

**MIKROBIÁLIS UJJLENYOMAT VIZSGÁLATI
MÓDSZER ALKALMAZÁSA KÖRNYEZETI MINTÁK
ANALÍZISE SORÁN**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

BALÁZS MARGIT

Témavezető:

DR. KISS István divízióigazgató
DR. SZVETNIK Attila vezető kutató

BAY ZOLTÁN ALKALMAZOTT KUTATÁSI KÖZHASZNÚ
NONPROFIT KFT. BIOTECHNOLÓGIAI DIVÍZIÓ (BAY-BIO)

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
KÖRNYEZETTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA



SZEGED
2018

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A XXI. századi társadalomnak az egyik és talán legnagyobb kihívása a környezet állapotának javítása. A kármentesítési programok első éveiben a munka csupán a talaj és a felszín alatti vizeket veszélyeztető, károsító szennyező források felmérésére fókuszált, viszont később felismerték a talaj, mint élőhely és az elemkörforgalmak kulcsfontosságú helyzetét és ezt figyelembe véve olyan talajkezelési módszerek kutatásába és fejlesztésébe kezdtek, melyek egyrészt hatékony, költségtakarékos megoldások, ugyanakkor környezet kímélőek és a fenntartható üzemeltetést is biztosítják. A remediációs technológiák fejlődésével egy időben a biotechnológia is robbanásszerűen fejlődött. A múlt század első kétharmadában még hagyományos, laboratóriumi tenyésztést alkalmazva izolálták az egyes vegyületek lebontására képes mikrobákat. A kutatók a 90'-es évek környékén szembesültek először azzal a problémával, hogy nem minden talajbaktérium tenyészthető. A tenyésztéssel nem kimutatható prokarióták nagy száma készítette a kutatókat a tenyésztéstől független, molekuláris biológiai módszerek alkalmazására.

Napjainkban a PCR alapú technikák alkalmazása már elkerülhetetlen mikrobiális összetétel vizsgálatok során, mivel ez ad lehetőséget arra, hogy a klasszikus mikrobiológiával, tenyésztéssel nem vizsgálható mikroorganizmusokról és azok tulajdonságairól információt kapjunk. A kapott eredmény azonban nagymértékben függ attól, hogy milyen mintavételt, minta előkészítést és milyen mérési módszert alkalmazunk. Különösen fontos ezt figyelembe venni olyan eljárások során, ahol a kísérlet során kapott eredményt több egymást követő lépés során alkalmazott eljárási módszer határozza meg. Egy ilyen, több lépést tartalmazó módszer a mikrobiális összetétel vizsgálatokhoz alkalmazott PCR-DGGE is. A DGGE mintázatot alapvetően befolyásolja a DNS izolálás módja (feltárás hatékonyság, DNS tisztasága, mennyisége, stb.).

Mindezek alapján munkám során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- 1. Melyik DNS-extrakciós módszer biztosítja a legnagyobb fajgazdagság detektálását PCR-DGGE módszerrel?*

Ehhez kapcsolódva, kutatási munkám első részében vizsgáltam, hogy talajminták esetében a DNS izolálás során alkalmazott módszer milyen mértékben befolyásolja a kapott eubaktérium specifikus DGGE mintázatot? A kísérleteink során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a szakirodalomban talajmintákból történő bakteriális DNS izolálásához leggyakrabban alkalmazott módszerhez (MoBio PowerSoil® kit) képest a sejtfeltárás során egy erőteljesebb

kémiai lízist alkalmazva kimutatható-e a kapott PCR-DGGE mintázatban eltérés a vizsgált talaj domináns baktériumtörzsei között?

2. *Van-e számottevő hatása az amplifikáció során alkalmazott DNS polimeráznak a kapott PCR-DGGE mintázatra és a detektált fajgazdagságra?*

A kutatási munkám második részében az amplifikációs körülmények módosításának hatását vizsgáltam PCR-DGGE vizsgálatok során, különös tekintettel arra, hogy milyen hatással van a kapott mintázatra az amplifikáció során alkalmazott DNS polimeráz enzim. Mivel a szakirodalomban a *Taq* DNS polimerázt alkalmazzák, így ehhez hasonlítottunk egy nagy pontosságú és inhibitor rezisztens fúziós DNS polimeráz (*Phusion*) és egy kevésbé ismert, de nagyméretű és C/G gazdag templátok másolására képes polimeráz enzimmel (*KOD*) kapott PCR-DGGE mintázatokat.

3. *A mintákban jelenlévő PCR inhibitorok hogyan befolyásolják a különböző DNS polimerázokat?*

A kísérletek során arra kerestük a választ, hogy a DNS polimeráz enzimek mennyire érzékenyek a leggyakrabban előforduló inhibitor komponensekre (talaj, huminsav, vér). A vizsgált enzimek közül melyik a legalkalmasabb inhibitor jelenlétében történő amplifikációra.

4. *Környezeti minták vizsgálata során melyik DNS polimerázzal lehet a legjobb PCR-DGGE mintázatot létrehozni?*

5. *PCR gátló anyagok jelenléte hogyan befolyásolja a multitemplátról készített PCR-DGGE mintázatot?*

A kísérletek segítségével arra kerestük a választ, hogy az egyes DNS polimeráz enzimek eltérő amplifikációt mutatnak-e multitemplát alkalmazása során, ami különösen fontos mikrobiális diverzitás vizsgálatok során.

MÓDSZEREK

A talajmintákból történő DNS izoláláshoz két kereskedelmi forgalomban beszerezhető DNS tisztító kit-et - Mo Bio PowerSoil® DNA Isolation kit és AquaGenomic™ oldatot – alkalmaztunk a gyártó utasítása szerint, valamint egy *Mycobacterium*-DNS izolálásra fejlesztett módszert. A módszereken annyi módosítást végeztünk, hogy a DNS-t az utolsó lépénél steril vízben vettük fel vagy az oszlopról steril vízzel eluáltuk, hogy a pufferek különbözőségéből adódó problémákat elkerüljük.

A kísérletek során három DNS polimeráz enzimet alkalmaztunk. A 16S riboszómális RNS kódoló gént eubaktérium specifikus primerekkel (EubB (27F) és EubA (1552R) PCR amplifikáltuk. A DGGE mintázatok készítéséhez a „GC-clamp”-pel rendelkező 16S RNS gén V3 variábilis régióját (~200 bp hosszúságú) amplifikáltuk, ahol templátként a 16S rDNS PCR termékeket alkalmaztuk. Az amplifikációhoz 341F-GC és 534R primereket alkalmaztuk. A reakciók során *KOD* (Novagen) és *Taq* (Fermentas) és *Phusion* (Finnzyme) DNS polimerázokat alkalmaztunk a gyártó utasítása szerint vagy kisebb módosítással (azonos primer és enzim koncentráció mellett). A 1,5kb méretű 16S rRNS gént 1%-os agaróz gélen, a 200bp méretű 16S rRNS gén V3 gént 2%-os agaróz gélen történő futtatással ellenőriztük. A denaturáló gradiens gél elektroforézist 30-70%-os és 30-60%-os denaturáló gradiens koncentráció mellett, 8%-os poliakrilamid gélen végeztük. A DGGE futtatást BioRad DCode Universal Mutation Detection System készülékben 60 °C-on, 150V-on, 1x TAE pufferben 4 órán át végeztük. Elektroforézis után a gélt 20 percig etidium-bromiddal (0,5 µg/ml) festettük, majd UV fény alatt vizsgáltuk és VisionWorks®LS 5.5.0 szoftverrel dokumentáltuk.

A mesterséges konzorcium készítéséhez referencia törzsekből MoBio Ultraclean PCR tisztító kittel DNS izoláltunk. A tisztított DNS-ről 16S rDNS PCR végeztünk. A PCR termékekről a maradék templát DNS-t és oligót EZ-Spin Column PCR tisztító kittel leválasztottuk. Az egyedi fragmenteket pJET 2.1 blunt klónozó vektorba ligáltuk. A reakcióelegyet 20 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten (22°C), majd közvetlenül transzformáltuk *Escherichia coli* DH5α kémiai kompetens sejtekbe: 200 µl jégen kiolvaszott kompetens sejthez 10 µl ligálási reakcióelegyet adtunk, majd 30 perc jégen történő inkubáció után hűsökkoltuk, 40 másodpercig 42 °C-on, 5 perc jégen való lehűtést követően 800 µl SOC oldattal (2% Tripton; 0,5% élesztő kivonat; 10mM MgSO₄; 10mM MgCl₂; 20mM glükóz; 10mM NaCl, 5mM KCl) egészítettük ki az elegyet, majd 30 percig 37 °C-on inkubáltuk. Ezt

követően 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB táptalajra szélesztettük a sejteket. Az antibiotikumon felnőtt sejtekből plazmidot tisztítottunk. A tiszta plazmidokat, amelyek tartalmazzák az adott szekvenciákat, azonos arányban összekevertük. A plazmidokat *E. coli* kompetens sejtben, törzsgyűjteményben -80°C-on tároltuk.

A PCR inhibíciós vizsgálatokat huminsavval, talaj extraktummal, vérrel és vérszérummal végeztük. Talaj extraktum készítéséhez 1g virágföldet 10ml KLA pufferben (50mM Tris, pH=9,5; 16mM (NH₄)₂SO₄; 2,5mM MgCl₂ és 0,1% Tween) szuszpendáltunk és 30 percig 75°C-on inkubáltuk, 12 000g-n 20 percig centrifugáltuk és a felülúszót -20°C-on tároltuk a felhasználásig. A teljes vér 5mM EDTA (antikoaguláns) tartalmú kezeletlen vér volt. A vérszérumhoz a vért szobahőmérsékleten (22°C) hagytuk 30 percig, majd a véralvadást követően 2000g fordulaton, 10 percig centrifugáltuk és a felülúszót (vérszérumot) leválasztottuk.

A hőstabil DNS polimerázok inhibitor érzékenységét 16S rRNS gén specifikus PCR során vizsgáltuk. A PCR reakciókeverék talajmintákból izolált 5 ng genomiális DNS templátot tartalmazott és a reakciót 0-0,6µg/ml huminsav koncentráció mellett végeztünk. Mesterséges konzorciummal történő inhibíciós vizsgálatokhoz ismert baktériumtörzsek 16S rRNS génjét tartalmazó plazmidokból 1:1 arányú keveréket készítettünk. A plazmid keverékről a 16S rRNS gént amplifikáltuk a 27F/Eub-1552R primerekkel és a klónozó vektor (pJET1.2/blunt) primerjeivel. A két PCR során tapasztalt reakciógátlásból határoztuk meg az inhibitorok PCR gátló koncentrációját. Az inhibitorok DGGE mintázatra gyakorolt hatásának vizsgálatához az ampikonokat a 8%-os poliakrilamid gélen, 30-60%-os denaturáló gradiensben vizsgáltuk.

A molekuláris munkákhoz szükséges DNS oligonukleotidok elkészítését az Integrated DNA Technologies, a DNS szekvenálásokat Micorsynth cég, a Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Központ szekvenáló platformja valamint a Xenovea Kft végezték.

TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

T1. *Mycobacterium* DNS izolálására kifejlesztett módszer hatékonyan alkalmazható talajminták baktérium populációjának vizsgálatára.

1.1. PCR-DGGE mintázatok alapján a *Mycobacterium* DNS izolálására kifejlesztett un. Käser-módszerrel talajmintákból nagyobb baktérium diverzitás mutatható ki, mint a talajmintákra kifejlesztett, kereskedelmi forgalomban beszerezhető DNS tisztító kit-ekkel és főként a magasabb G/C-tartalmú baktériumok esetében.

1.2. Metagenom szekvenálási eredményekkel igazoltuk, hogy a Käser módszer alkalmasabb a talajmintákból *Actinobacterium* DNS kinyerésére.

T2. Elsőként igazoltuk a *KOD* DNS polimeráz alkalmazásának előnyét PCR-DGGE vizsgálatok során.

2.1. A *KOD* DNS polimeráz enzim a magas G/C-tartalmú, nehezebben amplifikálható templátokat hatékonyabban képes másolni, mint a *Taq* és *Phusion* DNS polimeráz.

2.2. A *KOD* DNS polimeráz a *Taq* és *Phusion* polimeráznál pontosabb másolásából (high fidelity) adódóan élesebb mintázatot ad, amely alapvetően meghatározza a DGGE mintázat szoftveres kiértékelését.

2.3. Igazoltuk, hogy a PCR-DGGE vizsgálatok során az amplifikációhoz alkalmazott az DNS polimeráz enzim befolyásolja az amplifikáció eredményeként létrejövő mintázatot.

T3. Kidolgoztunk egy eljárást ismert szekvenciákat tartalmazó PCR-DGGE marker készítéséhez.

3.1. 16S rRNS gént tartalmazó plazmidok alkalmazásával sikeresen elő tudtunk állítani egy kívánt szekvencia összetétellel rendelkező PCR-DGGE markert.

3.2. Kifejlesztettünk és alkalmaztunk egy olyan módszertani eljárást, amellyel tetszőleges szekvenciák kiválasztásával a PCR-DGGE technika alkalmassá tehető egy gyors minőségellenőrzési módszerként történő használatra.

T4. Elsőként igazoltuk, hogy a *KOD* DNS polimeráz kiemelkedően rezisztens humisav jelenlétére a PCR során

4.1. Eredményeink alapján, genomiális DNS-ről történő amplifikáció során a *KOD* DNS polimeráz 16-szor nagyobb koncentrációjú (5 µg/ml) huminsav mellett is képes a kívánt DNS fragment másolására szemben a *Phusion* (~0,3 µg/ml) és *Taq* (< 0,2µg/ml) DNS polimerázokkal.

T5. *KOD* DNS polimeráz kevésbé érzékeny a talaj eredetű inhibitor komponensekre.

5.1. Mesterséges konzorciummal végzett végpont PCR kísérletek alátámasztották, a *KOD* egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációban képes tolerálni a huminsav jelenlétét, mint a *Phusion* és *Taq* DNS polimeráz.

5.2. Igazoltuk, hogy a *KOD* kiemelten rezisztens a talaj eredetű inhibitor anyagok jelenlétére, még 10% talaj extraktum jelenlétében is alkalmazható.

T6. Elsőként igazoltuk, hogy PCR-DGGE mintázat eredményét befolyásolja a PCR inhibitorok jelenléte.

6.1. Talaj és vér eredetű PCR inhibitorok jelenlétében a PCR-DGGE mintázat a részleges amplifikáció következtében megváltozik. Az eredmények alapján elmondható, hogy habár a *Phusion* DNS polimeráz enzim a végpont PCR eredmények alapján magasabb koncentrációban (akár 20 v/v%) képes tolerálni a vér inhibitor komponenseit, mégis multitemplát amplifikáció során keletkezett termékek nem adják vissza az eredeti populáció összetételét.

6.2. Az eredmények alapján a DNS polimerázok inhibitor érzékenysége nem elegendő információ annak eldöntésére, hogy egy enzim alkalmas-e inhibitor tartalmú DNS minták mikrobiális összetételének vizsgálatára. A három polimeráz enzimmel és négy PCR inhibitorral végzett kísérletek során a mesterséges konzorciumról készített DGGE mintázatokban a PCR inhibitor mennyiségének növelésével a mintázatban az egyes fragmentek intenzitása nem azonos mértékben csökkent. Inhibitor jelenlétében egyes szekvenciák amplifikációja eltérő mértékben gátolt.

T7. Kialakítottunk egy eljárás tervezetet a talajminták molekuláris biológiai vizsgálatára.

T8. Sikerral alkalmaztuk ezt a protokollt valós környezeti minták esetében.

TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

1. **Balázs M, Rónavári A, Rutkai E, Kiss I, Szvetnik A Investigation of effects of different DNA Polymerases on PCR-DGGE patterns in an artificial microbial consortium** bírálóat alatt az *International Biodeterioration and Biodegradation*-ben (2018)
IF: 2,235 Független hivatkozás: 14
2. **Balázs M, Rónavári A, Németh A, Bihari Z, Rutkai E, Bartos P, Kiss I, Szvetnik A Effect of DNA polymerases on PCR-DGGE patterns** *International Biodeterioration & Biodegradation* 2013, 84, pp. 244–249
IF: 2,235 Független hivatkozás: 14
3. Rónavári A., **Balázs M.**, Tolmacsov P., Molnár Cs., Kiss I, Kukovecz A., Kónya Z. **Impact of the morphology and reactivity of nanoscale zero-valent iron (NZVI) on dechlorinating bacteria.** *Water Research*, 2016, 95:165-173
IF: 5,991 Független hivatkozás: 7
4. Papp I., **Balázs M.**, Tombácz E., Babcsán N., Kesseru P., Kiss I., Szvetnik A. **PCR-DGGE analysis of the bacterial composition of a kaolin slurry showing altered rheology** *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2012, 28:(4) pp. 1843-1848.
IF: 1,93 Független hivatkozás: 2
5. 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 Microbiology Letters* 2011, 316:100-107.
IF: 2,51 Független hivatkozás: 12
6. 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: 0,84 Független hivatkozás: 10
7. 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: 0,84 Független hivatkozás: 1
8. Bartos P., Balázs M., Kiss I., Bihari Z., Kelemen O., Mecs I. **Toxic effect of methyl tert-butyl ether on growth of soil isolate Pseudomonas veronii T1/1** *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:(6) pp. 875-878. (2008)
IF: 0,718 Független hivatkozás: 5

9. Kun R., **Balazs M.**, Dekany I. **Photooxidation of organic dye molecules on TiO₂ and zinc–aluminum layered double hydroxide ultrathin multilayers** *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2005, 265(s 1–3):155–162

IF: 1,37

Független hivatkozás: 33

10. Bihari Z., Pettko Szandtner A., Csanadi G., **Balazs M.**, Bartos P., Kessler P., Kiss I., Mecs I. **Isolation And Characterization of a Novel N-alkane-degrading Strain, Acinetobacter Haemolyticus Ar-46** *Zeitschrift für Naturforschung C-A Journal of Bioscience* 62:(3-4) pp. 285-295. (2007)

IF: 0,76

Független hivatkozás: 6

KONFERENCIA MEGJELENÉSEK

1. Performance of DNA polymerases.

Balázs M., Szvetnik A., Németh A., Rónavári A., Kiss I.

Power of Microbes in Industry and Environment, Malinska, Horvátország, 2010

2. Effect of DNA polymerases on DGGE patterns.

Balázs M., Németh A., Rónavári A., Bihari Z., Kiss I., Szvetnik A.

BioMicroWorld 2011 - IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, Torremolinos, Malaga, Spain, 2011

3. Performance of DNA polymerases.

Balázs M., Szvetnik A., Németh A., Rónavári A., Kiss I.

15th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium, Bécs, Ausztria, 2011

4. Investigation of effects of different DNA Polymerases on DGGE patterns in an artificial microbial consortium.

Németh A., Balázs M., Rónavári A., Rutkai E., Urbán G., Kiss I., Szvetnik A.

5th International Symposium on Biosorption and Bioremediation, Prága, Csehország, 2012

5. In situ railway ballast treatment

Potörő P., Balázs M., Kiss I.

5th International Symposium on Biosorption and Bioremediation, Prága, Csehország, 2012

6. A case study of the bioremediation of a methyl tert-butyl ether-polluted Hungarian aquifer

Szabó Z, Izing I, László T, Balázs M., Kiss I, Bihari Z.

IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology Torremolinos, Málaga, Spain; 2011.

7. Functional analysis of n-alkane degradation by *Dietzia* spp.

Bihari Z, Szvetnik A, Szabó Z, Blastyák A, Zombori Z, Balázs M., Kiss I

IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, Torremolinos, Málaga, Spain; 2011.

8. Investigation of the Iron Solubilization Ability of Natural Phosphorus Mobilizing Bacteria

- Kesserű P., Balázs M., Tolmacsov P., Mekler Cs.1, Kiss I
6th International Symposium on Biosorption and Biodegradation Bioremediation BioBio
 2017 Prague, Czech Republic 2017.
- 9. Raw Material Recovery from Mining Wastes Applying Aerobic Bacteria**
 Kesserű P., Balázs M., Tolmacsov P., Mekler Cs.1, Kiss I
6th International Symposium on Biosorption and Biodegradation Bioremediation BioBio
 2017 Prague, Czech Republic 2017
- 10. Comparison of the reactivity and the effect of different nanoscale zero-valent iron on microbial populations in trichloroethylene contaminated groundwater.**
 Rónavári A., Balázs M., Németh A., Rutkai E., Urbán G., Tolmacsov P., Kiss I., Kukovecz Á., Kónya Z.
Workshop on Functionalized Surfaces and Nanocomposites, Joint Meeting of WG2-WG3-WG4 of COST Action CM1101, Szeged, 2013
- 11. Különböző nulla vegyértékű vas nanorészecskék reaktivitásának és a mikrobiológiai összetétel változására gyakorolt hatásának összehasonlítása klórozott szénhidrogénnel szennyezett talajvíz vizsgálatában.**
 Rónavári A., Balázs M., Németh A., Rutkai E., Urbán G., Tolmacsov P., Kiss I., Kukovecz Á., Kónya Z.
XI. Környezetvédelmi analitikai és technológiai konferencia - innovatív környezetdiagnosztikai módszerekkel és technológiákkal az egészségesebb emberi környezetért, Hajdúszoboszló, 2013
- 12. The effect of different nanoscale zero-valent iron on microbial populations in cis-1,2-dichloroethylene contaminated groundwater.**
 Rónavári A., Balázs M., Németh A., Rutkai E., Urbán G., Tolmacsov P., Kiss I., Kukovecz Á., Kónya Z.
Power of microbes in Industry and Environment, Primosten, Horvátország, 2013
- 13. Assessing the application and impact of different nanoscale zero-valent irons on microbial populations.**
 Rónavári A., Balázs M., Németh, A., Rutkai, E., Urbán, G., Tolmacsov, P., Kiss, I., Kukovecz, Á., Kónya, Z. I.
Innováció a Természettudományban 2014 - Doktorandusz Konferencia, Szeged, 2014
- 14. Investigation of the reactivity and the effect of different nanoscale zero valent iron on microbial populations in cis-, dichloroethylene (cDCE) contaminated groundwater.**
 Rónavári A., Balázs M., Homa M., Németh A., Rutkai E., Urbán G., Tolmacsov P., Kiss I., Kukovecz Á., Kónya Z.
16th Danube-Kris-Mures-Tisza (DKMT) Conference Environment and Health, Arad, Románia, 2014
- 15. Remediation by nZVI: impact on the soil microbial community.**
 Rónavári A., Balázs M., Rutkai E., Tolmacsov P., Kiss I, Kukovecz A., Kónya Z.
XVIII. International Symposium on Gnotobiology, Szentpétervár, Oroszország, 2014
- 16. Impact of nanoscale zero valent iron on the soil microbial community: the role of morphology and reactivity.**

Rónavári A., Balázs M., Tolmacsov P., Molnár Cs., Kiss I, Kukovecz A., Kónya Z.
The International Bioscience Conference and the 6th International PSU – UNS Bioscience Conference (IBSC), Újvidék, Szerbia, 2016

17. Development of in situ remediation technologies

Balázs M., Bartos P, Bihari Z, Kiss I, Mécs I, Kálmán M
The 12th Symposium on Analytical and Environmental Problems 2005, Szeged

18. Remediation heavy metal polluted groundwater with natural zeolites

Vesselenyi I, Bartos P, Balázs M., Sutyinszki M
The 12th Symposium on Analytical and Environmental Problems 2005, Szeged

TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK

Összes referált közlemény:	9
Összesített impakt faktor:	17,194
Összes független hivatkozás:	90