

Hidrofób szennyező anyagok biológiai lebontása, új oldószer toleráns baktériumok izolálása és jellemezése

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Erdeiné Kis Ágnes

Témavezető: Dr. Perei Katalin

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Környezettudományi Doktori Iskola

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Biofizikai Intézet

Szeged

2016

BEVEZETÉS

Az elmúlt évszázadban az emberiség növekvő igényei az ipar gyors ütemű fejlődését eredményezte, mely azonban magával hozta a különböző szennyező anyagok környezetben való felhalmozódását is. A romló környezeti állapot viszont fokozatosan hozzájárult egy olyan szemléletmód kialakulásához, melynek köszönhetően ma már tudatosan törekszünk a természeti elemek megóvására, a környezet terhelésének csökkentésére.

Napjainkban aktív kutatás folyik annak érdekében, hogy olyan környezetbarát technológiákat és eljárásokat fejlesszünk, melyek megfelelőek a környezetszennyező, környezetterhelő anyagok eltávolítására. A fizikai-, kémiai technológiák mellett a biológiai módszerek alternatív megközelítést jelenthetnek, hiszen a mikrobiológiai aktivitást kihasználó bioremediációs eljárások nemcsak hatékony, de olcsó és környezetbarát megoldást is kínálnak számunkra.

Környezetünkben számos olyan mikroorganizmus él, melyek változatos enzimkészletüknek köszönhetően jó hatékonysággal alkalmazhatóak különböző szennyező anyagok lebontására. A legkiemelkedőbbeket a *Rhodococcus* nemzetség egyes tagjai között találjuk.

Rendkívül változatos enzimeik, felületaktív anyag termelő tulajdonságuk alkalmassá teszi őket arra, hogy különböző, akár hidrofób tulajdonságú szennyező anyagokat is lebontsanak.

Hazánkat a hidrofób szennyező anyagok közül legnagyobb mennyiségben a különböző kőolaj eredetű gázolaj és az élelmiszeripari zsíros hulladékok (elsősorban sertés- és baromfiszőr) érintik. Munkám során elsődleges célt volt, hogy e szennyező anyagok eltávolítására környezetbarát megoldást kínáljak.

Hidrofób környezetet kedvelő mikroorganizmusoknak jelentős szerepe lehet biokonverziós eljárásokban, ezért további célul tűztem ki gázolajból és fűtőolajból oldószer toleráns mikroorganizmusok izolálását is.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

A *Rhodococcus erythropolis* MK1 törzs (MK1 törzs) gázolaj bontó képességét mikrokozmosz kísérletekben laboratóriumi körülmények között minimál sós tápoldatban és talajban vizsgáltam. A biodegradáció hatékonyságának növelése érdekében mintáimat β -ciklodextrinnel egészítettem ki, továbbá a sejteket kísérlettől függően immobilizáltam kalcium alginát gélágyba. A gázolaj bontás hatékonyságát gázkromatográffal kapcsolt tömegspektrométerrel (GC-MS) vizsgáltam a minták 1:1 arányú extrakcióját követően.

Gázolajjal szennyezett talaj kármentesítését on site prizmás eljárást választva 2 m³-es halmokban végeztem. A kármentesítésben biostimulációt és bioaugmentációt használtam. Biostimuláció során a halmokat minimál sós tápoldattal kezeltem, míg bioaugmentáció esetén az MK1 törzset juttattam ki a halmokba. A friss szennyezés modellezéséhez egyes halmokba 2800 mg/kg gázolajat juttattam ki. A halmok szénhidrogén tartalmát 9 héten át, három hetes mintavételezéssel vizsgáltam 1:1 arányú extrakciót követően GC-MS készülékkel.

Az MK1 törzs zsírbontó képességét a *Rhodococcus erythropolis* PR4 (NBRC 100887) alternatív törzs zsírbontó képességével hasonlítottam össze. A törzsek zsíros hulladék (csirke- és sertészsír) hasznosító képességét minimál sós tápoldatban vizsgáltam laboratóriumi körülmények között. Mintáimat szükség esetén NaHCO₃-al egészítettem ki. A minták zsírtartalmában bekövetkező változásokat, az azokból származtatott metilésztereken keresztül követtem nyomon GC-MS készülékkel.

Az MK1 törzs genomi DNS-ét a hagyományos fenol-kloroform módszerrel vontam ki, majd a genom szekvenálása Illumina MiSeq új generációs platformon történt. A szekvencia adatok összeszerelése MIRA 4 assembler segítségével történt. Az összerakott szekvenciákat a RAST 2.0 szerveren annotáltam.

Új, hidrofób környezetet kedvelő mikroorganizmusok izolálása gázolajból és fáradt olajból történt. A törzsek gázolaj tolerancia vizsgálatát kétfázisú (gázolaj/víz) rendszerben tanulmányoztam. Mintáim 88,7%-ban tartalmazták gázolajat és 11,3%-ban az anyagcsere folyamatokhoz elengedhetetlenül szükséges ásványi sók vizes oldatát. A sejtek aktív

anyagcseréjének következtében felszabaduló CO₂-ot gázkromatográf készülékkel vizsgáltam.

AZ ÉRTEKEZÉS EREDMÉNYEI

Kutatómunkám során a hazánkat leginkább érintő hidrofób szennyező anyagok, a gázolaj valamint csirke- és sertézsír mikrobiológiai bontását vizsgáltam, lebontó szervezetként a *Rhodococcus erythropolis* MK1 törzset felhasználva.

Kísérleteimben új oldószer toleráns extremofil mikroorganizmusokat is izoláltam.

I. Gázolaj, mint hidrofób szennyező anyag lebontásának vizsgálata során tett megállapítások

- 1) Az MK1 törzs képes egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítani a gázolajat.
- 2) Laboratóriumi körülmények között vizes közegben a MK1 törzs a gázolaj közel 70%-át elbontotta egy hét alatt, mely bontási hatékonyság tovább növelhető 20%-al ciklodextrin hozzáadásával. A sejtek bezárásos immobilizálása nem javít a bontási körülményeken.
- 3) Az MK1 törzs, a szakirodalomban a legkiemelkedőbb olajbontóként számon *Alcanivorax borkumensis* törzshöz képest lényegesen hatékonyabb szénhidrogén bontó. Az MK1 katabolizmusa nem korlátozódik csupán az alkánokra, hanem valamennyi típusú szénhidrogén párhuzamos lebontására képes.
- 4) Talajban a természetes szennyező anyag csökkenés jelensége volt megfigyelhető, a szénhidrogének mennyisége közel 40%-kal volt kevesebb a kezeletlen kontroll mintákban a kiindulási értékhez képest. Ásványi sók hozzáadásával (biostimulációval) a bontás hatékonysága növelhető volt, az elért biodegradáció közel 80% volt. A szénhidrogén bontására szelektált mikroorganizmusok hozzáadása (bioaugmentáció) nem fokozta tovább a bontás mértékét.
- 5) A terepi kármentesítésben a régóta fennálló szennyezés (TPH= 671 mg/kg) megszüntetéséhez elegendőnek bizonyult a helyi mikrobiális közösség ásványi sós tápoldattal történő stimulálása. A bioaugmentáció nem növelte a bontás sebességét.

- 6) Friss szennyezés esetében (TPH= 3480 mg/kg) a biostimuláció megfelelő kezelésnek bizonyult, azonban az időfaktort tekintve a bioaugmentáció eredményesebb kármentesítési eljárásnak bizonyult a gyorsabb tisztulás elérésével.

II. Csirke- és sertézsír, mint hidrofób szennyező anyagok lebontásának vizsgálata során tett megállapítások

- 1) Az MK1 törzs képes a gázolajon túl, a sertés és csirkezsírt is egyedüli szén- és energia forrásként hasznosítani.
- 2) Az MK1 törzs zsírbontó képességét a *Rhodococcus erythropolis* PR4 (NBRC 100887) alternatív törzs zsírbontó képességével hasonlítottam össze.
- 3) A zsírok lebontási hatékonyságát a tápoldat pufferelő kapacitása és a vizsgált zsírok zsírsav összetétele befolyásolja. A NaHCO₃-al kiegészített mintákban az MK1 törzs a csirkezsírt teljesen elbontotta, míg sertézsír esetén az elért biodegradáció 78% volt egy hét alatt.
- 4) A csirkezsír teljes biodegradációja már 5 nap alatt bekövetkezett, míg a sertézsír magasabb telített zsírsav tartalma miatt e szubsztrát lebontásához hosszabb idő szükséges.
- 5) A PR4 törzs bár mindkét szubsztrát esetében gyorsabb biodegradációt eredményezett, mint az MK1 törzs, de ez a hatékony biodegradáció szűkebb pH tartományt mutatott PR4 törzs esetében.

III. A *Rhodococcus erythropolis* MK1 törzs genom szekvenálását követően tett megállapítások

- 1) Az MK1 törzs genomjában a gének közül 5 gén *alkB* enzimeket kódol, melyek feltételezhetően a gázolaj alkán komponenseinek a lebontásában vesznek részt. További 11 db citokróm P450 fehérjecsaldba tartozó fehérjéket kódoló géneket is sikerült

kimutatni. A gázolaj aromás vegyületeinek bontásában potenciálisan 77 db gén terméke vehet részt.

- 2) A zsírokat alkotó trigliceridek lebontásában szerepet játszó lipáz enzimek közül 5 db triacil-glicerol lipázt és 2 db monoacil-glicerol lipázt azonosítottam. További 87 db olyan feltételezett fehérjét kódoló szekvenciát találtam a genomban, melyek szerepet játszhatnak a zsírsavak biokonverziójában.

IV. Új oldószer toleráns baktériumok vizsgálata során tett megállapítások és elért eredmények

- 1) Gázolajból és fáradt olajból 8 féle, a gázolaj szénhidrogén komponenseinek bontására képes törzset izoláltam.
- 2) Az izolált törzsek mindegyike, egy kivétellel, a legközelebbi rokonságot a *Rhodococcus* nemzetséggel mutatta. Egy törzs, az előzőektől eltérően, Gram-negatív, és a *Pseudomonas koreensis* fajjal mutatott legnagyobb hasonlóságot.
- 3) Az izolált törzsek magas gázolaj tolerancia-szinttel rendelkeznek. Kétfázisú (gázolaj/víz) rendszerben, 88,7%-os gázolaj koncentráció mellett is képesek aktív anyagcserét folytatni hozzáadott szerves tápanyagok (N, P, Ca, Mg) jelenlétében.

TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

MTMT azonosító: 10037754

Impakt faktor: 8,934

A dolgozat alapját képező közlemények:

1) **Ágnes Kis**, Krisztián Laczi., Szilvia Zsíros, Gábor Rákhely and Katalin Perei: Biodegradation of animal fats and vegetable oils by *Rhodococcus erythropolis* PR4, International Biodeterioration and Biodegradation, (2015) 105: 114-119.

IF: 2,131

2) **Ágnes Kis**, Krisztián Laczi, Szilvia Zsíros, Péter Kós, Roland Tengölics, Naila Bounedjoun, Tamás Kovács, Gábor Rákhely és Katalin Perei: Characterization of the *Rhodococcus erythropolis* MK1 strain and its application for bioremediation of oil contaminated soil, Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, *elbírálás alatt*

IF: 0,568

3) **Ágnes Kis**, Krisztián Laczi, Andrea Hajdú, Árpád Szilágyi, Gábor Rákhely and Katalin Perei: Efficient removal of unctuous wastes from wastewater, International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, (2013) 3: 395-398, ISSN: 2010-3638.

A dolgozat alapjául nem szolgáló, de hozzá szorosan kapcsolódó közlemények:

4) Krisztián Laczi; **Ágnes Kis**; Balázs Horváth; Gergely Maróti; Botond Hegedüs, Katalin Perei and Gábor Rákhely: Metabolic responses of *Rhodococcus erythropolis* PR4 grown on diesel oil and various hydrocarbons, Applied Microbiology and Biotechnology, (2015) 99:9745-59.

IF: 3,337

5) Gábor Rákhely, Balázs Bálint, Rita Béres, **Ágnes Kis**, Kornél L. Kovács, Krisztián Laczi, Andrea Nyilasi, András Fülöp, Zoltán Bagi, Etelka Kovács, Gergő Maróti és Katalin Perei:

Production of gaseous biofuels and fine chemicals from food industrial wastes, *New Biotechnology*, (2014) 31: 103.

IF: 2,898

Egyéb közlemények:

- 6) **Ágnes Kis**, Krisztián Laczi, Roland Tengölics, Kornél L. Kovács, Gábor Rákhely and Katalin Perei: Biodegradation of unctuous waste of food industry, *The 17th International Symposium on Analytical and Environmental Problems*, (2011) ISBN: 978-963-315-066-5.
- 7) **Kis Ágnes**, Laczi Krisztián, Zsíros Szilvia, Kovács L. Kornél, Rákhely Gábor és Perei Katalin: Kőolaj- és élelmiszeripari hulladékok biodegradációja, *Környezettudományi Doktori Iskolák Konferenciája*, (2012) ISBN:978-963-284-242-4.
- 8) **Ágnes Kis**, Roland Tengölics, Krisztián Laczi, Szilvia Zsíros, Andrea Hajdú, Katalin Perei and Gábor Rákhely. Bioremediation of unctuous wastes by Rhodococci, *7th International conference on environmental engineering and management-ICEEM07, Integration Challenges for Sustainability, Conference Abstract Book*, (2013) 293, ISBN 978-973-621-418-9.
- 9) **Ágnes Kis**, Krisztián Laczi, Attila Bodor, Gábor Rákhely és Katalin Perei: Bioremediation of fresh and old diesel oil contaminated soil By biostimulation and bioaugmentation, *6th European Bioremediation Conference Chania, Crete, Greece, June 29-July 2*, Eds.: N. Kalogerakis, F. Fava, E. Manousaki, (2015) 61, ISBN: 978-960-8475-23-6.
- 10) **Kis Ágnes**, Laczi Krisztián, Bodor Attila, Rákhely Gábor és Perei Katalin Bioremediációs eljárások alkalmazása hidrofób szennyező anyagok lebontására, *Környezet-biotechnológiai eljárások fejlesztés, XII. Környezetvédelmi analitikai és technológia konferencia program és előadás összefoglalók, Környezet-analitikai és Technológiai Társaság*, (2015) 37, ISBN 978-963-9970-58-8.

- 11) Krisztián Laczi, Ágnes Kis, Kornél L. Kovács, Gábor Rákhely and Katalin Perei: Biosurfactant synthesis in the oil eater *Rhodococcus* sp. MK1 strain, The 17th International Symposium on Analytical and Environmental Problems, (2011) ISBN: 978-963-315-066-5.
- 12) Katalin Perei, Szilvia Zsíros, Júlia Baán, **Ágnes Kis**, László Erdei, Kornél L. Kovács and Gábor Rákhely: Microbial phosphorous mobilization from bone meal for agricultural applications. 7th International conference on environmental engineering and management-ICEEM07, Integration Challenges for Sustainability, Conference Abstract Book, (2013) 151, ISBN 978-973-621-418-9.
- 13) Krisztián Laczi, **Ágnes Kis**, Andrea Hajdú, Gábor Rákhely and Katalin Perei: Hydrocarbon degrading ability of two *Rhodococcus* strains in soil, saltwater medium and minimal salt medium. 7th International conference on environmental engineering and management-ICEEM07, Integration Challenges for Sustainability, Conference Abstract Book, (2013) 291, ISBN 978-973-621-418-9.
- 14) Laczi Krisztián, **Kis Ágnes**, Bodor Attila, Rákhely Gábor és Perei Katalin: Olajfaló baktériumokkal a szénhidrogén szennyeződések elleni harcban, Zöld Újság, (2014) 9 (3): 21-22, ISSN: 17854911.
- 15) Attila Bodor, Krisztián Laczi, **Ágnes Kis**, Sándor Mészáros, Nikolett Rácz, Gábor Rákhely and Katalin Perei: Microbial degradation of hydrophobic compounds under various environmental conditions, 21th International Symposium on Analytical and Environmental Problems, (2015) ISBN 978-963-306-411-5.
- 16) Attila Bodor, Sándor Mészáros, **Ágnes Kis**, Krisztián Laczi, Gábor Rákhely and Katalin Perei: Szénhidrogének biodegradációjára alkalmas baktérium törzsek izolálása bioremediációs eljárásokban, Innováció a természettudományban – Doktorandusz Konferencia, (2015) ISBN 978-963-9970-63-2.

- 17) Krisztián Laczi, **Ágnes Kis**, Katalin Perei and Gábor Rákhely: Expression profile of monooxygenases in *Rhodococcus erythropolis* PR4 grown on artificial hydrocarbon mixtures, European Bioremediation Conference, (2015) 182, ISBN: 978-960-8475-23-6.
- 18) Perei Katalin, **Kis Ágnes**, Laczi Krisztián, Bodor Attila, Szilágyi Árpád, és Rákhely Gábor: Környezet-biotechnológiai eljárások fejlesztés, XII. Környezetvédelmi analitikai és technológia konferencia program és előadás összefoglalók, Környezet-analitikai és Technológiai Társaság, (2015) 32, ISBN 978-963-9970-58-8.
- 19) Katalin Perei, **Ágnes Kis**, Krisztián Laczi, Szilvia Zsíros és Gábor Rákhely: Biodegradation of hydrophobic wastes by rhodococcus strains, 6th European Bioremediation Conference Chania, Crete, Greece, June 29-July 2, Eds.: N. Kalogerakis, F. Fava, E. Manousaki, (2015) 79, ISBN: 978-960-8475-23-6.
- 20) Gábor Rákhely, Botond Hegedűs, **Ágnes Kis**, Krisztián Laczi, Gábor Bende, Attila Bodor and Katalin Perei: Metabolic insight into biodegradation of sulfonated aromatic and other industrial hydrocarbon wastes, 6th European Bioremediation Conference Chania, Crete, Greece, June 29-July 2, Eds.: N. Kalogerakis, F. Fava, E. Manousaki, (2015) 256, ISBN: 978-960-8475-23-6.