmA), és egy kisebb kobalaminkötő alegységből (HcmB) áll, melyeket a *hcmA*, ill. a *hcmB* gének kódolnak. Az L108-ban az MTBE és az ETBE lebontása TBA-n keresztül történik, azonban kis mennyiségben, melléktermékként izobutilén is keletkezik [125]. Az izobutilén képződése TBA-ból alacsony oxigénkoncentráció mellett figyelhető meg és valószínűleg az MdpJK deszaturáz aktivitásának tulajdonítható. A TAME és a TAEF katabolikus útvonala TAA köztiterméken át vezet, melyből kevés oxigén jelenlétében számottevő mennyiségben β - és γ -izoamilén is képződik [125]. Elegendő oxigén mellett a TAA-ból az MdpJ deszaturáz aktivitása nyomán 2-metil-3-butén-2-ol keletkezik, mely prenol és prenal intermediereken keresztül 3-metilkrotonsavvá alakul, ami azután a leucin katabolikus útvonalába csatlakozhat be [126]. Lényeges különbség tehát, hogy a TBA metabolizmusával összehasonlítva TAA esetében az MdpJ nem hidroxilációs reakciót katalizál, továbbá a TAA-n történő növekedéshez az L108 nem igényel kobalamint, viszont biotinra szüksége van.

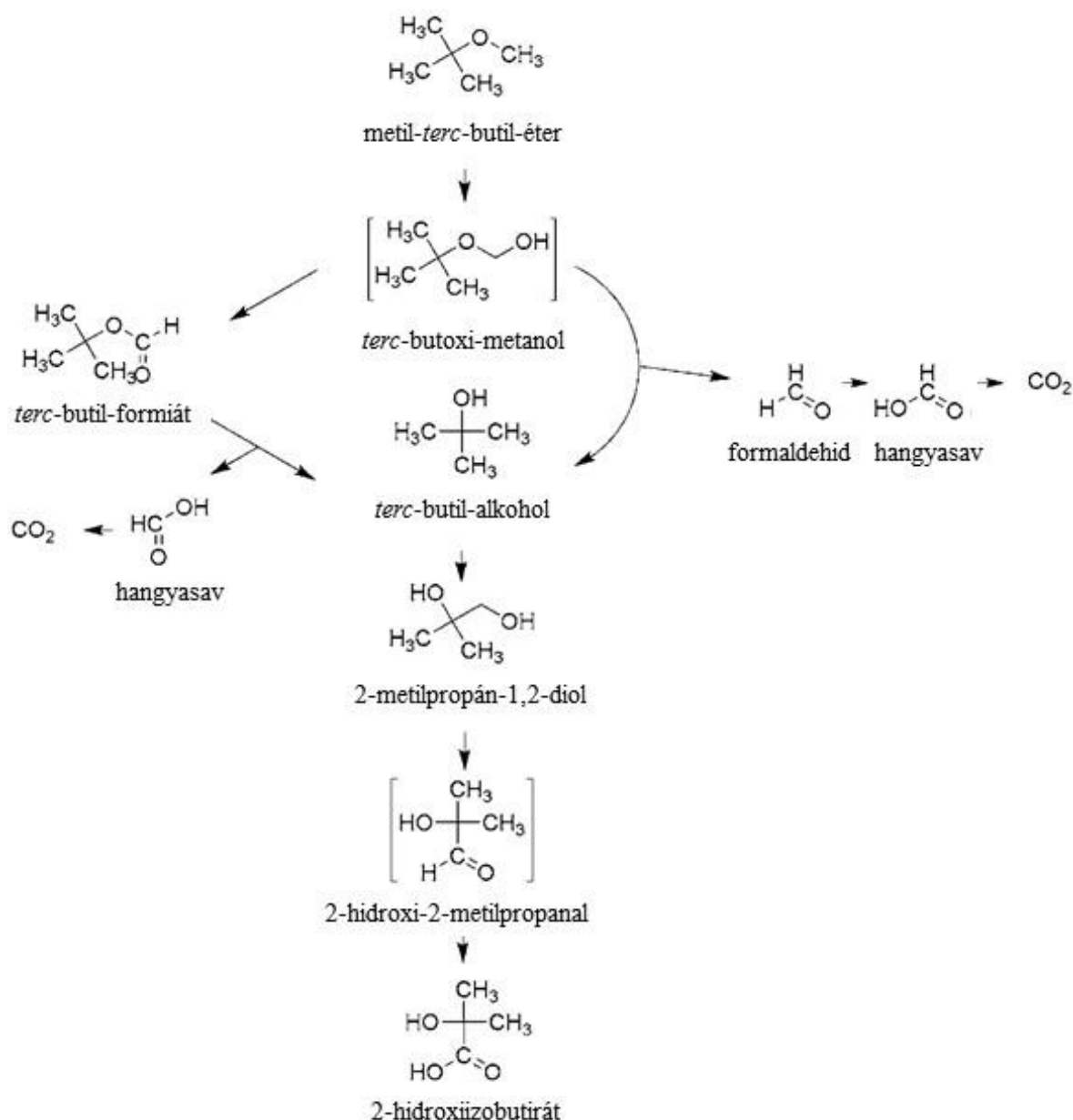
A PM1 jelű törzset egy komposzt alapú biofilterből származó, dúsított, MTBE-bontó bakteriális konzorciumból izolálták az Egyesült Államokban, Kaliforniában [127]. A laboratóriumi tesztek alapján nagyon hatékony izolátumnak bizonyult, jelentősebb lag fázis nélkül képes volt akár 500 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban adagolt MTBE gyors lebontására is. MTBE-bontó képességét vizsgálták környezeti mintákból (talajvíz, üledék) összeállított mikrokozmosz rendszerekben is [127,128], és igazolták, hogy a PM1 sejtszámának növekedése együtt járt az MTBE koncentrációjának csökkenésével [128]. A PM1 16S rRNS génjére tervezett specifikus primerek alkalmazásával sikerült MTBE-vel szennyezett területekről a PM1-hez rendkívül hasonló ($\geq 99\%$) izolátumok jelenlétét kimutatni [129,130], de ezeket a törzseket nem izolálták. E PM1-szerű törzsek esetében is megfigyelték mikrokozmosz rendszerekben, illetve terepi kísérletek során *in situ* körülmények között is, hogy sejtszámuk növekedése és az MTBE fogyása pozitív korrelációt mutatott [129]. A PM1 jelű izolátumot végül később a *Methylobium* nemzetség első tagjaként, *Methylobium petroleiphilum* PM1-ként írták le [131]. A PM1 az alkil éterek és jelentősebb intermediereik közül az MTBE és a TAME, valamint a TBA, a TAA és a 2-HIBA nagy hatékonyságú lebontására képes [118,125,131]. A PM1 esetében az MTBE

lebontási útvonalában három reakció enzimatis és genetikai háttere ismert, melyek közül kettőt az L108-nál megismert enzimekhez nagymértékben hasonló fehérjék katalizálnak. Az MTBE-bontás kezdő lépésében mutatkozik jelentős eltérés az L108-hoz képest. Míg ott egy citokróm P450 monooxigenáz (EthB), addig a PM1-ben egy az alkán hidroxilázokkal rokon enzim, az MdpA végzi a kezdő oxidációs lépést [132]. Az MdpA tartalmazza a membránkötött alkán hidroxilázokra jellemző 6 konzervált transzmembrán régiót, valamint a 3 klaszterbe rendeződött szintén konzervált 8 hisztidin aminosavat is. Az alkán hidroxilázokat két csoportra osztják az aktív centrumukban, egy kitüntetett pozícióban lévő aminosav-oldallánc típusa szerint, mely nagymértékben meghatározza az enzim által átalakítható szubsztrátok mérettartományát [133]. Az AH1 csoport esetében ez egy nagyméretű aminosav (Trp, Tyr), így az ide tartozó enzimek a rövid vagy közepes láncosságú alkánok hidroxilálására képesek. Az AH2 csoportnál viszont jellemzően egy kisebb méretű aminosav-oldallánc (Ile, Leu, Val) található ebben a pozícióban, így ezek az enzimek hosszú láncú alkánok oxidációját végzik. Az MdpA esetében Thr található ezen a helyen, így, noha a filogenetikai vizsgálatok szerint az AH1 csoporttal rokon, egyik fenti csoportba sem sorolható, hanem egy önálló alcsaládot képvisel az alkán hidroxilázok között. Az MdpA-t és redox partnereit, a rubredoxint és a rubredoxin reduktázt kódoló gének (*mdpA*, *mdpB*, *mdpD*) [134], melyek a *Pseudomonas putida* GPo1 *alkB*, *alkF/G* és *alkT* génjeivel homológok [135], a PM1 megaplazmidján, egy 10 kb méretű lókuszbán találjuk. A megaplazmidot nem tartalmazó mutáns PM1 vonal nem volt képes MTBE-bontásra [136]. Az MdpA alacsony szintű konstitutív expressziót mutat, MTBE viszont erősen indukálja a termelődését [132]. Methimazol, a flavin kofaktort (FAD) tartalmazó monooxigenázok irreverzibilis inhibitora gátolta a PM1 MTBE-bontását, az acetilén, az alkán monooxigenázok másik ismert inaktivátora/inhibitora, azonban nem volt rá hatással [132]. Leírták, hogy bizonyos körülmények között az MdpA ugyan részt vehet a TBA-bontás szabályozásában, de a TBA oxidációjáért egy másik monooxigenáz felelős a PM1-ben. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, miszerint az *mdpA* knockout (KO) mutáns PM1 vonal MTBE-bontásra nem volt képes, TBA-t viszont továbbra is bontott [132]. A PM1 teljes transzkriptom analízise során azonosították a TBA oxidációját végző enzimet, mely egy hidroxiláz (MdpJ) és egy oxidoreduktáz (MdpK) alegységből épül fel, és a filogenetikai elemzés alapján a ftalát dioxigenázok rokonsági körébe tartozik, hasonlóképpen az L108 esetében megismert enzimmel [134]. A teljes transzkriptom adatok vizsgálata feltárta továbbá azt is, hogy az MTBE-n történő növekedés során más vegyületcsoportok, így aromás vegyületek (toluol, fenol) és alkánok lebontási útvonalában

szereplő gének is indukálódnak. A PM1 esetében is megfigyelhető a TBA-ból és a TAA-ból illékony, telítetlen szénhidrogén melléktermékek (izobutilén, ill. izoamilének) képződése alacsony oxigénkoncentráció mellett az L108-nál bemutatott mechanizmus szerint, de itt lényegesen kisebb intenzitású a folyamat [125]. A két törzsnél az *mdpJ* gén esetében megfigyelhető nagyfokú azonosság (~97%), valamint a csaknem egyforma génkörnyezet alapján feltételezik, hogy a TAA metabolizmusa a PM1-ben szintén az L108-nál leírt útvonalon megy végbe, melyet alátámaszt az a tény, hogy a PM1 képes a 2-metil-3-butén-2-ol egyedüli szén-és energiaforrásként történő hasznosítására [126]. A 2-HIBA metabolizmusa a PM1-ben nagy valószínűség szerint szintén az L108-nál leírtak szerint játszódik le. Erre utal, hogy az L108 Hcm alegységeit kódoló gének (*hcmA* és *hcmB*) nagymértékű azonosságot (>97%) mutatnak a PM1 homológjaival (*mdpO/R*), és a gének elrendeződése is megegyezik a két törzsben [118,124,136]. A teljes transzkriptom vizsgálata során az *mdpO/R* géneken kívül két másik gén indukcióját is kimutatták MTBE-n nőtt sejtekben, melyek valószínűsíthetően szintén a 2-HIBA lebontási útvonalában vesznek részt: az acil-KoA szintetázét (2-HIBA-KoA ligáz) (*mdpP*) és a 3-hidroxibutiril-KoA dehidrogenázét (*mdpX*) [134].

A fent bemutatott izolátumokon kívül egyéb törzsekről is leírták, hogy az éter típusú üzemanyag-oxigenátok bontására képesek [74,119,137-145], de mivel esetükben a biodegradáció részletei, különös tekintettel a folyamatban részt vevő génekre és enzimekre, valamint a lebontási útvonalra vonatkozóan egyáltalán nem, vagy legfeljebb csak néhány részletükben ismertek, ezért itt most ezeket a törzseket nem tárgyaljuk részletesen.

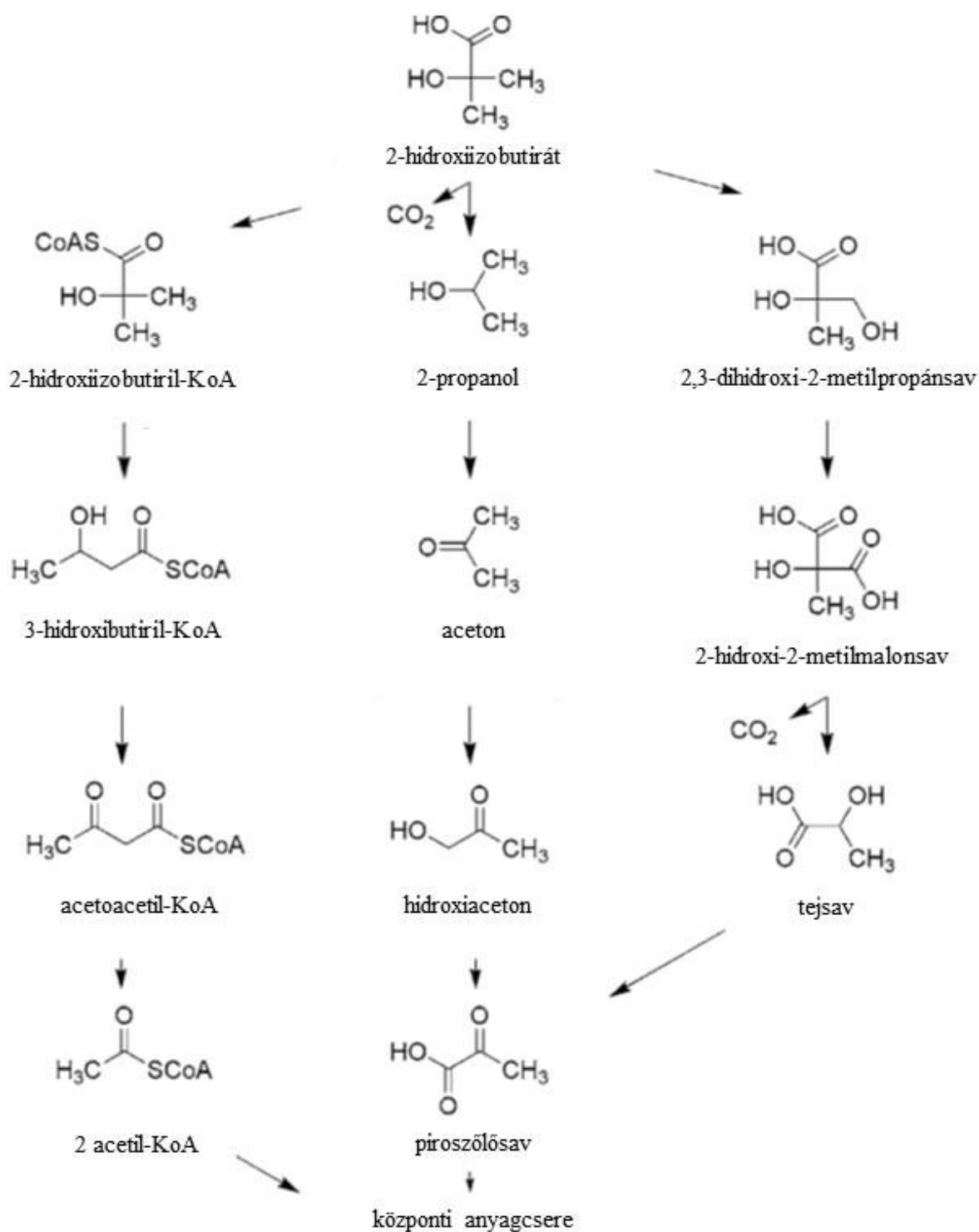
Az éter típusú üzemanyag-adalékok aerob mikrobiális lebontásának részletes áttekintése után elmondhatjuk, hogy kisszámú kivételtől eltekintve, a biodegradációs folyamatokban részt vevő gének és/vagy enzimek, nincsenek minden kétséget kizáróan azonosítva, sokszor csak indirekt bizonyítékok (pl.: szekvencia homológiák, enzim inhibitorok) utalnak egy adott gén vagy enzim részvételére egy adott lépésben. Ezenfelül nincs olyan mikroorganizmus, melyben valamelyik GEO vegyület teljes lebontási útvonala ismert lenne. Az egyes törzsekben azonosított intermedierek, valamint katabolikus gének és enzimek felhasználásával azonban leírták az MTBE valószínűsíthető biodegradációs útvonalát, melynek felső, 2-HIBA-ig tartó szakaszát a **3. ábra** mutatja be, míg a 2-HIBA lehetséges további átalakulásait a **4. ábra** szemlélteti.



3. ábra Az MTBE aerob biodegradációs útvonalának felső, 2-HIBA-t eredményező legvalószínűbb útvonala ([93] alapján). (A szögletes zárójelben feltüntetett intermediereket mindeddig még nem sikerült kimutatni.)

2.9 A *Methylibium* nemzetség általános jellemzése

A *Methylibium* nemzetség a *Betaproteobacteria* osztály *Burkholderiales* rendjének *Comamonadaceae* családjába tartozik, legközelebbi rokonai az *Aquabacterium*, a *Piscinibacter* és a *Rhizobacter* nemzetségek tagjai között találhatók [131,136,146]. A nemzetség jelenleg egyetlen leírt faja a *M. petroleiphilum*, melynek típus törzse a PM1^T. A PM1 Gram-negatív, sejtjei egyenes pálca alakúak, mozgékonyak, egy poláris flagellummal



4. ábra A 2-HIBA átalakulásának lehetséges útvonalai az MTBE-lebontás alsó szakaszában ([93] alapján).

rendelkezik. Fakultatív anaerob, optimális növekedése 6,5-es pH-n és 30 °C-on figyelhető meg, 37 °C-on nem nő. 2-3 nap alatt NA táplemezen 2-3 mm átmérőjű, krémszínű telepeket képez. Vitaminokat nem igényel a szaporodásához, a mikroelemek közül a Co, a Cu, a Fe, a Mn, a Mo, a Ni és a Zn szükséges a növekedéséhez minimál

táplódatban MTBE-n, mint egyedüli szénforráson. Fakultatív metilotróf, a C_1 vegyületek közül a metanol, a formaldehid és a hangyasav hasznosítására képes. Számos alkoholt és szerves savat hasznosít egyedüli szén- és energiaforrásként, így etanolt, butanolt, acetátot, piruvátot és tejsavat, viszont nem nő egyedüli szénforrásként alkalmazott glükózon, citráton és DL-glicinen. Nagyszámú aromás vegyületet metabolizál, így benzolt, toluolt, etil-benzolt, *o*-xilolt, fenolt és különböző dihidroxibenzoátokat, naftalint azonban nem bont. A nyílt láncú telített szénhidrogének közül a C_5 - C_{12} *n*-alkánok bontására képes.

A törzs teljes genomszekvenciája ismert, genommérete 4,6 Mb. Cirkuláris kromoszómája mintegy 4 Mb méretű, továbbá rendelkezik egy megközelítőleg 600 kb-os megaplazmiddal (pPM1) is [136]. Az alifás és aromás szénhidrogének metabolizmusában részt vevő, valamint a különböző nehézfémek elleni rezisztenciákért (Cd, Co, Cr, Cu, Zn) és a metilotrófiáért felelős géneket a kromoszómán találjuk. A megaplazmidon lokalizálódnak az MTBE-lebontás és a kobalamin szintézis útvonalában közreműködő gének. A kromoszóma és a megaplazmid is nagy számban tartalmaz inszerciós szekvenciákat (IS elemek), de eloszlásuk meglehetősen eltér a két replikonon. Az MTBE bontásában részt vevő gének szomszédságában is számos IS elem található, melyek szerepet játszhatnak az *mdp* génklaszter esetleges mobilitásában, deléciójában vagy átrendeződésében. A PM1 és az eltérő földrajzi helyekről izolált PM1-szerű törzsek megaplazmidjai nagymértékben konzervált nukleotid szekvenciákkal rendelkeznek (~99% azonosság), kromoszómaikban azonban lényeges eltérések figyelhetők meg. A kromoszómán, illetve a megaplazmidon kódolt fehérjék legközelebbi homológjainak filogenetikai eloszlása meglepő módon nagy különbségeket mutat. A fentiek figyelembevételével, valamint kiegészítve azzal, hogy a kromoszóma és a megaplazmid GC-tartalma is különbözik (69,2%, ill. 66%), valószínűsíthető, hogy a plazmidot a közelmúltban horizontális transzfer során szerezte a törzs.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Hazánkban számos MTBE-vel szennyezett terület vált ismertté az utóbbi időben, mely szennyezések döntő hányada üzemanyag eredetű. Ahogyan az előző fejezetben ismertettük, Magyarországon jelenleg még nincs érvényben rendeletileg előírt környezeti határérték az üzemanyag-oxigenátokra vonatkozóan, de a közeljövőben várható az MTBE környezeti küszöbkonzentrációinak Európai Unió szintű szabályozása, ami maga után vonja majd a szennyezett területek kötelező kármentesítését. A környezeti kármentesítések során a bioremediációs eljárások sok esetben elsőbbséget élveznek a fizikai-kémiai módszerekkel szemben, elsősorban alacsonyabb költségeik és a szennyezett közegek ökoszisztémáját lényegesen kevésbé károsító tulajdonságaik miatt.

A szakirodalomban ugyan egyre több információ áll rendelkezésre üzemanyag-adalékokat bontó konzorciumok, és ezáltal közvetve a forrásukként szolgáló, üzemanyag-adalékokkal szennyezett közegek mikrobiális összetételéről is a világ számos pontjáról, de legjobb tudomásunk szerint hazánkban mindeddig még nem történt részletes felmérés az MTBE-vel szennyezett területek mikrobiális viszonyait (diverzitás, biodegradációs potenciál) illetően, pedig a hatékony remediáció szempontjából ez elengedhetetlenül szükséges.

Munkánk során ezért célul tűztük ki hazai, MTBE-vel és rokon vegyületekkel szennyezett felszín alatti közegekből bontóképes konzorciumok izolálását, mikrobiális összetételük meghatározását és ezáltal a lokális MTBE-bontó potenciálok felmérését. Végző célunk, a későbbi hatékony terepi beavatkozások érdekében, az üzemanyag-oxigenátok, mindenekelőtt az MTBE bontására képes bakteriális konzorciumokból egyedi bontóképes baktériumtörzs(ek) izolálása és jellemzése volt. Az izolátum(ok) jellemzésének első lépéseként először laboratóriumi szinten kívántuk meghatározni az optimális MTBE-bontáshoz szükséges abiotikus paramétereket, majd feltérképezni a törzs(ek)ben az MTBE lebontási útvonalát, megadni a hasznosítható szénforrások spektrumát, azonosítani a biodegradációban szerepet játszó géneket és enzimeket, végül pedig a kapott eredményeket összevetni az irodalmi adatokkal. Az azonosított gének, mint az aktív MTBE-bontási képesség meglétét igazoló molekuláris markerek, a jövőbeni kármentesítési eljárások során a remediációs folyamatban alkalmazott törzs terepi nyomon követését, és a beavatkozás hatékonyságának igazolását tehetik lehetővé.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 MTBE-bontó konzorciumok izolálása talajvízmintákból

MTBE-bontó konzorciumok izolálásához az alábbi földrajzi helyekről származó, jellemzően MTBE-tartalmú üzemanyagokkal, vagy más, döntően alifás és aromás szénhidrogénekkal szennyezett talajvízmintákat használtuk fel: Baja, Balassagyarmat, Barcs, Békéscsaba, Bonyhád, Fonyód, Füzesabony, Gyöngyös, Jánossomorja, Komárom, Pálmonostora, Püspökladány, Sátoraljaújhely, Tihany, Tiszaújváros, Vásárosnamény, Vép, Zalaegerszeg, Zalalövő. A vízmintákból 25-25 ml-eket lecentrifugáltunk (9500 g, 10 perc), a kiülepedett pelletet háromszor mostuk 1,5-1,5 ml MSM tápoldattal, majd 250 ml-es, teflonbetétes kupakkal légmentesen zárható üvegekbe 50-50 ml MSM tápoldatba inokuláltuk azokat, egyedüli szén- és energiaforrásként 200 mg/l koncentrációban MTBE-t mértünk be és a rendszereket 25 °C-on 150 rpm-el rázatva inkubáltuk 30 napig. Ezután azokból a tenyészetekből, melyek ez idő alatt számottevő növekedést mutattak, 500-500 µl-eket friss 50-50 ml MSM tápoldatba oltottunk át, majd 200 mg/l MTBE hozzáadása után tovább inkubáltuk őket. A dúsításhoz használt MSM tápoldat és a megfelelő MSA táptalaj összetételét a **2. táblázat** mutatja be.

4.2 MTBE-bontó konzorciumok mikrobiális összetételének meghatározása piroszekvenálással

Az előző lépésben izolált konzorciumok közül a GC-MS analitikai eredmények alapján leghatékonyabbnak bizonyult RL és SC jelű dúsítások MTBE-n nőtt tenyészeiből UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) felhasználásával genomi DNS-t tisztítottunk a gyártó utasításai szerint. Ezekről a templátokról a 16S rDNS szekvenciák amplifikálását, a kapott termékek piroszekvenálását ([147] alapján), valamint a nyers szekvencia adatok előzetes bioinformatikai feldolgozását (http://www.researchandtesting.com/docs/Archive/Data_Analysis_Methodology-01-26-2012.pdf szerint) a Research and Testing Laboratory (Lubbock, Texas, USA) végezte.

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
Vitamin oldat	1 ml
Agar (amennyiben szükséges)	15 g
Desztillált víz	1000 ml
pH 6,7	
Mikroelem oldat:	
FeSO ₄ *7H ₂ O	1,00 g
CoCl ₂ *6H ₂ O	1,00 g
MnSO ₄ *H ₂ O	1,00 g
ZnSO ₄ *7H ₂ O	1,00 g
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	1,00 g
Na ₂ WO ₄ *2H ₂ O	1,00 g
NiCl ₂ *6H ₂ O	0,25 g
H ₃ BO ₃	0,10 g
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,10 g
Desztillált víz	1000 ml
Vitamin oldat:	
Biotin	200 mg
Kalcium-pantotenát	50 mg
Nikotinsav	50 mg
p-amino-benzoesav	50 mg
Riboflavin	50 mg
Folsav	20 mg
Tiamin	15 mg
Cianokobalamin (B ₁₂ -vitamin)	1,5 mg
Desztillált víz	1000 ml

2. táblázat Az MSM tápoldat, illetve az MSA táptalaj összetétele.

4.3 MTBE-bontásra képes egyedi baktériumtörzsek izolálása az MTBE-bontó konzorciumokból

A GC-MS analitikai eredmények alapján hatékony MTBE-bontásra képes konzorciumok tenyésztéseiből hígítási sorokat készítettünk, majd egyedüli szénforrásként MTBE-t vagy TBA-t tartalmazó MSA lemezekre szélesztettük őket. A lemezeket 25 °C-on két hétig inkubáltuk. A megjelenő telepeket izoláltuk és 2-2 ml, 200 mg/l MTBE vagy TBA szénforrással kiegészített MSM tápoldatba oltottuk le őket ún. headspace (HS) (Chromacol 20-HSV T717) üvegekbe. A rendszereket két hétig inkubáltuk 25 °C-on 150

rpm-el rázatva. A számottevő optikai denzitásbeli (OD_{600}) növekedést mutató tenyészetek tisztaságát $\frac{1}{2} \times$ TSA és NA lemezekre történő szélesztéssel ellenőriztük, majd további ellenőrzésként egyedüli szénforrásként MTBE-t vagy TBA-t tartalmazó MSA lemezekre is kiszélesztettük, valamint 50 ml, 200 mg/l koncentrációban MTBE-t vagy TBA-t tartalmazó MSM tápoldatba is átoltottuk őket. Azokkal az izolátumokkal dolgoztunk tovább, amelyek a $\frac{1}{2} \times$ TSA és az NA szélesztések alapján is egyneműnek bizonyultak, valamint MSA táptalajon és MSM tápoldatban is felnőttek MTBE-n vagy TBA-n, mint egyedüli szénforrásokon. A TSA és az NA táptalajok, valamint a megfelelő TSB és NB tápoldatok összetételét a **3. és a 4. táblázat** tartalmazza.

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
Agar (amennyiben szükséges)	15 g
Desztillált víz	1000 ml

3. táblázat A TSB tápoldat, illetve a TSA táptalaj összetétele.

Pepton	5 g
Marhahús kivonat	3 g
Agar (amennyiben szükséges)	15 g
Desztillált víz	1000 ml

4. táblázat Az NB tápoldat, illetve az NA táptalaj összetétele.

4.4 Az izolált MTBE- vagy TBA-bontásra képes egyedi baktériumtörzsek azonosítása

A hatékony MTBE- vagy TBA-bontásra képes izolátumok azonosítását a 16S rRNS-t kódoló génjük (16S rDNS) szekvenciájának meghatározásával végeztük el. A 16S rDNS szekvenciák amplifikálásához az eubaktériumok körében univerzális EubA (1522R; 5'-AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA-3') és EubB (27F; 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') primereket használtuk [148]. Az 50 µl végtérfogatban összemért PCR reakciók templátjaként minden esetben 1-1, $\frac{1}{2} \times$ TSA lemezről izolált, 20 µl nukleázmentes vízben (AccuGENE™, Lonza) felvett egyedi kolónia sejtszuszpenziójának

1 µl-e szolgált. Az alkalmazott program az alábbi volt: 95 °C 5 min, majd 30 ciklus: 95 °C 20 s, 55 °C 10 s, 70 °C 40 s, végül 70 °C 5 min. A termékeket pJET1.2 vektorba (Fermentas) klónoztuk, majd *Escherichia coli* DH5α™ kémiai kompetens sejtekbe (Invitrogen) transzformáltuk a gyártó utasításai szerint. Az inszertet hordozó pozitív klónokból plazmid DNS-t tisztítottunk EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Kit (Bio Basic Canada Inc.) segítségével, majd az inszerteket mindkét irányból megszekvenáltattuk. A törzsek szekvencia homológia alapján történő azonosítása érdekében a kapott 16S rDNS szekvenciákat a SILVA nem redundáns rRNS gén szekvencia adatbázisával (<http://www.arb-silva.de>) [149] hasonlítottuk össze.

4.5 Az MTBE- és az ETBE-bontásban részt vevő ismert gének PCR-alapú kimutatási tesztjei a konzorciumokban és két egyedi izolátumban

Az MTBE-bontó konzorciumokból (5K, 5L, 8K, RL, SC) és két egyedi izolátumból (M28, T29) genomi DNS-t izoláltunk UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) felhasználásával. Ezt követően ezeken a templátokon az MTBE és az ETBE lebontási útvonalában azonosított gének kimutatását végeztük el PCR reakciók segítségével ([150] alapján). A vizsgált géneket, az alkalmazott primerek szekvenciáját, valamint a termékek várható méretét az **5. táblázat** tartalmazza.

4.6 A T29 jelű izolátum növekedési tesztjei különböző szubsztrátokon és szubsztrát keverékeken

A T29 jelű izolátum által egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítható vegyületek vizsgálatát 200 mg/l koncentrációban alkalmazott egyedi szubsztrátokkal MSM tápoldatban végeztük el. A rendszereket 28 °C-on, 2 hétig, 150 rpm-el rázatva inkubáltuk 3-3 párhuzamosban, HS üvegekben 2 ml térfogatban. A törzs növekedési képességét az adott szubsztráton a 600 nm-en mért optikai denzitás (OD₆₀₀) mérésével határoztuk meg az inkubációs idő végén. A vizsgálatokhoz MTBE-n előnövesztett sejteket használtunk, az egyes rendszerekbe annyi sejtet inokuláltunk, hogy a kiindulási OD₆₀₀ érték 0,03 legyen.

Az alábbi egyedi szubsztrátok vizsgálatára került sor: metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, formaldehid, aceton, hangyasav, 2-metilpropánsav (izobutirát), tejsav, piroszőlősav (Na-piruvát), ecetsav (Na-acetát), citromsav (Na-citrát), glükóz, glicerin, glicin, 2-HIBA, *n*-hexán, *n*-dodekán, *n*-hexadekán, ciklohexán, benzol, toluol, etilbenzol, *o*-xilol, *m*-xilol, *p*-xilol, fenol, naftalin, MTBE, ETBE, TAME, DIPE, tetrahydrofurán és TBA. Az üzemanyag-oxigenátok, az alifás és az aromás szénhidrogének esetében szubsztrát mixeken is elvégeztük a szubsztráthasznosítási teszteket a fentiekkel teljesen megegyező elrendezésben. Az üzemanyag-oxigenát keverék ("étermix") MTBE-t, ETBE-t, TAME-t, DIPE-t és TBA-t, az alifás szénhidrogén keverék ("n-alkánmix") *n*-pentánt, *n*-hexánt, *n*-oktánt, *n*-dekánt és *n*-dodekánt, az aromás szénhidrogén keverék ("BTEX mix") pedig benzolt, toluolt, etilbenzolt, *o*-xilolt, *m*-xilolt és *p*-xilolt tartalmazott. A szubsztrátmixek esetében az alkotó egyedi komponensek koncentrációja azonos volt a 2 ml végtérfogatban. Ez az érték az étermix és a *n*-alkánmix esetében 40-40 mg/l, a BTEX-mix esetében pedig 33,3-33,3 mg/l volt komponensenként.

Célgén (kódolt fehérje)	Primer pár	Szekvencia (5'-3')	Termék mérete (bp)	Referencia
<i>alkB</i> (alkán hidroxiláz)	Rhose2 Rhoas1	ACG GSC CAY TTC TAC RTC G CCG TAR TGY TCG AGR TAG	343	[116]
<i>ethB</i> (citokróom P450 monooxygenáz)	EthB-F2 EthB-R2	CAC GCG CTC GGC GAC TGG CAG ACG TTC AGT TCC GAC GCA CAT GTG CGG GCC GTA CCC GAA	881	[151]
<i>ethR</i> (<i>eth</i> génnek regulátora)	EthRfor EthRrev	ATG GGA ACG TCG ACG ACG AG CTA GGA GCG CAA GGT GTC CG	995	[152]
<i>icmB</i> (izobutiril-KoA mutáz B ₁₂ - vitaminkötő alegység)	ICMB-f ICMB-r	ATG GAC CAA ATC CCG ATC CGC TCA GCG GGC GCC GCG CGC GG	410	[118]
<i>mdpA</i> (MTBE monooxygenáz)	MdpA1F MdpA1R	CTT ACC GGG CTC AAC TAT GC CGC TTC CCT GGA TCG ATG TT	796	[152]
<i>mpdB</i> (alkohol dehidrogenáz)	MpdB-F MpdB-R1	ACG GTC TCG TCG GCA AAT AC GCA CAT CCC AGG TCT GAT	590	[117]
<i>mpdC</i> (aldehid dehidrogenáz)	MpdC-F2 MpdC-R2	GTC AAC CTG GAA CTC GGC GGG AAG AGC CCG TTG CAC CGC TGT GAC GGG CCC GAA GAT CTC CTC	437	[117]
<i>pdo/mdpJ</i> (ftalát-4,5-dioxigenáz)	PDO2-for PDO2-rev	TGT TGT CGT CGG TCG GGT GC CGT CGA CGG CAA ACT GCT GG	379	[123,134]
<i>piso/mdpK</i> (ftalát-4,5-dioxigenáz oxidoreduktáz alegység)	PISO3-for PISO3-rev	CAC CTG CGC GAT CGA CTT GT CGC TGA ACC TGC GGG TCC GG	767	[123]

5. táblázat Az MTBE- és az ETBE-bontás ismert génjeinek PCR-alapú kimutatása során alkalmazott primerek és néhány tulajdonságuk.

4.7 A T29 jelű izolátum MTBE-bontási sebességének összehasonlítása a *Methylibium petroleiphilum* PM1-ével

A *Methylibium petroleiphilum* PM1-et a BCCM-től (Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms; <http://bccm.belspo.be/>) szereztük be. A liofilizált formában érkezett tenyészetet MSM tápoldatban szuszpendáltuk föl, majd félórányi rehidratálást követően tisztaságának ellenőrzése céljából $\frac{1}{2} \times$ TSA táptalajra szélesztettük ki. A továbbiakban a törzs fenntartását a T29-ével megegyező módon végeztük.

A két törzs MTBE-bontási sebességének összehasonlításához a T29 és a PM1 MSM tápoldatban MTBE-n előnövesztett tenyészeiteiből a sejteket centrifugálással kiülepítettük, kétszer mostuk őket MSM tápoldattal, majd HS üvegekbe, MSM tápoldatba belőlük annyit inokuláltunk, hogy 2 ml végtérfogatban a kiindulási, 600 nm-en mért optikai denzitás érték 0,100 legyen. Az egyes rendszerekben 200 mg/l MTBE koncentrációt állítottunk be, majd 28 °C-on, 150 rpm-el rázatva inkubáltuk őket 6, 12, 18 és 24 órát. Mindkét törzs esetében mindegyik időpontban 3-3 párhuzamos minta levétele történt, melyek maradék MTBE koncentrációját HS-GC-MS mérésel határoztuk meg. Kontrollként sejteket nem tartalmazó abiotikus rendszereket használtunk, melyekben a kísérlet kezdetén szintén 200 mg/l MTBE koncentrációt állítottunk be, majd 0 és 24 óra inkubáció után ezekből is 3-3 párhuzamos mintát analizáltunk GC-MS mérésel.

4.8 Az MTBE lebontási útvonalában szereplő intermedierek azonosítása a T29 jelű izolátumban

A T29 jelű izolátum MTBE-n előnövesztett tenyészetéből a sejteket centrifugálással kiülepítettük, háromszor mostuk őket 20 mM foszfát pufferrel (7,8 mM NaH_2PO_4 , 12,2 mM Na_2HPO_4 , pH=7,0), majd HS üvegekbe, 20 mM foszfát pufferbe belőlük annyit inokuláltunk, hogy 2 ml végtérfogatban a 600 nm-en mért optikai denzitás érték 1,000 legyen. A rendszerekben 200 mg/l MTBE koncentrációt állítottunk be, majd 28 °C-on, 150 rpm-el rázatva inkubáltuk őket $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3 és 4 órát. Minden időpontban 2-2 párhuzamos mintát vettünk le, melyekben a lehetséges köztitermékeket GC-MS analízissel SCAN módban kerestük.

4.9 Az analitikai mérések módszertani leírása

4.9.1 Nagy koncentrációjú MTBE, ETBE, TAME, DIPE és TBA mennyiségi meghatározása

A headspace üvegekben lévő 2 ml mintákat lefagyasztottuk és az analízisek kezdetéig -20 °C-on tároltuk. A rendszerekhez nem adtunk belső standardot (ISTD), mivel külső standardos kalibrációt használtunk a meghatározáshoz. A fagyasztott mintákhoz 10 ml mátrixmódosító oldatot (MMS: 6,16 M NaCl; EPA Method 5021 alapján) pipettáztunk és az azonnali visszazárást követően a gázkromatográf mintatartójába helyeztük őket. Az automata mintaadagoló az üvegeket egyenként 20 percen át rázta 80 °C-on (CTC HS PAL), majd ezt követően vett a gázfázisból 250 µl mintát és a készülékbe (Agilent Technologies 6850 Network GC System) injektálta. A mintabeviteli port (inlet) 250 °C-os volt, a split arány 1:500. Az elválasztást DB-VRX (60 m × 0,250 mm × 1,4 µm) kolonnán végeztük a következő fűtésprogrammal: kezdő hőmérséklet 40 °C 3 percen át, 7 °C/min fűtési sebességgel fűtve 100 °C-ra és 100 °C-on tartva 0,43 percen át. A detektáláshoz Agilent Technologies 5975C VL MS detektort használtunk. A vivőgáz hélium volt (Linde, 6.0). A méréseket az EPA 8260B szabvánnyal összhangban végeztük. A mérés pontossága ±10% volt.

4.9.2 Az MTBE lebontás lehetséges intermediereinek analitikai vizsgálata

A headspace üvegekben lévő 2 ml mintákat lefagyasztottuk és az analízisek kezdetéig -20 °C-on tároltuk. A fagyasztott mintákhoz 10 ml mátrixmódosító oldatot (MMS: 6,16 M NaCl; EPA Method 5021 alapján) pipettáztunk és az azonnali visszazárást követően a gázkromatográf mintatartójába helyeztük őket. Az automata mintaadagoló az üvegeket egyenként 20 percen át rázta 98,5 °C-on (CTC Combi PAL), majd ezt követően vett a gázfázisból 1,5 ml mintát és a készülékbe (Agilent Technologies 6850 Network GC System) injektálta. A mintabeviteli port (inlet) 250 °C-os volt, splitless módban használva (split vent 20 ml/min, 0,05 percen át). Az elválasztást DB-VRX (60 m × 0,250 mm × 1,4 µm) kolonnán végeztük a következő fűtésprogrammal: kezdő hőmérséklet 40 °C 3 percen át, majd 7 °C/min fűtési sebességgel fűtve 120 °C-ra. A detektálást Agilent Technologies

5975C VL MS detektorral végeztük, melyet BFB tune módban használtunk, az MTBE elúciós ideje alatt off módban detektálva. A vivőgáz hélium volt (Linde, 6.0).

4.9.3 Nagy koncentrációjú *n*-alkánok és BTEX komponensek mennyiségi meghatározása

A headspace üvegekben lévő 2 ml mintákat lefagyasztottuk és az analízisek kezdetéig -20 °C-on tároltuk. A rendszerekhez nem adtunk belső standardot (ISTD), mivel külső standardos kalibrációt használtunk a meghatározáshoz. A fagyasztott mintákhoz 10 ml mátrixmódosító oldatot (MMS: 6,16 M NaCl (pH 2,0; foszforsavval); EPA Method 5021 alapján) pipettáztunk és az azonnali visszazárást követően a gázkromatográf mintatartójába helyeztük őket. Az automata mintaadagoló az üvegeket egyenként 20 percen át rázta 80 °C-on (CTC HS PAL), majd ezt követően vett a gázfázisból 250 µl mintát, és a készülékbe (Agilent Technologies 6850 Network GC System) injektálta. A mintabeviteli port (inlet) 250 °C-os volt, a split arány 1:200. Az elválasztást DB-VRX (60 m × 0,250 mm × 1,4 µm) kolonnán végeztük a következő fűtésprogrammal: kezdő hőmérséklet 40 °C 3 percen át, 7 °C/min fűtési sebességgel fűtve 240 °C-ra, majd 240 °C-on tartva 2,14 percen át. A detektálást Agilent Technologies 5975C VL MS detektorral végeztük. A vivőgáz hélium volt (Linde, 6.0). A mérés pontossága ±10% volt.

4.10 *Methylibium* izolátumok antibiotikum rezisztenciájának vizsgálata

Az M28, T29, T29-B és PM1-B jelű izolátumaink antibiotikum rezisztenciáját vizsgáltuk és hasonlítottuk össze a *Methylibium petroleiphilum* PM1-ével. $\frac{1}{2} \times$ TSB tápoldaton felnövesztett tenyészetekből 5-5 µl-t cseppentettünk pozitív kontrollként $\frac{1}{2} \times$ TSA lemezre, majd az alábbi antibiotikumokat a jelzett koncentrációkban tartalmazó $\frac{1}{2} \times$ TSA lemezekre: ampicillin (*Amp*) (50 és 100 µg/ml), apramicin (*Apr*) (25 és 50 µg/ml), kanamicin (*Km*) (25 és 50 µg/ml), kloramfenikol (*Cm*) (15 és 30 µg/ml), sztreptomycin (*Sm*) (12,5 és 25 µg/ml) és tetraciklin (*Tc*) (6,25 és 12,5 µg/ml). A lemezeket 28 °C-on 1 hétig inkubáltuk és ezután értékeltük az egyes törzsek esetében a rezisztencia mértékét az egyes antibiotikumokkal szemben.

4.11 *Methylibium* izolátumok higany rezisztenciájának vizsgálata

Az M28, T29, T29-B és PM1-B jelű izolátumaink higany rezisztenciáját vizsgáltuk és hasonlítottuk össze a *Methylibium petroleiphilum* PM1-ével. $\frac{1}{2} \times$ TSB tápoldaton felnevesztett tenyészetekből 20-20 μ l-t inokuláltunk pozitív kontrollként 2 ml $\frac{1}{2} \times$ TSB tápoldatba, majd HgCl₂-ot 12,5, 25, 50 és 100 mg/l koncentrációban tartalmazó 2-2 ml $\frac{1}{2} \times$ TSB tápoldatba. Mindegyik törzs esetében valamennyi HgCl₂ koncentráció hatását három párhuzamos rendszerben vizsgáltuk. A rendszereket 28 °C-on 150 rpm-el rázatva inkubáltuk 1 hétig és ezután értékeltük az egyes törzsek esetében a rezisztencia mértékét a HgCl₂-dal szemben a tenyészetek optikai denzitásának (OD₆₀₀) meghatározásán keresztül.

4.12 *Methylibium* izolátumok genomjának összehasonlítása pulzáló mezejű gélelektroforézis (PFGE) vizsgálattal

Az M28 és a T29 jelű izolátumokat, valamint a *Methylibium petroleiphilum* PM1-et $\frac{1}{2} \times$ TSA lemezeken növesztettük 1 hétig 28 °C-on. Mindegyik törzs esetében a lemezeken kiválasztottunk 1-1, körülbelül 1-2 mm átmérőjű telepet és 100 μ l 50 mM EDTA-ban felszuszpendáltuk azokat. Centrifugálással (9500 g, 3 perc) kiülepítettük a sejteket, majd visszavettük őket friss 100 μ l 50 mM EDTA-ba. A sejtszuszpenziókhoz azonos térfogatú, 50 mM EDTA-ban feloldott 2%-os koncentrációjú alacsony olvadáspontú (LMP) agarózt adtunk, majd öntőformába töltöttük és 30 percre 4 °C-ra helyeztük. A megszilárdult agaróz dugókat 1 ml lízis puffert (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM EDTA, 0,5% N-lauril-szarkozin, 0,5% SDS, 0,2% nátrium-dezoxikolát, 100 μ g/ml proteináz K, 20 μ g/ml RNáz A) tartalmazó 2 ml-es mikrocentrifuga csövekbe emeltük át és 24 órán át 55 °C-on inkubáltuk. Ezt követően a dugókat kétszer mostuk 30 percig 37 °C-on 1,5 ml inaktiváló pufferrel (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 1 mM PMSF) és további felhasználásig 0,5 M EDTA-ban (pH 8,0) 4 °C-on tároltuk. Használat előtt a dugókat ötször mostuk 1,5 ml TE pufferrel (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) 55 °C-on, alkalmanként 15-15 percig, majd körülbelül 5 mm \times 4 mm \times 1 mm nagyságú darabokra vágtuk fel őket steril pengével. Az így kapott gélkockákat 37 °C-on 30 percig inkubáltuk a későbbiekben használni kívánt restrikciós enzimek saját puffereinek 100 μ l-ében. Ezután 16 órán át, 37

°C-on, 100 µl friss pufferben inkubáltuk a kockákat immáron kiegészítve a megfelelő restrikciós enzimekkel (*AseI*, *BcuI*, *BspTI*, *HpaI*; 20 U, Fermentas). Az inkubációs idő letelte után a gélkockákat kétszer mostuk 500 µl $\frac{1}{2} \times$ TBE pufferrel (45 mM Tris-bázis, 45 mM H₃BO₃, 1 mM EDTA pH 8,0, 100 µM tiourea), majd a fésűre helyeztük és 15 percig száradni hagytuk őket. Ezután a fésűt, rajta a gélkockákkal 100 ml folyékony, 1,2%-os agaróz (SeaKem® LE) gélbe helyeztük és 1 órán át állni hagytuk, hogy megszilárduljon. Az agarózt előzetesen $\frac{1}{2} \times$ TBE pufferben oldottuk fel és etídium-bromidot nem adtunk hozzá. Miután megszilárdult, a gél 14 °C-ra előhűtött futtató pufferbe ($\frac{1}{2} \times$ TBE puffer 100 µM tioureával kiegészítve [153]) helyeztük és fél órát állni hagytuk benne, hogy ekvilibrálódjon. Az elektroforézishez CHEF Mapper® XA System (Bio-Rad) készüléket használtunk, a futtatás paraméterei pedig a következők voltak: 6 V/cm feszültség, 30-90 s pulzushossz, 120°-os orientációs szög és 24 óra futási idő. A futtatás után a gél 0,5 µg/ml koncentrációban etídium-bromidot tartalmazó desztillált vízben festettük meg 1 órán át. Az eredményt Infinity VX2 (Vilber Lourmat) típusú gél dokumentációs rendszer segítségével rögzítettük.

4.13 Plazmid detektálás és izolálás a *Methylibium* izolátumokból

A plazmidok kimutatását és méretének hozzávetőleges meghatározását S1 nukleáz kezelést követő PFGE analízissel, [154] alapján végeztük el. A vizsgálathoz az egyes *Methylibium* törzseket a lehető legszelektívebb növesztési körülményeket alkalmazva, MSM tápközegben szaporítottuk fel: a T29-et és a T29-B-t tetraciklin (12,5 µg/ml) jelenlétében MTBE-n, illetve TBA-n (200-200 mg/l), az M28-at és a PM1-et pedig MTBE-n (200-200 mg/l). A PM1-B-t egyedüli kivételként $\frac{1}{2} \times$ TSB tápoldatban növesztettük, mivel ez az izolátum nem nőtt egyik üzemanyag-oxigenáton sem. A kísérlet során a mintaelőkészítés, valamint az S1 nukleáz kezelést követő elektroforézis lépései és körülményei megegyeztek a 4.12 fejezetben foglaltakkal.

Plazmid izoláláshoz a T29 és a T29-B törzseket 100-100 ml MSM tápoldatban növesztettük elő az előzőekben ismertetett módon. A tenyészeteket centrifugálással kiülepítettük (17600 g, 10 perc), ezt követően ([155] szerint) a sejteket 1-1 ml GTE pufferben (50 mM glükóz, 10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0) felszuszpendáltuk, majd 2-2 ml lízis oldatot (0,2 M NaOH, 1% SDS) adtunk a rendszerekhez és alapos homogenizálás után szobahőmérsékleten 5 percig inkubáltuk őket. Ezt követően 1,5 ml 7,5

M ammónium-acetát oldatot és 1,5 ml kloroformot mértünk a lizátumhoz, alapos homogenizálást követően 10 percig jégen inkubáltuk, majd centrifugáltuk (9000 g, 10 perc). A felülúszókhöz 2,4-2,4 ml kicsapó oldatot (30% polietilén glikol 6000, 1,5 M NaCl) pipettáztunk, alapos homogenizálás után 10 percig jégen inkubáltuk, majd centrifugáltuk (9000 g, 10 perc). A felülúszók eltávolítása után a DNS pelletet 1-1 ml 75%-os etanollal mostuk, steril fülkében megszárítottuk, végül pedig 300-300 µl nukleázmentes vízben (AccuGENE™, Lonza) feloldottuk. Ezt követően RNáz A-val (Sigma) és PlasmidSafe™ ATP-függő DNáz-zal (Epicentre) kezeltük a mintákat a gyártók utasításai szerint. Az enzimkezelések után a rendszereket fenol és kloroform 1:1 arányú elegyével extraháltuk, a DNS-t izopropanollal kicsaptuk, 70%-os etanollal mostuk, majd 50-50 µl TE pufferben (1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) visszaoldottuk.

4.14 A T29 és a T29-B törzsek *de novo* genomszekvenálása, illetve a pT29A és pT29B jelű plazmidok *de novo* szekvenálása

Genomi DNS-t MSM tápoldatban 200 mg/l MTBE (T29), illetve TBA (T29-B) szénforrásokon növesztett tenyészetekből UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) felhasználásával tisztítottunk a gyártó utasításai szerint. A kinyert DNS mennyiségét Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen) segítségével határoztuk meg. A tenyészetek tisztaságát $\frac{1}{2} \times$ TSA lemezekre történő szélesztéssel ellenőriztük. Átlagosan 10-20 µg DNS-t sikerült tisztítani, melyből 1 µg-ot használtunk fel a genomi könyvtár készítéséhez. A genomi könyvtárat IonXpress Plus Fragment Library Kit (Life Technologies) felhasználásával készítettük el, minőségét Agilent Bioanalyzer készülékkel ellenőriztük. Az emulziós PCR-t Ion PGM Template OT2 200 Kit (Life Technologies) felhasználásával Ion OneTouch™ v2 készülékkel végeztük, majd egy dúsítási lépés után a genomi könyvtárat hordozó gyöngyöket Ion 316™ v2 Chip-re töltöttük fel és Ion PGM™ 200 Sequencing Kit v2 (Life Technologies) segítségével egy Ion PGM™ Sequencer készüléken végeztük a szekvenálást. A nyers adatokat a Torrent Serveren futó Torrent Suite 4.0.1 segítségével dolgoztuk fel, amely a beépített minőségi szűrő segítségével szükség esetén a szekvenciák végéről levágta a nem megbízható részeket. A kontigok *de novo* összeépítését a GS De Novo Assembler 2.9 (454 Life Sciences, Roche) szoftver

végezte, ezután sorba rendezésük a Mauve programmal [156] történt a *Methylibium petroleiphilum* PM1 kromoszómáját és megaplazmidját használva referenciaként. A sorba rendezett kontigok összehasonlítása a PM1-ével a MUMmer 3.0 szoftver [157] segítségével történt, az eltérések ábrázolását a program mummerplot nevű szkriptje végezte. Az összerendezett szekvenciák annotálásához a Prokka 1.8 (Prokka: Prokaryotic Genome Annotation System; <http://vicbioinformatics.com/>) programot [158] használtuk.

A 4.13 fejezetben foglaltak szerint izolált és kezelt plazmid preparátumok szekvenálását és a kapott adatok bioinformatikai feldolgozását alapvetően a teljes genomokéval megegyező módon hajtottuk végre. Esetükben azonban a szekvenciárészletek összeépítését a SPAdes 3.0 [159] program végezte, az annotálás itt is Prokka 1.8 szoftverrel történt.

4.15 A T29 jelű izolátum transzformációs hatékonyságának összehasonlítása a *Methylibium petroleiphilum* PM1-ével kétféle protokoll szerint

A T29 és a PM1 jelű törzseket 60-60 ml $\frac{1}{2} \times$ TSB tápoldatban, 28 °C-on, 150 rpm-el rázatva növesztettük a korai logaritmusos fázisnak megfelelő optikai denzitás értékek eléréséig ($OD_{600}=0,140-0,160$). Ezt követően mindkét tenyészetet két egyenlő részre osztottuk a kétféle transzformációs protokoll kivitelezéséhez.

Az első módszer esetében ([160] alapján) a 30 ml tenyészeteket szobahőmérsékleten lecentrifugáltuk (17600 g, 10 perc), a kiülepedett sejteket háromszor mostuk 1-1 ml szobahőmérsékletű 300 mM szacharóz oldattal, majd 300 mM szacharóz oldatban reszuszpendáltuk őket (120 μ l végtérfogat).

A másik eljárás esetében ([136] módosításával) a 30 ml tenyészeteket 30 percig jégen inkubáltuk, majd 4 °C-ra hűtött centrifugában kiülepítettük a sejteket (17600 g, 10 perc), háromszor mostuk őket 1-1 ml jéghideg 10%-os glicerinnel, majd jéghideg 10%-os glicerinnel oldatban reszuszpendáltuk őket (120 μ l végtérfogat).

A 120 μ l sejtszuszpenziókat mindkét módszer esetében 40 μ l-es térfogatokra osztottuk szét, 50-50 ng pBBR1MCS2 [161] vektort mértünk hozzájuk, majd 2 mm-es részméretű elektroporációs küvettákba (Bio-Rad) pipettáztuk őket (a 10% glicerinnel történő módszer esetében 0 °C-ra hűtött küvettákat alkalmaztunk), majd BTX Electro Cell Manipulator 600

típusú elektroporátor készülékben 1,8 kV feszültség, 186 Ω ellenállás és 25 μ F kapacitás mellett transzformáltunk. Ezután a sejteket 1-1 ml $\frac{1}{2} \times$ TSB tápoldatban reszuszpendáltuk, 150 rpm-el rázatva 28 °C-on 1 órát inkubáltuk, majd 50 μ g/ml koncentrációban kanamicint tartalmazó $\frac{1}{2} \times$ TSA lemezekre szélesztettünk a T29 tenyészetéből 1 és 5, a PM1 tenyészetéből pedig 100 és 500 μ l-eket. A lemezeket 10 napig 28 °C-on inkubáltuk, a kinőtt rezisztens telepeket összeszámoltuk és a transzformációs hatékonyság értékeit meghatároztuk.

4.16 MTBE-bontásra képtelen inszerciós *mdpA* knockout mutáns vonalak előállítása a T29 jelű izolátumból

A knockout (KO) konstrukciók létrehozásához a T29 jelű izolátum *mdpA* génjének 529, illetve 784 bp hosszúságú darabját hibajavító KOD Hot Start DNS polimeráz (TOYOBO) segítségével amplifikáltuk. A 10 μ l végtérfogatú reakcióelegyek összetétele a következő volt: 1 \times KOD Hot Start DNS polimeráz puffer, 1,5 mM MgSO₄, 0,2 mM dNTP, 10% DMSO, 10 ng genomi DNS templát, 0,05 U/ μ l KOD Hot Start DNS polimeráz, 0,6-0,6 μ M MO31 primer (5'-CAC GGT GCC TGT TCA CTA TCT CG-3') és MO32 primer (5'-CGC GAT CAC GAG GAA CCA GTA G-3') az 529 bp méretű, illetve MO31 és MO33 (5'-CCG ATA CAG AGG CGG AAC ATG AC-3') primer a 784 bp méretű géndarab amplifikálásához. Az alkalmazott program az alábbi volt: 95 °C 2 min, majd 35 ciklus: 95 °C 20 s, 61 °C 10 s, 70 °C 40 s. A termékeket 1%-os agaróz gélen választottuk el, a megfelelő méretű fragmenteket EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kittel (Bio Basic Canada Inc.) tisztítottuk, majd *HincII* enzimmal linearizált pSm18 vektorba ligáltuk. A klónozás eredményét teszt PCR-rel és restrikciós emésztéssel ellenőriztük, a helyes klónokat megszekvenáltattuk. A KO konstrukciókat (pSm18-*mdpA*529 és pSm18-*mdpA*784) a T29 jelű izolátum kompetens sejtjeibe elektroporációval juttattuk be ([160] alapján). A spontán rezisztenciát szerzett klónoktól a beépülést hordozókat teszt PCR-rel válogattuk szét, amelyben egy vektorspecifikus (M13F(-62) [5'-GAT TAA GTT GGG TAA CGC CAG GGT T-3'] vagy M13R(-73) [5'-TCC GGC TCG TAT GTT GTG TGG AAT-3']) és egy *mdpA*-specifikus primert (MO29: 5'-CCG CCA GAT CGT CAT CCA CAA AG-3') használtunk. A reakciók körülményei megegyeztek a fentiekkel.

4.17 Az *mdpA* knockout mutáns T29 vonalak növekedésének vizsgálata MTBE-n, TAME-n, TBA-n és 2-HIBA-n

A növekedési tesztekhez a T29 jelű törzs *mdpA* knockout mutáns vonalainak 25 µg/ml sztreptomocinnal kiegészített $\frac{1}{2} \times$ TSA lemezekon ($\frac{1}{2} \times$ TSA_{Sm}) felnőtt szélesztéseiről 3-3 telepet izoláltunk, majd $\frac{1}{2} \times$ TSB tápoldatban 25 µg/ml sztreptomycin mellett ($\frac{1}{2} \times$ TSB_{Sm}) felnövesztettük őket. Kontrollként a vad típusú T29 jelű izolátum $\frac{1}{2} \times$ TSB tápoldatban felnövesztett három, $\frac{1}{2} \times$ TSA lemezzről izolált egyedi telepe, valamint a vad típusú törzs pSm18-*mdpA*529 jelű konstrukcióval történő transzformálása során kapott sztreptomycin rezisztens, de a PCR tesztek eredményei alapján intakt *mdpA* gént hordozó illegitim rekombináns vonal $\frac{1}{2} \times$ TSB_{Sm} tápoldatban felnövesztett három, $\frac{1}{2} \times$ TSA_{Sm} lemezzről izolált egyedi telepe szolgált. Mindegyik tenyészetből 10-10 ml-t lecentrifugáltunk (9000 g, 2 min), a kiülepedett sejteket háromszor mostuk 1-1 ml MSM tápoldattal, végül 2-2 ml MSM tápoldatban reszuszpendáltuk őket. Ezekből a sejtszuspenziókból minden esetben annyit inokuláltunk HS üvegekbe, hogy azokban 2 ml végtérfogatban a kiindulási OD₆₀₀ érték 0,100 legyen. Valamennyi vizsgált szubsztrát (MTBE, TAME, TBA, 2-HIBA) MSM tápoldatban előzetesen elkészített 2 g/l koncentrációjú törzsoldatából az egyes üvegekbe 200-200 µl-t mértünk be (200 mg/l végkoncentráció), majd MSM tápoldattal 2 ml-re egészítettük ki a térfogatot és 25 µg/ml koncentrációban sztreptomocint adtunk a rendszerekhez. Minden szubsztrát esetében 3-3, sejteket nem tartalmazó abiotikus kontroll rendszert is összeállítottunk. A rendszereket 14 napig inkubáltuk 28 °C-on, 150 rpm-el rázatva. Az inkubációs idő letelte után a maradék szubsztrátok mennyiségét az MTBE, a TAME és a TBA esetében GC-MS analitikával határoztuk meg. A 2-HIBA vonatkozásában a növekedési képességet az optikai denzitás (OD₆₀₀) változásának meghatározásán keresztül követtük nyomon.

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

5.1 MTBE-bontó konzorciumok izolálása talajvízmintákból és mikrobiális összetételük meghatározása

A 19 különböző földrajzi helyről származó talajvízminták felhasználásával összesen öt, hatékony MTBE-bontásra képes bakteriális konzorciumot sikerült izolálnunk, melyeket az 5K, 5L, 8K, RL és SC jelöléssel láttunk el. Közülük is az optikai denzitás értékek (OD_{600}) és a GC-MS analitikai eredmények alapján (*nem bemutatott adatok*) a legintenzívebb növekedést és a leghatékonyabb MTBE-degradációt (100% szubsztrátfogyás az inkubációs idő végére) az RL jelű konzorcium esetében figyeltük meg. Valamennyi konzorcium képes volt továbbá TBA-n és TAME-n is, mint egyedüli szén- és energiaforrásokon növekedni, az SC konzorcium pedig ezeken túlmenően hatékony ETBE-bontónak is bizonyult. A bontóképes konzorciumok mindegyike Tiszaújváros és Zalaegerszeg térségéből származó talajvízmintákból történő dúsítással lett izolálva.

Az öt konzorcium közül mikrobiális összetétel vizsgálatra az RL és az SC jelűeket választottuk ki, mivel az RL konzorcium mind közül kimagaslóan a leggyorsabb MTBE degradációra volt képes, az SC jelű pedig valamennyi vizsgált üzemanyag-oxigenátot hasznosítani tudta egyedüli szén- és energiaforrásként.

A piroszekvenálás eredményei nyomán az RL konzorciumban 37, az SC-ben pedig összesen 31 baktérium nemzetséget azonosítottunk. Mindkét konzorciumban a domináns törzs (*phylum*) a *Proteobacteria* volt, amely az RL konzorcium esetében a nemzetségek 64,9, az SC esetében pedig 58,1%-át foglalta magába. A *Proteobacteria* törzsön belül az *Alphaproteobacteria* volt a leggyakoribb osztály mindkét rendszerben, ahová az RL konzorcium nemzetségeinek 40,5, míg az SC nemzetségeinek 25,8%-a tartozott. Jelentős volt még a *Bacteroidetes* törzs részaránya is, amely az RL konzorcium esetében az azonosított nemzetségek 10,8, az SC esetében pedig a 19,4%-át tömörítette. Az *Actinobacteria* törzs és osztály az RL konzorciumban a nemzetségek 13,5%-ával a harmadik legnépesebb volt. A kimutatott nemzetségek törzsek és osztályok szerinti százalékos megoszlását a két konzorciumban a **7. táblázat** mutatja be.

Az RL konzorcium 37 nemzetségéből 14, az SC 31 nemzetségéből pedig 7 aránya haladta meg az 1%-ot. Az 1%-os részarányt meghaladó nemzetségek az RL konzorcium

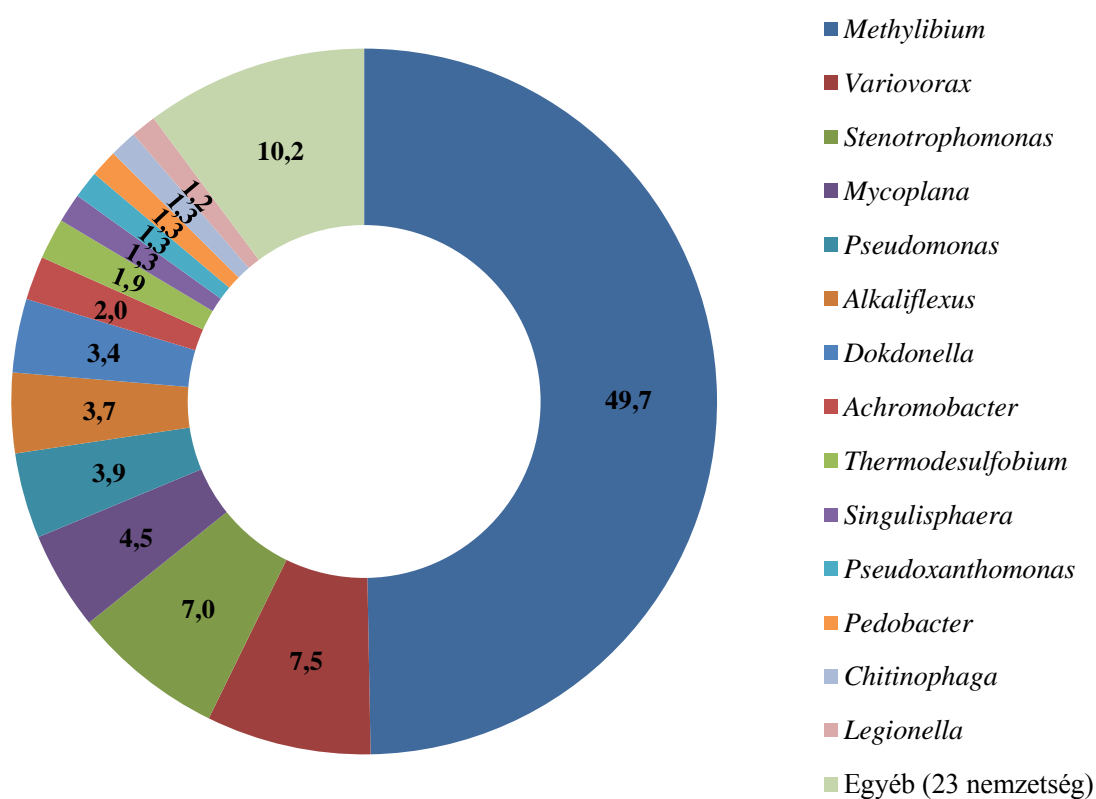
esetében az összes mikrobák 89,8%-át tették ki, míg az SC konzorciumnál ez az érték 95,9% volt. Az RL és az SC konzorciumok esetében ezeket a dominánsnak tekintett nemzetségeket az **5.**, illetve a **6. ábra** mutatja be.

Az ismert MTBE-bontó törzset vagy törzseket tartalmazó, 1%-os részarányt meghaladó nemzetségek közül a *Methylibium* (49,7% [RL], ill. 29,9% [SC]) megtalálható volt mindkét konzorciumban, míg a *Variovorax* (7,5%), a *Pseudomonas* (3,9%), az *Achromobacter* (2,0%) és a *Pseudoxanthomonas* (1,3%) nemzetségek csak az RL, a *Hydrogenophaga* (2,3%) pedig csak az SC konzorciumból volt kimutatható. Az ismert TBA-bontó fajokat tartalmazó nemzetségek közül egyedül a *Hydrogenophaga* (2,3%) volt jelen az SC konzorciumban. Az irodalomban leírt ETBE-bontók közül egyik sem volt kimutatható az SC konzorciumból.

Törzs	Osztály	Konzorcium	
		RL	SC
<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteria</i>	2,7% (1)	3,2% (1)
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	13,5% (5)	3,2% (1)
<i>Armatimonadetes</i>	-	-	3,2% (1)
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	2,7% (1)	6,5% (2)
	<i>Cytophagia</i>	-	3,2% (1)
	<i>Flavobacteriia</i>	2,7% (1)	6,5% (2)
	<i>Sphingobacteriia</i>	5,4% (2)	3,2% (1)
<i>Chloroflexi</i>	<i>Chloroflexi</i>	-	3,2% (1)
<i>Fibrobacteres</i>	<i>Fibrobacteria</i>	-	3,2% (1)
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	2,7% (1)	-
<i>Gemmatimonadetes</i>	<i>Gemmatimonadetes</i>	2,7% (1)	3,2% (1)
<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomycetia</i>	2,7% (1)	-
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	40,5% (15)	25,8% (8)
	<i>Betaproteobacteria</i>	8,1% (3)	16,1% (5)
	<i>Gammaproteobacteria</i>	16,2% (6)	6,5% (2)
	<i>Deltaproteobacteria</i>	-	6,5% (2)
	<i>Epsilonproteobacteria</i>	-	3,2% (1)
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Opitutae</i>	-	3,2% (1)

7. táblázat Az azonosított baktérium nemzetségek százalékos megoszlása törzs és osztály szinten a két vizsgált konzorciumban a piroszekvenálási eredmények alapján (zárójelben az adott osztályhoz tartozó nemzetségek száma van feltüntetve az egyes konzorciumokban).

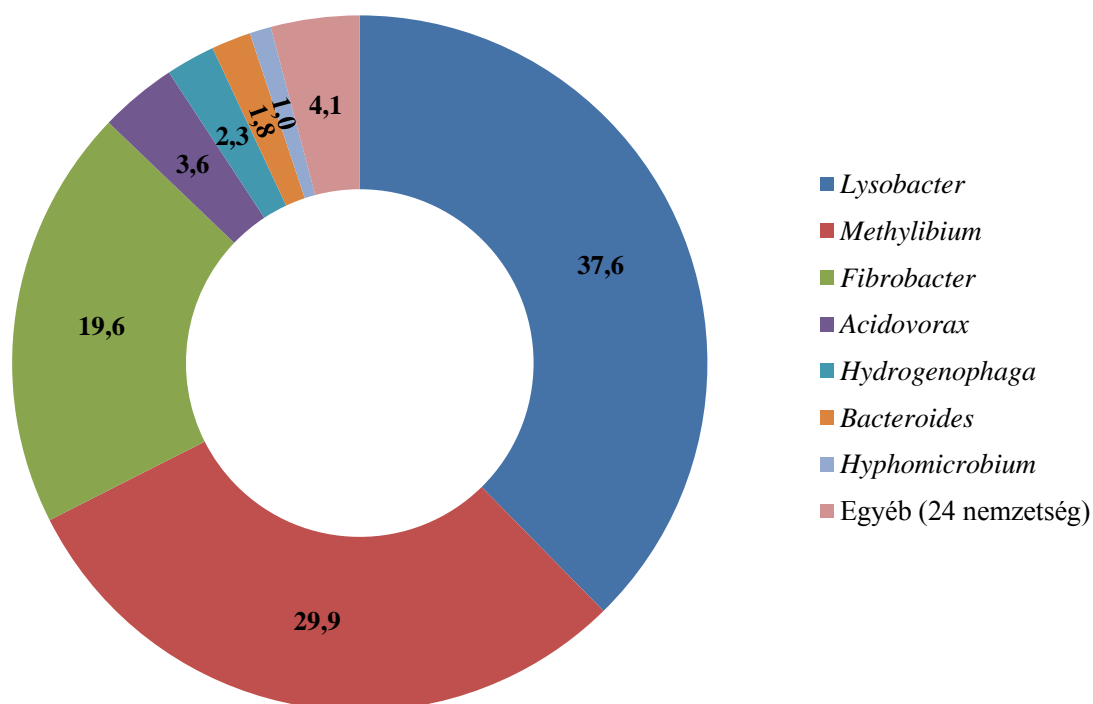
Kiemelkedő a *Methylibium* nemzetség részaránya a konzorciumokban, hiszen az RL konzorciumban csaknem 50%, az SC-ben pedig közel 30% a részesedése, ami alapján az RL konzorciumnak magasán a leggyakoribb, míg az SC-nek a második leggyakoribb nemzetségét alkotja. Az irodalmi adatok ismeretében mindezek alapján valószínűsíthető, hogy a *Methylibium* törzseknek mindkét rendszerben döntő szerepük van a hatékony MTBE-bontásban. További potenciálisan MTBE-bontó nemzetségek tagjai ugyan megtalálhatóak mindkét konzorciumban, azonban részarányuk a *Variovorax* nemzetség (RL) kivételével olyannyira alacsony, hogy az MTBE-bontásban való részvételük nem tekinthető jelentősnek.



5. ábra Az 1%-os részarányt meghaladó baktérium nemzetségek százalékos megoszlása az RL konzorciumban.

A *Lysobacter* nemzetségbe [162], amely az SC konzorcium domináns nemzetségének bizonyult, aerob, Gram-negatív fajok tartoznak, melyek szerves anyagban és mikrobákban gazdag élőhelyeken, jellemzően a talajban és édesvizekben fordulnak elő, és kemoorganotróf életmódot folytatnak. Az ide tartozó fajok közös ismertetőjegye, hogy hidrolitikus exoenzimeket termelnek, melyek révén nemcsak más baktériumok, hanem

cianobaktériumok, algák, fonalas gombák, sőt egyes törzsek fonálférgek lizálására is képesek. A nemzetségnek mindeztáig nem ismert olyan törzse, amely valamelyik éter típusú üzemanyag-adalék hasznosítására képes volna. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a *Lysobacter* törzsek az SC konzorciumban nem vesznek részt az MTBE lebontásában, hanem vélhetően az MTBE lebontása során keletkező egyszerűbb intermediereket és/vagy az elpusztult sejtek anyagait hasznosítják, vagy exoenzimeikkel élő sejteket támadnak meg. Közel 20%-os részarányával a *Fibrobacter* nemzetség [163] jelenléte is számottevő az SC konzorciumban, annak ellenére, hogy a nemzetséghez tartozó ismert fajok anaerob környezetből, elsődlegesen az emlősök, mindenekelőtt a kérődzők emésztő szervrendszerének különböző szakaszaiból lettek elkülönítve. Azonban több 16S rDNS szekvencia lelhető fel különböző nukleinsav adatbázisokban, amelyek a legközelebbi rokonságot a *Fibrobacter* nemzetséggel mutatják, de eredetileg talajból vagy valamilyen vízi élőhelyről származnak. Jelenlétük tehát ebből a szempontból ugyan magyarázható, azonban szigorúan anaerob életmódjuk oldaláról nézve meglehetősen szokatlan.



6. ábra Az 1%-os részarányt meghaladó baktérium nemzetségek százalékos megoszlása az SC konzorciumban.

Nem a *Fibrobacter* az egyetlen anaerob nemzetség a konzorciumokban, hiszen az RL konzorciumban az *Alkaliflexus* és a *Thermodesulfobium*, az SC-ben pedig a *Bacteroides* nemzetség előfordulása is kimutatható volt számottevő mennyiségben. Mindkét konzorcium esetében megfigyelhető volt az a jelenség, hogy a sejtek egy része szabad szemmel is jól látható, makroszkopikus, esetenként néhány mm átmérőjű aggregátumokat képzett, vagy az üveg falán kitapadva, helyenként bevonatot hozott létre. Ezekben a képződményekben jó eséllyel alakulhattak ki olyan oxigén-limitált vagy teljesen oxigénmentes mikrokörnyezetek, amelyekben az anaerob mikrobák életfeltételei adottak voltak. Az *Alkaliflexus* nemzetségről továbbá leírták, hogy kis vagy közepes mértékben képes tolerálni az oxigén jelenlétét is [164]. A *Bacteroides* nemzetség tagjai a *Fibrobacter*éhoz hasonlóan az emlősök gasztrointesztinális rendszeréből ismertek [165]. Ugyanakkor sekély, BTEX vegyületekkel és MTBE-vel szennyezett talajvíz zónából számos baktérium taxont azonosítottak, amelyek a legközelebbi rokonságot a *Bacteroidetes* törzshöz, illetve a *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes* csoporthoz tartozó nem tenyésztett izolátumokkal mutatták [166]. Korábban hasonló megfigyelést tettek aerob MTBE-bontó bioreaktorok mikrobiális összetételének vizsgálatakor is, amikor a *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* törzshöz tartozó, szintén nem tenyésztett izolátumokat sikerült nagy gyakorisággal kimutatni a vizsgált rendszerekből [167].

Az egyetlen aerob MTBE-bontó konzorcium esetében, amelyet mikrobiális összetétel és aktivitás szempontjából, multidiszciplináris eszközökkel részletesen vizsgáltak, meglepően hasonló eredményeket kaptak, mint a mi rendszereinknél [168]. Az US3-M jelű konzorciumot, egy, az Egyesült Államokból származó, üzemanyaggal szennyezett talajvízmintából MTBE-n, mint egyedüli szén- és energiaforráson történő dúsítással izolálták. A konzorciumban azonosított 26 baktérium taxon (OTU) 66,3%-a a *Proteobacteria* törzshöz (*phylum*) tartozott, melyből 36,6% volt a *Betaproteobacteria*, és 20,3% az *Alphaproteobacteria* osztály részesedése. A domináns törzs tehát itt is a *Proteobacteria* volt, nagyon hasonló - az RL-ével szinte megegyező - részaránnyal, mint a mi konzorciumaink esetében. Az osztályok tekintetében viszont a mi rendszereinkben az *Alphaproteobacteria* volt a legnépesebb, a *Betaproteobacteria* az SC esetében (16,1%) a második, az RL-nél (8,1%) viszont csak a negyedik legnépesebb rendszertani kategória volt. A *Bacteroidetes* (10,8%) és az *Actinobacteria* (9,5%) törzsek részaránya szintén nagyfokú hasonlóságot mutat az RL konzorcium esetében tapasztalt gyakoriság értékekkel (10,8, ill. 13,5%). Az US3-M-ben a domináns taxon (19%) a legközelebbi rokonságot a *Methylibium petroleiphilum* PM1-gyel mutatta, melyről stabil izotópos vizsgálatokkal

(CSIA és fehérje-SIP) igazolták is, hogy a konzorcium MTBE-bontó kapacitásáért csaknem kizárólagosan felelős.

Eredményeinket összevetve a rendelkezésre álló irodalmi adatokkal elmondható tehát, hogy MTBE-vel szennyezett közegekből dúsítással izolált bontóképes konzorciumokban a *Proteobacteria* törzshöz tartozó fajok túlsúlya figyelhető meg. Az a tény pedig, hogy az Egyesült Államokban ugyanúgy *Methylibium* nemzetséghez tartozó izolátum a domináns törzs egy MTBE-vel szennyezett közegben, mint hazánkban, arra enged következtetni, hogy a nemzetségnek döntő szerepe lehet, jelenlegi ismereteink szerint Észak-Amerikában és Európában, de vélhetően ennél szélesebb körben is, a környezetbe kikerülő MTBE természetes koncentráció-csökkenésében.

5.2 MTBE/TBA-bontásra képes egyedi baktériumtörzsek izolálása az MTBE-bontó konzorciumokból

Az egyes konzorciumok MSM tápoldatban egyedüli szén- és energiaforrásként MTBE-n nőtt tenyészeiteiből hígítási sorokat készítettünk, majd egyedüli szén- és energiaforrásként MTBE-t vagy TBA-t tartalmazó MSA lemezekre szélesztettük őket, amelyekről kétheti inkubáció után összesen 99 telepet sikerült izolálnunk. A 99 izolátum közül 14 mutatott számottevő növekedést ($OD_{600} > 0,150$), illetve MTBE/TBA biodegradációt ($> 50\%$ szubsztrátfogyás) folyadék tenyészetben. Közülük a TSA és az NA táptalajokra végzett szélesztések alapján 6 bizonyult tiszta, egyedi törzsnek, melyeket az alábbi jelölésekkel láttunk el: M2, M6, M15, M28, M48 és T29. Az M2, M6, M15, M28 és M48 jelűeket MTBE, a T29 jelűt pedig TBA szénforrásról különítettük el.

Az izolátumok azonosítása a 16S rDNS szekvenciájuk meghatározása révén történt. A törzsek rendszertani kategóriába történő besorolásához a 16S rRNS génjeik nukleotid szekvenciáját a SILVA nem redundáns rRNS gén szekvencia adatbázisával hasonlítottuk össze. Ez alapján valamennyi törzsünk a *Methylibium* nemzetségbe tartozónak bizonyult és a legközelebbi rokonságot a *Methylibium petroleiphilum* PM1-gyel mutatta. A szekvencia homológia mértéke alapján a hat izolátumot két csoportba tudtuk sorolni. Az M2, M15 és T29 jelű törzsek 16S rDNS szekvenciája 100%-os egyezést mutatott a PM1-ével (GenBank azonosító: AF176594), míg a másik három törzs (M6, M28, M48) esetében 1 nukleotid eltérést tapasztaltunk (C-T csere a 444-es pozícióban). A két csoportba tartozó izolátumok

különböző konzorciumokból lettek izolálva: az M2, M15 és T29 jelűek az RL konzorciumból, míg az M6, M28 és M48 jelűek a 8K jelű dúsításból.

A következőkben elvégeztük az ismert, MTBE-, ETBE- és TBA-bontásban részt vevő enzimek génjeinek PCR-alapú kimutatási tesztjét valamennyi konzorciumban, illetve a két izolátum-csoport egy-egy tagján (M28 és T29). Ily módon számos gén jelenlétét sikerült igazolnunk az 5K, 5L, 8K és SC konzorciumok, valamint az M28 jelű izolátum esetében, azonban az RL konzorcium és az abból elkülönített T29 jelű törzs esetében egyik vizsgált gén esetében sem kaptunk pozitív reakciót (**8. táblázat**).

Az ETBE-bontás kapcsán vizsgált gének közül az *ethB* jelenlétét sikerült kimutatnunk az SC konzorciumban. Ez az eredmény egybevág azzal a korábbi megfigyeléssel, miszerint a konzorciumaink közül kizárólag az SC volt képes ETBE-bontásra. Az *eth* operon transzkripció szabályozásáért felelős *ethR* gén hiánya arra utal, hogy az ETBE-bontó aktivitás konstitutívan expresszálódik a konzorciumban, ahogyan azt korábban az *Aquicola tertiaricarbonis* L108 esetében bemutattuk [122].

Az RL konzorcium és a T29 jelű izolátum kivételével valamennyi rendszerben kimutatható volt az MTBE monooxygenázt (MdpA), a TBA monooxygenáz két alegységét (MdpJ, MdpK), valamint a 2-HIBA átalakítását végző mutáz B₁₂-vitamint kötő alegységét (IcmB) kódoló gének jelenléte.

Konzorcium/ egyedi izolátum \ Gén	<i>alkB</i>	<i>ethB</i>	<i>ethR</i>	<i>icmB</i>	<i>mdpA</i>	<i>mpdB</i>	<i>mpdC</i>	<i>pdo/ mdpJ</i>	<i>piso/ mdpK</i>
5K	-	-	-	+	+	+	-	+	+
5L	-	-	-	+	+	+	-	+	+
8K	-	-	-	+	+	+	-	+	+
RL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC	-	+	-	+	+	-	-	+	+
M28	-	-	-	+	+	+	-	+	+
T29	-	-	-	-	-	-	-	-	-

8. táblázat Az ismert, MTBE-, ETBE- és TBA-bontásban részt vevő enzimek génjeinek PCR-alapú kimutatási tesztjének eredményei az öt konzorcium és két egyedi izolátum (M28 és T29) esetében.

Az eredetileg a *Mycobacterium austroafricanum* IFP2012-ben leírt [117], az MPD két lépésben lejátszódó, 2-HIBA-vá történő átalakítását katalizáló gének közül az alkohol dehidrogenáz aktivitású MpdB (*mpdB*) jelenlétét sikerült kimutatnunk az 5K, 5L és a 8K konzorciumokban, valamint az M28 jelű izolátumban is. Érdekes módon azonban az MpdB által katalizált reakció termékét továbbalakító, aldehid dehidrogenáz aktivitású MpdC (*mpdC*) esetében egyetlen mintában sem kaptunk pozitív reakciót. Hozzá hasonlóan az *alkB* gént sem tudtuk detektálni egyik konzorciumban és egyedi izolátumban sem.

Konzorciumainkat a kimutatott gének, valamint a korábbiakban részben már bemutatott degradációs spektrumok és kapacitások figyelembe vételével három csoportba sorolhatjuk. Az 5K, 5L és 8K jelű dúsítások, valamint a 8K-ból izolált M28 jelű törzs a detektált gének szempontjából teljesen megegyező profilt mutatnak. Degradációs spektrumuk megegyezik az RL-ével, illetve a T29-ével, degradációs sebességük azonban elmarad azokétól. Az SC konzorcium nemcsak degradációs spektrumával, hanem ebből adódóan egyedi génkészletével is eltért valamennyi vizsgált konzorciumtól. Az RL konzorcium szintén egyedinek bizonyult, hiszen egyik vizsgált gén sem volt kimutatható belőle, ami igaz a T29 jelű törzsrre is. Mindezek miatt, valamint mivel előzetes tesztjeink alapján valamennyi egyedi izolátumunk közül a T29 bizonyult a leghatékonyabb MTBE-bontónak, ezt választottuk ki további, részletesebb vizsgálatokra.

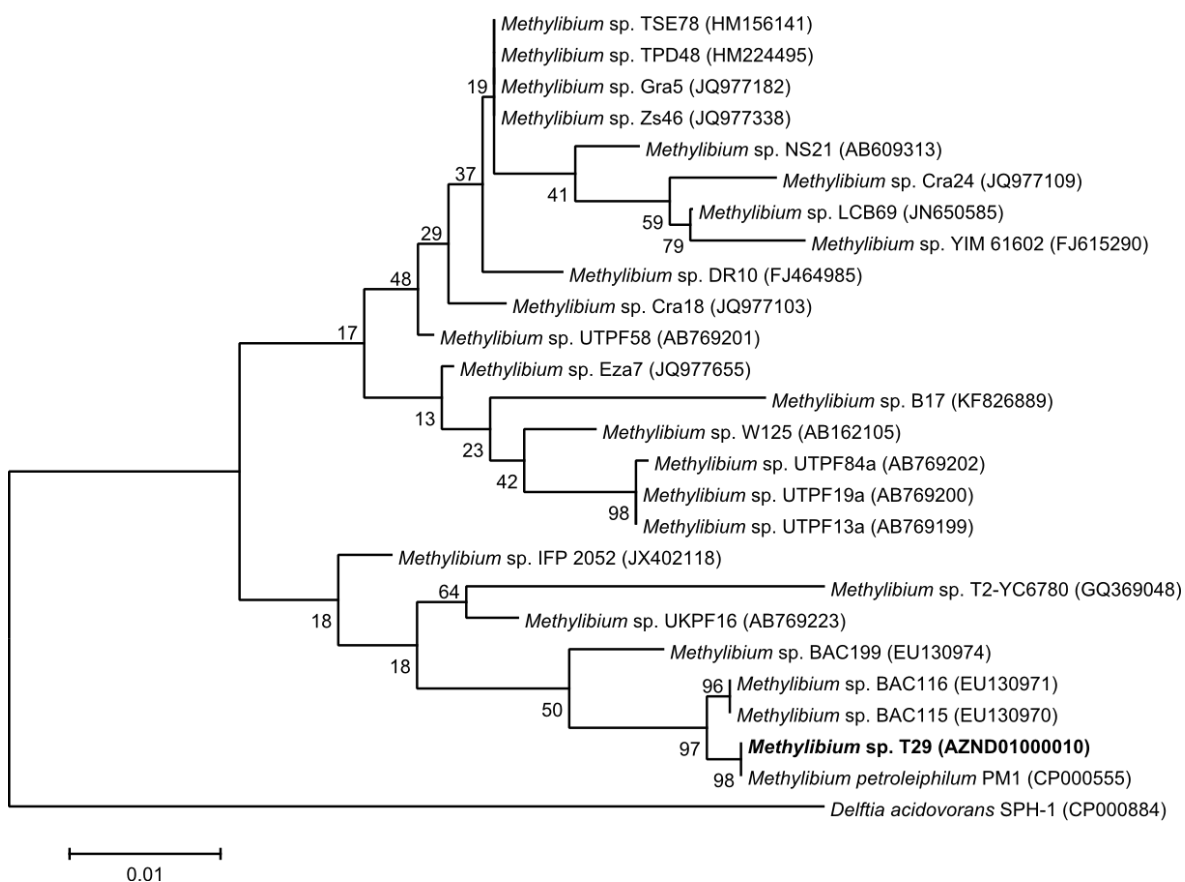
5.3 A T29 jelű izolátum növekedésének és növesztésének általános jellemzői

A T29 jelű izolátumot az RL konzorcium MTBE-n nőtt tenyészetéből MSA táplemezen, TBA-n, mint egyedüli szén- és energiaforráson izoláltuk. MSM tápoldatban TBA-n nőtt tenyészetéből nyert sejteket MTBE szénforrásra visszaoltva, kiemelkedően gyors növekedést figyeltünk meg, ezért a továbbiakban a törzs fenntartását rutinszerűen MTBE szénforráson végeztük.

A törzs rokonsági viszonyainak megállapítása érdekében elkészítettük az ismert, teljes vagy közel teljes 16S rDNS szekvenciával (≥ 1300 bp) rendelkező, *Methylibium* nemzetségbe tartozó izolátumok filogenetikai törzsfáját (7. ábra). A vizsgálat eredménye megerősítette, hogy törzsünk a legközelebbi rokonságot a nemzetségen belül a *Methylibium petroleiphilum* PM1-gyel mutatja. Az izolátumot ennek megfelelően

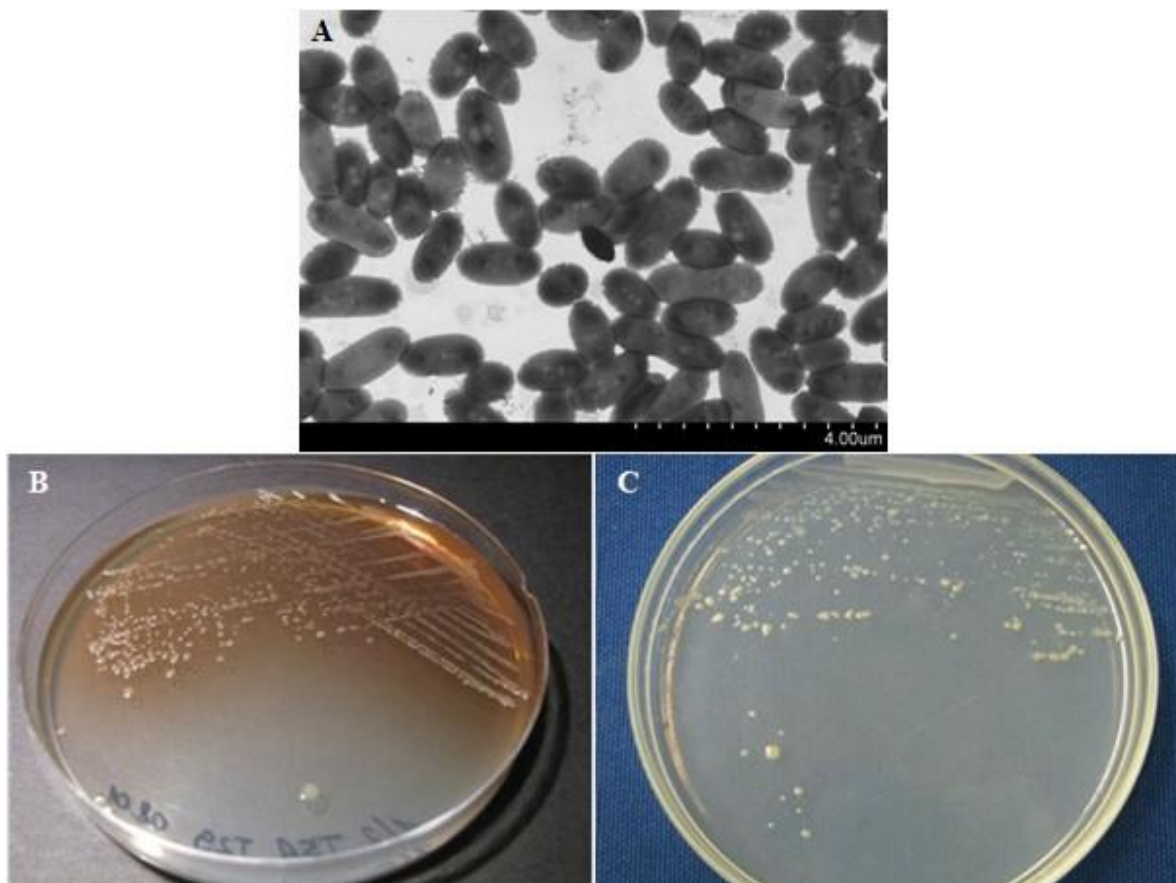
Methylibium sp. T29-nek neveztük el és NCAIM B.02561 azonosító alatt a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében is elhelyeztük.

A *Methylibium* sp. T29 sejtjei átlagosan 1,4 µm × 0,7 µm nagyságúak, leginkább coccobacillus morfológiát mutatnak (**8.A ábra**). A sejtpopuláció kisebb részén polárisan egy flagellum volt megfigyelhető. ½ × TSA lemezen, 25 °C-on, 7-10 napig történő inkubálás során a törzs átlagosan 2-3 mm átmérőjű, sárgás-krémszínű telepeket képzett (**8.B ábra**). MSA táptalajon, MTBE vagy TBA szénforráson kétheti inkubációt követően hasonló méretű, de lényegesen világosabb, fakósárga telepeket figyeltünk meg (**8.C ábra**).



7. ábra A *Methylibium* sp. T29 nemzetségen belüli rokonsági viszonyait bemutató filogenetikai törzsfa. A kladogram a rendelkezésre álló 16S rDNS szekvenciák 1329 bp hosszúságú szakaszainak összehasonlításával a Tamura-Nei modell alapján MEGA 6 szoftver felhasználásával készült [169]. A *Delftia acidovorans* SPH-1 szolgált a nemzetségen kívüli referencia törzsként (outlier). Az elágazásoknál feltüntetett számok 1000 véletlenszerű ismétléssel generált bootstrap támogatottsági értékek (%). A skála 100 nukleotidonkénti 1 eltérést reprezentál. Zárójelben az egyes izolátumok 16S rDNS szekvenciáinak GenBank azonosító számai találhatóak.

Érdekes növekedési tulajdonsága volt a törzsnek, hogy $\frac{1}{2} \times$ TSA táptalajon, a telepek környezetében az agar színe kezdetben világos, majd fokozatosan egyre sötétebb barna elszíneződést mutatott az inkubáció előrehaladtával. Hasonló jelenség volt megfigyelhető $\frac{1}{2} \times$ TSB tápoldatban történő növesztés során is, amikor a halványsárga színű tápközeg az inkubáció során egészen sötétbarnára színeződött. Ugyanez a növekedési fenotípus megfigyelhető volt a többi izolátumunk esetében is, ugyanakkor NA táptalajon, illetve NB tápoldatban nem tapasztaltunk hasonlót. A barna színért minden valószínűség szerint egy, a pyomelaninnal rokon pigmentmolekula lehet felelős. A pyomelanin abiotikus úton, a sejteken kívül képződik a tirozin anyagszere egyik közttermékéből, a homogentizinsavból [170]. A sejten kívüli térbe szekretált homogentizinsavból autooxidáció révén benzokinon ecetsav képződik, amelyből spontán autopolimerizáció révén keletkezik a pyomelanin. A szerkezetileg a huminsavakkal rokon pyomelanin ebben az állapotában oldható exocelluláris pigmentként viselkedik, de képes szorpcióval a sejtfelszínhez kapcsolódni, és



8. ábra A *Methylibium* sp. T29 sejteinek transzmissziós elektronmikroszkópos felvétele (Hitachi S-4800 (FEG) pásztázó elektronmikroszkóp; transzmissziós mód; 25 kV gyorsító feszültség; 13 000-szeres nagyítás) (A), valamint növekedési morfológiája $\frac{1}{2} \times$ TSA (B) és MSA+MTBE táptalajon (C).

ezáltal a sejteket is pigmentálni. A pyomelanin molekula számos feladatot ellát: véd a fénytől és az oxidatív stressztől, részt vesz különböző redox folyamatokban és a hozzájuk kapcsolt energiatranszferben. Pyomelanin termelésről számos baktérium nemzetség esetében beszámoltak már, különösen elterjedt a *Gammaproteobacteria* osztályon belül (pl.: *Pseudomonas* fajok), *Methylibium* törzsek kapcsán azonban mindeddig még nem írták le hasonló pigment termelődését.

A törzs azonosítása után a növesztés során áttértünk a 28 °C-on történő inkubálásra, mivel a legközelebbi rokon PM1 esetében az irodalmi adatok alapján ez volt a rutinszerű fenntartás során alkalmazott hőmérsékleti érték [134].

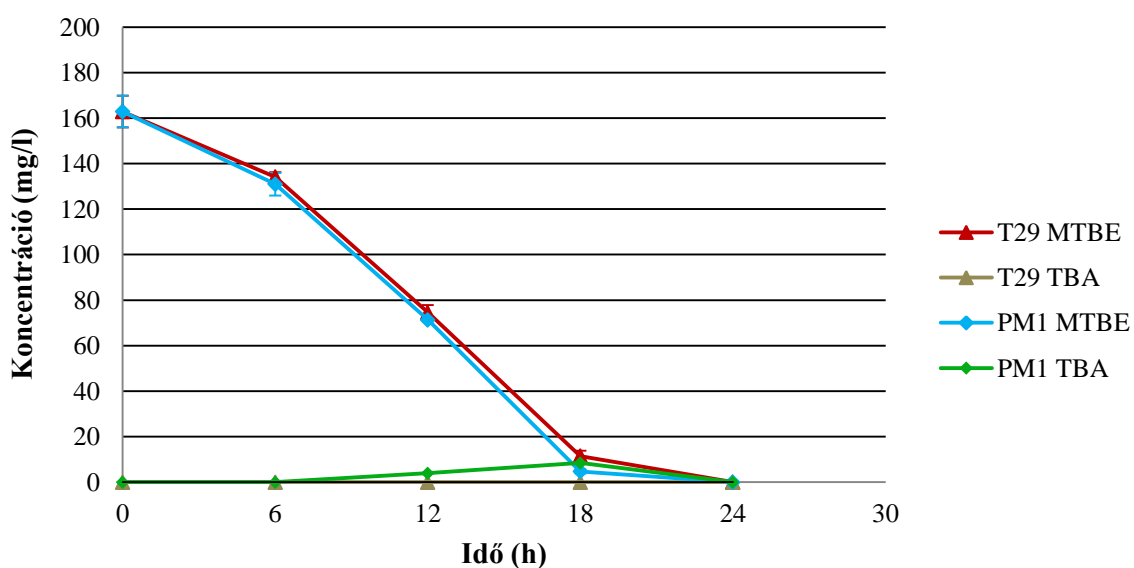
5.4 A *Methylibium* sp. T29 növekedése különböző szubsztrátokon és szubsztrát keverékeken

A T29 jelű törzs a következő egyedüli szén- és energiaforrásként alkalmazott vegyületeken mutatott egyértelmű növekedést: MTBE, TAME, TBA, 2-HIBA, metanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol, hangyasav, Na-piruvát, Na-acetát, glicerín és benzol. Az alábbi szubsztrátokat viszont nem tudta hasznosítani egyedüli szén- és energiaforrásként: ETBE, DIPE, 2-propanol, formaldehid, acetón, izobutirát, tejsav, Na-citrát, glükóz, glicin, *n*-hexán, *n*-dodekán, *n*-hexadekán, ciklohexán, toluol, etilbenzol, *o*-xilol, *m*-xilol, *p*-xilol, fenol, naftalin és tetrahidrofurán. A törzs szubsztráthasznosítási profilja számos egyezést mutat a PM1-ével, ugyanakkor jelentős különbségek is megfigyelhetők a két izolátum között. A legnagyobb eltérések a telített alifás és az aromás szénhidrogének vonatkozásában mutatkoznak meg. Míg a PM1 a C₅-C₁₂ *n*-alkánok hasznosítására képes [136], addig a T29 egyik vizsgált *n*-alkánt sem tudta metabolizálni sem egyedi szubsztrátként, sem pedig szubsztrát keverékben ("n-alkánmix"). Az aromás szénhidrogének csoportjából a BTEX vegyületek közül a T29 kizárólag a benzolt tudta egyedüli szubsztrátként elfogadni, a PM1 ezzel szemben a benzolon kívül a toluol, az etilbenzol és az *o*-xilol bontására is képes [131,136]. BTEX-mixben a T29 már nem volt képes benzolbontásra, ami arra utalhat, hogy az egyedüli szénforrásként nem hasznosítható BTEX komponensek gátolják a benzol hasznosulását a törzsben. A PM1 a fentiekén túlmenően a formaldehid [131], a tejsav [146] és a fenol [131] hasznosítására is képes, míg a T29 egyiket sem bontja. Az üzemanyag-oxigenátok közül mindkét törzs az MTBE, a TAME és a TBA bontására képes, az ETBE-ére egyikük sem. A T29 az "étermix"

komponensei közül is csak az MTBE-t, a TBA-t és TAME-t bontotta le, az ETBE és a DIPE koncentrációja változatlan maradt. Mindezek alapján elmondható, hogy a T29-ben sem konstitutív, sem pedig indukálható ETBE/DIPE-bontó aktivitás nincs jelen. A két törzs további közös metabolikus tulajdonsága, hogy egyikük sem képes a Na-citrát, a glükóz, a glicin, valamint a naftalin egyedüli szén- és energiaforrásként történő hasznosítására.

5.5 A *Methylibium* sp. T29 és a *Methylibium petroleiphilum* PM1 MTBE-bontási sebességének összehasonlítása

Azért, hogy pontosabb képet kapjunk a T29 MTBE-bontó képességéről és sebességéről, elvégeztük a PM1-gyel történő kinetikai összehasonlítást. A kísérlet eredményei azt mutatták, hogy a két törzs esetében azonos körülmények között az MTBE koncentráció-csökkenése nagyon hasonlóan alakul (**9. ábra**).

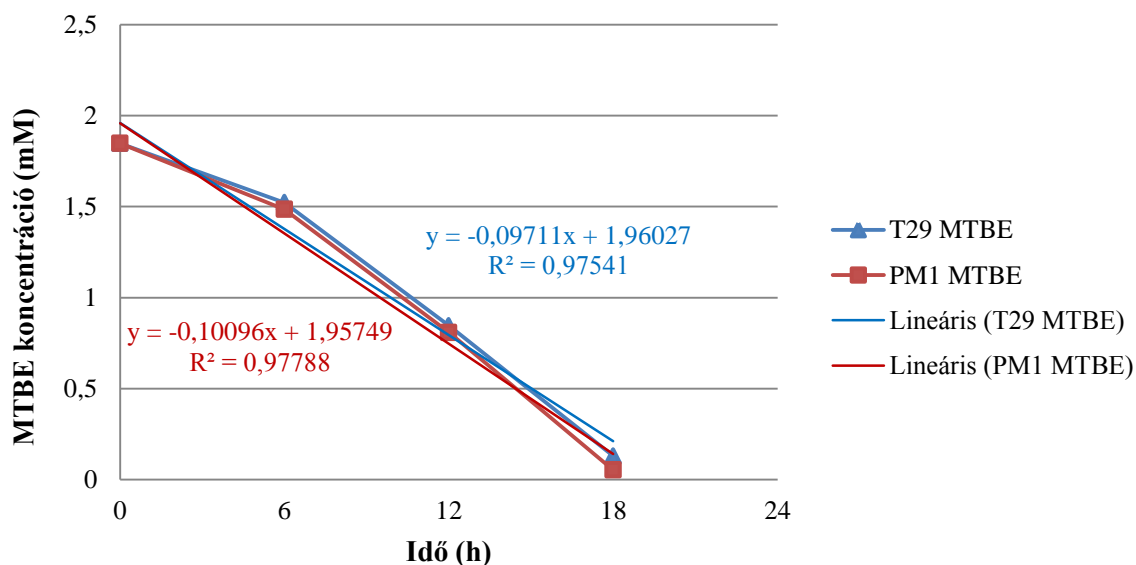


9. ábra A *Methylibium* sp. T29 és a *Methylibium petroleiphilum* PM1 MTBE-bontó képességének összehasonlítása az MTBE és a TBA koncentrációk változásának GC-MS analízissel történő nyomon követésével.

Az MTBE fogyása mindkét törzsben nulladrendű sebességi állandóval volt leginkább jellemezhető. Ennek értékét a fogyási görbék lineáris szakaszaira illesztett egyenesek meredekségéből számítottuk ki (**10. ábra**). A T29 esetében 0,09711 mM/h, a PM1

esetében pedig 0,10096 mM/h sebességi állandó értéket (k_{T29} , ill. k_{PM1}) kaptunk. A két sebességi állandó közötti csekély, mindössze 3,96%-os eltérés azt mutatja, hogy a két törzs azonos körülmények között gyakorlatilag azonos sebességű MTBE-bontásra képes. Ez a tény pedig előrevetíti a T29 bioremediációs célú alkalmazhatóságának lehetőségét is, hiszen a PM1-et, mint az egyik leghatékonyabb MTBE-bontásra képes ismert törzset már több esetben vetették be nemcsak MTBE-vel terhelt vizek bioreaktorban és biofilteren át történő kezelésénél, de MTBE-vel szennyezett területek *in situ* bioaugmentációs kármentesítése során is [80,130,171-173].

A két törzs MTBE-bontásának nyomon követése során sikerült ugyanakkor megfigyelniük egy szembetűnő különbséget is. Míg a T29 esetében egyetlen mintavétel alkalmával sem sikerült TBA köztiterméket kimutatni a rendszerekben, addig a PM1-nél az idő előrehaladtával átmeneti, kismértékű TBA akumuláció volt megfigyelhető: a 12 órás mintákban átlagosan 3,96, a 18 órákban pedig átlagosan 8,46 mg/l TBA koncentráció volt kimérhető (9. ábra). Ennek háttérében vélhetően az állhat, hogy a TBA-t átalakító lépés (a TBA monooxygenáz enzim által katalizált reakció) a T29-ben nagyobb sebességgel megy végbe, mint a PM1-ben. Ezenfelül magyarázhatja a jelenséget az is, hogy a T29-ben a TBA bomlási sebessége lényegesen nagyobb lehet, mint az MTBE-é, így nincs lehetőség arra, hogy a TBA felhalmozódjon az MTBE-bontás során.



10. ábra A T29 és a PM1 nulladrendű sebességi állandóinak meghatározása az MTBE fogyási görbéik lineáris szakaszára illesztett egyenesek egyenletének felhasználásával történt. A sebességi állandók értéke az egyenesek meredekségének -1-szeresével egyezik meg.

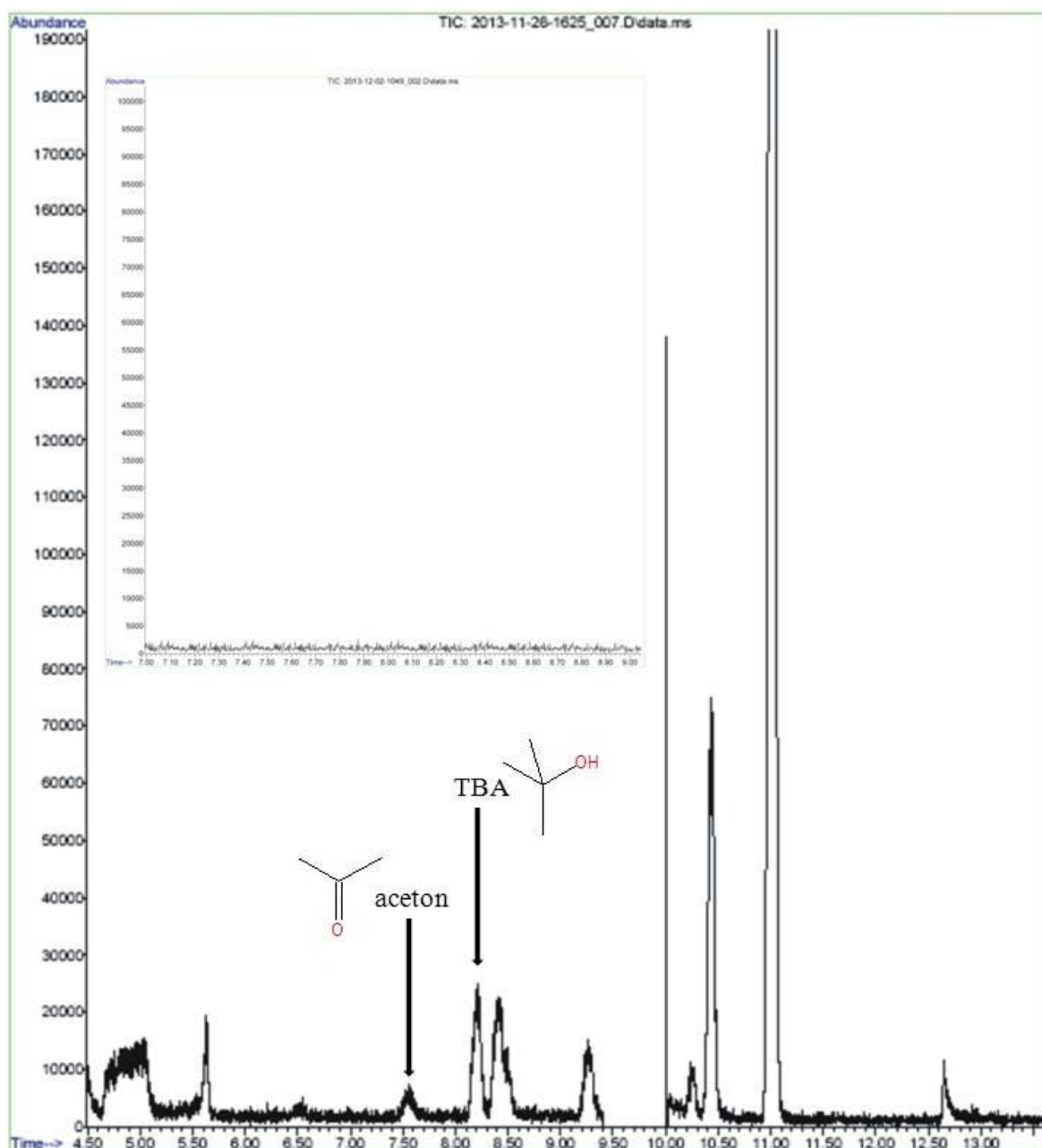
5.6 Az MTBE lebontási folyamatában szereplő intermedierek azonosítása a *Methylibium* sp. T29-ben és az MTBE biodegradációjának valószínűsíthető útvonala a törzsben

A GC-MS mérések eredményei nyomán két intermediert sikerült azonosítanunk az MTBE lebontási útvonalában a *Methylibium* sp. T29-ben: TBA-t és acetont (**11. ábra**).

Az abiotikus mintákból a GC-MS analízis során, az alkalmazott erőteljes mintaelőkészítési körülmények (nagy sókoncentráció, magas hőmérséklet, alacsony pH) ellenére egyik intermedier sem volt kimutatható, így kizárható, hogy az MTBE abiotikus hidrolízise nyomán keletkeztek volna ezek a köztitermékek. Közülük a TBA jelenléte nem meglepő, hiszen a szakirodalmi adatok alapján elmondható, hogy valamennyi ismert MTBE-bontásra képes törzs TBA-n is jól nő, és több esetben igazolták azt is, hogy az adott izolátumban az MTBE metabolikus útvonala TBA-n keresztül halad. Mindazonáltal meg kell említenünk, hogy a *Methylibium petroleiphilum* PM1 esetében az MTBE potenciális lebontási köztitermékei közül mindeddig egyet sem mutattak ki. Az aceton is régóta szerepel az MTBE-bontás lehetséges köztitermékeinek sorában, de minden kétséget kizáróan mindezidáig csak a *Mycobacterium austroafricanum* IFP2012 törzs esetében detektálták [114].

Az aceton, mint köztitermék kimutatása a részünkről jelentős eredmény, hiszen általa pontosabb képet kaphatunk a törzs MTBE hasznosítási útvonaláról és ezáltal a benne potenciálisan részt vevő enzimekről is. Ugyanakkor itt kell megjegyeznünk azt is, hogy amint korábban már leírtuk, a T29 nem képes acetnonon, mint egyedüli szén- és energiaforráson nőni, míg az IFP2012 igen. Ennek hátterében azonban több dolog is állhat: az aceton az alkalmazott koncentrációban (200 mg/l) toxikus lehet a T29-re, de lehetséges az is, hogy a T29-ből hiányzik az aceton sejtekbe történő felvételéhez szükséges transzport rendszer.

Mivel az MTBE lebontási útvonalának felső szakaszából egyedül a TBA-t sikerült azonosítani, így arról nem tudunk részletesebb képet adni. Az alsó szakaszban viszont a 2-HIBA lehetséges átalakulásai közül (**4. ábra**) az aceton kijelöli a valószínű útvonalat. Eszerint a 2-HIBA-ból dekarboxiláz enzimaktivitás révén 2-propanol képződik, melyet egy alkohol dehidrogenáz enzim alakít acetonná. Az acetont egy monooxygenáz enzim hidroxiacetonná oxidálja, amely további oxidáció után piroszőlőssavvá alakul és belép a központi anyagcsere-folyamatokba.



11. ábra A *Methylibium* sp. T29 MTBE lebontási útvonalában azonosított intermedierek GC-MS kromatogramja. A bal felső sarokban az abiotikus minta kromatogramja szemlélteti, hogy a mérési körülmények hatására nem keletkeznek ezek a köztitermékek az MTBE-ből.

5.7 *Methylibium* izolátumok antibiotikum és nehézfém rezisztenciájának összehasonlító vizsgálata

A tervezett molekuláris biológiai kísérletek megkezdése előtt szükséges volt, hogy megismerjük izolátumaink, mindenekelőtt a T29, esetleges antibiotikum rezisztenciáját,

illetve érzékenységet. A PM1-ről korábban már leírták, hogy eredendően az antibiotikumok széles spektrumával szemben rezisztens, sőt könnyen képez spontán mutánsokat is, melyek további antibiotikumokkal szemben válhatnak rezisztenssé [132]. Ugyanakkor az ampicillinre és a tetraciklinre szenzitív a törzs, és ezen antibiotikumok ellen a PM1-ben nem fejeződnek ki a molekuláris biológiai gyakorlatban általánosan alkalmazott rezisztencia gének sem.

Az antibiotikum tesztjeink eredményei alapján mind a *Methylibium* sp. M28, mind pedig a PM1 szenzitív valamennyi vizsgált antibiotikumra (Amp, Apr, Cm, Km, Sm, Tc) mindkét alkalmazott koncentrációban. Ezzel szemben a T29 rezisztensnek bizonyult ampicillinnel (100 µg/ml) és tetraciklinnel (12,5 µg/ml) szemben is, a többi antibiotikumra a T29 is szenzitív.

Az a tény, hogy a T29 éppen arra a két antibiotikumra rezisztens, amelyre a PM1 szenzitív, ráadásul a kívülről bevitt rezisztencia gének sem működnek benne, remek lehetőséget kínálhat a jövőben arra, hogy a már azonosított T29 rezisztencia gének felhasználásával próbáljunk meg rezisztenciát kialakítani a PM1-ben. Mivel a két törzs egymással közeli rokonságban áll, nagyobb a valószínűsége annak, hogy a bevitt gének expresszálódnak majd, és ezáltal lehetőség nyílna a molekuláris biológiai munkák megkönnyítésére a PM1-ben, sőt más *Methylibium* izolátumokban is.

A *Methylibium petroleiphilum* PM1 teljes genomszekvenciájának meghatározását követően számos nehézfém (Cd, Co, Cr, Cu, Zn) elleni rezisztenciában potenciálisan szerepet játszó gént azonosítottak a törzs genomjában szekvencia homológiák alapján [136], de e rezisztenciák kifejeződését kísérletesen nem igazolták.

Kísérleteink során a nehézfémek közül a higany elleni rezisztenciát vizsgáltuk a törzsekben, különböző koncentrációkban adagolt HgCl₂ formájában. A PM1 kizárólag a Hg²⁺-t nem tartalmazó kontroll rendszerekben nőtt föl, míg a T29 és az M28 törzseink 12,5 mg/l HgCl₂ koncentráció mellett még a kontroll rendszerekével megegyező növekedést mutattak, magasabb Hg²⁺ koncentrációknál viszont már nem voltak képesek növekedésre.

Az antibiotikum és a higany rezisztenciákban megmutatkozó szembetűnő különbségek tovább erősítették azt a megállapítást, miszerint a hazai *Methylibium* izolátumok a PM1-gyel való nagyon közeli rokonság ellenére is számos tekintetben különböznek a típustörzstől, ami indokoltá tette mélyrehatóbb vizsgálatukat.

5.8 *Methylibium* törzsek genomjának összehasonlítása pulzáló mezejű gélelektroforézis (PFGE) vizsgálattal

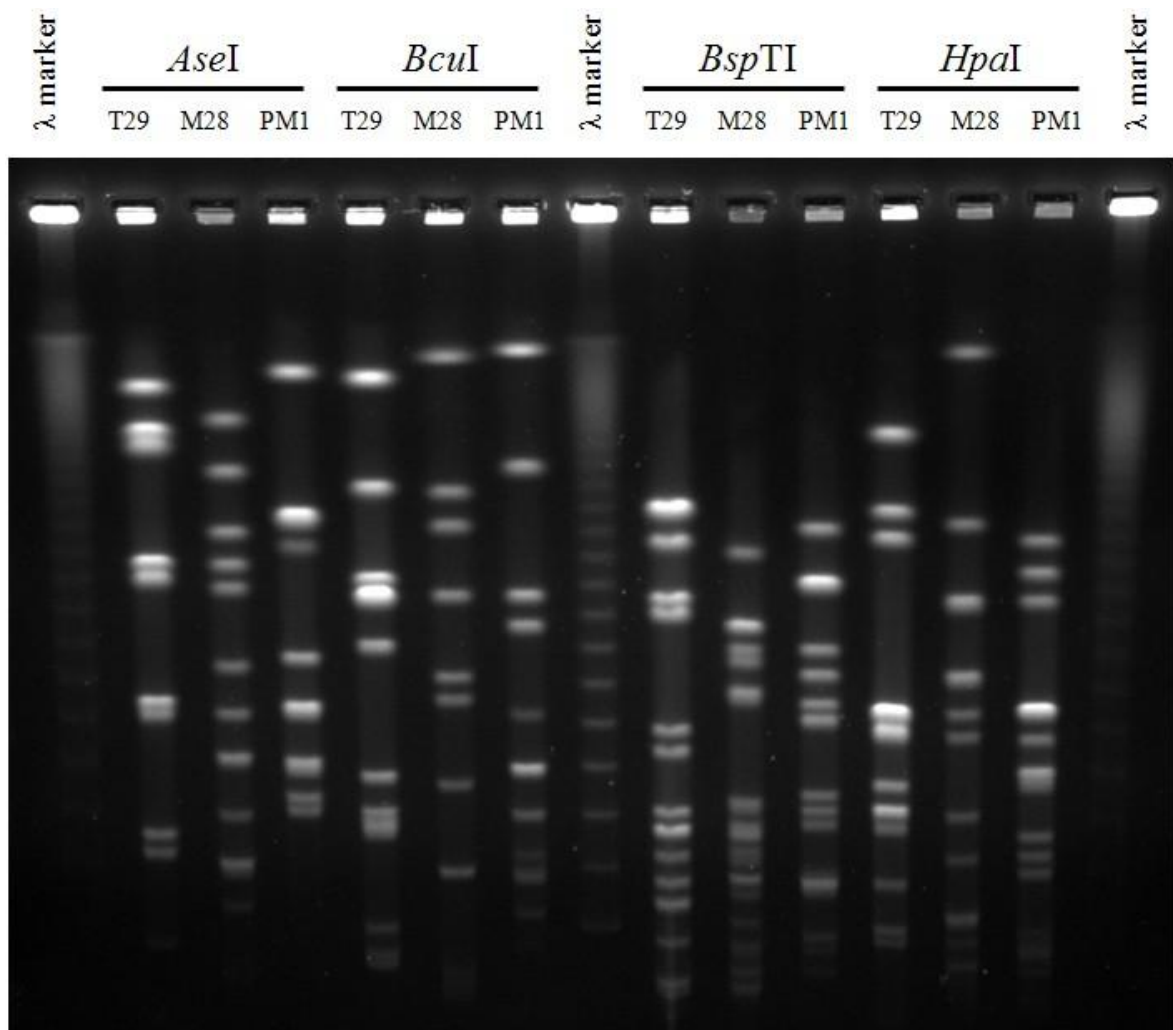
A pulzáló mezejű gélelektroforézis módszer ideálisan megválasztott restrikciós enzimekkel kombinálva kiválóan alkalmas közelrokon fajok vagy ugyanazon fajhoz tartozó törzsek genomjának összehasonlításához. Kísérletünk során a két *Methylibium* izolátum-csoport 1-1 tagjának (M28 és T29) genomját kívántuk összevetni a PM1-ével. A restrikciós enzimek kiválasztásához a PM1 ismert, teljes genomszekvenciáját használtuk föl. A vizsgálat során négy különböző restrikciós enzimmal (*AseI*, *BcuI*, *BspTI*, *HpaI*) kezeltük a három törzs LMP agaróz géldugókba ágyazott intakt genomjait, majd a **4.12** fejezetben leírtak szerint elvégeztük a kapott fragmentek elválasztását. A három törzs esetében az így előállt restrikciós mintázatokat a **12. ábra** mutatja be.

A kapott mintázatok alapján egyértelművé vált, hogy a három törzs között a rendkívül nagyfokú 16S rDNS szekvencia homológia ($\geq 99\%$ azonosság) ellenére a teljes genomok szintjén jelentős különbségek figyelhetők meg. Mindehhez valószínű, hogy nagyban hozzájárultak az egyes törzseket élőhely-specifikusan érő abiotikus és biotikus tényezők, hiszen noha a PM1 és a hazai izolátumok is mindannyian MTBE-vel szennyezett közegekből, de egymástól tetemes földrajzi távolságban, eltérő mikrokörnyezetből lettek izolálva.

Annak megállapításához, hogy e számottevő eltérések mely géneket érintik, illetve hogy a különbségek csak nukleotid szinten jelentkeznék-e vagy a fehérjék szintjén is megmutatkoznak, mélyrehatóbb vizsgálatok voltak szükségesek. Ezért, valamint mivel korábban az MTBE-bontás ismert génjeinek PCR-alapú kimutatása során egyetlen pozitív reakciót sem kaptunk a T29 esetében, úgy döntöttünk, hogy a későbbiekben a törzs teljes genomját megszekvenáljuk, hogy ezáltal pontosabb képet kapjunk nemcsak az MTBE-bontáshoz kapcsolódó génekről, de a PM1-gyel történő részletesebb összehasonlítás céljából is.

5.9 Természetes mutáns vonalak izolálása a *Methylibium* sp. T29-ből és a *Methylibium petroleiphilum* PM1-ből

A *Methylibium* törzsek fenntartásához és tisztaságának ellenőrzéséhez a $\frac{1}{2} \times$ TSA és



12. ábra A *Methylibium* sp. T29, a *Methylibium* sp. M28 és a *Methylibium petroleiphilum* PM1 genomjának összehasonlítása négy különböző restrikciós enzimmel végzett kezelést követő pulzáló mezejü gélelektroforézis (PFGE) vizsgálattal.

az NA táptalajokat, valamint a $\frac{1}{2} \times$ TSB és az NB tápoldatokat párhuzamosan használtuk. Egyértelműen megfigyelhető volt, hogy NB tápoldatban a T29 gyorsabban nőtt és nagyobb optikai denzitás értékeket ért el, mint $\frac{1}{2} \times$ TSB tápközegben. Hasonló jelenség volt észrevehető a szilárd táptalajok vonatkozásában is, hiszen NA táptalajon a T29 szintén gyorsabban nőtt és nagyobb telepeket képzett, mint $\frac{1}{2} \times$ TSA-n.

NB tápoldaton történő folyamatos fenntartás (hetenkénti átoltás és NA táptalajra történő szélesztés) során többször, egymástól független esetekben előfordult, hogy az NA szélesztésekről izolált, majd NB tápoldaton felnevelt egyedi kolóniák tenyészetéből MSM tápoldatba MTBE-re, mint egyedüli szén- és energiaforrásra visszaoltott sejtek egyáltalán nem mutattak növekedést, elvesztették MTBE-bontó képességüket. $\frac{1}{2} \times$ TSB és $\frac{1}{2} \times$ TSA tápközegeken fenntartott tenyészetek esetében hasonló jelenség nem volt megfigyelhető.

Nyilvánvaló volt tehát, hogy a funkcióvesztés kialakulásában a tápközegek eltérő összetételének fontos szerepe volt.

A külföldi törzsgyűjteményből beszerzett *Methylibium petroleiphilum* PM1 tenyészet tisztaságának ellenőrzése során, a $\frac{1}{2} \times$ TSA lemezre végzett szélesztésen (4.7 fejezet), kétheti, 28 °C-on történő inkubációt követően kétféle telepmorfológiát tudtunk elkülöníteni. Mindkét típusú telepből kolónia PCR segítségével a 16S rDNS szekvenciákat amplifikáltuk, majd a termékeket megszekvenáltattuk. Az eredmények alapján mindkét kolónia 16S rDNS-e 100%-ban megegyezett a PM1-ével. Mindkét vonal $\frac{1}{2} \times$ TSB tápoldaton felnevesztett egyedi kolóniájának tenyészetéből áttoltunk sejteket MSM tápoldatba MTBE-re, mint egyedüli szén- és energiaforrásra, de csak az egyik vonal esetében tapasztaltunk növekedést, a másik egyáltalán nem nőtt.

Úgy döntöttünk, hogy a T29 és a PM1 funkcióvesztéses mutáns vonalait részletesebb vizsgálatoknak vetjük alá. Azért, hogy összehasonlíthassuk őket a vad típusú törzsekkel, elvégeztünk néhány szubsztráthasznosítási kísérletet, illetve megvizsgáltuk antibiotikum és higany rezisztenciájukat is.

A kísérletek érdekes eredményekkel szolgáltak. A T29 mutáns vonala sem MTBE-t, sem pedig TAME-t nem volt képes egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítani, viszont TBA-n jól nőtt. Az antibiotikumok közül a vad típushoz hasonlóan rezisztens volt ampicillinre és tetraciklinre is, viszont higany jelenlétében (12,5 mg/l) nem volt képes növekedni. A PM1 mutáns vonala sem MTBE-n, sem TAME-n, sem pedig TBA-n nem volt képes növekedni, ezen felül szenzitív volt ampicillinre és tetraciklinre is, higany jelenlétében pedig nem mutatott növekedést. A két törzs esetében ezeket a mutáns vonalakat T29-B-nek, illetve PM1-B-nek neveztük el. Közülük a T29-B-t *Methylibium* sp. T29-B néven a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében is elhelyeztük NCAIM B.02560 azonosító alatt. A T29 és a PM1 esetében a vad típusú és a mutáns vonalak leglényegesebb karakterisztikus tulajdonságait a **9. táblázat** foglalja össze.

A szakirodalomból ismert, hogy az antibiotikumokkal és nehézfémekkel szembeni rezisztenciát biztosító gének sokszor extrakromoszómális elemeken, így gyakran rezisztencia plazmidokon helyezkednek el. Hasonlóképpen, számos környezetszennyező antropogén vegyület lebontásában szerepet játszó enzimek katabolikus plazmidokon kódoltak. Nem szelektív környezetben történő növekedés során ezek az extrakromoszómális elemek bizonyos esetekben eliminálódnak a sejtekből, hiszen fenntartásuk feleslegessé válik. Hasonló jelenséget más abiotikus külső tényezők is kiválthatnak, így az optimálisnál alacsonyabb vagy magasabb növesztési hőmérséklet,

bizonyos kémiai anyagokkal történő érintkezés vagy kezelés, vagy megfelelő növekedési inhibitorok alkalmazása.

	Növekedés			Rezisztencia		
	MTBE	TAME	TBA	Amp	Tc	Hg ²⁺
T29	+	+	+	+	+	+
T29-B	-	-	+	+	+	-
PM1	+	+	+	-	-	-
PM1-B	-	-	-	-	-	-

9. táblázat A *Methylibium* sp. T29 és T29-B, valamint a *Methylibium petroleiphilum* PM1 és PM1-B törzsek összehasonlítása az egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítható üzemanyag-oxigenátok vonatkozásában, valamint az ampicillin (Amp), tetraciklin (Tc) és higany (Hg²⁺) elleni rezisztencia alapján.

A T29 esetében az NA/NB, illetve a $\frac{1}{2} \times$ TSA/TSB tápközegeken történő hosszabb idejű fenntartás egyaránt nem szelektív növekedési környezetet jelentett a sejtek számára a vizsgált tulajdonságok tekintetében, de közülük csak az NA/NB esetében tapasztaltunk fenotípus változást. Ennek oka valószínűleg az, hogy az NA/NB esetében gyorsabb szaporodás, ezáltal rövidebb generációs idő volt megfigyelhető, aminél nagyobb valószínűséggel következhet be egy esetleges plazmid veszteség vagy deléció, ami maga után vonhatja bizonyos funkciók kiesését. Annak háttérében, hogy a T29 esetében csak az MTBE- és a TAME-bontó képesség, valamint a Hg²⁺ elleni rezisztencia tűnt el, viszont a TBA-bontó tulajdonság és az ampicillin és tetraciklin elleni rezisztencia továbbra is megmaradt, több dolog is állhatott. Elképzelhető, hogy a vad típusú törzsre jellemző tulajdonságok egymástól függetlenül, több plazmidon kódoltak, melyeknek csak egy része veszett el vagy pedig a funkciók részben a kromoszómán kódoltak. Ugyanakkor a funkcióvesztéshez nem szükségszerű, hogy teljes plazmidok vesszenek el, elképzelhető, hogy deléció révén csupán DNS darabok estek ki a genomból, vagy éppen valamilyen mobilis genetikai elem integrálódott a génekbe, amely inaktíválta őket.

A PM1-re vonatkozóan nem tudtunk hasonló hipotézist felállítani, minthogy a mutáns fenotípussal rendelkező vonal a vad típussal együtt érkezett a liofilizátumban, de elképzelhető, hogy a liofilizálás folyamata során, vagy még azt megelőzően a törzsgyűjteményben történő fenntartás vagy tárolás során történt a funkcióvesztés. A PM1 esetében az általunk vizsgált tulajdonságok közül csak az üzemanyag-oxigenátok bontására

való képesség tűnt el a mutáns vonalból, hiszen a vizsgált anyagokkal (Amp, Tc, Hg²⁺) szembeni rezisztenciák a vad típusból is hiányoznak. Az MTBE- és TBA-bontásban részt vevő gének a PM1-ben a megaplazmidon lokalizálódnak, sok más funkcióval együtt. Éppen ezért kevésbé tűnt valószínűnek, hogy egy 600 kb-os plazmid teljesen elveszen a törzsből. Emiatt úgy véltük, hogy deléció vagy mobilis genetikai elem integrációja okozta a PM1 esetében a mutáns vonal létrejöttét.

A következőkben elméleteink helyességének ellenőrzése céljából megvizsgáltuk, hogy a törzseink rendelkeznek-e plazmiddal vagy plazmidokkal, amelyek jelenléte vagy hiánya, illetve a köztük lévő esetleges méretbeli különbség magyarázhatja-e a fenotípus változásokat és a mutáns vonalak létrejöttét.

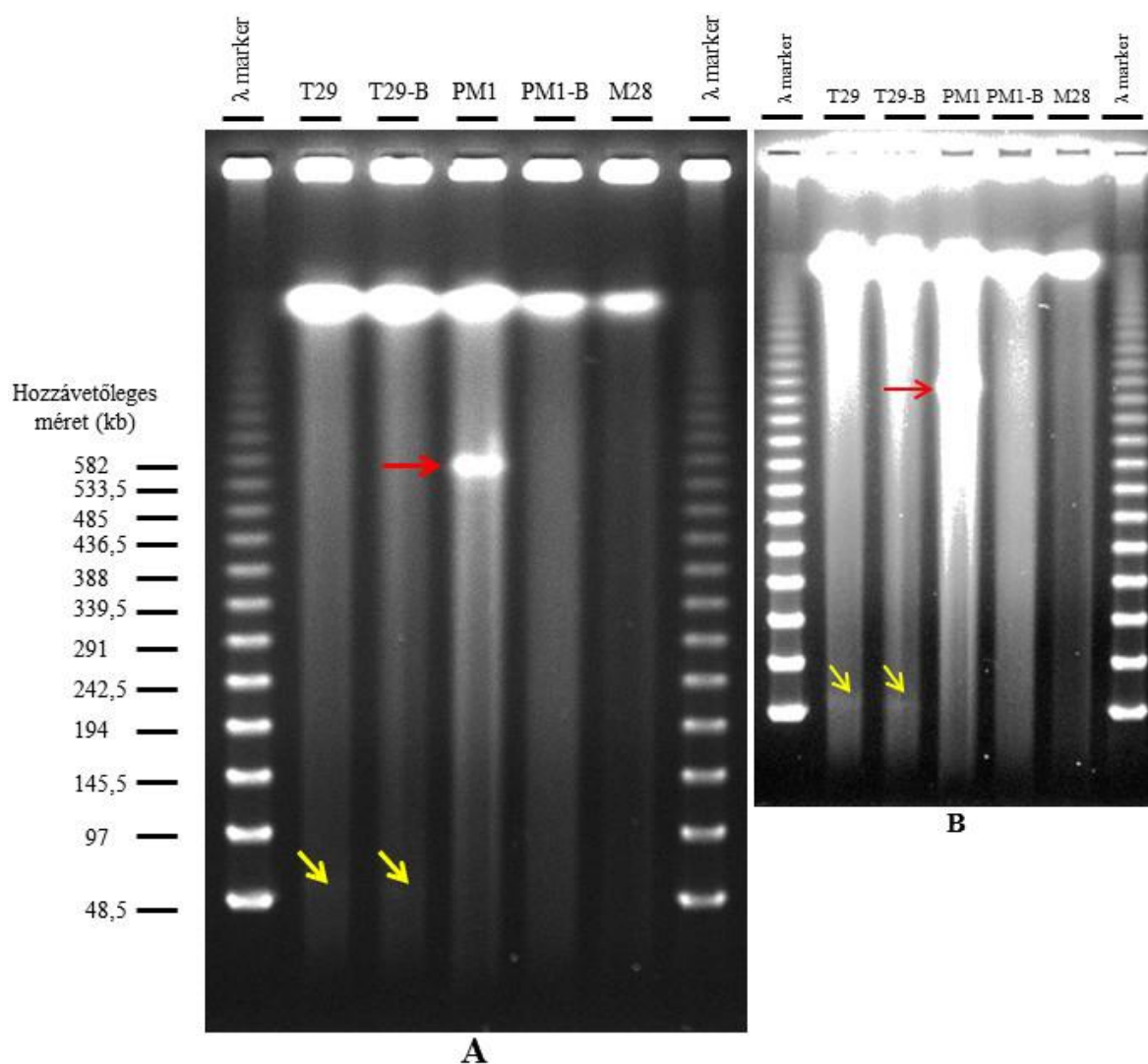
5.10 Plazmid detektálás és izolálás a *Methylibium* sp. T29 és a *Methylibium petroleiphilum* PM1 vad típusú és természetes mutáns vonalaiból, valamint a *Methylibium* sp. M28-ból

A *Methylibium* sp. T29, T29-B, M28 és a *Methylibium petroleiphilum* PM1-B jelű izolátumainkban, valamint a *Methylibium petroleiphilum* PM1 törzsben a plazmidok kimutatását és méretük hozzávetőleges meghatározását S1 nukleáz kezeléssel kapcsolt PFGE analízissel végeztük el. Az öt törzs esetében az S1-PFGE vizsgálat eredményét a **13. ábra** mutatja be.

Az S1-PFGE analízis érdekes eredményekkel szolgált: három törzsben sikerült 1-1 plazmidot azonosítanunk (PM1, T29, T29-B), míg a másik két izolátum (M28, PM1-B) esetében nem kaptunk extrakromoszómális elemre utaló jelet.

A *Methylibium petroleiphilum* PM1 teljes genomszekvenciájának meghatározása során korábban már leírtak ugyan egy 600 kb körüli (599 444 bp) méretű megaplazmidot a törzsben [136], de mindezidáig még nem született bizonyíték, amely kísérletes úton ténylegesen igazolta volna a jelenlétét. A pPM1 jelű megaplazmid összesen 646 gént hordoz, melyből 382 egyedi („hipotetikus fehérje”) a PM1-re nézve. A megaplazmidon találhatóak a PM1-ben az MTBE- és a TBA-bontásban részt vevő gének, de ezek mellett számos más anyagcsere-folyamat, így bizonyos koenzimek és szervetlen ionok transzportjában és metabolizmusában, a kobalamin bioszintézisben, továbbá a replikációban, a rekombinációs és repair folyamatokban szereplő egyes fehérjék génjei.

Leírták a plazmidról azt is, hogy minden valószínűség szerint a közelmúltban horizontális transzfer során tett szert rá a törzs.



13. ábra Plazmid detektálás a *Methylibium* izolátumokban S1-PFGE analízissel. Az **A** és a **B** kép ugyanazt a gélfotót ábrázolja kétféle fényerősség mellett. Az azonosított plazmidokat a piros és a sárga nyilak jelzik.

A PM1-B-ből egyértelműen a teljes megaplazmid hiányzik, hiszen nincs nyoma kisebb méretű (≥ 40 kb) plazmidnak a törzsben. Mindez amellet, hogy magyarázza korábbi kísérleti eredményeinket, miszerint a törzs nem képes sem MTBE, sem pedig TBA bontására, cáfolja azon feltételezésünket, hogy a mutáns vonal kialakulásának hátterében delécio vagy inszercio állna. Figyelembe véve, hogy a megaplazmidon nagyszámú alapanyagcsere-folyamatban szerepet játszó gén is lokalizálódik, melyek együttes hiánya nagy valószínűséggel letális lenne egy olyan környezetben, ahol nincs lehetőség a pótlásukra (például horizontális géntranszfer révén), a plazmid elvesztésénél

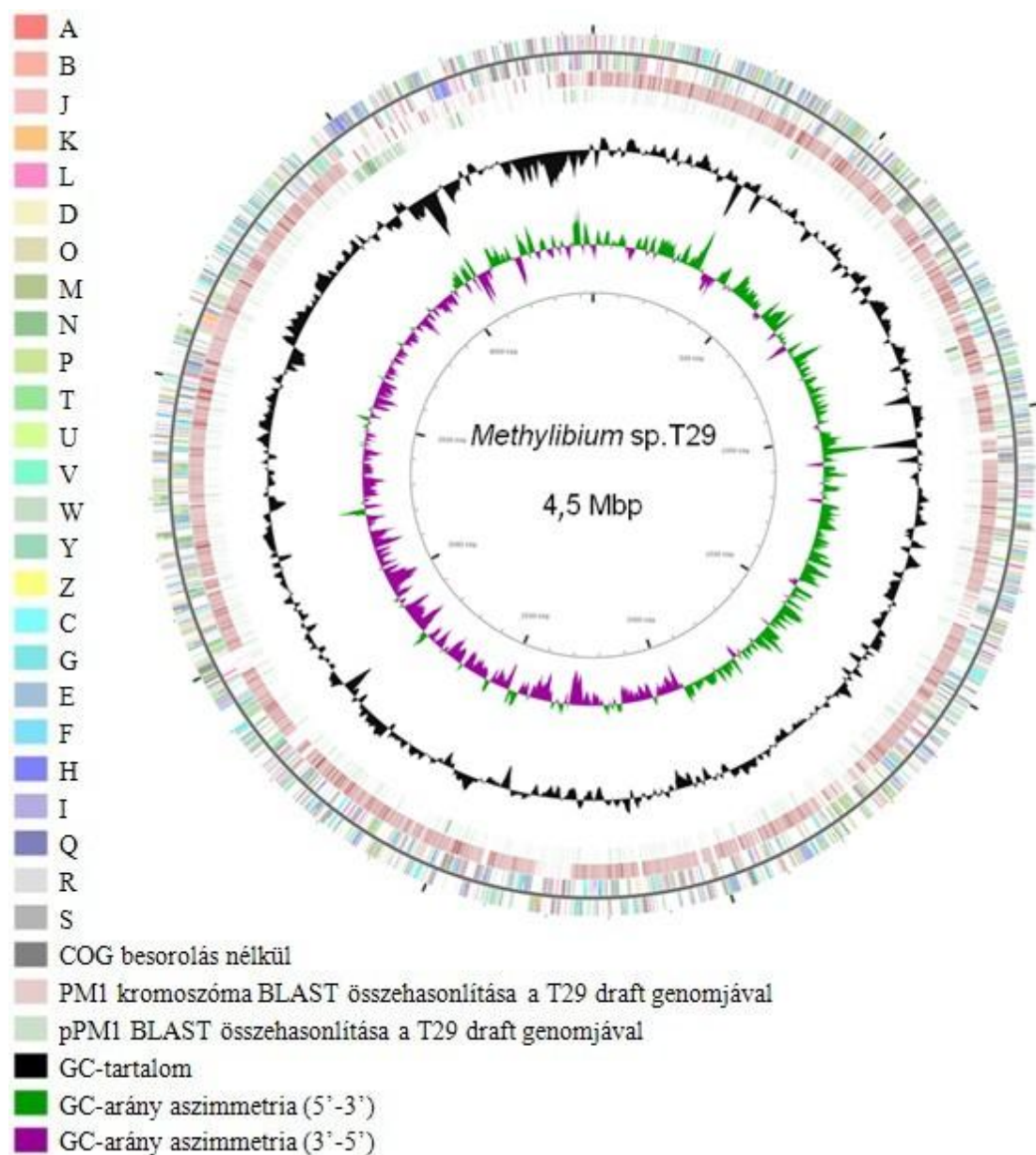
valószínűbbnek tűnik annak integrációja a kromoszómába. Ennek során vagy ezt megelőzően egy deléciós vagy inszerciós folyamat által válhattak inaktívvá vagy veszthettek el az MTBE/TBA metabolizmusában szerepet játszó gének a PM1-ből.

A *Methylibium* sp. M28 esetében sem kaptunk plazmidra utaló jelet, viszont ez a törzs hatékony MTBE- és TBA-bontásra volt képes. Így ebben az esetben az egyetlen magyarázat az lehet, hogy a bontásért felelős gének a kromoszómán lokalizálódnak. A gének eredetére vonatkozóan azonban nem tudunk semmilyen megállapítást tenni, vagyis nem tudhatjuk, hogy a törzsben evolúciós-adaptációs folyamatok során alakult-e ki a bontásra való képesség vagy pedig horizontális géntranszfer történt. Ennek eldöntéséhez további mélyrehatóbb vizsgálatok szükségesek.

A T29 és a T29-B törzsekben egyértelműen azonosítható volt egy-egy, hozzávetőlegesen 50 és 90 kb közötti méretű plazmid, viszont a PM1-re jellemző megaplazmid mindkettőből hiányzott. A két törzs esetében hasonló méretű plazmidra utaló jeleket kaptunk, de az esetleges méretbeli és szekvenciabeli különbségek megismeréséhez ez a vizsgálat nem volt elegendő. Így arra sem kaptunk választ még, hogy a vizsgált tulajdonságokért (MTBE/TBA-bontás, ampicillin, tetraciklin és higany elleni rezisztenciák) felelős gének közül melyek találhatóak a plazmidon és melyek a kromoszómán. Ezért a T29 és T29-B jelű törzsekből a **4.13** fejezetben foglaltak szerint plazmid DNS-t izoláltunk és a teljes genomok szekvenálását követően azokat is megszekvenáltuk. A két törzs esetében a plazmidokat pT29A, illetve pT29B jelöléssel láttuk el.

5.11 A *Methylibium* sp. T29 és T29-B törzsek *de novo* genomszekvenálása, valamint a pT29A és pT29B jelű plazmidok *de novo* szekvenálása

A *de novo* genomszekvenálás során kapott nyers adatok bioinformatikai feldolgozása alapján a *Methylibium* sp. T29 vázlatos (draft) genomszekvenciája 4 449 424 bp méretű, amelyet 608 kontigba sikerült összeépíteni, GC-tartalma 68,7%. A genom mérete és a GC-tartalom értéke nagyfokú hasonlóságot mutat a legközelebbi rokon PM1 genomjának megfelelő adataival (4 643 669 bp genomméret, ill. 67,6% GC-tartalom) [136]. A T29 esetében összesen 4806 gén jelenléte valószínűsíthető a genomszekvenciából, a PM1-nél



14. ábra A *Methylibium* sp. T29 draft genomszekvenciájának grafikus ábrázolása, néhány releváns tulajdonságának bemutatásával. A kontigokat a Mauve 2.3.1 program [156] segítségével rendeztük sorba a PM1 teljes genomszekvenciáját használva referenciaként. A gének COG kategóriákba történő besorolása a WebMGA szerver [174] segítségével történt. A genom térképének ábrázolását CGView programmal [175] végeztük. A megjelenített tulajdonságok a következők (kívülről befelé haladva): gének az 5'-3' szálon, gének a 3'-5' szálon (COG kategóriák szerint színezve); a *Methylibium petroleiphilum* PM1 kromoszómájának és megaplazmidjának összehasonlítása a T29 draft genomjával BLAST segítségével; GC-tartalom; GC-arány aszimmetria. (A COG kategóriák betűkódjainak feloldásai a **11. táblázat**ban találhatóak.)

korábban 4477 gént írtak le [136]. A T29 genomjában 3 rRNS, 48 tRNS és 1 tmRNS gént azonosítottunk. A fehérjekódoló gének 72,8%-ához tudtunk funkciót rendelni, a többit hipotetikus fehérjeként neveztük el. Ezenfelül a fehérjekódoló gének 71,0%-a volt

besorolható COG (Clusters of Orthologous Groups) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) kategóriákba. A *Methylibium* sp. T29 draft genomszekvenciájának (**14. ábra**) statisztikai adatait a **10. táblázat** összegzi, a fehérjekódoló gének COG kategóriák szerinti megoszlását pedig a **11. táblázat** tartalmazza.

A NUCmer programmal [157] végzett összehasonlítások eredményei nyomán elmondható, hogy a *Methylibium* sp. T29 draft genomszekvenciája átlagosan 97%-os azonosságot mutat a PM1 kromoszómájával nukleotid szinten, illetve 85%-ot a pPM1 megaplazmid egy kis részletével (**15. ábra**). Ugyanakkor azonban jelentős eltérések is megfigyelhetők a két törzs esetében. A legjelentősebb ezek közül, hogy a közel 600 kb-os pPM1 megaplazmid legnagyobb része hiányzik a T29-ből, a meglévő homológ szekvenciák pedig a kromoszómán találhatóak. Mindez lényeges különbség az Egyesült Államokban izolált PM1-szerű törzsekkel szemben is, melyek a T29-hez hasonlóan szintén nagyon közeli rokonai a PM1-nek (~99% azonosság a 16S rDNS szekvenciákban), viszont bennük kivétel nélkül megtalálható a közel 600 kb-os megaplazmid, a PM1-ével csaknem megegyező (~99% azonosság) nukleotid szekvenciával [136]. Esetükben azonban a kromoszómabeli különbségek lényegesen nagyobbak bizonyultak, olyannyira, hogy a reszekvenálási kísérleteket nem tudták elvégezni ezekkel az izolátumokkal. Feltételezhető tehát, hogy a T29 és az USA-beli *Methylibium* törzsek esetében eltérő eredetű az MTBE-bontásra való képesség, illetve az egyes, vélhetően transzpozonok vagy más mobil genetikai elemek által indukált genomátrendeződések is másként játszódtak le. Minden bizonnyal ezekben a folyamatokban az egyes törzseket élőhely-specifikusan érő abiotikus és biotikus kölcsönhatásoknak is kiemelt szerepe volt.

A *Methylibium* sp. T29 **5.10** fejezetben leírt pT29A jelű plazmidját szintén megszekvenáltuk. A plazmid mérete 86 856 bp, 90 fehérjekódoló gént hordoz, GC-tartalma 67,1%. Itt található a kobalamin szintézisben részt vevő gének egy jelentős része, továbbá számos, a higany elleni rezisztenciáért felelős gén, valamint több transzpozáz kódozó szekvencia is. A pT29A plazmid (**16. ábra**) nukleotid szekvenciájának statisztikai adatait a **12. táblázat** foglalja össze, a fehérjekódoló gének COG kategóriák szerinti megoszlását a **13. táblázat** mutatja be.

A tény, miszerint a PM1-ben az MTBE-bontásban részt vevő gének a pPM1 megaplazmidon találhatóak [136], előzetesen azt valószínűsítette, hogy ezeket a géneket a T29-ben a pT29A plazmidon fogjuk megtalálni. Meglepő módon azonban egy kobalamin szintézis operontól eltekintve, mely lényegesen eltér a PM1-ben találhatóától, nem találtunk MTBE-bontásban szereplő géneket a T29 plazmidján. Ahogy a korábbiakban már

említettük, kobaltion vagy kobalamin a 2-HIBA intermedier továbbalakításához szükséges az MTBE metabolizmusa során [118].

Tulajdonság	Érték	Az összes százalékában
Genom mérete (bp)	4 449 424	100
Kódoló DNS szakasz hossza (bp)	3 743 112	84,1
GC-tartalom (bp)	3 057 506	68,7
Kontigok száma	608	-
Összes gén	4 806	-
Fehérjekódoló gének	4 754	98,9
RNS gének	52	1,1
Pszeudogének	196	4,1
Gének funkció megjelöléssel	3 498	72,8
COG kategóriába sorolható gének	3 376	71,0

10. táblázat A *Methylibium* sp. T29 draft genomszekvenciájának fontosabb statisztikai adatai.

A *Methylibium petroleiphilum* PM1 teljes genomszekvenciáját használva referenciaként szekvencia homológiák alapján sikerült azonosítanunk a T29 kromoszómáján az MTBE-bontás útvonalának valószínű komponenseit, köztük az MTBE monooxygenázt (MdpA) és a TBA monooxygenázt (MdpJ) is, melyek mindössze 84, illetve 81%-os azonosságot mutatnak aminosav szinten a PM1-es megfelelőikkel. Megfigyeltük, hogy a szubsztrát specifikitást meghatározó pozícióban lévő aminosav a PM1 MdpA-jához hasonlóan a T29-ben is treonin, nem pedig valin vagy egyéb hidrofób aminosav, melyek az MdpA közeli rokonaira, az alkán hidroxilázokra jellemzőek [132]. Mindez pedig a poláros treoninnak az enzimkatalízis során az éter-szubsztrát megkötésében játszott esetleges szerepére utalhat.

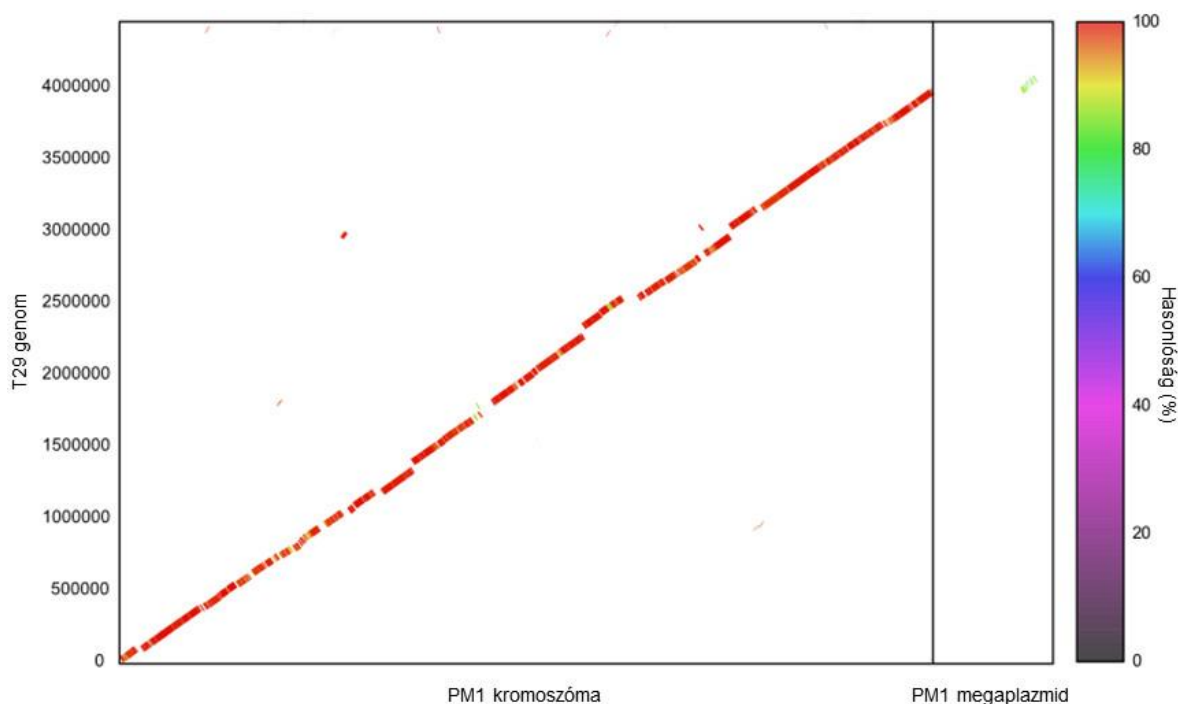
További fontos megfigyelés lehet, hogy a T29 *mdpA* génjének promótere teljesen különbözik a PM1 *mdpA*-jának promóterétől, ami lényegesen eltérő génszintű szabályozás meglétét valószínűsíti a két törzsben. Ellentétben tehát a T29 és a PM1 genomjainak nagy része között fennálló nagymértékű általános hasonlósággal, az MTBE metabolizmusában szereplő gének (**14. táblázat**) lényegesen kisebb szekvencia konzerváltságot és teljesen eltérő lokalizációt (plazmid [PM1], illetve kromoszóma [T29]) mutatnak a két törzsben, ami arra utalhat, hogy ezek a gének valószínűleg egy transzpozonon, esetleg valamilyen más típusú mozgó genetikai elem helyezkednek el, mely a PM1 esetében a megaplazmidon, míg a T29-ben a kromoszómán található.

Korábban a *Rhodococcus ruber* IFP 2001 esetében leírták, hogy az ETBE bontásáért felelős *eth* génklasztert mindkét irányból egy-egy 5,6 kb méretű, azonos direkt repeat szekvencia határolja, amelyek a II-es osztályba tartozó transzpozonok [108]. Megfigyelték, hogy a törzsben spontán kromoszómális deléció játszódhat le a két azonos direkt repeat szekvencia közötti homológ rekombináció révén, melynek során az IFP 2001 elveszíti az

Kód	Gének száma	Százalékos arány	Leírás
J	169	3,5	Transzláció, riboszóma-szerkezet és -biogenezis
A	2	0,0	RNS érés és módosítás
K	276	5,8	Transzkripció
L	190	4,0	Replikáció, rekombináció és repair
B	4	0,1	Kromatin szerkezet és dinamika
Y	0	0,0	Sejtmagi struktúrák
D	32	0,7	Sejtciklus szabályozás, sejtosztódás, kromoszóma szegregáció
V	59	1,2	Védekező mechanizmusok
T	284	6,0	Szignál-transzdukciós mechanizmusok
Z	0	0,0	Citoszkeleton
W	0	0,0	Extracelluláris struktúrák
M	218	4,6	Sejtfal és sejtmembrán biogenezis
N	100	2,1	Sejt motilitás
U	122	2,6	Sejten belüli anyagtranszport és szekréció
O	170	3,6	Poszt-transzlációs módosítás, fehérje turnover, chaperonok
C	292	6,1	Energiatermelés és -konverzió
G	126	2,6	Szénhidrát transzport és metabolizmus
E	295	6,2	Aminosav transzport és metabolizmus
F	72	1,5	Nukleotid transzport és metabolizmus
H	196	4,1	Koenzim transzport és metabolizmus
I	177	3,7	Lipid transzport és metabolizmus
P	236	5,0	Szervetlen ion transzport és metabolizmus
Q	118	2,5	Szekunder metabolitok bioszintézise, transzportja és katabolizmusa
R	456	9,6	Csak általános funkció megjelölés
S	337	7,1	Ismeretlen funkció
-	823	17,3	Nem szerepel COG kategóriában

11. táblázat A *Methylibium* sp. T29 draft genomszekvenciájában azonosított fehérjék COG (Clusters of Orthologous Groups) kategóriák szerinti megoszlása.

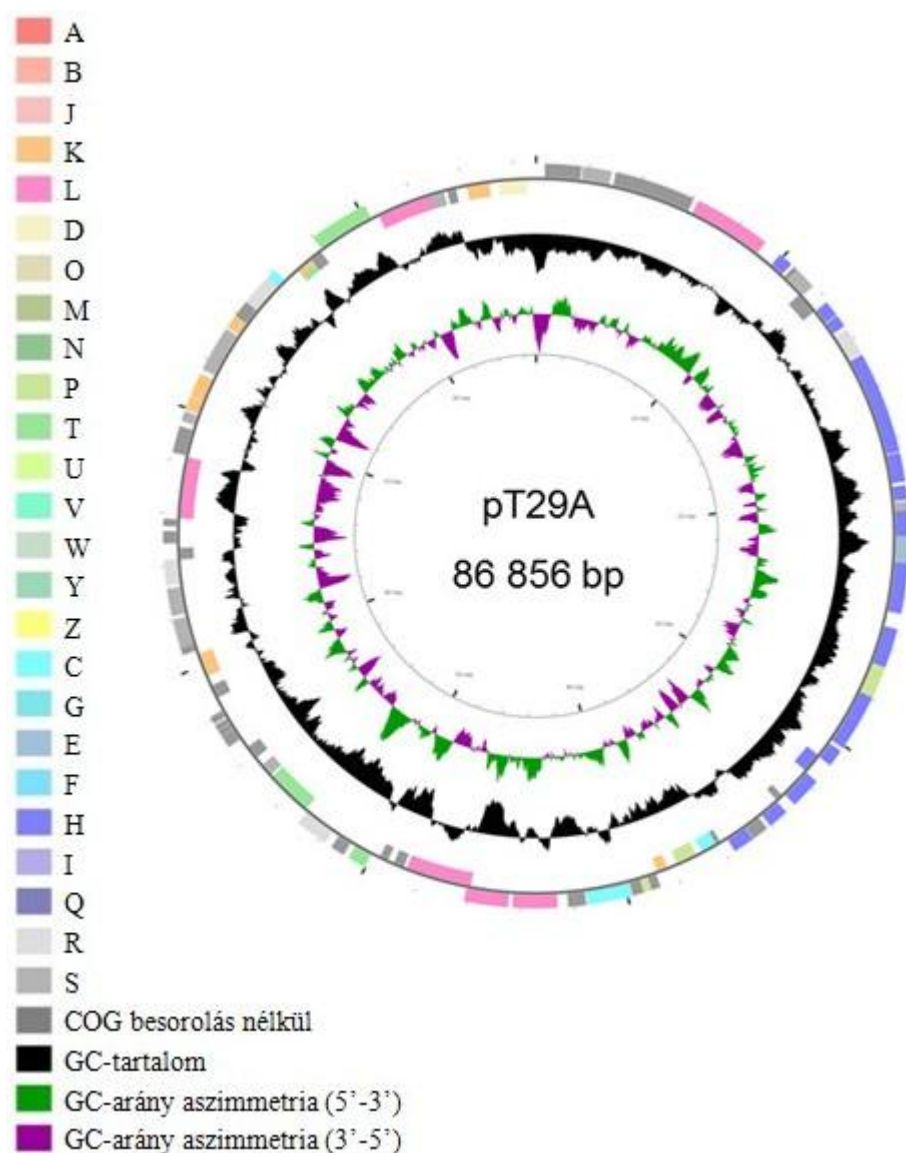
eth géneket, így ETBE-bontó képességét is. A pPM1 megaplazmidon közvetlenül az *mdpA* szomszédságában szintén található egy, az IS4 családba tartozó transzpozáz gén. Ezeknek és a rokon szekvenciáknak minden bizonnyal fontos szerepe van a fajok közötti horizontális géntranszferben, ezáltal pedig a különböző metabolikus útvonalak fenntartásában és evolúciójában is. A T29 esetében ugyan az *mdpA* gén közelében nem találtunk mobil genetikai elemeket, de szerte a kromoszómán nagyszámú transzpozázt, rekombinázt és integrázt tudtunk azonosítani, melyeknek korábbi vagy jövőbeli rekombinációs eseményekben egyaránt szerepe lehet.



15. ábra A *Methylibium* sp. T29 és a *Methylibium petroleiphilum* PM1 genomszekvenciájának összehasonlítása. A T29 draft genomszekvenciájának kontigjait a Mauve 2.3.1 [156] program segítségével rendeztük sorba a PM1 teljes genomszekvenciáját használva referenciaként. Az összehasonlítás és az ábrázolás MUMmer 3.0 szoftverrel [157] történt.

Számos egyedi szekvenciát azonosítottunk a T29-ben, amelyek a PM1-ből teljesen hiányoznak, köztük több antibiotikum (ampicillin, meticillin, szulfonamid, tetraciklin) és nehézfém (Cd, Co, Cu, Hg, Ni, Te, Zn) elleni rezisztenciát biztosító gént. A további T29-specifikus gének többek között különböző anyagcsere-folyamatokban szerepet játszó enzimeket, transzkripciós regulátorokat, szenzor fehérjéket, a restrikciós modifikációs rendszerek elemeit, fág és transzpozon eredetű fehérjéket, valamint egyéb hipotetikus fehérjéket kódolnak. A génannotációk alapján a T29 képes lehet több más

környezetszennyező vegyületcsoport tagjainak hasznosítására is, így például bizonyos klórozott aromás szénhidrogének, halogénezett szerves savak és policiklusos aromás szénhidrogének (PAH) lebontására, de mindezeket a tulajdonságokat kísérletesen még nem vizsgáltuk. A PathogenFinder 1.1 [176] programmal végzett elemzés szerint a törzs minden valószínűség szerint nem humán patogén (a patogenitás valószínűsége 0,083), ami a terepi alkalmazhatóság szempontjából mindenképpen biztató.



16. ábra A *Methylibium* sp. T29 pT29A jelű plazmidjának grafikus ábrázolása, néhány releváns tulajdonságának bemutatásával. A gének COG kategóriákba történő besorolása a WebMGA szerver [174] segítségével történt. A plazmid térképének ábrázolását CGView programmal [175] végeztük. A megjelenített tulajdonságok a következők (kívülről befelé haladva): gének az 5'-3' szálon, gének a 3'-5' szálon (COG kategóriák szerint színezve); GC-tartalom; GC-arány aszimmetria. (A COG kategóriák betűkódjainak feloldásai a **13. táblázat**ban találhatóak.)

Tulajdonság	Érték	Az összes százalékában
Méret (bp)	86 856	-
Kódoló DNS szakasz hossza (bp)	75 837	87,3
GC-tartalom (bp)	58 265	67,1
Kontigok száma	1	100,0
Összes gén	90	100,0
Fehérjekódoló gének	90	100,0
RNS gének	0	0,0
Pszeudogének	1	1,1
Gének funkció megjelöléssel	65	72,2
COG kategóriába sorolható gének	63	70,0

12. táblázat A pT29A jelű plazmid nukleotid szekvenciájának fontosabb statisztikai adatai.

A *Methylibium* sp. T29-B draft genomszekvenciája 4 430 398 bp méretű, melyet 409 kontigba tudtunk összeépíteni, GC-tartalma 68,8%, összesen 4750 gént tartalmaz, melyből 4696 a fehérjekódoló szekvenciák száma. A pT29B plazmid 76 724 bp méretű, GC tartalma 67,7% és 82 fehérjekódoló gént tartalmaz, köztük a pT29A-hoz hasonlóan a kobalamin szintézis és a higany elleni rezisztencia számos elemét, valamint több transzpozáz génjét is. Noha a T29-B genomszekvenciájában megtaláltuk valamennyi, a T29-ben is azonosított higany elleni rezisztenciáért felelős fehérje génjét, a kísérleti eredmények (5.7 fejezet) alapján a T29-B nem rezisztens a higannyal szemben a T29 által még tolerált koncentrációban (12,5 mg/l HgCl₂). Valószínű, hogy valamely hipotetikus fehérjeként azonosított, de a higany elleni rezisztenciában szerepet játszó géntermék hiánya vagy mutációja áll a megváltozott fenotípus hátterében.

Azért, hogy megállapíthassuk, hogy a *Methylibium* sp. T29-B MTBE-bontó képességének kiesésében mely gén(ek) hiánya állhat, a vad típusú törzs *de novo* genomszekvenálásából származó readekből a MIRA v. 4.0.2 szoftver (<http://mira-assembler.sourceforge.net/docs/DefinitiveGuideToMIRA.html>) mirabait nevű modulja segítségével kiszűrtük a T29-B *de novo* genomszekvenálásából nyert readeket. Az így visszamaradt T29-specifikus readeket a GS De Novo Assembler 2.9 program segítségével összerendeztük, majd az így előállt 29 kontigot (52 710 bp) Prokka 1.8 szoftverrel annotáltuk. Összesen 84 gént kaptunk, melyek közül 72 a kromoszómán, 12 a pT29A plazmidon lokalizálódik. Ezen T29-specifikus gének legnagyobb része, mind a kromoszómán, mind pedig a plazmidon találhatóak között, azonosított funkció nélküli hipotetikus fehérjét kódol (60, illetve 8). A fennmaradó gének által kódolt fehérjék

mindkét replikon esetében változatos szabályozó és metabolikus funkciókat látnak el (pl.: transzkripciós regulátor, endonukleáz, multidrog rezisztencia fehérje, metiltranszferáz, stb.). Előzetes transzkriptomikai vizsgálataink során a hiányzó gének között mindeddig még nem sikerült azonosítani azt/azokat, amely(ek) a funkcióvesztés hátterében állhat(nak), így a felelős gén(ek) megállapításához további vizsgálatok szükségesek. Ugyanakkor azonban, meglepő módon, az MTBE biodegradációjában részt vevő, a T29-ben azonosított valamennyi gén (**14. táblázat**) megtalálható a T29-B-ben is.

Kód	Gének száma	Százalékos arány	Leírás
J	0	0,0	Transzláció, riboszóma-szerkezet és -biogenezis
A	0	0,0	RNS érés és módosítás
K	8	8,9	Transzkripció
L	10	11,1	Replikáció, rekombináció és repair
B	4	0,1	Kromatin szerkezet és dinamika
Y	0	0,0	Sejtmagi struktúrák
D	1	1,1	Sejtciklus szabályozás, sejtosztódás, kromoszóma szegregáció
V	0	0,0	Védekező mechanizmusok
T	7	7,8	Szignál-transzdukciós mechanizmusok
Z	0	0,0	Citoszkeleton
W	0	0,0	Extracelluláris struktúrák
M	0	0,0	Sejtfal és sejtmembrán biogenezis
N	0	0,0	Sejt motilitás
U	0	0,0	Sejten belüli anyagtranszport és szekréció
O	0	0,0	Poszt-transzlációs módosítás, fehérje turnover, chaperonok
C	3	3,3	Energiatermelés és -konverzió
G	0	0,0	Szénhidrát transzport és metabolizmus
E	1	1,1	Aminosav transzport és metabolizmus
F	0	0,0	Nukleotid transzport és metabolizmus
H	19	21,1	Koenzim transzport és metabolizmus
I	0	0,0	Lipid transzport és metabolizmus
P	5	5,6	Szervetlen ion transzport és metabolizmus
Q	0	0,0	Szekunder metabolitok bioszintézise, transzportja és katabolizmusa
R	4	4,4	Csak általános funkció megjelölés
S	10	11,1	Ismeretlen funkció
-	22	24,4	Nem szerepel COG kategóriában

13. táblázat A *Methylibium* sp. T29 pT29A jelű plazmidjának nukleotid szekvenciájában azonosított fehérjék COG (Clusters of Orthologous Groups) kategóriák szerinti megoszlása.

Így azt feltételezzük, hogy vagy a szubsztrát érzékelésében és felvételében szerepet játszó, vagy pedig az *mdpA* gén transzkripció szabályozásában közreműködő gén(ek) tűnt(ek) el vagy vált(ak) inaktívvá.

Gén funkció	Génazonosító a <i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1-ben	Génazonosító a <i>Methylibium</i> sp. T29-ben	Azonosság nukleinsav szinten (%)	Azonosság aminosav szinten (%)
MTBE monooxygenáz	Mpe_B0606	X551_03232	79	84
rubredoxin	Mpe_B0602	X551_03234	nincs szignifikáns hasonlóság	43
rubredoxin reduktáz	Mpe_B0597	X551_01331	nincs szignifikáns hasonlóság	29
ATP-függő transzkripció regulátor	Mpe_B0601	X551_04638	74	85
hidroximetil- <i>terc</i> -butil-éter dehidrogenáz	Mpe_B0558	X551_02800	86	91
<i>terc</i> -butil-formiát karboxilészteráz	Mpe_A2443	X551_01122	99	99
<i>terc</i> -butil alkohol hidroxiláz	Mpe_B0555	X551_02402	79	81
Fe-S oxidoreduktáz	Mpe_B0554	X551_02401	82	82
2-metil-2-hidroxi-1-propanol dehidrogenáz	Mpe_B0561	X551_02804	83	85
hidroxiizobutiraldehid dehidrogenáz	Mpe_A0361	X551_03863	részleges homológia	36
2-hidroxiizobutiril-KoA ligáz	Mpe_B0539	X551_02557	85	94
2-hidroxiizobutiril-KoA mutáz	Mpe_B0541	X551_02559	89	92
2-hidroxiizobutiril-KoA mutáz C-terminális domain	Mpe_B0538	X551_02556	86	91
3-hidroxiizobutiril-KoA dehidrogenáz	Mpe_B0547	X551_02564	79	84
acetyl-KoA acetyltransferáz	Mpe_A3367	X551_00431	részleges homológia	45

14. táblázat Az MTBE lebontási útvonalában részt vevő gének a *Methylibium petroleiphilum* PM1-ben és a *Methylibium* sp. T29-ben.

A *Methylibium* sp. T29 és T29-B draft genomszekvenciája megtalálható a DDBJ/EMBL/GenBank adatbázisokban AZND000000000, illetve AZSN000000000 azonosító szám alatt. A pT29A és pT29B plazmidok teljes szekvenciája szintén elérhető a GenBank adatbázisban NC_024957, illetve NC_024958 azonosító alatt.

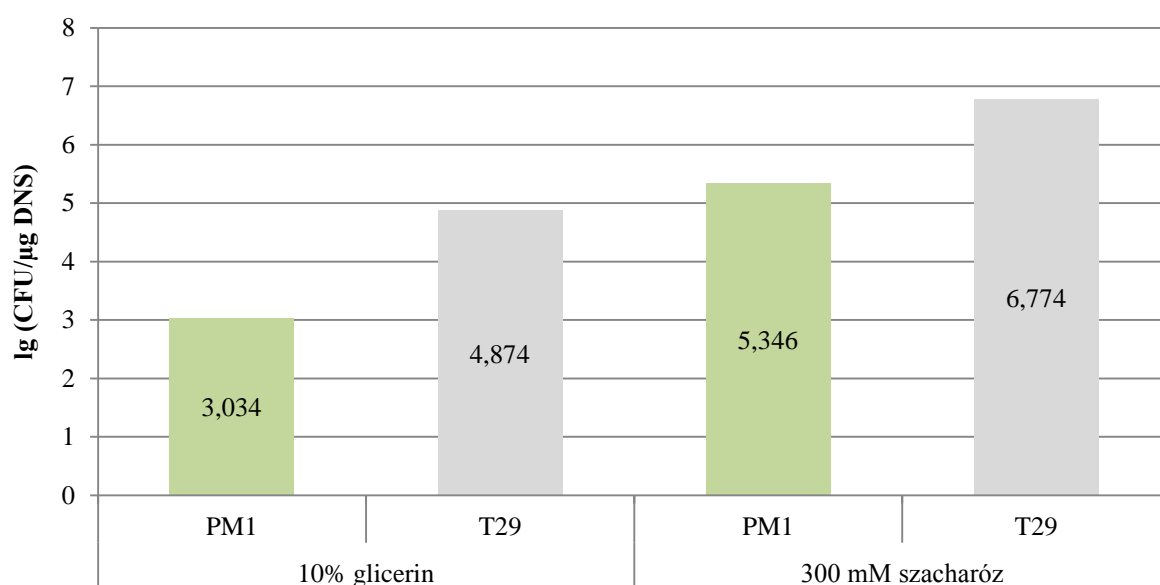
5.12 A *Methylibium* sp. T29 transzformációs hatékonyságának összehasonlítása a *Methylibium petroleiphilum* PM1-ével kétféle protokoll szerint

A későbbi funkcionális genetikai kísérletek megfelelő hatékonyságának biztosítása céljából elvégeztük a T29 számára leginkább alkalmas transzformálási protokoll kiválasztását és optimalizálását, melyet összekapcsoltunk a két törzs (T29 és PM1) transzformálhatóságának összehasonlításával. Előkísérleteink során több eljárást teszteltünk elektrokompetens T29 sejtek előállítására, melyek közül végül a ”300 mM szacharóz” módszer [160] bizonyult a leghatékonyabbnak, a **4.15** fejezetben bemutatott protokoll szerint végrehajtva. Kontroll eljárásként az irodalomban a PM1 transzformálására leírt ”10% glicerín” módszert [136] használtuk, melyet azonban néhány pontban módosítottunk, a **4.15** fejezetben foglaltak szerint.

A kísérletsorozat eredményei (**17. ábra**) azt mutatják, hogy a T29 mindkét módszerrel lényegesen hatékonyabban transzformálható, mint a PM1. Az irodalomban korábban leírt, a PM1 transzformálására alkalmazott eljárással (”10% glicerín”) közel 70-szer nagyobb transzformációs hatékonyságot kaptunk a T29 esetében, mint a PM1-nél. A ”300 mM szacharóz” protokoll alkalmazása nyomán, melyet eredetileg *Pseudomonas aeruginosa* törzsek transzformálására írtak le, mindkét törzs esetében két nagyságrendbeli növekedés volt megfigyelhető a transzformációs hatékonyságban a ”10% glicerín” módszerhez képest, továbbá a T29 ezzel a módszerrel is csaknem 30-szor nagyobb transzformációs hatékonyságot produkált a PM1-hez képest. Az elért maximális transzformációs hatékonyság értékek a PM1 és a T29 esetében $2,22 \times 10^5$, illetve $5,95 \times 10^6$ CFU/ μ g DNS voltak.

Mivel az irodalomban nem állnak rendelkezésre transzformációs hatékonyság adatok a PM1-re vonatkozóan a ”10% glicerín” módszert illetően, így nincs összehasonlítási alapunk, amelyhez eredményeinket viszonyítani tudnánk. *Pseudomonas aeruginosa*

törzsek transzformálása során a "300 mM szacharóz" protokoll alkalmazásával 10^7 és 10^{11} közötti transzformáns számot kaptak a vizsgált replikatív plazmidok esetében. A mi értékeink a T29 esetében ennek az intervallumnak az alsó határát közelítik meg, de további optimalizálással a *Methylibium* izolátumoknál is minden bizonnyal tovább lehet majd növelni a transzformációs hatékonyságot.



17. ábra A *Methylibium* sp. T29 és a *Methylibium petroleiphilum* PM1 maximális transzformációs hatékonyságának összehasonlítása kétféle protokoll alapján, az 1 μg plazmid DNS-re (pBBR1MCS-2) vonatkoztatott transzformáns értékek bemutatásán keresztül.

Mindazonáltal egyértelműen elmondhatjuk, hogy sikerült adaptálnunk egy eredetileg *Pseudomonas* izolátumokra leírt transzformációs módszert a *Methylibium* törzsekre, amely több nagyságrendbeli növekedést eredményezett a transzformánsok számában, továbbá lényegesen időhatékonyabbnak is bizonyult, mint a szakirodalomban eddig leírt módszer. A T29 nagyobb transzformációs hatékonyságát a jövőben metagenomikai screen vizsgálatok (pl.: környezeti mintákból izolált metagenom könyvtárak transzformálása) során kívánjuk majd kamatoztatni.

5.13 A *Methylibium* sp. T29 *mdpA* knockout mutáns vonalainak növekedési tulajdonságai

A pSm18-*mdpA*529 és a pSm18-*mdpA*784 jelű konstrukciókkal történő transzformálás eredményeképpen két mutáns vonalat sikerült létrehozni a vad típusú *Methylibium* sp. T29-ből. Az *mdpA*_KO529 és az *mdpA*_KO784 jelölésű vonalak esetében teszt PCR reakciókkal és ellenőrző Sanger-szekvenálással is megbizonyosodtunk arról, hogy a sztreptomicin rezisztenciáért felelős kazetta homológ rekombináció révén a kívánt helyre, vagyis az *mdpA* génbe integrálódott, biztosítva ezáltal, hogy arról elméletileg funkcióképes géntermék nem keletkezhet. Ugyanakkor sikerült izolálnunk egy olyan sztreptomicin rezisztens mutánst is, amelyben intakt *mdpA* gént tudtunk kimutatni. Ezt az illegitim rekombináns *Methylibium* sp. T29-Sm-nek neveztük el. Ez utóbbi vonalat a szubsztráthasznosítási kísérletek során kontrollként használtuk fel annak megállapítására, hogy a sztreptomicin rezisztencia kifejeződése önmagában mennyivel veti vissza a törzs növekedési képességét és sebességét MTBE-n a vad típushoz képest.

A növekedési tesztek nem várt eredményekkel is szolgáltak az *mdpA* génnek az üzemanyag-oxigenátok bontásában betöltött szerepét illetően. A kísérletek eredményei ugyanis azt mutatták, hogy az *mdpA* KO-k esetében nemcsak az MTBE-bontási képesség veszett el, de ezzel egyidejűleg a TAME-n és a TBA-n, mint egyedüli szén- és energiaforrásokon történő növekedésre való képesség is. A GC-MS analitikai adatok alapján ugyanis, mind az MTBE, mind pedig a TAME és a TBA esetében is az abiotikus kontrollok esetében visszamért koncentrációkkal (~159 mg/l) lényegében megegyező értékeket kaptunk a KO vonalagnál (~155 mg/l), míg a vad típusú T29 és az illegitim rekombináns T29-Sm is teljesen elfogyasztotta a 200 mg/l koncentrációban adagolt szubsztrátokat a kísérlet végére.

Azt már korábban a PM1-nél is leírták, hogy az MdpA fehérje bizonyos körülmények között részt vesz a TBA-bontás szabályozásában, de közvetlenül nem felelős érte [132]. Ezt alátámasztották az enzim inhibíciós kísérletek is, melyek szerint az MTBE és a TBA bontásáért minden valószínűség szerint két különböző monooxygenáz felelős a PM1-ben [132]. Később az *Aquicola tertiarycarbonis* L108-ban azonosítottak egy ftalát dioxigenázzal rokon fehérjét és oxidoreduktáz alegységét, amelyek TBA-n történő növekedés során erősen indukálódtak [123]. A két fehérje kódoló génjeivel csaknem

azonos szekvenciákat megtalálták a PM1-ben is (*mdpJ/mdpK*), melyekről ez alapján feltételezik, hogy a PM1-ben felelősek a TBA bontásáért.

A kísérleti eredményeink alapján a leglényegesebb különbség a T29 és a PM1 *mdpA* mutáns vonalai között, hogy míg a T29 esetében az *mdpA* gén kiütése az MTBE- és a TBA-bontó képesség egyidejű elvesztését jelentette, addig a PM1-ből létrehozott *mdpA* mutáns vonal MTBE-n ugyan szintén nem nőtt, viszont TBA-n továbbra is képes volt szaporodni [132]. Mindez pedig a PM1-étől lényegesen eltérő gén szintű szabályozás meglétét valószínűsíti a *Methylibium* sp. T29-ben. Míg korábban a PM1-nél nem vizsgálták az *mdpA* gén részvételét a TAME metabolizmusában, addig a mi eredményeink igazolták, hogy az *mdpA*-nak valamennyi üzemanyag-oxigenát biodegradációjában szerepe van a T29-ben. Minden valószínűség szerint az MTBE és a TAME lebontása során a kezdő oxidációs lépést katalizálja, míg a TBA esetében a PM1-nél leírt szabályozó funkcióhoz hasonló feladatot lát el. Az a megfigyelés, miszerint 2-HIBA-n valamennyi törzs felnőtt, arra utal, hogy az *mdpA* génnek és termékének csak a vizsgált üzemanyag-adalékok lebontási útvonalának kezdő lépéseiben van szerepe.

A T29-re jellemző fenotípus visszaállítását célzó komplementációs kísérleteink nem jártak sikerrel. A vad típusú törzs intakt *mdpA* génjét és annak valószínű promóterét tartalmazó fragmentet pBBR1MCS2 vektorba klónoztuk, majd betranszformáltuk a mutáns vonalba. Ennek hatására azonban nem állt helyre az MTBE-bontó képesség, a komplementáló plazmidot hordozó vonalak nem voltak képesek MTBE-n, mint egyedüli szén- és energiaforráson, kis kiindulási sejtszámról felnőni. Korábban hasonló eredménnyel jártak a PM1-gyel, a miénkhez hasonló elrendezésben végzett azonos célú kísérletek is [132].

Vizsgálataink alapján az *mdpA* gén molekuláris markerként alkalmas lehet a jövőbeni bioremediációs célú terepi kezelések alkalmával a *Methylibium* sp. T29 nyomon követésére. A törzs *mdpA* génjének amplifikálására tervezett specifikus primerek (MO29: 5'-CCG CCA GAT CGT CAT CCA CAA AG-3' és MO30: 5'-TTC AAG CGT CTC AAT CGG GCT C-3') segítségével ugyanis elvégeztük a T29 kimutatását valamennyi rendelkezésünkre álló hazai, MTBE-vel szennyezett területről származó talajvízmintából, valamint a BAY-BIO törzsgyűjteményében megtalálható, eredetileg Belgiumban, Franciaországban, Németországban, valamint az Egyesült Államokban izolált és dúsított MTBE-bontó konzorciumokból. A törzs nem volt detektálható egyik külföldi konzorciumban sem, továbbá a hazai minták közül is egyedül a Tiszaújváros térségéből származóakban volt kimutatható a jelenléte. A kapott eredmények így arra engednek

következtetni, hogy jelenlegi ismereteink szerint a *Methylibium* sp. T29 kizárólag Magyarországon, azon belül is csak Tiszaújváros környékén fordul elő, ahol minden bizonnyal fontos szerepe lehet az MTBE szennyezések természetes koncentráció-csökkenésében.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A világszerte folyamatosan növekvő üzemanyagigényekkel egyidejűleg emelkedik az éter típusú üzemanyag-adalékok iránti kereslet is, hiszen ezek a vegyületek az oktánszám növelésén túlmenően nagyban hozzájárulnak az üzemanyagok tökéletesebb égéséhez is, ami által lényegesen csökken a közlekedésből származó káros légköri kibocsátások mennyisége. Azonban elsősorban kémiai szerkezetükből adódóan az üzemanyag-éterek a környezetbe kikerülve sokkal jobban ellenállnak a különböző természetes fizikai-kémiai és biológiai lebontó folyamatoknak, mint az üzemanyagok egyéb komponensei, így kiváló vízzoldhatóságuknak köszönhetően nagy kiterjedésű és tartós vízszennyezéseket okozhatnak. Noha ökotoxikológiai és humán egészségügyi szempontból végzett vizsgálataik ellentmondásos eredményekkel szolgáltak, legelterjedtebben és legnagyobb mennyiségben alkalmazott képviselőjüket, az MTBE-t, a potenciális humán karcinogén vegyületek közé sorolták. Az utóbbi időben hazánkban is egyre több MTBE-vel szennyezett terület vált ismertté, melyek kármentesítése a közeljövőben esedékessé válhat. Ehhez költséghatékonysági szempontból a legjobb választás a bioaugmentáció lehet, melyhez azonban szükség van egy, a célvegyületet hatékonyan bontó, mikrobiológiailag jól jellemzett baktériumtörzsrre, amelynek terepi nyomon követése is megoldott. Ennek megfelelően munkánk során célunk az volt, hogy MTBE bontására képes egyedi törzset izoláljunk és elvégezzük annak legfontosabb mikrobiológiai és molekuláris biológiai vizsgálatát, megalapozva ezáltal az izolátum jövőbeli terepi alkalmazását.

Munkánk során először Magyarország területéről származó, jellemzően üzemanyag eredetű szennyezésekkel terhelt talajvízminták felhasználásával MTBE-n, mint egyedüli szén- és energiaforráson történő dúsítással bontóképes konzorciumok izolálását végeztük el. Összesen öt, hatékony MTBE-bontásra képes konzorciumot izoláltunk, melyek közül a két legintenzívebb növekedésre képes dúsítás mikrobiális összetételét piroszekvenálással meghatároztuk. A rendelkezésre álló korlátozott számú irodalmi adattal összevetve nagymértékben hasonló eredményeket kaptunk, hiszen a domináns törzs (*phylum*) mindkét rendszerünkben a *Proteobacteria* volt. A meghatározó nemzetségek közül kiemelkedő volt a *Methylibium* részaránya mindkét dúsításban.

A konzorciumokból hat egyedi, MTBE-bontásra képes törzset sikerült izolálnunk, melyek mindegyike a 16S rDNS szekvencia homológia vizsgálatok alapján a legközelebbi

rokonságot a *Methylibium petroleiphilum* PM1-gyel mutatta. Az izolátumokat a PM1-gyel való rokonság mértéke, az MTBE-bontás sebessége és a forrásukként szolgáló konzorcium alapján két csoportba tudtuk sorolni. Az RL konzorciumból elkülönített M2, M15 és T29 jelű törzsek 16S rDNS szekvenciája teljesen megegyezett a PM1-ével és MTBE degradációs sebességük lényegesen nagyobb volt, mint a 8K konzorciumból izolált M6, M28 és M48 jelű törzseké, melyek 16S rDNS szekvenciája egy nukleotid eltérést mutatott a PM1-éhez képest. Elvégeztük az üzemanyag-oxigenátok bontása során ezidáig azonosított gének PCR-alapú kimutatási tesztjét valamennyi konzorciumban, illetve a két izolátum-csoport 1-1 tagján. A vizsgálatba bevont gének közül egyet sem tudtunk kimutatni sem az RL konzorciumból, sem pedig a T29 jelű izolátumból. Ezért, valamint az előzetes analitikai vizsgálatok eredményei alapján a T29-et választottuk ki további részletes vizsgálatokra.

Az elektronmikroszkópos felvételek tanúsága szerint a törzs sejtsíri coccobacillus morfológiát mutatnak, egy részük polárisan egy flagellumot visel. A sejtek Gram-negatívan festődnek, $\frac{1}{2} \times$ TSA táptalajon krémszínű, MSA+MTBE táptalajon pedig fakósárga telepeket képeznek. A törzset *Methylibium* sp. T29 néven, NCAIM B.02561 azonosító alatt a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében is elhelyeztük.

Részletesen megvizsgáltuk a törzs által hasznosítható szubsztrátok spektrumát, melynek során megállapítottuk, hogy a T29 az üzemanyag-oxigenátok közül egyedüli szén- és energiaforrásként az MTBE-n és a TBA-n kívül a TAME-t is hasznosítani tudja, csakúgy, mint a PM1, és a PM1-hez hasonlóan ETBE-n és DIPE-n nem képes szaporodni. Több lényeges metabolikus tulajdonságban azonban eltért a PM1-től, így nem volt képes *n*-alkánokon, fenolon, formaldehiden és tejsavon nőni, továbbá a BTEX komponensek közül egyedül a benzolt tudta hasznosítani a növekedéséhez. Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatok további eltéréseket tártak föl a két törzs között, hiszen míg a PM1 valamennyi vizsgált antibiotikumra szenzitív volt, addig a T29 ampicillin és tetraciklin jelenlétében is tudott növekedni. Higany jelenlétében szintén eltérés volt megfigyelhető a két törzs növekedésében, hiszen míg a T29 12,5 mg/l HgCl₂ mellett még szaporodott, addig a PM1 csak a Hg²⁺-t nem tartalmazó kontroll rendszerekben tudott nőni.

A T29 és a PM1 MTBE-bontási sebességének összehasonlításakor a nulladrendű sebességi állandók meghatározásán keresztül megállapítottuk, hogy a két törzs a vizsgált körülmények között gyakorlatilag azonos sebességű MTBE-bontásra képes. Ugyanakkor a PM1 esetében a kísérlet során kismértékű, átmeneti TBA akkumuláció volt megfigyelhető,

ami arra utalhat, hogy a PM1-ben a TBA oxidációja lassabban megy végbe, mint a T29-ben. Az MTBE lebontási útvonalában szereplő intermedierek vizsgálata során két vegyületet sikerült GC-MS analitikával azonosítanunk: TBA-t és acetont. Az aceton kimutatása jelentős eredmény, hiszen eddig korábban csak a *Mycobacterium austroafricanum* IFP2012 esetében igazolták a jelenlétét. Ez alapján feltételezzük, hogy a T29-ben az MTBE lebontása során a 2-HIBA központi intermediérből egy dekarboxiláz enzim 2-propanolt állít elő, melyet egy alkohol dehidrogenáz enzim alakít acetonná. Az aceton hidroxiacetonon keresztül piruváttá oxidálódik, mely a központi anyagcsere folyamatokba belépve hasznosul.

Elvégeztük a *Methylibium* sp. T29 és M28, valamint a PM1 genomjainak összehasonlítását négy különböző restrikciós enzimmel történő emésztést követő PFGE vizsgálattal. A három törzs esetében kapott restrikciós mintázatok nagyfokú eltéréseket tártak föl DNS szinten, mely alapján bizonyosságot nyert, hogy noha a három izolátum nagyon közeli rokonságban van egymással ($\geq 99\%$ azonosság a 16S rDNS szekvenciákban), a teljes genomok szintjén mégis jelentős eltérések vannak közöttük, ami magyarázza a korábbi PCR-alapú detektálások sikertelenségét a T29 esetében.

A *Methylibium* sp. T29 NA és NB tápközegeken történő hosszabb idejű fenntartása során sikerült izolálnunk egy spontán funkcióvesztéses mutáns vonalat, melyet T29-B-nek neveztünk el. A T29-B nem volt képes sem MTBE-n, sem pedig TAME-n növekedni, TBA-n azonban továbbra is jól nőtt. Ezenfelül rezisztens volt ampicillinre és tetraciklinre is, viszont higany jelenlétében nem tudott nőni. A PM1 mellől is elkülönítettünk egy mutáns vonalat (PM1-B), mely nem nőtt MTBE-n, TBA-n és TAME-n sem, továbbá nem volt rezisztens ampicillinre, tetraciklinre és higanyra sem.

S1-PFGE analízis segítségével megvizsgáltuk, hogy a vad típusú, illetve a funkcióvesztéses mutáns *Methylibium* izolátumok hordoznak-e plazmidokat, melyek jelenléte vagy hiánya esetlegesen magyarázhatja a megfigyelt fenotípus változásokat. A T29 és a T29-B esetében sikerült egy-egy hasonló méretű, 50-90 kb tartományba eső plazmid jelenlétét kimutatnunk. Az M28 és a PM1-B esetében nem kaptunk plazmidra utaló jelet, viszont a PM1 esetében elsőként sikerült kísérletes bizonyítékot szolgáltatnunk a 600 kb-os megaplazmid jelenlétére. Ezáltal igazoltuk, hogy a T29 nem hordozza a PM1-re jellemző megaplazmidot, így feltételeztük, hogy a két törzs genomszerveződése jelentősen eltér. Az eddigiekben részletezett különbségek hatására úgy döntöttünk, hogy mind a T29, mind pedig a T29-B teljes genomját, valamint mindkét törzs plazmidját (pT29A, ill. pT29B) *de novo* megszekvenáljuk.

A *Methylibium* sp. T29 draft genomja 4 449 424 bp méretű, GC tartalma 68,7%, 4806 gént tartalmaz. A szoftveres összehasonlítások alapján a T29 draft genomszekvenciája átlagosan 97%-os azonosságot mutat a PM1 kromoszómájával, illetve 85%-ot a PM1 megaplazmidjának egy kis részletével. A leglényegesebb eltérés, hogy a pPM1 megaplazmid legnagyobb része hiányzik a T29-ből, a meglévő homológ szekvenciák pedig a kromoszómán találhatóak. A pT29A jelű plazmid mérete 86 856 bp, 90 fehérjekódoló gént hordoz, GC-tartalma 67,1%. A plazmidon az előzetes várakozásokkal ellentétben sem antibiotikumok elleni rezisztenciáért felelős, sem pedig az MTBE bontásában közvetlenül szerepet játszó géneket nem találtunk. Mindössze egy kobalamin szintézis operont azonosítottunk rajta, amelynek a 2-HIBA továbbalakítása során lehet szerepe, ezenfelül a higany elleni rezisztencia számos eleme is itt lokalizálódik. Szekvencia homológiák alapján, a PM1 genomját használva referenciaként, valamennyi, a PM1-ben azonosított, MTBE-bontásban szerepet játszó gént sikerült megtalálnunk a T29 genomszekvenciájában. Ellentétben azonban a két törzs genomjainak nagy része között fennálló nagymértékű általános hasonlósággal, az MTBE metabolizmusában szereplő gének lényegesen kisebb szekvencia konzerváltságot és teljesen eltérő lokalizációt mutattak, ami arra utalhat, hogy ezek a gének vélhetően valamilyen mozgó genetikai elemen helyezkednek el, mely a PM1 esetében a megaplazmidon, míg a T29-ben a kromoszómán található. Számos egyedi szekvenciát azonosítottunk a T29 genomjában, melyek a PM1-ből teljesen hiányoznak, így például több antibiotikum és nehézfém elleni rezisztenciát biztosító gént. A *Methylibium* sp. T29-B draft genomszekvenciája 4 430 398 bp méretű, GC-tartalma 68,8%, összesen 4750 gént tartalmaz, a pT29B plazmid pedig 76 724 bp méretű, GC-tartalma 67,7% és 82 fehérjekódoló gént hordoz. A T29 és a T29-B draft genomszekvenciáinak összehasonlító vizsgálata alapján 84 gén hiányzik a T29-B genomjából, közülük azonban előzetes transzkriptomikai vizsgálataink során még nem sikerült azonosítanunk az MTBE-bontási képesség elvesztésének hátterében álló gén(ek)e)t, így a felelős szekvenciák megtalálásához még további vizsgálatok szükségesek.

A funkcionális genetikai kísérletek megkezdése előtt megvizsgáltuk és összehasonlítottuk a T29 és a PM1 transzformálhatóságát kétféle elektroporációs protokoll szerint. Az eredmények alapján a T29 mindkét vizsgált módszerrel hatékonyabban transzformálható, mint a PM1, továbbá az általunk *Methylibium* törzsekre adaptált, eredetileg *Pseudomonas* fajokra leírt eljárás hatékonyabbnak bizonyult mindkét törzs esetében, mint az irodalomban a PM1 transzformálásához korábban publikált módszer.

Az *mdpA* gén funkcionális vizsgálata során a vad típusú T29-ből két *mdpA* knockout mutáns vonalat hoztunk létre. A szubsztráthasznosítási kísérletek eredményei alapján ezek az *mdpA* T29 törzsek nemcsak MTBE-bontó képességüket veszítették el, hanem TBA-n és TAME-n sem voltak képesek növekedni. Így igazoltuk, hogy a *Methylibium* sp. T29-ben az *mdpA* génnek a törzs által hasznosítható valamennyi üzemanyag-oxigénát biodegradációjában fontos szerepe van. Minthogy a PM1-ből létrehozott *mdpA* KO mutáns továbbra is képes volt TBA-n növekedni, így valószínű, hogy a két törzsben az *mdpA* gén működése és szabályozása eltérő módon alakul. A mutáns fenotípus helyreállítását célzó komplementációs kísérleteink nem jártak sikerrel, ahogy korábban a PM1 esetében sem tudták az MTBE-bontó képességet a miénkhez hasonló elrendezésben revertálni.

Az T29 *mdpA* génjére tervezett primerek segítségével elvégeztük a törzs kimutatási próbáját a rendelkezésre álló hazai, MTBE-vel szennyezett talajvízmintákból, illetve több külföldi MTBE-bontó konzorciumból. A T29 nem volt kimutatható egyik külföldi dúsításból sem, továbbá a hazai minták közül is egyedül csak a Tiszaújváros környékéről származóakban volt igazolható a jelenléte.

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a *Methylibium* sp. T29 egy Magyarországon izolált, jelenlegi ismereteink szerint kizárólag hazánkban előforduló, kiváló MTBE- és TBA-bontó képességgel rendelkező izolátum, melynek *mdpA* génje molekuláris markerként alkalmas a törzs kimutatására környezeti mintákból is. A közelmúltban a törzs egy terepi teszt során, MTBE-tartalmú üzemanyagokkal súlyosan szennyezett talajvíz zóna bioremediációs kezelésénél már biztató eredményekkel szolgált, így a jövőben mindenképpen ideális választás lehet a hazai, MTBE-vel szennyezett területek bioaugmentációs kármentesítéséhez.

7. SUMMARY

The need for fuel additive ethers grows simultaneously with the continuous growth in demand for fuels worldwide. These compounds, beyond increasing octane ratings, significantly contribute to the more complete combustion of gasoline, hereby they considerably help to reduce the amount of harmful emissions from traffic. However, particularly due to their chemical structure, fuel ethers are much more recalcitrant to natural physicochemical and biological degradation processes than other components of gasoline. Hence, because of their excellent water solubility they can cause extensive and persistent pollutions in aquatic environments. Though investigations concerning ecotoxicological and human health issues provided contradictory results, their most widespread representative - MTBE - was classified as a potential human carcinogen. In Hungary, the number of sites contaminated with MTBE has been growing in recent years and their remediation may start in the near future. For this purpose, bioaugmentation can be the ideal alternative in terms of cost efficiency, but it requires a microbiologically well-characterized and traceable bacterial strain capable of the efficient degrading of the target compound. Accordingly, we aimed to isolate an individual MTBE-degrading strain and carry out the essential microbiological and molecular biological studies necessary to establish its prospective field application.

Firstly, using Hungarian groundwater samples mainly contaminated with gasoline, we performed the isolation of MTBE-degrading consortia by enrichment on MTBE as the sole source of carbon and energy. We succeeded to isolate five consortia being able to effectively degrade MTBE and other fuel oxygenates. The most efficient growers, RL and SC, were analyzed using pyrosequencing to assess their microbial diversity. The predominant phylum in both of our enrichments was *Proteobacteria*, which finding is in great accordance with the limited number of available data in the literature. Among the prevalent genera, *Methylibium* had significant proportions both in RL and in SC with almost 50% and 30%, respectively.

From the consortia we isolated six individual MTBE-degrading strains and the 16S rDNA sequence homology analyses indicated that their closest relative is *Methylibium petroleiphilum* PM1. The isolates could be divided into two groups based on the degree of relatedness to PM1, the rate of MTBE degradation and the consortium they were isolated from. The 16S rDNA sequence of strains M2, M15 and T29 isolated from RL was identical

to PM1's and their MTBE degradation rate was substantially higher than that of strains M6, M28 and M48, which had a single nucleotide substitution in the 16S rDNA sequence compared to PM1's and they were originated from 8K. We carried out the PCR-based detection of the genes identified in the degradation of fuel oxygenates so far on all consortia and on one representative of both isolate groups. None of the examined genes could be detected either in the RL consortium or in isolate T29. Based on this result and preliminary analytical data, strain T29 was chosen for further detailed investigation.

According to electron micrographs, the cells of T29 show coccobacillus morphology and a fraction of them possesses a single polar flagellum. Cells stained Gram-negative and formed cream colored colonies on $\frac{1}{2} \times$ TSA plates and pale yellow ones on MSA+MTBE plates. The strain was deposited as *Methylibium* sp. T29 into the National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms under the accession number NCAIM B.02561.

We investigated the spectrum of the metabolizable substrates in detail. Of the fuel oxygenates tested, similarly to PM1, T29 could utilize MTBE, TBA and TAME, but not ETBE and DIPE as the sole source of carbon and energy. However, T29 differed from PM1 in several significant metabolic properties, e.g. it could not grow on *n*-alkanes, phenol, formaldehyde and lactic acid and of the BTEX compounds it could only utilize benzene for growth. Antibiotic resistance studies revealed further differences between the two strains, since PM1 was sensitive to all tested antibiotics, but T29 could grow in the presence of ampicillin and tetracycline, too. There was also a difference in the growth of T29 and PM1 in the presence of mercury. T29 could grow at a HgCl_2 concentration of 12.5 mg/l, but PM1 could only propagate in the control systems not containing Hg^{2+} .

By determining the zero-order rate constants, we compared the MTBE degrading capabilities of T29 and PM1 and concluded that under the applied conditions the two strains had almost identical degradation rates. However, we could observe some transient TBA accumulation at PM1 which may suggest that TBA oxidation is somewhat slower in PM1 than in T29. In the course of searching for the possible intermediates of the MTBE degradation pathway by GC-MS analysis we could identify two compounds: TBA and acetone. Detection of acetone is a significant achievement, since, thus far, it was only verified from *Mycobacterium austroafricanum* IFP2012. According to our findings, we assume that during MTBE degradation in T29 a decarboxylase enzyme produces 2-propanol from central metabolite 2-HIBA which is then converted into acetone by an alcohol dehydrogenase. Acetone is oxidized to pyruvate via hydroxyacetone which enters the central metabolic pathways.

We compared the genomes of *Methylibium* sp. T29, *Methylibium* sp. M28 and *Methylibium petroleiphilum* PM1 with pulsed field gel electrophoresis after treated with four different restriction enzymes. The obtained restriction patterns revealed significant differences at the nucleotide level, verifying that despite the very high degree of relatedness ($\geq 99\%$ identity in the 16S rDNA sequences) there are major differences among the isolates at the genomic level. This observation served as a possible explanation for the fail of the earlier PCR-based gene detections in T29.

During long-term culturing of *Methylibium* sp. T29 on NA and NB media we isolated a spontaneous loss-of-function mutant line, designated as T29-B, which lost its ability to grow on MTBE and TAME, but still grew well on TBA. Moreover, it was resistant to ampicillin and tetracycline, but could not grow in the presence of Hg^{2+} . We also separated a mutant PM1 line (PM1-B) which could grow neither on MTBE and TAME nor on TBA and was sensitive to ampicillin, tetracycline and mercury.

We carried out S1-PFGE analyses to detect plasmids in wild-type and loss-of-function mutant *Methylibium* strains to ascertain whether the presence or the lack of them may explain the observed phenotypic changes. We detected a plasmid both in T29 and in T29-B with a similar size of approximately 50-90 kb and designated them as pT29A and pT29B, respectively. There was no sign of plasmids in M28 and in PM1-B, but in PM1 we provided the first experimental evidence for the presence of the 600 kb megaplasmid. Consequently, we proved that T29 does not harbor the PM1-type megaplasmid and thus, we supposed that the genetic arrangement of the two strains was substantially different. Based on the differences between the *Methylibium* isolates (T29, T29-B, PM1) discussed so far, we decided to sequence *de novo* both the entire genomes and the plasmids of T29 and T29-B, too.

The size of the draft genome sequence of *Methylibium* sp. T29 is 4,449,424 bp, its G+C content is 68.7% and harbors 4,806 predicted genes. Comparison of the two genomes revealed that the draft genome sequence of T29 shows an average identity of 97% to the PM1 chromosome and 85% to a small part of the pPM1 megaplasmid. The most important differences are the absence of the most parts of the PM1-type megaplasmid from T29 and the fact that the extant homologous sequences are located on the chromosome. The pT29A plasmid was found to be 86,856 bp in size, it carries 90 protein coding genes and has a G+C content of 67.1%. Contrary to our previous assumptions, we found neither plasmid-bound antibiotic resistance genes nor ones directly involved in MTBE degradation. On pT29A we could only identify a number of elements of mercury resistance and a

cobalamin synthesis operon which may have a role in the transformation of 2-HIBA. Based on nucleotide sequence homologies, using the complete genome sequence of PM1 as a reference, we could find all the putative genes involved in the MTBE metabolism of T29 previously described in PM1. However, in contrast to the considerably high similarity of the majority of the two genomes, the genes involved in the MTBE metabolism of PM1 and T29 show significantly lower sequence conservation and different localization (plasmid versus chromosome). By these observations we hypothesize that these genes are located on a mobile genetic element which resides on the megaplasmid in PM1 and on the chromosome in T29. We identified several unique sequences in the genome of T29, missing from PM1's, coding for resistances to different antibiotics and heavy metals. The draft genome sequence of *Methylibium* sp. T29-B is 4,430,398 bp long, it has a G+C content of 68.8% and carries 4,750 genes. pT29B is 76,724 bp in size, it has a G+C content of 67.7% and bears 82 protein coding genes. Comparative analysis of the draft genome sequences of T29 and T29-B indicated that 84 genes are missing from T29-B. During preliminary transcriptomic analyses we could not identify any possible candidate sequences responsible for the loss of MTBE degrading ability in T29-B, so finding these genes requires further investigations.

Before starting the functional genetic experiments, we assessed and compared the transformation efficiencies of T29 and PM1 using two different electroporation protocols. According to our results, T29 can be transformed much more efficiently with both of the tested methods than PM1. Furthermore, one of the protocols, originally described for the transformation of *Pseudomonas* spp., was successfully adapted to *Methylibium* strains and proved to be more effective at both strains than the one published for the transformation of PM1 before.

To analyze the function of *mdpA* gene, we created two *mdpA* knockout mutant lines from wild-type T29. Results of the substrate utilization tests showed that these *mdpA*⁻ T29 strains lost the ability to degrade not only MTBE but also TBA and TAME. Consequently, we verified that the *mdpA* gene has an important role in the biodegradation of all fuel oxygenates in *Methylibium* sp. T29. Since, according to literature data, the *mdpA* KO mutant of PM1 was still able to degrade TBA, it is likely that the function and regulation of *mdpA* are considerably different in the two strains. Our efforts to restore the wild-type phenotype in T29 during complementation experiments failed just like in PM1 before.

Using primers designed to amplify the *mdpA* gene of *Methylibium* sp. T29, we carried out the detection probe of T29 from a series of Hungarian groundwater samples and

several MTBE-degrading consortia originating from outside of Hungary. We could not detect T29 from any foreign MTBE-degrading enrichment cultures, moreover, of the inland environmental samples tested it was only present in the ones from the area of Tiszaújváros.

Summing up, we have isolated a novel bacterial strain, *Methylibium* sp. T29, and performed its essential microbiological and molecular biological characterization. According to our current knowledge, T29 is known only from a limited number of Hungarian environments and found to have an excellent ability to degrade MTBE and TBA. Its *mdpA* gene as a selective molecular marker is most likely to be suitable for the tracking of the strain in the field. In the recent past, during a field trial aiming to remediate a groundwater zone severely polluted with MTBE-containing gasoline we obtained promising results with T29, so the strain can definitely be an ideal candidate for the bioremediation of Hungarian sites contaminated with MTBE.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok témavezetőmnek, Dr. Bihari Zoltánnak, tudományos munkám támogatásáért és irányításáért, mellyel nagymértékben hozzájárult szakmai fejlődésemhez.

Köszönöm Dr. Kiss Istvánnak, a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közhasznú Nonprofit Kft. Biotechnológiai Divízió (BAY-BIO) igazgatójának, hogy a kutatásaimhoz minden szükséges feltételt biztosított.

Rendkívül hálás vagyok munkatársamnak, Dr. Gyula Péternek, aki a molekuláris biológiai kísérletek és a bioinformatikai analízisek elvégzésében nyújtott pótolhatatlan segítséget.

Köszönet illeti Dr. Tolmacsov Pétert a GC-MS analitikai mérések elvégzéséért és Dr. Robotka Herminát a *de novo* genomszekvenálásokban nyújtott segítségével.

Köszönetemet fejezem ki továbbá a BAY-BIO valamennyi munkatársának, akikkel mindennapi munkám során lehetőségem volt együtt dolgozni, hiszen különböző mértékben ugyan, de mindannyiuknak elévülhetetlen érdeme van abban, hogy ez a dolgozat elkészülhetett.

Végül, de nem utolsósorban hálás köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak, akik mindvégig támogattak és a nehéz időszakokon tanácsaikkal átsegítettek.

A dolgozat alapjául szolgáló kutatások jelentős részben a francia-magyar MiOxyFun projekt (Biodegradability of fuel oxygenates (ETBE and MTBE): **M**icroorganisms - **M**onooxygenases - **F**unctionality; TÉT_10-1-2011-0376) részeként, a Nemzeti Fejlesztési Ügynökség finanszírozásában valósultak meg.

9. FELHASZNÁLT IRODALOM

1. 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.
2. Landrigan PJ: **The worldwide problem of lead in petrol.** *Bull World Health Organ* 2002, **80**:768.
3. Tong S, von Schirnding YE, Prapamontol T: **Environmental lead exposure: A public health problem of global dimensions.** *Bull World Health Organ* 2000, **78**:1068-1077.
4. 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.
5. Bellinger DC: **Teratogen update: Lead and pregnancy.** *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005, **73**:409-420.
6. Skerfving S, Bergdahl I: **Lead.** In *Handbook on the Toxicology of Metals, 3rd Edition*. Edited by Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT. Academic Press; 2007:599-643.
7. ATSDR: **Toxicological profile for lead.** US Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2007. Available at: <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp13.pdf>
8. Stupp D, Gass M, Leiteritz H, Pijls C, Thornton S, Smith J, Dunk M, Grosjean T, den Haan K: **Gasoline ether oxygenate occurrence in Europe, and a review of their fate and transport characteristics in the environment.** CONCAWE; Brussels; 2012. Available at: <https://www.concawe.eu/>
9. Wu WT, Tsai PJ, Yang YH, Yang CY, Cheng KF, Wu TN: **Health impacts associated with the implementation of a national petrol-lead phase-out program (PLPOP): Evidence from Taiwan between 1981 and 2007.** *Sci Total Environ* 2011, **409**:863-867.
10. Oost C, Sundmacher K, Hoffmann U: **Synthesis of tertiary amyl methyl ether (TAME): Equilibrium of the multiple reactions.** *Chem Eng Technol* 1995, **18**:110-117.
11. Pock M: **Gasoline and diesel demand in Europe: New insights.** Institute for Advanced Studies; Vienna; 2007. Available at: <http://www.ihs.ac.at/publications/eco/es-202.pdf>
12. Squillace PJ, Zogorski JS, Wilber WG, Price CV: **Preliminary assessment of the occurrence and possible sources of MTBE in groundwater in the United States, 1993-1994.** *Environ Sci Technol* 1996, **30**:1721-1730.
13. Squillace PJ, Moran MJ, Lapham WW, Price CV, Clawges RM, Zogorski JS: **Volatile organic compounds in untreated ambient groundwater of the United States, 1985-1995.** *Environ Sci Technol* 1999, **33**:4176-4187.

14. Snelling J, Curtis CW, Park Y: **Synthesis of higher carbon ethers from olefins and alcohols: I. Reactions with methanol.** *Fuel Process Technol* 2003, **83**:219-234.
15. Snelling J, Barnett MO, Zhao DY, Arey JS: **Methyl tertiary hexyl ether and methyl tertiary octyl ether as gasoline oxygenates: Assessing risks from atmospheric dispersion and deposition.** *J Air Waste Manag Assoc* 2006, **56**:1484-1492.
16. Snelling J, Barnett MO, Zha D, Arey JS: **Methyl-tert-hexyl ether and methyl-tert-octyl ether as gasoline oxygenates: Anticipating widespread risks to community water supply wells.** *Environ Toxicol Chem* 2007, **26**:2253-2259.
17. Achten C, Püttmann W, Klasmeier J: **Compartment modeling of MTBE in the generic environment and estimations of the aquatic MTBE input in Germany using the EQC model.** *J Environ Monitor* 2002, **4**:747-753.
18. Rosell M, Lacorte S, Barceló D: **Occurrence and fate of MTBE in the aquatic environment over the last decade.** In *The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 5, Part R, Fuel Oxygenates*. Edited by Barceló D. Springer; 2007:31-55.
19. Squillace PJ, Pankow JF, Korte NE, Zogorski JS: **Review of the environmental behavior and fate of methyl tert-butyl ether.** *Environ Toxicol Chem* 1997, **16**:1836-1844.
20. Achten C, Kolb A, Püttmann W: **Methyl tert-butyl ether (MTBE) in urban and rural precipitation in Germany.** *Atmos Environ* 2001, **35**:6337-6345.
21. Kolb A, Püttmann W: **Methyl tert-butyl ether (MTBE) in snow samples in Germany.** *Atmos Environ* 2006, **40**:76-86.
22. Achten C, Kolb A, Püttmann W, Seel P, Gühr R: **Methyl tert-butyl ether (MTBE) in river and wastewater in Germany. 1.** *Environ Sci Technol* 2002, **36**:3652-3661.
23. Wilson JT: **Fate and transport of MTBE and other gasoline components.** In *MTBE Remediation Handbook*. Edited by Moyer EE, Kostecki PT. Amherst Scientific Publishers; 2003:19-61.
24. Fayolle F, Vandecasteele JP, Monot F: **Microbial degradation and fate in the environment of methyl tert-butyl ether and related fuel oxygenates.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2001, **56**:339-349.
25. ITRC: **Overview of groundwater remediation technologies for MTBE and TBA.** Interstate Technology & Regulatory Council; MTBE and Other Fuel Oxygenates Team; Washington, D.C.; 2005. Available at: <http://www.itrcweb.org/Guidance/GetDocument?documentID=56>
26. Drogos DL, Diaz AF: **Physical properties of fuel oxygenates and additives.** In *Oxygenates in Gasoline: Environmental Aspects*. Edited by Diaz AF, Drogos DL. American Chemical Society; 2002:258-279.

27. Stupp HD: **Spreading of MTBE and chlorinated hydrocarbons in groundwater: Comparison of groundwater transport and plume dimensions.** In *The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 5, Part R, Fuel Oxygenates*. Edited by Barceló D. Springer; 2007:121-138.
28. Morgenstern P, Versteegh AFM, de Korte GAL, Hoogerbrugge R, Mooibroek D, Bannink A, Hogendoorn EA: **Survey of the occurrence of residues of methyl tertiary butyl ether (MTBE) in Dutch drinking water sources and drinking water.** *J Environ Monit* 2003, **5**:885-890.
29. Kolb A: **Analysis of possible sources and pathways of methyl tertiary-butyl ether (MTBE) in the aquatic environment.** PhD thesis. Goethe-Universität; Frankfurt am Main; 2004.
30. Schmidt TC, Morgenroth E, Schirmer M, Effenberger M, Haderlein SB: **Use and occurrence of fuel oxygenates in Europe.** In *Oxygenates in Gasoline: Environmental Aspects*. Edited by Diaz AF, Drogos DL. American Chemical Society; 2002:58-79.
31. Kolb A, Püttmann W: **Methyl tert-butyl ether (MTBE) in finished drinking water in Germany.** *Environ Pollut* 2006, **140**:294-303.
32. Achten C, Kolb A, Püttmann W: **Occurrence of methyl tert-butyl ether (MTBE) in riverbank filtered water and drinking water produced by riverbank filtration. 2.** *Environ Sci Technol* 2002, **36**:3662-3670.
33. Arambarri I, Lasa M, Garcia R, Millán E: **Determination of fuel dialkyl ethers and BTEX in water using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-flame ionization detection.** *J Chromatogr A* 2004, **1033**:193-203.
34. Borden RC, Black DC, McBlief KV: **MTBE and aromatic hydrocarbons in North Carolina stormwater runoff.** *Environ Pollut* 2002, **118**:141-152.
35. Hellén H, Hakola H, Laurila T, Hiltunen V, Koskentalo T: **Aromatic hydrocarbon and methyl tert-butyl ether measurements in ambient air of Helsinki (Finland) using diffusive samplers.** *Sci Total Environ* 2002, **298**:55-64.
36. Vainiotalo S, Peltonen Y, Pfäffli P: **MTBE concentrations in ambient air in the vicinity of service stations.** *Atmos Environ* 1998, **32**:3503-3509.
37. Vainiotalo S, Kuusimäki L, Pekari K: **Exposure to MTBE, TAME and aromatic hydrocarbons during gasoline pump maintenance, repair and inspection.** *J Occup Health* 2006, **48**:347-357.
38. Werner I, Koger CS, Deanovic LA, Hinton DE: **Toxicity of methyl-tert-butyl ether to freshwater organisms.** *Environ Pollut* 2001, **111**:83-88.
39. Naddafi K, Nabizadeh R, Baiggi A: **Bioassay of methyl tertiary-butyl ether (MTBE) toxicity on rainbow trout fish.** *J Hazard Mater* 2008, **154**:403-406.

40. An YJ, Kampbell DH, McGill ME: **Toxicity of methyl *tert*-butyl ether to plants (*Avena sativa*, *Zea mays*, *Triticum aestivum*, and *Lactuca sativa*).** *Environ Toxicol Chem* 2002, **21**:1679-1682.
41. McGregor DB, Cruzan G, Callander RD, May K, Banton M: **The mutagenicity testing of *tertiary*-butyl alcohol, *tertiary*-butyl acetateTM and methyl *tertiary*-butyl ether in *Salmonella typhimurium*.** *Mutat Res* 2005, **565**:181-189.
42. Brown SL: **Atmospheric and potable water exposures to methyl *tert*-butyl ether (MTBE).** *Regul Toxicol Pharm* 1997, **25**:256-276.
43. Phillips S, Palmer RB, Brody A: **Epidemiology, toxicokinetics, and health effects of methyl *tert*-butyl ether (MTBE).** *J Med Toxicol* 2008, **4**:115-126.
44. Hong JY, Yang CS, Lee M, Wang YY, Huang WQ, Tan YZ, Patten CJ, Bondoc FY: **Role of cytochromes P450 in the metabolism of methyl *tert*-butyl ether in human livers.** *Arch Toxicol* 1997, **71**:266-269.
45. Amberg A, Rosner E, Dekant W: **Biotransformation and kinetics of excretion of methyl-*tert*-butyl ether in rats and humans.** *Toxicol Sci* 1999, **51**:1-8.
46. Nihlén A, Sumner SC, Löf A, Johanson G: **¹³C₂-labeled methyl *tert*-butyl ether: Toxicokinetics and characterization of urinary metabolites in humans.** *Chem Res Toxicol* 1999, **12**:822-830.
47. White GF, Russell NJ, Tidswell EC: **Bacterial scission of ether bonds.** *Microbiol Rev* 1996, **60**:216-232.
48. Schmidt TC, Schirmer M, Weiß H, Haderlein SB: **Microbial degradation of methyl *tert*-butyl ether and *tert*-butyl alcohol in the subsurface.** *J Contam Hydrol* 2004, **70**:173-203.
49. Häggblom MM, Youngster LKG, Somsamak P, Richnow HH: **Anaerobic biodegradation of methyl *tert*-butyl ether (MTBE) and related fuel oxygenates.** *Adv Appl Microbiol* 2007, **62**:1-20.
50. Waul C, Arvin E, Schmidt JE: **Long term studies on the anaerobic biodegradability of MTBE and other gasoline ethers.** *J Hazard Mater* 2009, **163**:427-432.
51. Sun W, Sun X, Cupples AM: **Anaerobic methyl *tert*-butyl ether-degrading microorganisms identified in wastewater treatment plant samples by stable isotope probing.** *Appl Environ Microbiol* 2012, **78**:2973-2980.
52. Mackay D, de Sieyes N, Einarson M, Feris K, Pappas A, Wood I, Jacobsen L, Justice L, Noske M, Wilson J, Adair C, Scow K: **Impact of ethanol on the natural attenuation of MTBE in a normally sulfate-reducing aquifer.** *Environ Sci Technol* 2007, **41**:2015-2021.
53. Youngster LKG, Somsamak P, Häggblom MM: **Effects of co-substrates and inhibitors on the anaerobic O-demethylation of methyl *tert*-butyl ether (MTBE).** *Appl Microbiol Biotechnol* 2008, **80**:1113-1120.

54. Bradley PM, Chapelle FH, Landmeyer JE: **Methyl *t*-butyl ether mineralization in surface-water sediment microcosms under denitrifying conditions.** *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**:1975-1978.
55. Bradley PM, Chapelle FH, Landmeyer JE: **Effect of redox conditions on MTBE biodegradation in surface water sediments.** *Environ Sci Technol* 2001, **35**:4643-4647.
56. Somsamak P, Cowan RM, Häggblom MM: **Anaerobic biotransformation of fuel oxygenates under sulfate-reducing conditions.** *FEMS Microbiol Ecol* 2001, **37**:259-264.
57. Landmeyer JE, Chapelle FH, Bradley PM, Pankow JF, Church CD, Tratnyek PG: **Fate of MTBE relative to benzene in a gasoline-contaminated aquifer (1993–98).** *Ground Water Monit R* 1998, **18**:93-102.
58. Finneran KT, Lovley DR: **Anaerobic in situ bioremediation.** In *MTBE Remediation Handbook*. Edited by Moyer EE, Kostecki PT. Amherst Scientific Publishers; 2003:265-277.
59. Mormile MR, Liu S, Suflita JM: **Anaerobic biodegradation of gasoline oxygenates: Extrapolation of information to multiple sites and redox conditions.** *Environ Sci Technol* 1994, **28**:1727-1732.
60. Kolhatkar R, Kuder T, Philp P, Allen J, Wilson JT: **Use of compound-specific stable carbon isotope analyses to demonstrate anaerobic biodegradation of MTBE in groundwater at a gasoline release site.** *Environ Sci Technol* 2002, **36**:5139-5146.
61. Somsamak P, Richnow HH, Häggblom MM: **Carbon isotopic fractionation during anaerobic biotransformation of methyl *tert*-butyl ether and *tert*-amyl methyl ether.** *Environ Sci Technol* 2005, **39**:103-109.
62. Wilson JT, Adair C, Kaiser PM, Kolhatkar R: **Anaerobic biodegradation of MTBE at a gasoline spill site.** *Ground Water Monit R* 2005, **25**:103-115.
63. Bradley PM, Landmeyer JE, Chapelle FH: **Aerobic mineralization of MTBE and *tert*-butyl alcohol by stream-bed sediment microorganisms.** *Environ Sci Technol* 1999, **33**:1877-1879.
64. Bradley PM, Landmeyer JE, Chapelle FH: **TBA biodegradation in surface-water sediments under aerobic and anaerobic conditions.** *Environ Sci Technol* 2002, **36**:4087-4090.
65. Shah NW, Thornton SF, Bottrell SH, Spence MJ: **Biodegradation potential of MTBE in a fractured chalk aquifer under aerobic conditions in long-term uncontaminated and contaminated aquifer microcosms.** *J Contam Hydrol* 2009, **103**:119-133.
66. Thornton SF, Bottrell SH, Spence KH, Pickup R, Spence MJ, Shah N, Mallinson HEH, Richnow HH: **Assessment of MTBE biodegradation in contaminated groundwater using ¹³C and ¹⁴C analysis: Field and laboratory microcosm studies.** *Appl Geochem* 2011, **26**:828-837.
67. Yeh CK, Novak JT: **Anaerobic biodegradation of gasoline oxygenates in soils.** *Water Environ Res* 1994, **66**:744-752.

68. Landmeyer JE, Bradley PM, Trego DA, Hale KG, Haas II JE: **MTBE, TBA, and TAME attenuation in diverse hyporheic zones.** *Ground Water* 2010, **48**:30-41.
69. Kuder T, Wilson JT, Kaiser P, Kolhatkar R, Philp P, Allen J: **Enrichment of stable carbon and hydrogen isotopes during anaerobic biodegradation of MTBE: Microcosm and field evidence.** *Environ Sci Technol* 2005, **39**:213-220.
70. 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.
71. Youngster LK, Kerkhof LJ, Häggblom MM: **Community characterization of anaerobic methyl *tert*-butyl ether (MTBE)-degrading enrichment cultures.** *FEMS Microbiol Ecol* 2010, **72**:279-288.
72. Wei N, Finneran KT: **Microbial community composition during anaerobic mineralization of *tert*-butyl alcohol (TBA) in fuel-contaminated aquifer material.** *Environ Sci Technol* 2011, **45**:3012-3018.
73. Doi Y, Takaya N, Takizawa N: **Novel denitrifying bacterium *Ochrobactrum anthropi* YD50.2 tolerates high levels of reactive nitrogen oxides.** *Appl Environ Microbiol* 2009, **75**:5186-5194.
74. Lin CW, Cheng YW, Tsai SL: **Influences of metals on kinetics of methyl *tert*-butyl ether biodegradation by *Ochrobactrum cytisi*.** *Chemosphere* 2007, **69**:1485-1491.
75. Baehr AL, Charles EG, Baker RJ: **Methyl *tert*-butyl ether degradation in the unsaturated zone and the relation between MTBE in the atmosphere and shallow groundwater.** *Water Resour Res* 2001, **37**:223-233.
76. Schirmer M, Barker JF: **A study of long-term MTBE attenuation in the Borden Aquifer, Ontario, Canada.** *Ground Water Monit R* 1998, **18**:113-122.
77. Schirmer M, Butler BJ, Barker JF, Church CD, Schirmer K: **Evaluation of biodegradation and dispersion as natural attenuation processes of MTBE and benzene at the Borden field site.** *Phys Chem Earth Pt B* 1999, **24**:557-560.
78. 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.
79. Kane SR, Beller HR, Legler TC, Koester CJ, Pinkart HC, Halden RU, Happel AM: **Aerobic biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by aquifer bacteria from leaking underground storage tank sites.** *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**:5824-5829.
80. Wilson RD, Mackay DM, Scow KM: **In situ MTBE biodegradation supported by diffusive oxygen release.** *Environ Sci Technol* 2002, **36**:190-199.
81. Schirmer M, Butler BJ, Church CD, Barker JF, Nadarajah N: **Laboratory evidence of MTBE biodegradation in Borden aquifer material.** *J Contam Hydrol* 2003, **60**:229-249.

82. Reinauer KM, Zhang Y, Yang X, Finneran KT: **Aerobic biodegradation of *tert*-butyl alcohol (TBA) by psychro- and thermo-tolerant cultures derived from granular activated carbon (GAC).** *Biodegradation* 2008, **19**:259-268.
83. Bradley PM, Landmeyer JE, Chapelle FH: **Widespread potential for microbial MTBE degradation in surface-water sediments.** *Environ Sci Technol* 2001, **35**:658-662.
84. Salanitro JP, Johnson PC, Spinnler GE, Maner PM, Wisniewski HL, Bruce C: **Field-scale demonstration of enhanced MTBE bioremediation through aquifer bioaugmentation and oxygenation.** *Environ Sci Technol* 2000, **34**:4152-4162.
85. 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.
86. Kharoune M, Kharoune L, Lebault JM, 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.
87. Lin CW, Tsai SL, Hou SN: **Effects of environmental settings on MTBE removal for a mixed culture and its monoculture isolation.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2007, **74**:194-201.
88. Hunkeler D, Butler BJ, Aravena R, Barker JF: **Monitoring biodegradation of methyl *tert*-butyl ether (MTBE) using compound-specific carbon isotope analysis.** *Environ Sci Technol* 2001, **35**:676-681.
89. Salanitro JP: **Understanding the limitations of microbial metabolism of ethers used as fuel octane enhancers.** *Curr Opin Biotech* 1995, **6**:337-340.
90. Deeb RA, Hu HY, Hanson JR, Scow KM, Alvarez-Cohen L: **Substrate interactions in BTEX and MTBE mixtures by an MTBE-degrading isolate.** *Environ Sci Technol* 2001, **35**:312-317.
91. Sedran MA, Pruden A, Wilson GJ, Suidan MT, Venosa AD: **Effect of BTEX on degradation of MTBE and TBA by mixed bacterial consortium.** *J Environ Eng* 2002, **128**:830-835.
92. Pruden A, Suidan M: **Effect of benzene, toluene, ethylbenzene, and *p*-xylene (BTEX) mixture on biodegradation of methyl *tert*-butyl ether (MTBE) and *tert*-butyl alcohol (TBA) by pure culture UC1.** *Biodegradation* 2004, **15**:213-227.
93. Debor L, Bastiaens L: **Bioremediation of groundwater contaminated with MTBE/TBA.** In *The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 5, Part R, Fuel Oxygenates*. Edited by Barceló D. Springer; 2007:159-190.
94. 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.

95. Hardison LK, Curry SS, Ciuffetti LM, Hyman MR: **Metabolism of diethyl ether and cometabolism of methyl *tert*-butyl ether by a filamentous fungus, a *Graphium* sp.** *Appl Environ Microbiol* 1997, **63**:3059-3067.
96. Skinner KM, Martinez-Prado A, Hyman MR, Williamson KJ, Ciuffetti LM: **Pathway, inhibition and regulation of methyl *tertiary* butyl ether oxidation in a filamentous fungus, *Graphium* sp.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2008, **77**:1359-1365.
97. Hernandez-Perez G, Fayolle F, Vandecasteele JP: **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.
98. Liu CY, Speitel Jr GE, Georgiou G: **Kinetics of methyl *t*-butyl ether cometabolism at low concentrations by pure cultures of butane-degrading bacteria.** *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**:2197-2201.
99. Smith CA, O'Reilly KT, Hyman MR: **Characterization of the initial reactions during the cometabolic oxidation of methyl *tert*-butyl ether by propane-grown *Mycobacterium vaccae* JOB5.** *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**:796-804.
100. Johnson EL, Smith CA, O'Reilly KT, Hyman MR: **Induction of methyl *tertiary* butyl ether (MTBE)-oxidizing activity in *Mycobacterium vaccae* JOB5 by MTBE.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:1023-1030.
101. Smith CA, O'Reilly KT, Hyman MR: **Cometabolism of methyl *tertiary* butyl ether and gaseous *n*-alkanes by *Pseudomonas mendocina* KR-1 grown on C₅ to C₈ *n*-alkanes.** *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**:7385-7394.
102. Smith CA, Hyman MR: **Oxidation of methyl *tert*-butyl ether by alkane hydroxylase in dicyclopropylketone-induced and *n*-octane-grown *Pseudomonas putida* GPo1.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:4544-4550.
103. Vainberg S, McClay K, Masuda H, Root D, Condee C, Zylstra GJ, Steffan RJ: **Biodegradation of ether pollutants by *Pseudonocardia* sp. ENV478.** *Appl Environ Microbiol* 2006, **72**:5218-5224.
104. Thiemer B, Andreesen JR, Schröder T: **Cloning and characterization of a gene cluster involved in tetrahydrofuran degradation in *Pseudonocardia* sp. strain K1.** *Arch Microbiol* 2003, **179**:266-277.
105. McKelvie JR, Hyman MR, Elsner M, Smith C, Aslett DM, Lacrampe-Couloume G, Lollar BS: **Isotopic fractionation of methyl *tert*-butyl ether suggests different initial reaction mechanisms during aerobic biodegradation.** *Environ Sci Technol* 2009, **43**:2793-2799.
106. Morales M, Nava V, Velásquez E, Razo-Flores E, Revah S: **Mineralization of methyl *tert*-butyl ether and other gasoline oxygenates by Pseudomonads using short *n*-alkanes as growth source.** *Biodegradation* 2009, **20**:271-280.

107. Mo K, Lora CO, Wanken AE, Javanmardian M, Yang X, Kulpa CF: **Biodegradation of methyl *t*-butyl ether by pure bacterial cultures.** *Appl Microbiol Biotechnol* 1997, **47**:69-72.
108. Chauvaux S, Chevalier F, Le Dantec C, 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.
109. 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 - Rev IFP* 2003, **58**:489-495.
110. Lopes Ferreira N, Malandain C, Fayolle-Guichard F: **Enzymes and genes involved in the aerobic biodegradation of methyl *tert*-butyl ether (MTBE).** *Appl Microbiol Biotechnol* 2006, **72**:252-262.
111. Hatzinger PB, McClay K, Vainberg S, Tugusheva M, Condee CW, Steffan RJ: **Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by a pure bacterial culture.** *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**:5601-5607.
112. 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.
113. Fayolle F, François A, Garnier L, Godefroy D, Mathis H, Piveteau P, Monot F: **Limitations in MTBE biodegradation.** *Oil Gas Sci Technol - Rev IFP* 2003, **58**:497-504.
114. François A, Garnier L, Mathis H, Fayolle F, Monot F: **Roles of *tert*-butyl formate, *tert*-butyl alcohol and acetone in the regulation of methyl *tert*-butyl ether degradation by *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2003, **62**:256-262.
115. Lopes Ferreira N, 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.
116. 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.
117. Lopes Ferreira N, 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.
118. Rohwerder T, Breuer U, Benndorf D, Lechner U, Müller RH: **The alkyl *tert*-butyl ether intermediate 2-hydroxyisobutyrate is degraded via a novel cobalamin-dependent mutase pathway.** *Appl Environ Microbiol* 2006, **72**:4128-4135.

119. Piveteau P, Fayolle F, Vandecasteele JP, Monot F: **Biodegradation of *tert*-butyl alcohol and related xenobiotics by a methylotrophic bacterial isolate.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2001, **55**:369-373.
120. Lechner U, Brodkorb D, Geyer R, Hause G, Härtig C, Auling G, Fayolle-Guichard F, Piveteau P, Müller RH, Rohwerder T: ***Aquicola tertiaricarbonis* gen. nov., sp. nov., a tertiary butyl moiety-degrading bacterium.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2007, **57**:1295-1303.
121. Müller RH, Rohwerder T, Harms H: **Degradation of fuel oxygenates and their main intermediates by *Aquicola tertiaricarbonis* L108.** *Microbiology* 2008, **154**:1414-1421.
122. 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.
123. Schäfer F, Breuer U, Benndorf D, von Bergen M, Harms H, Müller RH: **Growth of *Aquicola tertiaricarbonis* L108 on *tert*-butyl alcohol leads to the induction of a phthalate dioxygenase-related protein and its associated oxidoreductase subunit.** *Eng Life Sci* 2007, **7**:512-519.
124. Yaneva N, Schuster J, Schäfer F, Lede V, Przybylski D, Paproth T, Harms H, Müller RH, Rohwerder T: **Bacterial acyl-CoA mutase specifically catalyzes coenzyme B₁₂-dependent isomerization of 2-hydroxyisobutyryl-CoA and (*S*)-3-hydroxybutyryl-CoA.** *J Biol Chem* 2012, **287**:15502-15511.
125. Schäfer F, Muzica L, Schuster J, Treuter N, Rosell M, Harms H, Müller RH, Rohwerder T: **Formation of alkenes via degradation of *tert*-alkyl ethers and alcohols by *Aquicola tertiaricarbonis* L108 and *Methylibium* spp.** *Appl Environ Microbiol* 2011, **77**:5981-5987.
126. Schuster J, Schäfer F, Hübler N, Brandt A, Rosell M, Härtig C, Harms H, Müller RH, Rohwerder T: **Bacterial degradation of *tert*-amyl alcohol proceeds via hemiterpene 2-methyl-3-buten-2-ol by employing the tertiary alcohol desaturase function of the Rieske nonheme mononuclear iron oxygenase MdpJ.** *J Bacteriol* 2012, **194**:972-981.
127. Hanson JR, Ackerman CE, Scow KM: **Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by a bacterial pure culture.** *Appl Environ Microbiol* 1999, **65**:4788-4792.
128. Hristova KR, Luttenegger CM, Scow KM: **Detection and quantification of methyl *tert*-butyl ether-degrading strain PM1 by real-time TaqMan PCR.** *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**:5154-5160.
129. Hristova K, Gebreyesus B, Mackay D, Scow KM: **Naturally occurring bacteria similar to the methyl *tert*-butyl ether (MTBE)-degrading strain PM1 are present in MTBE-contaminated groundwater.** *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**:2616-2623.

130. Smith AE, Hristova K, Wood I, Mackay DM, Lory E, Lorenzana D, Scow KM: **Comparison of biostimulation versus bioaugmentation with bacterial strain PM1 for treatment of groundwater contaminated with methyl *tertiary* butyl ether (MTBE).** *Environ Health Perspect* 2005, **113**:317-322.
131. Nakatsu CH, Hristova K, Hanada S, Meng XY, Hanson JR, Scow KM, Kamagata Y: ***Methylibium petroleiphilum* gen. nov., sp. nov., a novel methyl *tert*-butyl ether-degrading methylotroph of the *Betaproteobacteria*.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2006, **56**:983-989.
132. Schmidt R, Battaglia V, Scow K, Kane S, Hristova KR: **Involvement of a novel enzyme, MdpA, in methyl *tert*-butyl ether degradation in *Methylibium petroleiphilum* PM1.** *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**:6631-6638.
133. van Beilen JB, Smits TH, Roos FF, Brunner T, Balada SB, Röthlisberger M, Witholt B: **Identification of an amino acid position that determines the substrate range of integral membrane alkane hydroxylases.** *J Bacteriol* 2005, **187**:85-91.
134. Hristova KR, Schmidt R, Chakicherla AY, Legler TC, Wu J, Chain PS, Scow KM, Kane SR: **Comparative transcriptome analysis of *Methylibium petroleiphilum* PM1 exposed to the fuel oxygenates methyl *tert*-butyl ether and ethanol.** *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**:7347-7357.
135. Smits THM, Balada SB, Witholt B, van Beilen JB: **Functional analysis of alkane hydroxylases from gram-negative and gram-positive bacteria.** *J Bacteriol* 2002, **184**:1733-1742.
136. Kane SR, Chakicherla AY, Chain PS, Schmidt R, Shin MW, Legler TC, Scow KM, Larimer FW, Lucas SM, Richardson PM, Hristova KR: **Whole-genome analysis of the methyl *tert*-butyl ether-degrading beta-proteobacterium *Methylibium petroleiphilum* PM1.** *J Bacteriol* 2007, **189**:1931-1945.
137. Kharoune M, Kharoune L, Lebeault JM, 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.
138. Goodfellow M, Jones AL, Maldonado LA, Salanitro J: ***Rhodococcus aetherivorans* sp. nov., a new species that contains methyl *t*-butyl ether-degrading actinomycetes.** *Syst Appl Microbiol* 2004, **27**:61-65.
139. Zaitsev GM, Uotila JS, Häggblom MM: **Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by cold-adapted mixed and pure bacterial cultures.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2007, **74**:1092-1102.
140. Zhang RL, Huang GQ, Lian JY, Li XG: **Degradation of MTBE and TBA by a new isolate from MTBE-contaminated soil.** *J Environ Sci (China)* 2007, **19**:1120-1124.

141. Purswani J, Pozo C, Rodríguez-Díaz M, González-López J: **Selection and identification of bacterial strains with methyl-*tert*-butyl ether, ethyl-*tert*-butyl ether, and *tert*-amyl methyl ether degrading capacities.** *Environ Toxicol Chem* 2008, **27**:2296-2303.
142. 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.
143. Chen SC, Chen CS, Zhan KV, Yang KH, Chien CC, Shieh BS, Chen WM: **Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether (MTBE) by *Enterobacter* sp. NKNU02.** *J Hazard Mater* 2011, **186**:1744-1750.
144. Barberà MJ, Mateo E, Monkaityte R, Constantí M: **Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by newly identified soil microorganisms in a simple mineral solution.** *World J Microbiol Biotechnol* 2011, **27**:813-821.
145. Aslett D, Haas J, Hyman M: **Identification of tertiary butyl alcohol (TBA)-utilizing organisms in BioGAC reactors using ¹³C-DNA stable isotope probing.** *Biodegradation* 2011, **22**:961-972.
146. Stackebrandt E, Verborg S, Fröhling A, Busse HJ, Tindall BJ: **Dissection of the genus *Methylibium*: reclassification of *Methylibium fulvum* as *Rhizobacter fulvus* comb. nov., *Methylibium aquaticum* as *Piscinibacter aquaticus* gen. nov., comb. nov. and *Methylibium subsaxonicum* as *Rivibacter subsaxonicus* gen. nov., comb. nov. and emended descriptions of the genera *Rhizobacter* and *Methylibium*.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2009, **59**:2552-2560.
147. Sun Y, Wolcott RD, Dowd SE: **Tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing for the elucidation of microbial and functional gene diversity in any environment.** In *High-Throughput Next Generation Sequencing: Methods and Applications*. Edited by Kwon YM, Ricke SC. Humana Press; 2011:129-141.
148. Giovannoni SJ: **The polymerase chain reaction.** In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Edited by Stackebrandt E, Goodfellow M. John Wiley & Sons, Inc.; 1991:177-203.
149. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO: **The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools.** *Nucleic Acids Res* 2013, **41**:D590-D596.
150. 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.

151. Babé A, Labbé D, Monot F, Greer CW, Fayolle-Guichard F: **Biodegradability of oxygenates by microflora from MTBE-contaminated sites: New molecular tools.** In *The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 5, Part R, Fuel Oxygenates*. Edited by Barceló D. Springer; 2007:75-98.
152. Jechalke S, Rosell M, Martínez-Lavanchy PM, Pérez-Leiva P, Rohwerder T, Vogt C, Richnow HH: **Linking low-level stable isotope fractionation to expression of the cytochrome P450 monooxygenase-encoding *ethB* gene for elucidation of methyl tert-butyl ether biodegradation in aerated treatment pond systems.** *Appl Environ Microbiol* 2011, **77**:1086-1096.
153. Zhang Y, Yakus MA, Graviss EA, Williams-Bouyer N, Turenne C, Kabani A, Wallace Jr RJ: **Pulsed-field gel electrophoresis study of *Mycobacterium abscessus* isolates previously affected by DNA degradation.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**:5582-5587.
154. Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ: **A general method for detecting and sizing large plasmids.** *Anal Biochem* 1995, **226**:235-240.
155. Heringa SD, Monroe JD, Herrick JB: **A simple, rapid method for extracting large plasmid DNA from bacteria.** *Nature Precedings* 2007, doi:10.1038/npre.2007.1249.1.
156. Darling AE, Mau B, Perna NT: **progressiveMauve: Multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement.** *PLoS One* 2010, **5**:e11147.
157. Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, Smoot M, Shumway M, Antonescu C, Salzberg SL: **Versatile and open software for comparing large genomes.** *Genome Biol* 2004, **5**:R12.
158. Seemann T: **Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation.** *Bioinformatics* 2014, **30**:2068-2069.
159. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA: **SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing.** *J Comput Biol* 2012, **19**:455-477.
160. Choi KH, Kumar A, Schweizer HP: **A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation.** *J Microbiol Methods* 2006, **64**:391-397.
161. Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop II RM, Peterson KM: **Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes.** *Gene* 1995, **166**:175-176.
162. Christensen P: **Genus IV. *Lysobacter* Christensen and Cook 1978, 372^{AL}.** In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition, Vol. 2, Part B*. Edited by Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. Springer; 2005:95-101.

163. Spain AM, Forsberg CW, Krumholz LR: **Genus I. *Fibrobacter* Montgomery, Flesher and Stahl 1988, 434^{VP}**. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition, Vol. 4*. Edited by Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W, Whitman WB. Springer; 2010:740-746.
164. Goodfellow M, Kämpfer P, Chun J, Vos PD, Rainey FA, Whitman WB: **Genus III. *Alkaliflexus* Zhilina, Appel, Probian, Llobet Brossa, Harder, Widdel and Zavarzin 2005, 1395^{VP}**. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition, Vol. 4*. Edited by Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W, Whitman WB. Springer; 2010:53-54.
165. Song Y, Liu C, Finegold SM: **Genus I. *Bacteroides* Castellani and Chalmers 1919, 959^{AL} emend. Shah and Collins 1989, 85**. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition, Vol. 4*. Edited by Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W, Whitman WB. Springer; 2010:27-41.
166. Feris KP, Hristova K, Gebreyesus B, Mackay D, Scow KM: **A shallow BTEX and MTBE contaminated aquifer supports a diverse microbial community**. *Microb Ecol* 2004, **48**:589-600.
167. Pruden A, Suidan MT, Venosa AD, Wilson GJ: **Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether under various substrate conditions**. *Environ Sci Technol* 2001, **35**:4235-4241.
168. Bastida F, Rosell M, Franchini AG, Seifert J, Finsterbusch S, Jehmlich N, Jechalke S, von Bergen M, Richnow HH: **Elucidating MTBE degradation in a mixed consortium using a multidisciplinary approach**. *FEMS Microbiol Ecol* 2010, **73**:370-384.
169. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S: **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0**. *Mol Biol Evol* 2013, **30**:2725-2729.
170. Turick CE, Knox AS, Becnel JM, Ekechukwu AA, Milliken CE: **Properties and function of pyomelanin**. In *Biopolymers*. Edited by Elnashar MM. Sciyo; 2010:449-472.
171. Eweis JB, Schroeder ED, Chang DPY, Scow KM: **Biodegradation of MTBE in a pilot-scale biofilter**. In *Natural Attenuation: Chlorinated and Recalcitrant Compounds*. Edited by Wickramanayake GB, Hinchey RE. Battelle Press; 1998:341-346.
172. Cheng ZW, Chen JM, Chen DZ, Zhang LL: **Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether in a bioreactor using immobilized *Methylibium petroleiphilum* PM1 cells**. *Water Air Soil Pollut* 2011, **214**:59-72.
173. Davis-Hoover WJ, Stavnes SA, Fleischman JJ, Hunt SC, Goetz J, Keper M, Roulier M, Hristova K, Scow K, Knutson K, Mahaffee W, Slomczynski DJ: **BTEX, MTBE bioremediation: Bionets containing PM1, SOS or air**. In *Seventh International in situ and on-site Bioremediation Symposium*. Edited by Magar VS, Kelley ME. Battelle Press; 2003:E-25.

174. Wu S, Zhu Z, Fu L, Niu B, Li W: **WebMGA: A customizable web server for fast metagenomic sequence analysis.** *BMC Genomics* 2011, **12**:444.
175. Grant JR, Stothard P: **The CGView Server: A comparative genomics tool for circular genomes.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36**:W181-W184.
176. Cosentino S, Larsen MV, Aarestrup FM, Lund O: **PathogenFinder - Distinguishing friend from foe using bacterial whole genome sequence data.** *PLoS One* 2013, **8**:e77302.

10. TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

1. * **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, doi:10.1186/s40793-015-0023-z.
IF: 3,167
2. Bihari Z, Szvetnik A, **Szabó Z**, Blastyák A, Zombori Z, Balázs M, Kiss I: **Functional analysis of long-chain *n*-alkane degradation by *Dietzia* spp.** *FEMS Microbiol Lett* 2011, **316**:100-107.
IF: 2,044
3. Szvetnik A, Bihari Z, **Szabó Z**, Kelemen O, Kiss I: **Genetic manipulation tools for *Dietzia* spp.** *J Appl Microbiol* 2010, **109**:1845-1852.
IF: 2,365
4. Bihari Z, **Szabó Z**, Szvetnik A, Balázs M, Bartos P, Tolmacsov P, Zombori Z, Kiss I: **Characterization of a novel long-chain *n*-alkane-degrading strain, *Dietzia* sp. E1.** *Z Naturforsch C* 2010, **65**:693-700.
IF: 0,718
5. Bihari Z, Vidéki D, Mihalik E, Szvetnik A, **Szabó Z**, Balázs M, Kesserű P, Kiss I: **Degradation of native feathers by a novel keratinase-producing, thermophilic isolate, *Brevibacillus thermoruber* T1E.** *Z Naturforsch C* 2010, **65**:134-140.
IF: 0,718

* A dolgozat alapjául szolgáló közlemény.