

Szénhidrogén bontó *Rhodococcus erythropolis* törzsek funkcionális genomikai analízise és biotechnológiai alkalmazása

Doktori értekezés

Laczi Krisztián



Témavezetők:

Dr. Perei Katalin
egyetemi adjunktus
Dr. Rákhely Gábor
egyetemi docens

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem
Biotechnológiai Tanszék

Szeged

2016.

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás	6
1. Rövidítések jegyzéke.....	7
2. Bevezetés.....	8
3. Irodalmi áttekintés.....	10
3.1. Szénhidrogének, mint környezeti szennyezőanyagok	10
3.1.1. A kőolaj keletkezése és összetétele.....	10
3.1.2. A szénhidrogén szennyeződések eredete, környezeti, egészségügyi és társadalmi hatása.....	11
3.1.3. A szénhidrogén szennyezés megelőzése illetve a szennyeződés eltávolítása.....	13
3.2. A bioremediáció	14
3.2.1. A bioremediáció általános bemutatása.....	14
3.2.2. A bioremediációs eljárások csoportosítása	15
3.3. Szénhidrogének mikrobiális lebontása	16
3.3.1. Oxigenáz enzimek.....	16
3.3.2. A alkánok oxidációjának módjai	18
3.3.3. Aromás szénhidrogének oxidációja	20
3.3.4. A szénhidrogének anaerob lebontása.....	20
3.4. A <i>Rhodococcus</i> nemzetség	21
3.4.1. A <i>Rhodococcus</i> nemzetség általános jellemzése	21
3.4.2. Felületaktív anyagok a <i>Rhodococcus</i> nemzetségben	23
3.4.3. <i>Rhodococcus</i> törzsek alkalmazási lehetőségei.....	24
3.4.4. <i>R. erythropolis</i> PR4 és MK1 törzsek	25
3.5. Transzkriptom analízis új generációs szekvenálási technikákkal.....	26
3.5.1. Új generációs szekvenáló módszerek	26
3.5.2. Teljes transzkriptom analízis új generációs szekvenálási technikákkal	27
4. Célkitűzések	29

5. Anyagok és módszerek.....	30
5.1. Felhasznált törzsek	30
5.2. Felhasznált anyagok és tápoldatok	30
5.2.1. Luria-Bertani (LB) tápoldat	30
5.2.2. Minimál tápoldat.....	30
5.2.3. Magas só koncentrációjú minimál tápoldat	30
5.2.4. Virágföld.....	30
5.3. Sejtkultúrák szaporítási körülményei	31
5.3.1. Törzsek fenntartása	31
5.3.2. Indító kultúrák szaporítása	31
5.3.3. R. erythropolis törzsek szénhidrogén-bontó képességének összehasonlítása minimál és nagy sókoncentrációjú minimál tápoldatban illetve virágföldben.....	31
5.3.4. R. erythropolis PR4 sejtkultúrák szaporítása fermentorban transzkriptomikai vizsgálatokhoz.....	31
5.4. Analitikai módszerek.....	32
5.4.1. Oxigén kimutatása a kultúrák légteréből	32
5.4.2. Szén-dioxid kimutatása a kultúrák légteréből.....	32
5.4.3. A gázok anyagmennyiségének kiszámítása térfogatuk alapján	33
5.4.4. n-hexadekan kivonása és mennyiségi meghatározása	33
5.4.5. Statisztikai módszerek	34
5.5. Molekuláris biológiai munkák.....	34
5.5.1. Primerek.....	34
5.5.2. Genomi DNS izolálás	34
5.5.3. Növekedési görbe meghatározása teljes nukleinsav koncentráció alapján.....	35
5.5.4. RNS izolálás.....	35
5.5.5. DNáz I kezelés	35
5.5.6. Agaróz gélelektroforézis.....	35
5.5.7. Polimeráz láncreakció.....	36

5.5.8. cDNS szintézis	36
5.5.9. RT-qPCR.....	36
5.6. <i>R. erythropolis</i> MK1 genom szekvenálása újgenerációs módszerekkel	36
5.6.1. Teljes genom szekvenálás SOLiD platformon	36
5.6.2. Teljes genom meghatározása Illumina MiSeq szekvenáló készülékkel	37
5.7. <i>R. erythropolis</i> PR4 transzkriptomikai vizsgálata	37
5.8. Bioinformatikai módszerek	37
6. Eredmények és tárgyalásuk	39
6.1. Szénhidrogének biodegradációja <i>R. erythropolis</i> MK1 és PR4 törzsekkel.....	39
6.1.1. A két <i>Rhodococcus</i> törzs jellemzőinek összehasonlítása n-alkánok jelenlétében ..	39
6.2.2. A sókoncentráció hatása a két <i>R. erythropolis</i> törzs szénhidrogén-bontó képességére	40
6.1.3. A talaj nedvességtartalom hatása a két <i>R. erythropolis</i> törzs szénhidrogén-bontó képességére	41
6.1.4. A n-hexadekán lebontásának oxigén és n-hexadekán mérlege a két <i>Rhodococcus</i> törzsben	42
6.1.5. A két törzs szénhidrogén bontó képességének összehasonlítása dízelolaj frakciókon	45
6.2. A <i>R. erythropolis</i> MK1 genom szekvenálása	47
6.2.1. <i>R. erythropolis</i> MK1 genomjának de novo összeszerelése.....	47
6.2.2. Az <i>R. erythropolis</i> MK1 és PR4 törzsek alkán-1-monooxygenáz génjeinek (alkB) filogenetikai vizsgálata	49
6.2.3. Plazmidok a <i>R. erythropolis</i> MK1 törzsben.....	51
6.3. n-hexadekánon és gázolajon nevelt <i>R. erythropolis</i> PR4 összehasonlító transzkriptomikai analízise	52
6.3.1. Sejtek növekedése a fermentáció során	52
6.3.2. A teljes transzkriptom analízis eredményei	53
6.3.3. Szénhidrogének oxidációja	54

6.3.4 Citokróm P450 monooxygenázok szerepe a gázolaj komponensek biodegradációjában	58
6.3.5. Zsírsv metabolizmus	60
6.3.6. Exopoliszacharid szintézis	62
6.3.7. Vas transzport és sziderofór szintézis	64
6.3.8. A génexpressziós vizsgálatok összefoglalása	64
7. Összefoglalás.....	67
8. Summary	70
I. Függelék: Oligonukleotidok listája.....	73
Irodalomjegyzék.....	75
Saját közlemények jegyzéke	92
Szakmai folyóiratban megjelent cikkek	92
A Ph.D. fokozatszerzéshez felhasznált publikációk	92
Egyéb publikációk	92
Konferencia absztraktok	93
Előadások	93
Poszterek	95
Egyéb közlemények.....	97

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Perei Katalin egyetemi adjunktusnak, hogy doktori munkámat egy színvonalas kutatási témában folytathattam. Köszönöm továbbá munkám során nyújtott irányadó tanácsait és biztató szavait, melyek sokat jelentettek a kutatás nehéz időszakaiban.

Köszönet illeti Dr. Rákhely Gábor egyetemi docenst, a Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai tanszékének vezetőjét, hogy támogatta munkámat, és lehetővé tette dolgozatom elkészítését. Köszönöm értékes tanácsait és a sok segítséget, melyet munkám során nyújtott, valamint hogy lehetővé tette, hogy részt vegyek más kutatási témákban, így számtalan gyakorlati technikával gazdagodott tudásom.

Köszönetet mondok minden kollégámnak, akik segítették munkámat. Külön szeretném megköszönni Zsíros Szilviának a sok technikai segítséget; Kis Ágnesnek a jó hangulatban telt közös munkát és hogy mindig bizalommal fordulhattam hozzá, ha gondom akadt; valamint Tengölics Rolandnak az éjszakába nyúló szakmai beszélgetéseket, melyekből mindketten sokat tanultunk.

Köszönöm édesanyámnak, nagymamámnak és testvéremnek, hogy mindig mellettem álltak és támogattak, bármilyen nehéz célt tűztem ki magam elé. Köszönöm feleségemnek, Mosolygó Tímeának, hogy mindvégig velem volt és a legnehezebb pillanatokban is számíthattam rá; hogy együtt örülhettünk a sikereknek és nem hagyott búslakodni, ha kudarc ért.

A kutatás a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

1. Rövidítések jegyzéke

AlkB:	alkán-1-monooxygenáz
AlmA:	flavin-kötő monooxygenáz
CYP:	citokróm P450
Dnase I:	dezoxiribonukleáz I
DNS:	dezoxi-ribonukleinsav
EDTA:	etilén-diamin-tetraecetsav
EtBr:	etídium-bromid
FASI:	I. típusú zsírsav szintáz
FASII:	II. típusú zsírsav szintáz
HIV:	humán immundeficiencia vírus
LadA:	alkán monooxygenáz
LB:	Luria-Bertani tápoldat
Mbp:	megabázispár
MCO:	multicopper oxidáz
MPSS:	<i>Massively Parallel Signature Sequencing</i>
NADH:	nikotinamid-adenin-dinukleotid (redukált)
OD ₆₀₀ :	600 nm hullámhosszon mért optikai denzitás
PAH:	policiklikus aromás szénhidrogén
PCB:	poliklórozott bifenilek
PCR:	polimeráz láncreakció
RAST:	Rapid Annotation using Subsystem Technology (gyors annotáció alrendszerek használatával)
RNS:	ribonukleinsav
RPKM:	leolvasás/ kilobázis/ millió leolvasás
RT-qPCR:	reverz transzkripció kapcsolt kvantitatív polimeráz láncreakció
SDS:	nátrium-dodecil-szulfát
SAGE:	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
SOLiD:	oligonukleotid ligáláson alapuló szekvenálás (<i>Supported Oligonucleotide Ligation and Detection</i>)
Tris:	Trisz-(hidroximetil)-aminometán

2. Bevezetés

Az elmúlt évszázadban az ipar rohamos fejlődésnek indult. A belső égésű motor feltalálása mérföldkövet jelentett a járműgyártásban, így a kőolajszármazékok üzemanyagként történő felhasználásában is. Ez meggyorsította az utazást, az áruszállítást és fellendítette a gazdaság fejlődését is. A kőolajszármazékokat üzemanyagként, fűtőanyagként, kenőanyagként vagy oldószerként használják az iparban és a hétköznapi életben egyaránt.

A nagymértékű felhasználás miatt az elmúlt fél évszázad során a kőolaj potenciális környezetszennyező anyaggá vált. Nemcsak az üzemanyagok égése során felszabaduló nagy mennyiségű szén-dioxid vagy a savas esőket okozó kén- és nitrogén-oxidok jelentenek problémát, hanem a kőolaj kitermelése és szállítása alatt bekövetkező balesetek számtalan esetben sodorják veszélybe az élővilágot [1]. Az emberiség hamar rádöbbsent, hogy a kőolajszármazékok minden előnyük mellett óriási hátrányokkal is rendelkeznek. A súlyos egészségkárosító, mérgező komponensek nemcsak a természetet, hanem a szennyezés környezetében élő emberek egészségét is veszélyezteti.

Mára már szigorú ENSZ egyezmény szabályozza például a szállításban résztvevő hajók paramétereit, így próbálva minimalizálni a balesetek számát [2]. Ugyanakkor nem minden baleset kerülhető el. A környezetbe jutó kőolajat alkotó szénhidrogének nagy része nehezen bomlik el, így sokáig fennmarad a környezetben. Mindemellett a környezetünk minden közegére veszélyt jelentenek, hiszen nemcsak a talajt vagy a vizet szennyezik, hanem illékony komponenseik révén a levegőt is. Ráadásul az illékony vegyületek között találhatóak a legmérgezőbb szénhidrogének [3,4].

A szénhidrogének környezetben tartósan fennmaradó jellege miatt a nagy mennyiségű szennyezőanyag eltávolítása emberi beavatkozást igényel. Az elmúlt néhány évtizedben sokféle módszert dolgoztak ki a kőolajjal szennyezett területek kármentesítésére. A fizikai és kémiai eljárásokkal szemben a szénhidrogének biológiai úton történő eltávolítása olcsóbb és nagy további előnye, hogy környezetbarát.

A biológiai kármentesítés során kiaknázzák a mikroorganizmusok azon képességét, hogy fel tudják használni a szennyezőanyagokat szén- és energiaforrásként. Sok esetben elegendő csak tápsókat juttatni a szennyezett területre, hiszen a “bennszülött” mikroflóra már rendelkezhet az adott szennyeződés lebontásához szükséges enzimszerekkel, csak más limitáló tényezők, például megfelelő mennyiségű és hozzáférhető nitrogén, foszfor, nyomelemek, vagy akár az oxigén hiánya akadályozza meg a hatékony lebontást. Más esetekben a helyi mikroflóra nem képes lebontani az adott szennyeződést, vagy nem elég

hatékony a lebontás. Ilyenkor egy nem őshonos, de a szennyezőanyagot nagy hatékonysággal metabolizáló mikroba törzset, konzorciumot alkalmaznak a terület kármentesítésére.

A kőolajszármazékok mikrobiális lebontása régóta ismert. A kőolajiparban egyes baktériumok éppen ezért okoznak problémát, hiszen jelenlétük rontja a kőolajipari termékek minőségét [5]. Más szempontból viszont ez a tulajdonságuk előnyös, hiszen a mikroba fajok széles tárháza áll rendelkezésünkre a szénhidrogénekkal szennyezett területek kármentesítésére.

A szénhidrogének biológiai átalakítása napjainkban is intenzíven kutatott terület. A vizsgálati módszerek fejlődése ebben a témakörben is új távlatokat nyitott. Újabb, jobb és nagyobb áteresztőképességű eljárások állnak rendelkezésünkre mind az egyedi mikroorganizmusok, mind pedig a mikrobaközösségek vizsgálatára. Ilyenek például az újgenerációs DNS szekvenáló rendszerek, melyek segítségével átfogó képet kaphatunk a szénhidrogének lebontásában résztvevő mikrobák genetikai állományáról [6–8], vagy a gének expressziós mintázatának változásáról a biodegradáció során [9]. Az expressziós mintázatok vizsgálatával megismerhetjük azokat a géneket, amelyek szerepet játszanak a szénhidrogének biodegradációjában illetve a toxikus komponensek elleni védelemben.

3. Irodalmi áttekintés

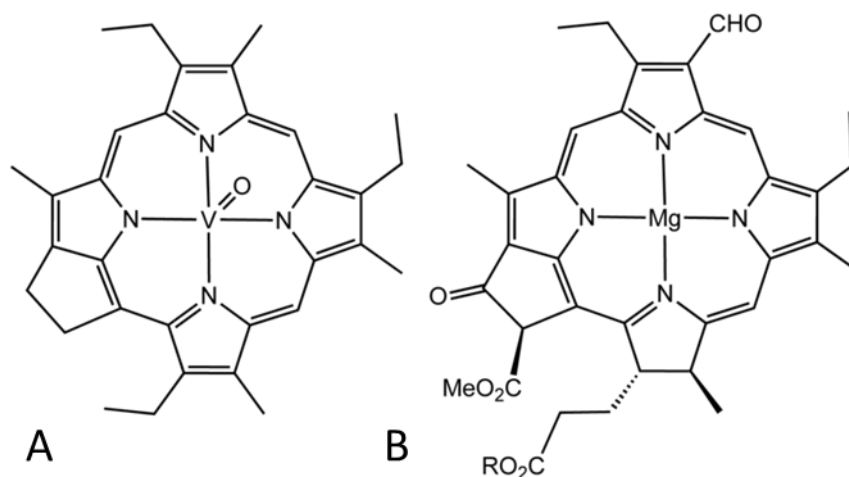
3.1. Szénhidrogének, mint környezeti szennyezőanyagok

A szénhidrogének emberi tevékenységből kifolyólag, illetve természetes úton is a környezetbe kerülhetnek, ahol nagy mennyiségben előfordulnak. A szénhidrogének környezetre ártalmas és súlyos egészségkárosító hatású anyagok. Ezért fontos feladat eltávolításuk a környezetből.

3.1.1. A kőolaj keletkezése és összetétele

A kőolaj a tengerfenéken és a tavak mélyén felhalmozódó nagy mennyiségű elhalt állati és növényi szerves anyagból képződik. Eerre az elméletre Alfred E. Treibs talált bizonyítékot 1936-ban. Treibs felismerte a hasonlóságot az élőlényekből származó porfirin vázas pigmentek és a kőolajban található porfirin vegyületek között (1. ábra) [10,11].

Az üledékkel betemetett állati és növényi maradványok oxigéntől elzárva, magas hőmérsékleten és nyomáson először kerogénné alakulnak át, ami az olaj alapközetének szerves anyaga. A kerogénből további hőmérséklet és nyomás emelkedés hatására jönnek létre a folyékony és gáz halmazállapotú szénhidrogének.

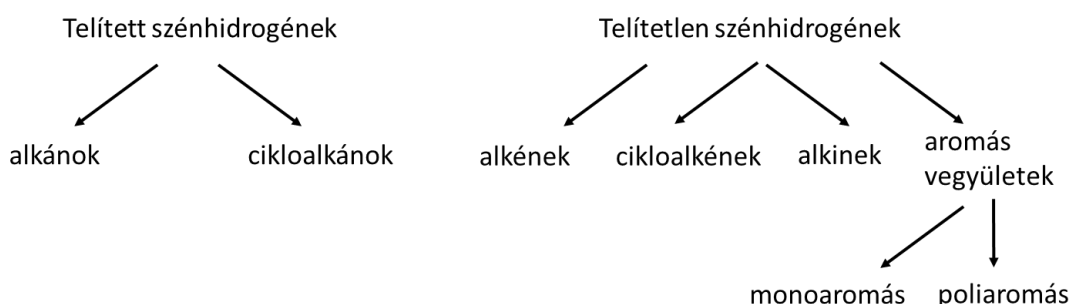


1. ábra: Kőolajból származó porfirin vázas vanádium vegyület (A) és a klorofill (B) szerkezete [12]

A kőolajat alkotó szénhidrogének két nagy csoportra, telített és telítetlen szénhidrogén vegyületekre oszthatók. A telített szénhidrogének lehetnek nyílt vagy zárt láncú vegyületek (2. ábra). Az előbbieket összefoglaló néven alkánoknak, az utóbbiakat cikloalkánoknak nevezzük. A kőolajból származó egyenes láncú alkánok a fosszilis üzemanyagok legnagyobb arányban jelen lévő komponensei.

A telítetlen szénhidrogének között található nyílt láncú vegyületek egyik csoportja az alkének, amelyek egy vagy több szén-szén kettős kötést tartalmaznak. A másik csoportot az alkinek alkotják, amelyek molekuláiban két szénatom között a σ -kötés mellett két π -kötés is kialakul. A telítetlen zárt láncú szénhidrogének közé tartoznak a cikloalkének és az aromás szénhidrogének.

Az aromás szénhidrogéneket csoportosíthatjuk a gyűrűk száma szerint, így megkülönböztethetünk egy gyűrűt tartalmazó monoaromás és több gyűrűből felépülő poliaromás szénhidrogéneket (PAH).



2. ábra: A szénhidrogének csoportosítása [13]

A kőolaj és származékainak összetevői között heteroatomot (kén, nitrogén, oxigén) tartalmazó vegyületeket is találhatunk. Ilyen vegyületek például a fenol származékok, a heterociklusos nitrogén vegyületek, mint a kinolin, vagy a kén tartalmú benzotiofének és dibenzotiofének.

3.1.2. A szénhidrogén szennyeződések eredete, környezeti, egészségügyi és társadalmi hatása

A világ energiatermelésének közel 80%-át a fosszilis energiahordozók (kőolaj, földgáz, kőszén) adják. A kőolaj, mint különböző üzemanyagok és kenőanyagok alapja, fontos szerepet tölt be az élet minden területén. A kőolajban található aromás vegyületeket festékek, oldószerek, gyógyszerek, és robbanószer gyártására használják fel. Az ipari léptékű használat elkerülhetetlen velejárója, hogy ezek az anyagok kikerülnek a környezetbe. A kitermelés és a szállítás során bekövetkező balesetek súlyos veszélyt jelentenek az érintett területek élővilágára. Mivel a kőolaj kitermelése és szállítása nagyrészt tengerekhez kötött, a tengeri környezet van kitéve a legnagyobb veszélynek.

A La-Manche csatornán, 1967-ben az első nagy tankhajó baleset következtében 120 ezer tonna nyersolaj ömlött a tengerbe [14]. Az ezt követő évtizedekben számos tanker

szenvedett balesetet, melyek közül az egyik legnagyobb az Exxon Valdez 1989. márciusi zátonyra futása volt Alaszka partjai mellett. 260 ezer hordó olaj jutott a tengerbe, több mint 1400 kilométer partvonalat szennyezve be. A mentésben több mint 10 ezer ember vett részt, a ráfordított összeg pedig meghaladta a 2 milliárd USD-t. Az új évezred eddigi legsúlyosabb olajkatasztrófája a Mexikói-öbölben történt 2010 áprilisában. A British Petrol tulajdonában lévő Deepwater Horizon olajfúró torony robbanása megközelítőleg 4,9 millió hordónyi olaj tengerbe jutását eredményezte [15].

Annak ellenére, hogy az olajkatasztrófák nagy hatással vannak az érintett területek élővilágára, gazdaságára és az emberiség olajiparról alkotott képére, a szénhidrogén szennyeződések mindössze negyede származik a kitermelés, szállítás illetve finomítás során történő balesetektől. Egy jóval nagyobb hányad származik más emberi tevékenységekből, például autómosók szennyvizéből, rossz műszaki állapotú gépekből és járművekből. A helytelenül tárolt üzemanyagok, oldószerek, illetve ipari alapanyagok szintén jelentős szennyezőforrások.

A szénhidrogének környezetbe jutásának van természetes módja is. Erdőtüzek vagy vulkáni tevékenység eredményeként policiklikus aromás szénhidrogének (PAH) keletkeznek [16]. Hasonlóképpen nyersolaj megjelenhet a környezetben az olajtározók szivárgása révén is. Az USA tudományos akadémiajának (National Academy of Science) becslései szerint az olajrezervoárok szivárgása a tengeri olajszennyezés 10%-át teszi ki, ami 600 ezer tonna olajat jelent évente [17].

A szénhidrogének a környezetbe kerülve súlyos károkat okoznak. Mivel a kőolaj legtöbb komponense könnyebb a víznél, filmréteget képeznek a vizek tetején, így gátolják az oxigén beoldódását és a napfény átjutását. Az állatok kültakarójára ragadva korlátozzák őket a mozgásban, felborítják hőháztartásukat. A talajban gátolhatják a növények csírázását, illetve fejlődését [18,19]. A talaj részecskéihez adszorbeálódva sokáig fennmaradhatnak a környezetben. A szénhidrogének legveszélyesebb csoportját az aromás vegyületek alkotják, melyek között számos mérgező illetve rákkeltő anyag is található. Például a magas benzol koncentrációnak való kitettség DNS károsodást okoz és leukémia kialakulásához vezethet [20]. A toluol bomlástermékei ugyancsak erősen mérgező hatásúak az emberre nézve. A PAH vegyületek felhalmozódhatnak az élő szervezetben és sok közülük bizonyítottan rákkeltő [21,22] valamint magzatkárosító [23,24] hatású.

Az olajszennyeződés egy adott terület gazdaságára és társadalmára is negatív hatással van. A Floridai Egyetem 2013-ban megjelent tanulmánya szerint a 2010-es Mexikói-öbölbeli olajkatasztrófa hatására megnőtt a depresszió és a szorongás az érintett területek lakossága

körében. Ez a hatás főként azokat érintette, akik tartósan elveszítették jövedelmüket a katasztrófa miatt [25].

3.1.3. A szénhidrogén szennyezés megelőzése illetve a szennyeződés eltávolítása

A szénhidrogén szennyeződések súlyos környezeti, egészségügyi, társadalmi és gazdasági hatását csak a szennyezés megelőzésével lehet kivédeni. Az 1967-es, La-Manche csatornában történt tankerbaleset hatására készítette el az ENSZ Nemzetközi Tengerészeti Szervezete 1973-ban a MARPOL egyezményt [14]. Az egyezmény protokollja 1978-ban készült el és ekkor lépett hatályba maga az egyezmény is. Az első kiegészítés 1983. október 2-án lépett életbe, ami a tengerek olajszennyezésének visszaszorítását tűzte ki célul. A kiegészítés magába foglalja a hajók működése közbeni olajszennyezés elleni védelmet, illetve a balesetekből származó szennyezés esélyének csökkentését. Meghatározza az olajszállító tankerek és a teherhajók szabványait, például az elkülönített olajmentes ballaszt tartályok meglétét. Az I. kiegészítés 1992-es módosítása szerint a tankerhajóknak dupla fallal kell rendelkeznie [2].

Ugyanakkor nemcsak a megelőzés, hanem az olajszennyeződés eltávolítása is sürgető feladat. A szennyezett terület kármentesítésére többféle kémiai, fizikai és biológiai módszert is alkalmaznak. A kémiai eljárások közül az egyik legolcsóbb a kiömlött olaj ellenőrzött égetése, ami hatékonyan csökkentheti a szénhidrogén szennyeződést. Ugyanakkor az égetéssel nagy mennyiségű szén-dioxid és - az olajban található kén és nitrogén vegyületek miatt - kén- és nitrogén-oxidok kerülhetnek a levegőbe. Ez növeli az üvegházhatást és savas esőkhöz vezethet.

A kémiai megoldások közé sorolják a diszpergáló anyagok használatát, melyek segítik az olaj a vízben emulzió kialakulását és növelik az olaj hozzáférhetőségét a mikrobák számára. Az egyik legnagyobb probléma az eljárással, hogy az alkalmazott diszpergáló anyagok nemcsak a mikroorganizmusok számára teszik elérhetővé a kőolaj toxikus komponenseit, hanem más vízi élőlények szervezetébe is könnyebben bejutnak [26]. Mindemellett maguk a felületaktív anyagok is toxikusak lehetnek [27].

Egy másik megközelítés a szilárdító anyagok használata. Ezek az anyagok szilárd gélle alakítják a folyékony olajat, így megkönnyítik az eltávolítását. Óriási hátránya az eljárásnak, hogy nem minden olajtípusra működik ugyanolyan hatékonysággal és nagy mennyiségű szilárdító anyagot kell felhasználni a várt eredmény eléréséhez. Mindemellett a legtöbb szilárdító anyag erősen toxikus [28]. Jadhav és munkatársai 2010-ben egy új szorbitol és mannitol alapú szilárdító anyagot dolgoztak ki, mely nem toxikus, szelektív az olaj frakcióra és könnyen visszanyerhető belőle az olaj [29].

A mechanikai eljárások egyik változata a lefölezés. A víz felszínén úszó olajfilmet bekerítik és lehalásszák. A lefölezéssel kombinálható különböző szorbensek alkalmazása. A szorbensek adszorbeálják vagy abszorbeálják az olajat így a szilárdító anyagokhoz hasonlóan megkönnyítik annak eltávolítását. Az alkalmazott szorbens lehet grafit, grafén, növényi rost, vagy állati eredetű anyag, mint a selyemhernyógubó [30]. Wu és munkatársai kifejlesztettek egy eljárást szén nanoszál aerogél olcsó gyártására, amely nagy szorpciós kapacitással rendelkezik [31].

A felsorolt eljárások, bár folyamatosan fejlődnek, önmagukban nem tökéletes megoldások az olajszennyeződés eltávolítására. A legtöbbjük drága anyagok használatát követeli meg vagy hasonlóan környezetkárosító hatású, mint maga az olajszennyeződés. Mindemellett a legtöbb fizikai és kémiai eljárás főként a tengeri szennyeződések eltávolítására alkalmazható, a szennyezett talaj kezelésére kevésbé alkalmas.

A biológiai kármentesítés egy olcsó és környezetbarát alternatívát nyújt az olajszennyeződések eltávolítására. A biológiai kármentesítés során mikroorganizmusokat, növényeket vagy azok termékeit használják fel a szennyező anyagok eltávolítására.

3.2. A bioremediáció

3.2.1. A bioremediáció általános bemutatása

A bioremediáció fogalma a múlt század közepén született meg. A dán származású amerikai kutató Claude E. ZoBell 1946-ban elsőként foglalta össze a szénhidrogének mikrobiális lebontásáról összegyűlt ismereteket [32]. Maga a bioremediáció viszont csak négy évtizeddel később az Exxon Valdez olajtanker katasztrófája kapcsán vált ismertté. A kármentesítés során főként nitrogén tartalmú tápanyagokat használtak, hogy felgyorsítsák az olaj biológiai úton történő lebontását [15]. Az elmúlt harminc év során sok olyan mikroorganizmust izoláltak, amelyek képesek metabolizálni akár a legmérgezőbb környezeti szennyezőanyagokat is.

A mikroorganizmusok bioremediációban való alkalmazásának több oka is van: gyorsan szaporodnak, viszonylag olcsó a szaporításuk, a szennyezett területekről izolált mikrobák már eredendően ellenállnak a toxikus anyagoknak és képesek lehetnek az adott szennyeződés bontására. A szennyezőanyagok mikrobiális biodegradációja történhet aerob vagy anaerob módon is. Az anaerob bioremediáció egyik nagy hátránya, hogy az átalakítás nem szén-dioxidig történik és a végtermék néha mérgezőbb, mint a kiindulási anyag. Erre példa a triklór-ecetsav biodegradációja során keletkező diklór-ecetsav és vinil-klorid [33]. Az aerob lebontás általában

a kiindulási anyag teljes oxidációjával végződik, tehát a végtermék szén-dioxid lesz, így nem marad veszélyes közti termék a környezetben.

Nemcsak a mikroorganizmusok használhatók fel bioremediációra, hanem a növények is, ezt nevezzük fitoremediációnak. A növények sok olyan előnyös tulajdonsággal rendelkeznek, ami miatt alkalmasak erre a feladatra. Többek között képesek immobilizálni vagy akkumulálni a különböző szennyezőanyagokat. A növények képesek lehetnek néhány mérgező anyag, mint a DDT vagy a PCB lebontására is [33,34].

3.2.2. A bioremediációs eljárások csoportosítása

A bioremediációs eljárásoknak két csoportját különböztetik meg. Az *ex situ* eljárások során a szennyezett talajt vagy vizet kitermelik és elkülönített helyen végzik el a kármentesítést. A szennyezett talaj kármentesítésére leggyakrabban alkalmazott *ex situ* technika a komposztálás. A talajszennyeződés eltávolításának egy másik módja, az úgynevezett „land farming” vagy talajműveléses technika. Elsősorban a talaj felső rétegét kezelik. Sikeresen alkalmazható szénhidrogén szennyeződések eltávolítására.

A szennyezett vizek és iszapok *ex situ* kármentesítésére bioreaktorokat használnak. A talajvíz kezelésére alkalmazható másik *ex situ* módszer az úgynevezett „pump and treat”, mely kombinálható a bioreaktorral. Az eljárás során kipumpálják a talajvizet, megtisztítják, majd visszajuttatják a talajba [35].

A talajműveléses technikának *in situ* változata is van, mely során a talajt helyben kezelik kitermelés nélkül. Az *in situ* módszerek jóval olcsóbbak, mint az *ex situ* eljárások, mivel nem kell megfizetni a kitermelés és a szállítás költségeit. Leggyakrabban biostimulációt és bioaugmentációt alkalmaznak az *in situ* módszerek kivitelezésekor. A biostimuláció során a szennyezett közegben őshonos mikrobaközösséget serkentik tápanyagokkal, illetve a megfelelő feltételek biztosításával, például levegőztetéssel. A bioventillációval levegőt pumpálnak a talajba, így növelve az aerob mikrobák biodegradációs aktivitását. Ezt az eljárást elsősorban gázolaj és kerozin eltávolításánál használják. Klórozott illetve aromás szénhidrogénekkel szennyezett talajok esetén ez az eljárás nem használható, mivel a toxikus illékony anyagokat kihajtja a talajból, amelyek így légszennyezést okoznak.

Bár a környezetben sok olyan mikroorganizmus található, amely képes egyedi szén- és energiaforrásként hasznosítani a környezetbe kikerülő szennyezőanyagokat, egy friss szennyeződéssel nem mindig képesek megbirkózni. Abban az esetben, ha az őshonos mikrobatorzsek között nincs olyan, amelyik bontani képes a szennyezőanyagot, vagy csak kis hatékonyságú biodegradáció tapasztalható, bioaugmentációt alkalmaznak. A

bioaugmentációval egy vagy több - laboratóriumban felszaporított - mikrobatörzset juttatnak a környezetbe. Ezek a laboratóriumi törzsek már előzetesen alkalmazkodtak az adott szennyeződéshez, így gyorsan és hatékonyan metabolizálják azt. A bioaugmentációt a nagyobb hatásfok elérése érdekében kombinálni szokták a biostimulációval [36].

Egy harmadik fajta módszer - *in situ* eljárásnak tekinthető - a passzív bioremediáció. Ebben az esetben kizárólag az őshonos mikroorganizmusok végzik a munkát. Az ember nem avatkozik be a szennyezőanyagok eltávolításába, csak megfigyeli a természetes tisztulási folyamatot.

3.3. Szénhidrogének mikrobiális lebontása

A szénhidrogén szennyezések nemcsak antropogén eredetűek lehetnek, már jóval az ember megjelenése előtt jelen voltak a környezetben. A vulkánkitörések és az olajrezervoárok folyamatos szivárgása révén a mikroorganizmusok már évmilliók óta kapcsolatban vannak a szénhidrogénekkel. Ugyanakkor sok élőlény termel szénhidrogéneket számos okból, például a kiszáradás elleni védelemre, feromonként vagy energiaraktárként [37]. Így nem meglepő, hogy a mikroorganizmusok evolúciója során számos enzimrendszer specializálódott a szénhidrogének lebontására.

A szénhidrogén metabolizmust a legkülönbözőbb mikrobacsoportok, mint eubaktériumok, élesztők, gombák és egyes algafajok esetében is leírták [38,39]. Az alkánok lebontására számos baktérium nemzetség, mint az *Acinetobacter*, *Alcanivorax*, *Bacillus*, *Dietzia*, *Geobacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* stb. képviselői képesek [38]. A tengeri kőolajszennyeződések esetén az egyik leggyakoribb baktérium faj az *Alkanivorax burcumensis*, mely hosszú láncú alkánokat metabolizál [38,40]. A mérsékelt övi tengerekben egy másik baktériumfaj a *Thalassolituus oleivorans* alkán-bontó jelentőségét is leírták [38]. A *Rhodococcus* fajok nemcsak tengerekben [41], hanem szénhidrogén szennyezett talajban is megtalálhatók [42], pszikrofil körülmények között is képesek az alkánok hasznosítására [43] és számos faj aromás szénhidrogének metabolizációjára is képes [39].

3.3.1. Oxigenáz enzimek

A szénhidrogének biológiai lebontása lehet anaerob vagy aerob. Az aerob biodegradáció első lépése a molekula oxidálása. Ezt a folyamatot speciális enzimek, ún. oxigenázok katalizálják. Az oxigenázokat csoportosíthatjuk aszerint, hogy hány oxigén atomot építenek be a szubsztrát molekulába [37]. Ez alapján megkülönböztetünk mono- és dioxigenázokat.

Mindkét enzimtípus molekuláris oxigént használ a szubsztrát oxidálására, azonban a monooxygenázok csak az egyik oxigén atomot építik be a szubsztrátjukba. A dioxigenázok viszont az oxigén molekula mindkét atomját a szubsztráthoz kapcsolják, létrehozva az adott szubsztrát dihidroxi származékát.

A monooxygenázok, melyek az enzimek egy heterogén csoportját alkotják, abban hasonlítanak egymásra, hogy a szubsztrát molekula oxidációját katalizálják molekuláris oxigén felhasználásával. A monooxygenáz reakció során az oxigén molekula egyik atomja - hidroxil csoport formájában beépül a molekulába és megfelelő alkohol képződik, a másik oxigén atom vízzé redukálódik [44]. A nyílt láncú szénhidrogénekből létrejött alkohol ezután több enzimreakción keresztül aldehiddé, majd zsírsavvá alakul. A zsírsavat egy acil-CoA acetyl-transzferáz CoA-hoz kapcsolva aktiválja, ami ezután a β -oxidációban metabolizálódik.

Az alifás szénhidrogének lebontásában résztvevő monooxygenázok több csoportra oszthatók. A legrövidebb szénláncú alkánok oxidációjában a metán, propán illetve a bután monooxygenázok vesznek részt. A hosszabb szénláncú alkánok oxidációjában a citokróm P450 monooxygenázok (CYP153) és az AlkB típusú alkán-1-monooxygenázok játszanak szerepet. Ezen kívül vannak olyan monooxygenázok, melyek a C₂₀ feletti lánchosszúságú alkánokat oxidálják. [37,45,46]

Az AlkB monooxygenáz enzimet elsőként a *Pseudomonas putida* GPo1 törzsében írták és sokáig ez maradt az egyetlen jól jellemzett alkán-1-monooxygenáz [37]. Számos szénhidrogén-bontó mikroorganizmusban megtalálható, így a *Pseudomonas* nemzetségen kívül, az *Alkanivorax*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Gordonia* és *Rhodococcus* fajokban is. Az AlkB típusú monooxygenázok membrán-kötött hem-nélküli enzimek, reakciócentrumukban két vas található. Az enzim működését két fehérje, a rubredoxin és a rubredoxin reduktáz segíti. A rubredoxin reduktáz elektronokat juttat a NADH-ról a rubredoxinra, ami pedig az enzimhez szállítja azokat [47]. Az elektrontranszportban résztvevő fehérjéket kódoló gének általában egy operonban vannak az *alkB* génnel, mely lehet plazmidon vagy kromoszómán kódolt is. A *P. putida* GPo1 esetében a pOCT plazmidon kódolt *alkB* génnel egy operonban található a rubredoxin génen kívül az alkán oxidáció többi lépésében résztvevő enzimeket kódoló nyitott leolvasási keretek is (*alkBFGHJKL* operon), azonban a rubredoxin reduktáz külön lókuszban van a transzkripciót szabályozó génnel együtt (*alkTS*). Jan B. van Beilen és munkatársai által végzett vizsgálatok szerint a GPo1 törzs AlkB fehérjéjének 55-ös pozícióban lévő triptofánja lehet felelős az enzim szubsztrát specifitásáért [48].

A citokróm P450 főcsalád a vas-hem tartalmú monooxygenázok egy széles körben elterjedt csoportját jelenti. Ebbe a hatalmas főcsaládba igen változatos reakciókat katalizáló

enzimek tartoznak. Mind prokariótákban, mind pedig eukariótákban megtalálhatók. A prokarióta enzimekre a szabad forma jellemző, míg az eukarióta enzimek szabad vagy membránkötött formában is előfordulhatnak [49]. Az alapján, hogy milyen forrásból kapják az elektronokat az általuk katalizált reakciókhoz, négy nagy csoportba oszthatjuk őket. Az I. csoport ferredoxin-ferredoxin reduktáz-NAD(P)H rendszerhez kapcsolt. A II. csoport tagjait egy P450 reduktáz enzim redukálja, míg a III. csoportnak nincs szüksége külső elektronforrásra a reakcióhoz, ami nem is igazán oxidáció, hanem hidroperoxidok átrendeződése. A IV. csoportba tartozó enzimek közvetlenül a NAD(P)H-ből nyerik az elektronokat. Az egyes citokróm P450 enzimek szekvenciái kevésbé hasonlítanak egymáshoz. A hasonlóság alapján családokba osztják őket, melyeket a citokróm P450-t kódoló CYP után számmal jelölnek (pl.: CYP51). Az egy családba tartozó CYP enzimek között több, mint 40% a szekvencia azonosság [49]. Egy bakteriális CYP család - a CYP153 - egyenes láncú (C₅₋₁₀) alkánok oxidációját katalizálja. Olyan baktériumokban is megtalálhatóak, amelyek nem rendelkeznek membránkötött alkán monooxygenázokkal, mégis képesek az alkánok szénforrásként való hasznosítására [50]. A CYP52-es családba tartozó monooxygenázok katalizálják a zsírsavak ω-hidroxilációját *Candida* fajokban. Az ugyancsak gomba eredetű CYP63A2 típusú monooxygenáz széles szubsztrát spektrummal rendelkezik, így egyaránt képes az alkánok, PAH-ok és alkil-fenolok oxidációjára [51].

A hosszú, 20 szénatom feletti alkánok oxidációjára több enzimsz csoport is képes. A *Gordonia* sp. SoCg törzs AlkB típusú membrán-kötött monooxygenáza 30-as szénatomszámg oxidálja az alkánokat [52]. Az AlkB típusú enzimeken kívül más monooxygenázok is elfogadják a hosszú szénláncú alkánokat szubsztrátként. Ilyenek például a *Geobacillus thermodenitrificans* LadA vagy egyes *Acinetobacter* és *Alkanivorax* törzsekben megtalálható AlmA enzimek. A LadA egy szolubilis, kétkomponensű flavin-függő fehérje, kristályszerkezete alapján a bakteriális luciferázok családjába tartozik [45]. Az AlmA enzim egy flavin-kötő monooxygenáz [46]. Mindkét enzim a 30 szénatomszám feletti alkánok oxidációját katalizálja.

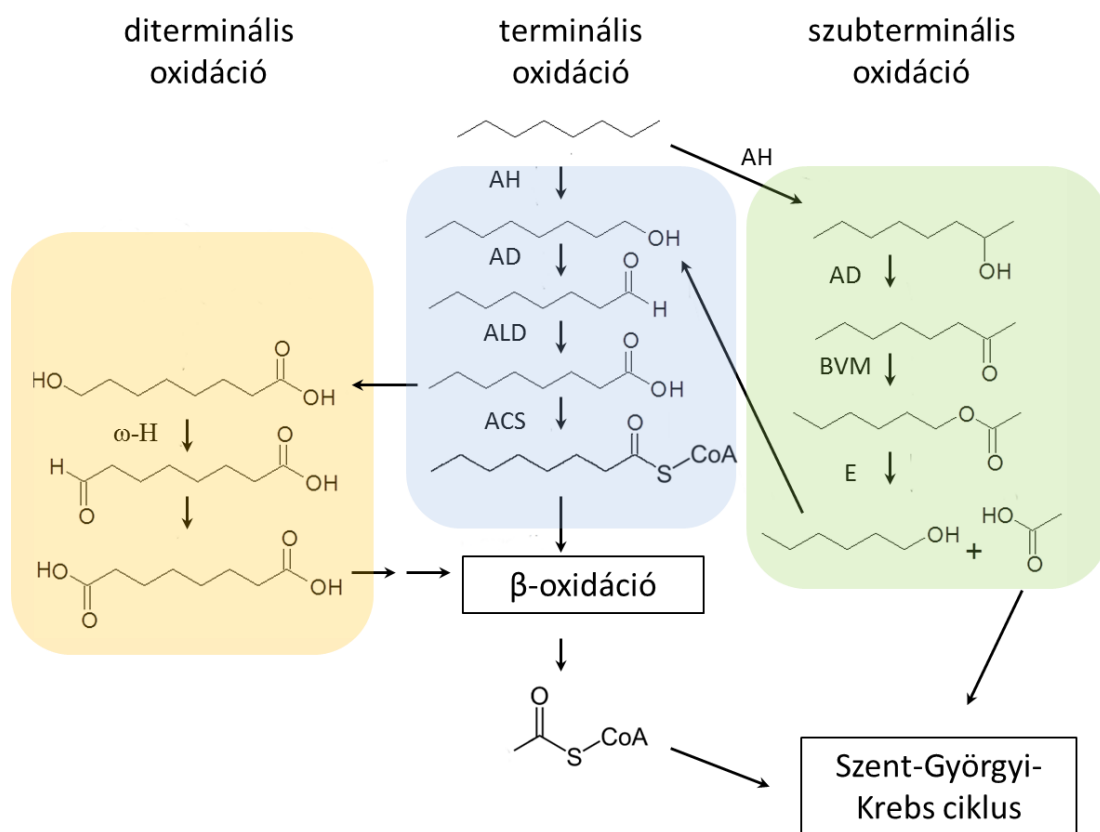
A dioxigenázok mind gyűrűs, mind pedig egyenes láncú alkánok oxidációját katalizálhatják. Az aromás szénhidrogének bontásában résztvevő dioxigenáz enzimek között megkülönböztetünk gyűrű-hidroxiláló és gyűrűhasító dioxigenázokat [53–56].

3.3.2. A alkánok oxidációjának módjai

Az egyenes láncú alkánok oxidációja több módon végbemehet. A monooxygenázok három módon hidroxilálhatják a szénláncot (3. ábra). Az első és a legelterjedtebb reakció a terminális oxidáció, melynek a terméke egy elsőrendű alkohol. A szubterminális oxidáció

esetén az oxigenáz az utolsó előtti szénatomra helyezi a hidroxil csoportot. Az így keletkező másodrendű alkohol ketonná, majd egy Bayer-Villiger monooxygenáz segítségével észterré alakul. Az észter hasítását követően egy elsőrendű alkohol keletkezik, ami tovább oxidálódik a terminális útvonalon. A reakcióból felszabaduló ecetsav pedig a Szent-Györgyi-Krebs ciklusban hasznosul, vagy a sejt felépítő folyamataiban vesz részt. A harmadik útvonal a diterminális oxidáció. Ebben az esetben az oxidáció a zsírsavig a hagyományos (terminális) útvonalon történik. A zsírsav ω szénatomját egy monooxygenáz hidroxilálja. A keletkező ω -hidroxi zsírsav több lépésben tovább oxidálódik α,ω -dikarbonsavvá [57,58].

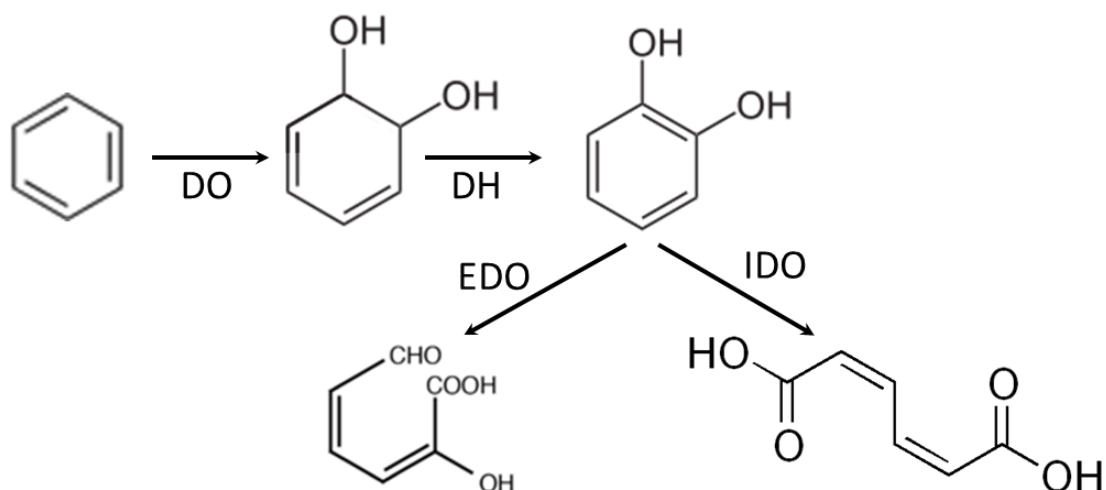
Az *Acinetobacter* sp. törzsek esetében leírtak egy dioxigenáz által katalizált útvonalat is, mely során alkil-hidroperoxid és peroxisav köztitermékeken keresztül keletkeznek a zsírsavak [59].



3. ábra: A szénhidrogének oxidációja monooxygenázok segítségével. AH: alkán hidroxiláz (monooxygenáz), AD: alkohol dehidrogenáz, ALD: aldehid dehidrogenáz, ACS: acil-CoA szintáz, ω -H: zsírsav ω -hidroxiláz (monooxygenáz), BVM: Bayer-Villiger monooxygenáz, E: észteráz [57]

3.3.3. Aromás szénhidrogének oxidációja

Az aromás szénhidrogének mono-, vagy dioxigenáz reakción keresztül bomlanak le. Első lépésben két egymást követő monooxygenáz reakció során [60–62], vagy egy gyűrű hidroxiláló dioxigenáz segítségével oxidálódik az aromás gyűrű [54]. Az így kialakult katekol származék szénláncát egy gyűrű-hasító dioxigenáz felnyitja. A hasítás kétféleképpen mehet végbe. Az intradiol dioxigenázok a két hidroxil csoport között, míg az extradiol dioxigenázok pedig az egyik hidroxil csoporthoz képest *meta* helyzetben, a másik hidroxilcsoport mellett hasítanak. A katekol intradiol hasításának terméke egy *cis*, *cis*-mukonsav, míg a *meta* hasítás eredményeként egy 2-hidoximukonsav szemialdehid alakul ki. A 4. ábra a legegyszerűbb aromás vegyület, a benzol példáján mutatja be az aromás vegyületek lebontását.



4. ábra: A benzol oxidációja dioxigenázokkal. DO: gyűrűhidroxiláló dioxigenáz, DH: *cis*-dihidrodiol dehidrogenáz, EDO: extradiol dioxigenáz, IDO: intradiol dioxigenáz

Az első monooxygenáz reakciót követheti egy dehidrogenáz reakció is, például a toluol oxidációja során. Ezt követően a kialakult 4-hidroxi-benzaldehyd számos enzimatikus lépés után a vanillin útvonalon hasznosul [62].

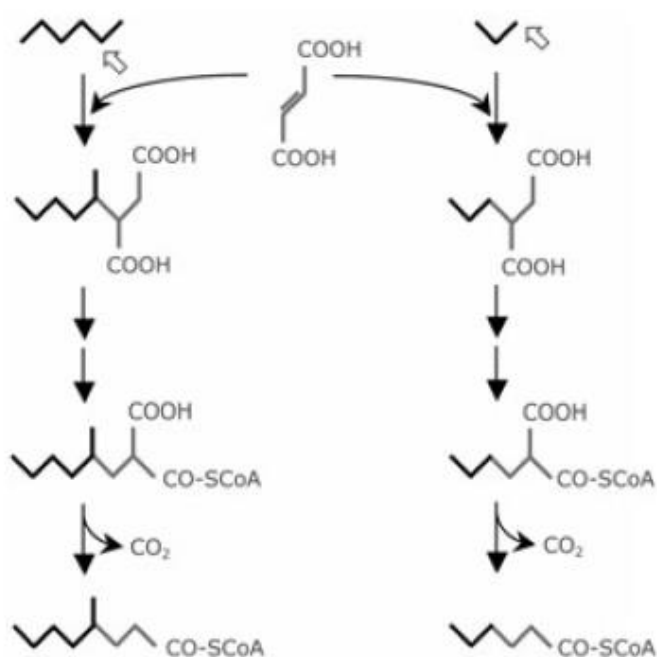
3.3.4. A szénhidrogének anaerob lebontása

Az alkánok lebontásában résztvevő anaerob baktériumok szulfát- vagy nitrát-redukálók és általában szűk szubsztrátspecifitással rendelkeznek [57]. A nyílt láncú alkánok anaerob lebontása során fumársav épül be a szénhidrogén láncba. A folyamat két módon mehet végbe [57] (5. ábra). Az *n*-hexán esetében a fumársav a második szénatomra épül rá, így jön létre az 1-metil-pentil-szukcinát, ami több lépésen keresztül koenzim A-hoz kapcsolódik és a β -

oxidációban hasznosul. Egy alternatív kapcsolódási pont lehet a 3. szénatom is, amit bizonyít az n-hexán lebontása közben megjelenő 1-etil-butil-szukcinát intermedier is [63,64]. Azt az útvonalat, melyben a szukcinát a láncvégi szénatomhoz kapcsolódik, eddig csak a propánra írták le [57].

Az aromás vegyületek anaerob lebontása több egymástól teljesen eltérő útvonalon történhet. A toluol és a xilolok fumársavval kapcsolódva aktiválódnak. Ez igaz a nitrát- és a szulfát-redukáló mikroorganizmusokra egyaránt. Ugyanakkor az etilbenzol anaerob lebontása már különbözik a két mikrobacsoportban. Míg a szulfát-redukálóknál fumaráttal kapcsolódik a molekula, a nitrát-redukálók egy dehidrogénező lépésben az etilbenzolt fenil-etanollá alakítják át [63].

A PAH vegyületek anaerob lebontása egy harmadik útvonalon történik. A kísérletes bizonyítékok arra utalnak, hogy a naftalin a lebontás első lépésében karboxilálódik a 2-es pozícióban. Ehhez hasonlóan a fenantrén lebontását is egy karboxilációs lépés iniciálhatja [63].



5. ábra: Az alkánok mikrobiális lebontása anaerob körülmények között [57]

3.4. A *Rhodococcus* nemzetség

3.4.1. A *Rhodococcus* nemzetség általános jellemzése

A *Rhodococcus* nemzetség neve a görög rhodon (rózsa) és coccus (szemcse) szavakból ered és egyes fajok rózsaszín telepeire utal. A nemzetség az Actinomycetales rend Corynebacterianeae alrendjének Nocardiaceae családjába tartozik. Aerob, kemoorganotróf

életmódot folytató rövid pálca vagy gömb alakú sejtjeik képtelenek mozgásra, nem spóráznak. Sejtfaluk Gram-pozitív felépítésű, benne a peptidoglikánhoz egy arabinogalaktán polimer kapcsolódik egy összekötő elemen keresztül [65]. Mint a *Corynebacteriaceae* alrend többi taxonja esetén, a *Rhodococcus* fajokban is az arabinogalaktánhoz általában mikolsavak kapcsolódnak. A mikolsavak egy $R_1R_2\text{-CH-COOH}$ típusú zsírsavak, ahol R_1 egy hosszabb, különféle módosulásokat hordozó β -hidroxi-alkil lánc, R_2 egy rövidebb alkil lánc. Az R_1+R_2 teljes hossza 22-100 szénatom között lehet és jellemző az adott nemzetségre [66,67]. A *rhodococcus* mikolsavak 28-54 szénatom hosszúságúak lehetnek [68].

A *Rhodococcus* fajok igen változatos környezetben fordulhatnak elő, legtöbbjük kozmopolita. Élőhelyük a sarkköröktől a tengereken át a trópusi talajokig terjed [41,43,69]. Heald és munkatársai mélytengeri üledékből 1100-6500 méteres extrém mélységből is izoláltak számos törzset [70]. Egyes törzsek képesek alkalmazkodni a száraz körülményekhez, például patagóniai olajszennyezett talajban szárazságtűrő *Rhodococcus* és *Gordonia* fajokat találtak [71].

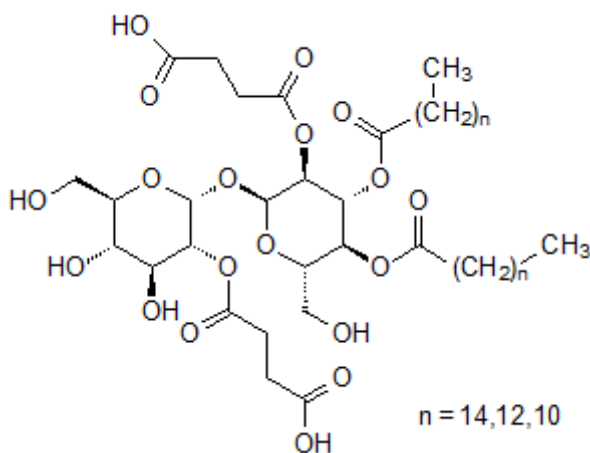
A *Rhodococcus* fajok változatos környezeti feltételekhez és szénforrásokhoz való alkalmazkodásának egyik kulcsa a jellemzően nagyméretű genomjuk lehet. Az 6-8 Mbp hosszú kromoszóma mellett változatos méretű (néhány száz kilobázisos) plazmidok találhatóak. A genomok G+C tartalma - mint az aktinobaktériumoknál általában - jellemzően magas. A plazmidok száma, mérete és génösszetétele fajon belül is változhat. Az egyik legnagyobb genommal rendelkező baktérium faj a *R. jostii*, melynek RHA1 törzse egy 7,8 Mbp lineáris kromoszóma mellett, három nagy méretű lineáris plazmidot (pRHL1: 1,2 Mbp, pRHL2: 0,44 Mbp és pRHL3: 0,33 Mbp) tartalmaz [72]. Lineáris kromoszómával rendelkezik a *R. opacus* is. Ezzel ellentétben más *Rhodococcus* fajok kör alakú kromoszómát hordoznak [73]. A nemzetségre általánosan jellemzőek a génduplikációk. A genomjaikban számtalan katabolikus útvonal génjei megtalálhatók, nagyszámú oxigenázt, lipázt és egyéb hidrolázt kódolnak. Ezért méltán nevezik például a *R. jostii* RHA1 törzsét „katabolikus erőműnek” [72]. Munkánk kezdetekor mindössze három *Rhodococcus* törzs genomja volt ismert, míg mára 25 faj 104 törzsének genomját megszekvenálták részben, vagy egészben. Ezen felül 50 olyan *Rhodococcus* genom assembly is található az adatbázisban, amelyet nem soroltak be az ismert fajok közé. Ezek közül összesen 79 genomot szekvenáltak meg 2015. január 1-je óta.

3.4.2. Felületaktív anyagok a *Rhodococcus* nemzetségben

A felületaktív anyagok szintézise számos mikroorganizmusra jellemző [74]. A mikroorganizmusok ezen amfifil molekulák segítségével teszik hozzáférhetővé a vízben nem oldódó szubsztrátokat.

A felületaktív anyagok egyik csoportját a glikolipidek alkotják [74]. A hidrofil fejet alkotó cukor molekulákhoz különböző zsírsavak kapcsolódnak, így épül fel a hidrofób farki rész. A glikolipideket a cukor csoport alapján nevezik el, amely mikrobacsoportonként változó. A *Pseudomonas* nemzetség tagjai rhamnolipideket [75], a *Corynebacteriaceae* alrendbe tartozó fajok így a *Rhodococcus* nemzetség tagjai is trehalolipideket állítanak elő [76]. A szoforolipidek az élesztők körében elterjedtek [77].

A *Rhodococcus* nemzetségre jellemzően, a kis molekulású glikolipidek hidrofil fejcsoportját egy α,α -1,1-glikozidos kötést tartalmazó diszacharid, a trehalóz alkotja. A hidrofób csoportok mikolsavakból, szukcinátból, vagy egyéb zsírsavakból épülhetnek fel [78–81]. A trehalolipidek felépítését a 6. ábra mutatja be. Ellentétben a *Pseudomonas*-ok által termelt rhamnolipidekkel, a *Rhodococcus*-ok trehalolipidjei főként sejtfal kapcsoltak, ugyanakkor egyes törzsek képesek sejtfal független felületaktív anyagok termelésére is [82].



6. ábra: Szukcinoil-trehalolipid szerkezete *Rhodococcus* sp. SD-74 törzsben [79]

A *Rhodococcus* törzsek által szénforrásként hasznosított kőolaj származékok jelentős része toxikus anyagokat tartalmaz. Számos törzs képes exopoliszaccharidok termelésére, mely az ellenálló sejtfal mellett védelmet nyújt a mérgező anyagokkal szemben, valamint segíthet a hidrofób szubsztrát emulzifikációjában. A *Rhodococcus* sejtek által termelt exopoliszacharidok szerkezetét több törzs esetén megállapították [83–86].

3.4.3. *Rhodococcus* törzsek alkalmazási lehetőségei

A *Rhodococcus* fajok többsége szerves szennyezőanyagok széles skáláját képes felhasználni szén- és energiaforrásként. Emellett egyedülálló alkalmazkodóképességük, ellenálló, hidrofób sejtfaluk és felületaktív anyagaik kiváló jelöltekké teszik őket bioremediációs célokra. Ezek a baktériumok képesek hatékonyan lebontani kőolaj származékokat [41,87,88], poliklórozott bifenileket [89,90], a környezetben sokáig fennmaradó gombaölő szereket, mint a karbendazim [91], vagy növényvédő szereket, mint a karbation [92].

A mezőgazdaságban jelentős károkat okoznak a különböző gombák által termelt toxinok, melyek súlyos egészségkárosító hatással bírnak az emberre és a haszonállatokra nézve. Egyes *Rhodococcus* törzsek képesek a gomba toxinok, mint a zearalenon [93] vagy az aflatoxin B₁ [94] bontására. Mindemellett magas nehézfém toleranciával is rendelkeznek és képesek sejten belül is felhalmozni azokat. A Fukushima Daiichi atomreaktor balesetében 2011-ben nagy mennyiségű cézium radionuklid került a környezetbe. Ennek kapcsán Takei és munkatársai vizsgálták a különböző gél mátrixokban immobilizált *R. erythropolis* CS98 cézium akkumuláló képességét. Kísérleteik során jó akkumulációs rátát figyeltek meg agaróz gélbe immobilizált sejteknél [95].

Egy alternatív lehetőség az üzemanyagok kénmentesítésére a biológiai deszulfurizáció, mely során mikroorganizmusok segítségével eltávolítják a ként az üzemanyag fűtőértékének csökkenése nélkül. Elsőként a *R. erythropolis* IGTS8 törzsről írták le [96], hogy képes kénmentesíteni a dibenzo-tiofént (DBT). A folyamatot 4S útvonalnak nevezik, mert 4 lépésben távolítja el a ként a DBT molekulából. Ezt követően számos más biodeszulfurizáló törzset izoláltak és azonosítottak, melyek főként a *Rhodococcus*, és *Gordonia* nemzetségekbe tartoznak [97,98].

A változatos anyagcsere útvonalak egy másik ígéretes példája a N-acil-homoszerin-laktonok (AHL) lebontása. A *Rhodococcus* sejtek által termelt laktonáz enzimek lebontják a más baktériumok kommunikációjában szerepet játszó AHL molekulákat [99,100]. A *Rhodococcus* törzsek homoszerin-laktonáz enzimeik blokkolják az AHL közvetített quorum sensing-et azaz lokális denzitásérzékelést, ezáltal megakadályozva egyes növényi petogének, például a *P. carotovorum* által okozott kórfolyamat kialakulását [101,102].

Az élő szervezetek vagy a belőlük kinyert enzimek segítségével a vegyiparban és a gyógyszeriparban fontos sztereoizomerek tiszta formában előállíthatók. A *Rhodococcus* fajok felhasználhatók a gyógyszeriparban fontos alapanyagok szintézisére. Például a *Rhodococcus*

sp. I24 az indént átalakítja 1.2-indándiollá, amely kulcsfontosságú kiindulási anyag a Crixivan nevű HIV elleni gyógyszer előállításában [103,104].

A *Rhodococcus* törzsek diagnosztikai szempontból fontos enzimeket termelnek. A *Rhodococcus* sp. H1 törzsből izolált heroin észteráz enzim alkalmazható a heroin kimutatására [105]. Egy másik törzs, a *Rhodococcus* sp. M4 fenilalanin dehidrogenáz enzime segítségével diagnosztizálható a fenilketonuria [106].

Egyes baktérium csoportok, köztük a *Rhodococcus* nemzetség tagjai is képesek a biodízel gyártásban fontos triacil-glicerolok (TAG) szintézisére. Előnyük a növényekkel szemben, hogy gyorsan szaporodnak, így rövid idő alatt nagy mennyiségű TAG kinyerhető belőlük, valamint a növényi biomasszából származó glükózon is szaporíthatók. A *R. opacus* PD360 törzs igen nagy mennyiségű TAG felhalmozására képes, mely zárványokat képez a sejt citoplazmájában [107]. Az elmúlt évben több publikáció is megjelent a témával kapcsolatban. Azonosították a TAG felhalmozásban résztvevő metabolikus útvonalakat *R. opacus* PD630 törzsben [108]. Beállították a PD630-as törzs optimális növesztési körülményeit, hogy minél nagyobb TAG koncentrációt érjenek el a sejtekben [109]. Heterológ cellulóz, cellobióz és xilóz bontó fehérjék génjeinek a törzsbe juttatásával, közvetlenül növényi biomassza felhasználásával is történhet TAG akkumuláció [110–112].

3.4.4. *R. erythropolis* PR4 és MK1 törzsek

A *R. erythropolis* PR4 törzset a Csendes-óceánból izolálták 1000 m mélységben. Egyedüli szénforrásként képes a prisztán hasznosítására és kiváló szénhidrogén bontó képességekkel rendelkezik. [41]. Emellett más, vízben nem oldódó szennyezőanyagok, mint az élelmiszeriparban felhalmozódó állati zsírok és növényi olajok hasznosítására is képes [113]. A hidrofób szubsztrátok hasznosításában jelentős szerepet játszhatnak a törzs által termelt exopoliszaccharidok, melyek szerkezetét Urai és munkatársai határozták meg [84,85]. A vizes és szerves fázis közötti transzlokációnak is fontos szerepe van a szerves szubsztrát hozzáférhetővé tételében. Az *R. erythropolis* PR4 képes megváltoztatni a sejt felszínének hidrofobicitását, ezáltal könnyebben a szerves fázisba juthat [114,115]. A PR4 törzs genomját megszekvenálták és 2009-től hozzáférhető a GenBank-ban. A kromoszóma mellett három plazmidot is tartalmaz, melyek közül kettő megaplazmid. A megaplazmidokon többek között alkán biodegradációban és zsírsav metabolizmusban szerepet játszó gének is találhatóak [73]. A *R. erythropolis* PR4 genomjában kódolt gének közül többnek a termékét is vizsgálták már. Ilyen például az ipari szempontból fontos bakteriális multicopper-oxidáz [116] vagy a sziderofór bioszintézisben szerepet játszó nem riboszómális peptid szintáz [117].

A csoportunk által izolált *R. erythropolis* MK1 törzs egy talajból származó baktérium. Az izolátum azonosítását a német törzsgyűjtemény (DSMZ) munkatársai végezték 16S rDNS alapú filogenetika és a sejtfal mikolsav összetétele alapján. Hasonlóan a PR4 törzshöz az *R. erythropolis* MK1 is jó hatékonysággal hasznosítja a hidrofób szubsztrátokat minimál tápoldatban [118]. Mindazonáltal a két törzs jelentősen különbözik, mind élettani, mind pedig morfológiai szempontból. Munkánk kezdetekor az *R. erythropolis* MK1 genomja még nem volt ismert, így a jól definiált *R. erythropolis* PR4 nemcsak a szénhidrogén bontási kísérletek referenciatörzsének, hanem a transzkriptomikai vizsgálatok modellorganizmusának is megfelelő volt.

3.5. Transzkriptom analízis új generációs szekvenálási technikákkal

3.5.1. Új generációs szekvenáló módszerek

A nagy áteresztőképességű szekvenálás története a 2000-es évek elején kezdődött. Brenner és munkatársai ekkor publikálták az első nagy áteresztőképességű szekvenálási technikát, a *massively parallel signature sequencing*-et (MPSS) [119]. A technológia 16-20 bp „szignó” szekvencia meghatározására alkalmas, mellyel a már ismert szekvenciák alapján be lehetett azonosítani az adott transzkriptet. A technológia alkalmas a transzkript mennyiségi meghatározására is, mert minden cDNS-hez egyedi adaptert kapcsolnak még a PCR-es sokszorozás előtt, így az egy adott génhez tartozó transzkript minden kópiája egyedi azonosítót kap. A cDNS-t a specifikus adapterekkel (kb. 1 millió féle) mikrogöngyökhöz rögzítik a PCR-es sokszorozást követően. Minden göngy csak egy adott egyedi adapterrel ellátott DNS-t képes megkötni. A szekvenálás hibridizációs próbákkal történik, melyeket a szekvenálni kívánt DNS túlnyúló végéhez ligálják. A hibridizációs próbákat fluoreszcensen jelölt másodlagos hibridizációs próbákkal azonosítják, majd egy restriktív endonukleáz segítségével lehasítják a teljes komplexet a szekvenálandó DNS-ről. Eközben a DNS is rövidül, így az új próba új bázisokhoz kapcsolódik [119].

A 2003-ban publikált polónia szekvenálási technika eredeti protokolla szerint a DNS felsokszorozása és szekvenálása egy üveg tárgylemezre polimerizált vékony akrilamid gélben történt. A nevét is innen kapta, hiszen a felszaporított DNS PCR kolóniákat, azaz polóniákat hozott létre a gélben. A bázissorrend meghatározására fluoreszcens *in situ* szekvenálást alkalmaztak [120]. Shendure és munkatársai 2005-ben publikálták a polónia szekvenálás egy módosított változatát. A DNS-t göngyökhöz kötötték, a sokszorozáshoz pedig emulziós PCR-

t használtak. A szekvenálás itt már nem szintézis, hanem ligálás alapon történt fluorszcensen jelölt, degenerált próbákkal [121].

Az ezt követő években robbanásszerű fejlődésnek indultak a szekvenálási technikák. Ekkor alakultak ki a valódi új generációs módszerek. Számos vállalat állt elő a saját megoldásával, viszont mindegyik a régi technikákból merített ihletet. Az Roche 454 szekvenátora piroszekvenáláson alapuló szintézis közbeni szekvenálás, a DNS minta előzetes felszaporozásához pedig emulziós PCR-t használnak. Az ABI SOLiD (Supported Oligonucleotide Ligation and Detection) esetében ugyancsak emulziós PCR-el sokszorozzák fel a mintákat, viszont a szekvenálás már ligáláson alapul. A Solexa megoldása eltér mindkét fent említett technológiától. A DNS felszaporításához úgy nevezett „híd” PCR-t alkalmaznak. Ez is egy szintézis közbeni szekvenálás, ugyanakkor itt reverzibilis lánctermináción alapul. Fluoreszcens festékkel blokkolják az új bázis beépülését, aminek az eltávolítása után folytatódik a szintézis [122,123].

A Helicos rendszere nem követel meg előzetes sokszorosítást, valódi egy-molekula szekvenálás történik. A DNS-t egy oligo dA adapterrel látják el, amely képes hibridizálni a hordozóra kötött oligo dT-vel. Az eljárás ugyancsak a szintézis közbeni szekvenálás elvét követi és a detektáláshoz fluoreszcensen festett nukleotidokat használ [123,124]. A felsoroltakon kívül sok más DNS szekvenáló eljárás is megjelent az elmúlt években. Ilyen a DNS nanolabdákra alapuló technológia [125], az ion félvezető szekvenálás (ion torrent), vagy a Pacific Bioscience forradalmi valós idejű egy-molekula szekvenálása [126]. A sort a lenyűgöző új technológia a Nanopore zárja [127].

3.5.2. Teljes transzkriptom analízis új generációs szekvenálási technikákkal

A transzkriptom a sejt teljes transzkript készlete egy adott sejtciklusbeli/kultúra növekedési fázisban, vagy élettani körülmények között. Vizsgálatával betekintést nyerhetünk abba, hogy milyen gének fejeződnek ki a sejtciklus bizonyos fázisaiban, hogyan reagál a sejt egyes környezeti tényezők megváltozására, a sejt számára toxikus anyagok jelenlétére, vagy az éhezésre. Vizsgálatára számos módszer áll a rendelkezésünkre. A hagyományos módszerek közé sorolható a hibridizáción alapuló microarray technika [128], vagy a címkézéssel alapuló SAGE [129].

Az új generációs rendszerekkel végzett transzkriptom analízist RNA-Seq technikának nevezik [130]. Előnye, hogy a hagyományos microarray technikánál jóval érzékenyebb, így a kis koncentrációban jelen lévő cDNS-t is detektálhatjuk. Továbbá megismerjük a transzkriptek

szekvenciáját, így akár új mRNS-eket, vagy mRNS érési variánsokat is felfedezhetünk. Nagy áteresztő képessége miatt a teljes transzkriptomról nagy mennyiségű adatot kaphatunk egyetlen kísérletben. Az RNA-Seq technika elméletben minden meglévő új generációs platformon alkalmazható, de a legtöbb esetben az Illumina, ABI SOLiD és a Roche 454 technológiákkal alkalmazzák [130]. A Helicos egy molekula szekvenáló rendszerre kidolgozott RNA-Seq protokoll 2011-ben jelent meg [131]. A Helicos előnye a többi új generációs technikával szemben, hogy az eljárás nem igényel előzetes amplifikációt, így minden transzkriptról egyetlen leolvasás készül, és nem okoz szórást a hosszú és a rövid transzkriptek detektálása között.

4. Célkitűzések

Kutatómunkám során a szénhidrogének, főként az alkánok biodegradációjának fiziológiás és molekuláris biológiai hátterét vizsgáltam, melyhez két *R. erythropolis* törzset használtam modellorganizmusként. Doktori disszertációmban a következő kérdésekre keresem a választ:

- Van-e eltérés a *R. erythropolis* MK1 és PR4 törzs kultúrái között az alkánok modellvegyületeként használt n-hexadekán jelenlétében?
- Hogyan befolyásolja a magas sótartalom a két törzs szénhidrogén-bontó képességét?
- Talajban milyen hatékonysággal képes a két törzs felhasználni a rendelkezésére álló alkánt? Befolyásolja-e a talaj nedvességtartalma a szénhidrogének lebontásának hatékonyságát?
- Hogyan hasznosul a sejtek által felvett n-hexadekán és mi az oxigén mérlege a hexadekán biodegradációjának?
- Mely gázolaj frakciókon, mint egyedüli szénforráson képesek szaporodni a törzsek? Milyen mérettartományban képesek oxidálni az alkánokat?
- Miben tér el az *R. erythropolis* MK1 genomja a PR4 törzsetől a szénhidrogén metabolizmus szempontjából?
- A két genomban található *alkB* gének mennyire hasonlítanak egymásra és milyen rokonságban állnak más fajokban található *alkB* génekkel?
- Található-e plazmid az *R. erythropolis* MK1 törzs genomjában és van-e hasonlóság más *Rhodococcus* törzsek plazmidjaival?
- Melyek azok a gének, amelyek termékei részt vesznek a szénhidrogének oxidációjában, és van-e különbség ezek expressziójában ha gázolajon, vagy csak n-hexadekánon szaporodnak a kultúrák?
- Mi a szerepe az egyes citokróm P450 monooxigenázoknak a gázolaj biodegradációja során?
- A szénhidrogének jelenléte hogyan befolyásolja a zsírsav metabolizmusért felelős gének expresszióját?
- Történik-e változás a felületaktív anyagok bioszintézisében résztvevő gének expressziós aktivitásában különböző szénhidrogének jelenlétében?
- Milyen egyéb gének aktiválódnak a *R. erythropolis* sejtekben különféle szénhidrogének jelenlétében?

5. Anyagok és módszerek

5.1. Felhasznált törzsek

R. erythropolis MK1: a Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai Tanszékén, szennyezett talajból izolált baktérium törzs.

R. erythropolis PR4 (NBRC100887): a Japánhoz tartozó Okinawa sziget déli részénél, a Csendes-óceánból izolált törzs [41]. A törzset a japán National Institute of Technology and Evaluation Biological Resource Center gyűjteményéből származik.

5.2. Felhasznált anyagok és tápoldatok

5.2.1. Luria-Bertani (LB) tápoldat

Az LB tápoldat 10 g/L peptont, 5 g/L élesztőkivonatot és 10 g/L NaCl-t tartalmaz. Táplemezek készítéséhez 15 g/L bakteriológiai agart kevertünk a tápleveshez.

5.2.2. Minimál tápoldat

A minimál tápoldat a következő összetevőket tartalmazta: 0,217 g/L KH_2PO_4 , 1,46 g/L K_2HPO_4 , 0,585 g/L NaCl, 0,125 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 44 mg/L $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 mg/L $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,06 mg/L $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,6 mg/L H_3BO_3 , 0,4mg/L $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,02 mg/L $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,04 mg/L $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,046 mg/L $\text{NaMoO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 14 mg/L FeSO_4 , 9,3 mg/L $\text{EDTA} \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 1,2 g/L NH_4NO_3 .

A lombikban végzett kísérletek esetén a minimál tápoldatot 1g/L NaHCO_3 -al egészítettem ki.

5.2.3. Magas só koncentrációjú minimál tápoldat

A sós tápoldat a minimál tápoldat egy módosított változata, amelyben a NaCl koncentrációja 35 g/L.

5.2.4. Virágföld

A talajos kísérletek során felhasznált virágföld a kereskedelmi forgalomban elérhető Florimo általános virágföld (pH= 6,4 – 6,9) volt. A virágföldet a kísérlet előtt 70 °C-os szárítószekrényben öt napig súlyállandóságig szárítottuk, majd tyndallozással sterilizáltuk. A talaj nedvességtartalmát friss minimál tápoldattal állítottuk be.

5.3. Sejtkultúrák szaporítási körülményei

5.3.1. Törzsek fenntartása

A napi munkákhoz a baktérium törzseket LB táplemezen tartottuk fenn 4 °C-on. A telepeket havi rendszerességgel oltottuk át friss táplemezre. 3-4 havonta -80 °C-ról friss tenyészeteket indítottunk.

5.3.2. Indító kultúrák szaporítása

Az indító kultúrákat 25°C-on 160 rpm rázatási sebességgel szaporítottuk OD₆₀₀= 1,00 értékig. Átoltás előtt a kultúrákat centrifugáltuk (13 000 rpm 4°C 10 perc) és az adott kísérletben használt tápoldattal mostuk. Minden kísérletben 1 % (v/v) indító kultúrát oltottunk tovább. Ez alól csak az 5 L-es fermentálások jelentenek kivételt, melyek esetében 4 % (v/v) inokulomot alkalmaztunk.

5.3.3. *R. erythropolis* törzsek szénhidrogén-bontó képességének összehasonlítása minimál és nagy sókoncentrációjú minimál tápoldatban illetve virágföldben

A respirációs vizsgálatok során 160 mL űrtartalmú hypo-vialban 20 mL minimál vagy emelt sókoncentrációjú minimál tápoldatban szaporítottuk a két törzset 1 % (v/v) n-hexadékan, mint egyedüli szén- és energiaforrás jelenlétében. A talajban végzett kísérletek során 10 g száraz tömegű virágföld nedvesség tartalmát 50 %-ra állítottuk be. Az üvegek nyílását légmentesen lezártuk butil szeptummal.

5.3.4. *R. erythropolis* PR4 sejtkultúrák szaporítása fermentorban transzkriptomikai vizsgálatokhoz

A minimál tápoldattal mosott indító kultúrát 5L minimál tápoldatba oltottuk Biostat C típusú fermentorba (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Németország). A leoltási arány 4 % (v/v) volt. Szén- és energiaforrásként 3 % (m/v) nátrium-acetátot, 1 % (v/v) n- hexadékant, vagy 1% (v/v) gázolajat alkalmaztunk. A felhasznált szénhidrogénkeverékek a következő összetevőket tartalmazták: (a) gyűrűs szénhidrogénekkal kiegészített hexadékan keverék 1 % (v/v) n-hexadékant, 0,0057 % (v/v) benzolt, 0,0057 % (v/v) toluolt, 0,0057 % (v/v) etil-benzolt, 0,0057 % (v/v) xilolt, 0,025 % (v/v) ciklohexánt, 0,02 % (m/v) naftalint, 0,02 % (v/v) tetralint és 0,022 % (v/v) dekalint tartalmazott, (b) az elágazó szénhidrogéneket tartalmazó keverékben 1 % (v/v) n-hexadékant egészítettem ki 0,029 % (v/v) 2,2,4-trimetil pentánnal,

0,023 % (v/v) szkvalánnal és 0,023 % (v/v) szkvalénnel. A tápoldatot 0,5 g/L aminosav keverékkel (minden aminosavat 26,3 mg/L koncentrációban alkalmaztunk) is kiegészítettük, hogy felgyorsítsuk a sejtszaporodást a fermentáció korai szakaszában. Az aminosav keverék glicint nem tartalmazott. A fermentálás hőmérséklete 25°C volt. A tápoldat kezdeti pH értéke 7,50 volt, amelyet 1 M NaOH és 1M HCl automatikus adagolásával tartottuk fent. Ebből az okból kifolyólag a $10 \times \text{NaHCO}_3$ puffer oldatot a fermentoros kísérletekben elhagytuk a minimál tápoldatból. A fermentorokat 4.5-ös tisztaságú oxigénnel (Linde Gáz Magyarország Zrt., Budapest, Magyarország) levegőztettük 100 mL/perc áramlási sebességgel. A tápoldat oxigén telítettségét 20 %-on tartottuk a keverési sebesség automatikus emelésével, melynek szélső értékeit 100-360 rpm-re állítottuk. A vízben nem oldódó szénforrások hatékonyabb elkeverése érdekében n-hexadekánon és dízel olajon nevelt kultúra esetén a kezdeti keverési sebesség 200 rpm volt. A kultúrák szaporodásának késői exponenciális fázisában vettünk mintát össz-RNS kivonáshoz. A fermentálásokat három egymástól független kísérletben ismételtük meg.

5.4. Analitikai módszerek

5.4.1. Oxigén kimutatása a kultúrák légteréből

A kultúrák légterében történő oxigén fogyás kinetikáját Agilent 6890 (Agilent Technologies Inc. Santa Clara, CA, USA) típusú gázkromatográfval vizsgáltuk, mely HP Molesieve 5 Å (30 m x 0,53 mm x 25 µm) kolonnával és hővezetőképességi detektorral volt felszerelve. A készülék split/splitless injektorát 150°C hőmérsékletre melegítve split üzemmódban használtuk. A split arány 0,2:1 volt. A kályha hőmérsékletét 60 °C-on tartottuk. A kolonna áramlási sebességet 16,8 ml/percre állítottuk. A detektor hőmérséklete 150 °C volt. A méréseket 5.0 tisztaságú argon vivőgáz alatt végeztük.

5.4.2. Szén-dioxid kimutatása a kultúrák légteréből

A CO₂ koncentrációját Shimadzu GC 2010 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japán) típusú gázkromatográfval követtük nyomon, mely split/splitless injektorral, hővezetőképességi detektorral és egy HP PlotQ (30 m x 0,5 mm x 40 µm) típusú kolonnával rendelkezett. A mérések során split inlet üzemmódot alkalmaztunk 0,5:1 split aránnyal. Az inlet hőmérséklet 200 °C volt, a kályha hőmérsékletét pedig 90°C-on tartottuk. A kolonna áramlási sebességet

8,44 ml/percre állítottuk. A detektor hőmérséklete 150°C volt. A méréseket 5.0 tisztaságú nitrogén vivőgáz alatt végeztük.

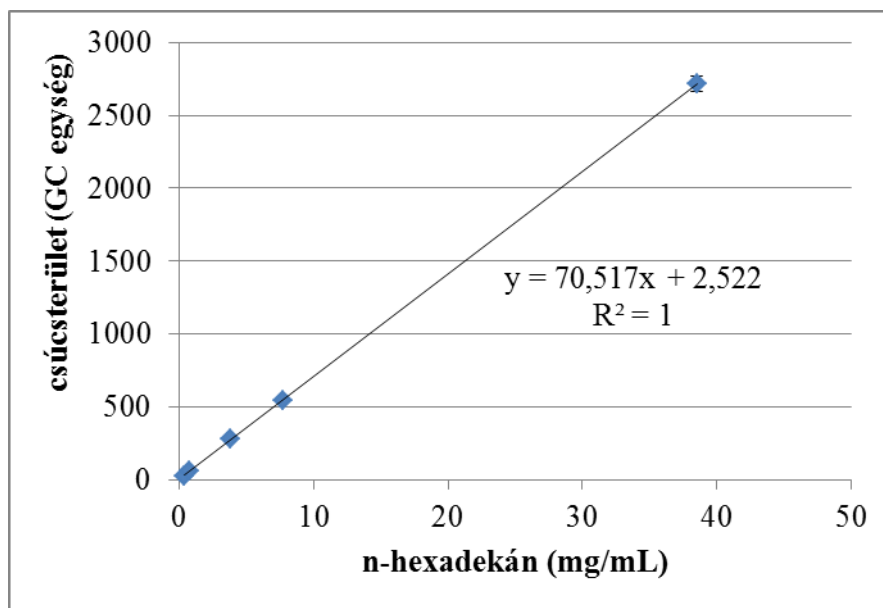
5.4.3. A gázok anyagmennyiségének kiszámítása térfogatuk alapján

Az oxigén anyagmennyiségének kiszámításához az ideális gáztörvényt alkalmaztuk: $pV=nRT$ (ahol a p az oxigén parciális nyomása a kultúra légterében (Pa), V az oxigén térfogata (m^3), n az anyagmennyiség (mol), R az egyetemes gázállandó, T pedig a hőmérséklet ($^{\circ}K$)). Mivel a szén-dioxid szobahőmérsékleten nem ideális gázként viselkedik, anyagmennyiségét a van der Waals egyenlet alapján számítottuk ki egy internetes alkalmazás segítségével (http://www.webqc.org/van_der_waals_gas_law.html).

5.4.4. n-hexadékan kivonása és mennyiségi meghatározása

A 20 mL tápoldatból 7 mL n-hexán segítségével vontuk ki az n-hexadekánt. A 10 g talajhoz a könnyebb kezelhetőség érdekében 14 mL n-hexánt mértünk. A mintákat 2 perces intenzív rázással extraháltuk. Az extrahált mintát n-hexánnal 10× hígítottunk.

Az n-hexadékan mennyiségének meghatározásához Agilent 6890 típusú gázkromatográfot használtuk, amely HP-Ultra 2 (25 m x 0,2 mm x 33 μm) típusú kolonnával, láng-ionizációs detektorral és split/splitless injektorral rendelkezett. A minták injektálása automatikusan, Agilent 7683 B típusú folyadék mintaadagoló robot segítségével történt. Az injektálási térfogat 1 μl volt. A mérések során split inlet üzemmódot alkalmaztunk 30:1 split aránnyal. Az inlet hőmérséklet 280 $^{\circ}C$ volt. A kályha hőmérsékletét 120-280 $^{\circ}C$ között változtattam 50 $^{\circ}C$ /perc fűtési sebességgel. A kolonna áramlási sebességet 2 ml/percre állítottuk. A detektor hőmérséklete 350 $^{\circ}C$ volt. A méréseket 5.0 tisztaságú hidrogén vivőgáz alatt végeztük. A hexadékan csúcsok területéből kalibrációs egyenes segítségével állapítottuk meg a koncentráció értékeket (7. ábra).



7. ábra: n-hexadekán kalibrációs egyenes: Az n-hexadekánból három nagyságrendet átfogó hígítási sort készítettem n-hexánban oldva. A hígítási sor tagjai rendre 0,5 µl/mL, 1 µl/mL, 5 µl/mL, 10 µl/mL, 50 µl/mL, 100 µl/mL. Az n-hexadekán sűrűségéből (0,77 g/cm³) és a bemért térfogatból kiszámoltam a koncentráció értékeket mg/mL-re vonatkoztatva.

5.4.5. Statisztikai módszerek

Az adatok statisztikai analízisét kétmintás t-próbával végeztük. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ értékben határoztuk meg.

5.5. Molekuláris biológiai munkák

5.5.1. Primerek

A primereket a Primer Designer 3.0 illetve az IDT internetes primer tervező segítségével terveztük. A megtervezett oligonukleotidokat a Sigma-Aldrich, illetve az MTA SZBK oligonukleotid szintézis laboratóriumában készítették. Az oligonukleotidok listája az I. függelékben található.

5.5.2. Genomi DNS izolálás

LB tápoldatban OD₆₀₀ = 0,7 értékre felszaporított *R. erythropolis* MK1 kultúrát 1 mg/ml ampicillin jelenlétében 2 órán keresztül 25 °C-on inkubáltuk. A sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze (20 000 × g 10 perc 4°C), a sejttöledéket 50 mg/ml lizozim tartalmú Milli-Q vízben vettük fel. Teljes genomi DNS kivonását *R. erythropolis* MK1-ből hagyományos fenol-

kloroformos módszerrel végeztük el [132]. A minta minőségét és mennyiségét 0,6 % agaróz gélen elektroforézissel és NanoDrop 1000 (Thermo Fischer Scientific Inc, Waltham, USA) készülékkel is ellenőriztük.

5.5.3. Növekedési görbe meghatározása teljes nukleinsav koncentráció alapján

3 mL baktérium kultúrát centrifugáltunk ($12\ 000\times g$ szobahőmérséklet 2 perc). A hexadekán és a dízel olaj tartalmú mintákat centrifugálás előtt kloroformmal mostuk. A sejteket savval tisztított homokkal (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland) dörzsöltük el és RLT pufferben (QiaGen RNeasy Mini Kit) vettük fel. A felülúszóhoz 70 %-os jéghideg etanolt mértünk. A nukleinsav mintákat a QiaGen RNeasy oszlopra kötöttük fel. A tisztítási lépéseket a gyártó által ajánlott protokoll szerint végeztük el. A nukleinsav koncentrációt a NanoDrop 1000 (Thermo Fischer Scientific Inc, Waltham, USA) segítségével határoztuk meg.

5.5.4. RNS izolálás

A *Rhodococcus* fajokhoz javasolt RNS tisztítási protokoll módosított változatát alkalmaztuk [133]. 12 mL baktérium kultúrát centrifugáltunk le ($15\ 000 \times g$ 4 °C 5 perc). A sejteket folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és savval mosott tengeri homokkal (Fluka Chemie AG, Buchs, Svájc) eldörzsöltük. A feltárt sejtekből össz RNS-t RNeasyTM Plus Mini Kit (QiaGen; Germantown; MD, USA) segítségével vontuk ki a gyártó által javasolt protokoll szerint.

5.5.5. DNáz I kezelés

Az RNS mintákban maradó DNS-t RNáz mentes DNáz I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) kezeléssel távolítottuk el a gyártó által javasolt protokoll szerint. Az enzimet 2,5 mM EDTA jelenlétében 10 perces 65 °C-os hőkezeléssel inaktívtuk.

5.5.6. Agaróz gélelektroforézis

A genomi DNS, az RNS és a PCR termékek ellenőrzése céljából végzett gélelektroforézisekhez 1 %, 1 µg/ml EtBr-ot tartalmazó agaróz gél használtunk 1 x TAE (40 mM TRIS-acetát, 1 mM EDTA) pufferben, 6 V/cm futtatási feszültséggel. Az RT-qPCR primerek ellenőrzéséből származó PCR termékeket kis méretükből kifolyólag 2 % agaróz gélen ellenőriztük.

5.5.7. Polimeráz láncreakció

Az RNS minták DNS tartalmának illetve a valós idejű PCR primerek működésének ellenőrzésére Eppendorf Mastercycler® pro (Eppendorf, Hamburg, Németország) készüléket használtunk. A reakciókban minden esetben DyNazyme II DNS polimeráz (Thermo Fischer Scientific Inc, Waltham, USA) enzimet alkalmaztunk a gyári pufferrel. A program az alábbiak szerint futott: 5 perces 95 °C-os elődenaturációt követően 40 cikluson keresztül 1 percig 95 °C-os denaturáció, 30 másodpercig 55 °C-os anelláció és 30 másodpercig 72 °C-os elongáció váltotta egymást.

5.5.8. cDNS szintézis

A RT-qPCR előtt az össz RNS-t Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fischer Scientific Inc, Waltham, USA) segítségével írtuk át cDNS-é. A reverz transzkripcióhoz 1 µg DNase I kezelt RNS mintát használtunk.

5.5.9. RT-qPCR

A qPCR-t ABI 7500 Real Time PCR System-ben (Life Technologies Co. Carlsbad, CA, USA) hajtottuk végre a gyártótól beszerezett Power SYBRGreen Master Mix segítségével. A reakciót az erre a célra gyártott 96 lyukas lemezen, relatív kvantitációs üzemmódban, a gyártó által javasolt programmal, 25 µL végtérfogatban végeztük el. A termékek tisztaságát a program végén olvadáspont analízissel ellenőriztük. Az eredményeket manuálisan Microsoft Excel táblázatkezelő szoftverrel értékeltem ki a Livak módszerrel [134].

5.6. *R. erythropolis* MK1 genom szekvenálása újgenerációs módszerekkel

5.6.1. Teljes genom szekvenálás SOLiD platformon

A genomi DNS-t Covaris™ S2 (Covaris Inc., Woburn, MA, USA) ultraszonikátor készülékkel feldaraboltuk. A könyvtár készítést és a szekvenálást az erre a célra ajánlott SOLiD 5500XL (Life Technologies Co. Carlsbad, CA, USA) kitékkel végeztük el. A teljes genom szekvenálást a SOLiD 5500XL™ hajtottuk végre. A leolvasásokat rátérképeztük az NCBI adatbázisában található *R. erythropolis* PR4 törzs genomjára (NC_012490) CLC Genomic Workbench 4.0.2. szoftver segítségével.

5.6.2. Teljes genom meghatározása Illumina MiSeq szekvenáló készülékkel

A genomi DNS-t nebulizációval törtük megfelelő méretűre a Roche protokolla alapján (Rapid Library Preparation Method Manual GS FLX+ / LX+ May 2011.). A DNS könyvtár a TruSeq DNA PCR Free Library Preparation Kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) segítségével készült a gyártó utasításai szerint. A párosított végű szekvenálást egy Illumina MiSeq asztali szekvenáló készülékkel hajtottuk végre a MiSeq reagent kit v3 kittel. A szekvenálás során 2×300 ciklus ment végbe.

5.7. *R. erythropolis* PR4 transzkriptomikai vizsgálata

A teljes transzkriptom analízist SOLiD 5500XL™ újgenerációs szekvenáló rendszerrel hajtottuk végre (Life Technologies Co.). Szekvenálás előtt a mintákból három biológiai párhuzamost összekevertünk. Könyvtárkészítés előtt a riboszómális RNS-t a Ribo-Zero™ rRNA Removal Kit for Gram-Positive Bacteria (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA) segítségével eltávolítottuk. A könyvtárkészítést és a szekvenálást az erre a célra ajánlott SOLiD 5500XL kitekkel végeztük el (Life Technologies). Mintánként 20-25 millió 50 nukleotid hosszú leolvasást generáltunk, melyből körülbelül 45-50 % bizonyult jó minőségűnek és *R. erythropolis* genomra térképezhetőnek.

A térképezést, az adatok normalizálását és az expressziós szintek meghatározását CLC Genomic Workbench 5.5.1. szoftver (CLC Bio A/S) segítségével végeztük el. Azért, hogy megállapítsuk a relatív expressziós szinteket, az RPKM értékeket (*Reads Per Kilobase of gene model per Million mapped reads*) hasonlítottuk össze. A dolgozatban bemutatott transzkriptomikai adatok hozzáférhetők az NCBI GEO adatbázisában a GSE56474 azonosító szám alatt.

5.8. Bioinformatikai módszerek

Az MK1 törzs genomjának összeszerelése a MIRA 4.0 genom assembler [135] szoftver segítségével történt. A leolvasásokat a kontigokra CLC Genomic Workbench 7.5 szoftver segítségével térképeztem vissza. A genomok összehasonlítására MAUVE szoftvert használtam [136]. A genom annotációját a RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) [137] internetes genom annotáló szolgáltatással, az alap beállítások megtartásával végeztük el (<http://rast.nmpdr.org>). A hipotetikus fehérjék azonosítása céljából az aminosav szekvenciákat blastp algoritmus segítségével kerestem a Swissprot/Uniprot és a “non-redundant” fehérje adatbázisokban (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). A domén szerkezetek jóslása az NCBI

konzervált domén adatbázisa és a SMART molekulaszerkezet jósló internetes eszköz (<http://smart.embl-heidelberg.de>) [138,139] segítségével történt.

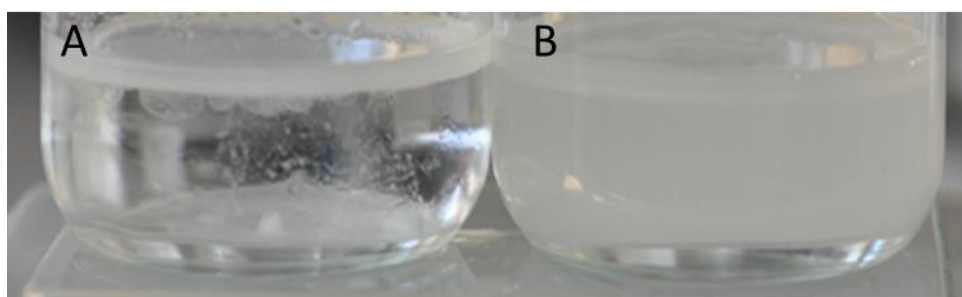
Az *alkB* és a *cyp* gének filogenetikai fájának elkészítéséhez a szekvencia illesztéseket az előzőekben publikált módszer szerint hajtottuk végre [140]. A T-COFFEE-t [141] használtuk a többszörös szekvencia illesztésekhez, a PhyML-t (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) [142] pedig a filogenetikai fa elkészítésére alkalmaztuk. Az elkészített filogenetikai fát a Figtree v1.4.0. szoftver (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) segítségével ábráztuk.

6. Eredmények és tárgyalásuk

6.1. Szénhidrogének biodegradációja *R. erythropolis* MK1 és PR4 törzsekkel

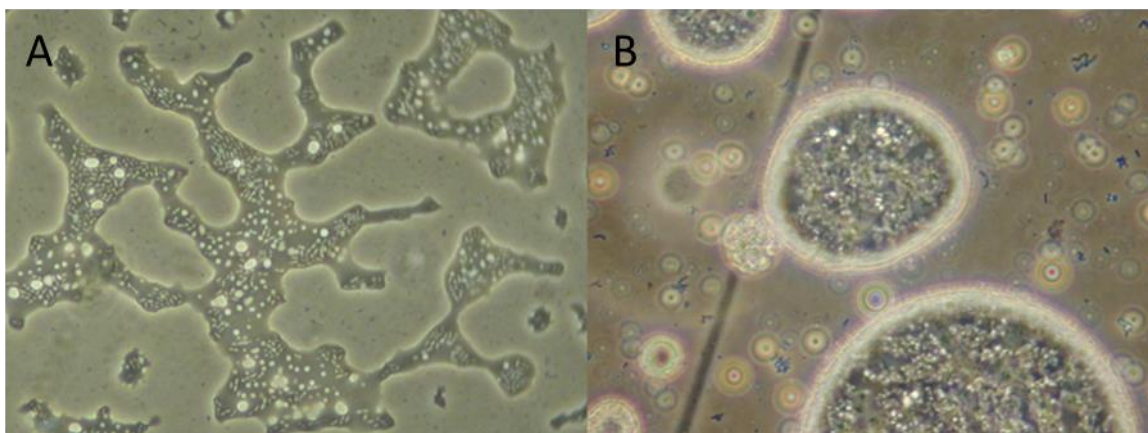
6.1.1. A két *Rhodococcus* törzs jellemzőinek összehasonlítása *n*-alkánok jelenlétében

A nagyfokú genetikai hasonlóság ellenére a két törzs eltérően viselkedik az *n*-hexadekán tartalmú tápoldatban. A *R. erythropolis* MK1 esetén a teljes kultúra a szerves és a vizes fázis határán található, hozzátapad a hexadekánhoz, míg a *R. erythropolis* PR4 kultúra nagy része a vizes fázisban marad (8. ábra). Ez a különbség azzal magyarázható, hogy a PR4 törzs képes olyan felületaktív anyagok termelésére, amelyek emulzióba viszik az oldhatatlan szénforrást. Így lehetővé válik, hogy a kultúra nagy része a vizes fázisban maradjon. Ezzel szemben az MK1-es törzs esetében jóval mérsékeltebb a vizes fázisban való szaporodás, helyette fehér pelyhek jelennek meg a kultúra felszínén. A vizes fázis kismértékű opálosodása csak az idősebb MK1 kultúráknál tapasztalható.



8. ábra: A *R. erythropolis* MK1 (A) és PR4 (B) törzsek 2 napos kultúrái 1% (v/v) *n*-hexadekán tartalmú minimál tápoldatban

A kultúrák fénymikroszkópos vizsgálata alapján mindkét törzs képes rátapadni a szénhidrogén cseppekre, és azok felületén szaporodva biofilmet képez. A különbség a két törzs között az, hogy míg a PR4 kultúrákban szabályos gömb alakú *n*-hexadekán cseppek találhatók, az MK1 törzs esetében a *n*-hexadekán alakatlan (9. ábra). Ez magyarázható a méytengerből izolált PR4 jó emulzióképző képességével. A *R. erythropolis* MK1 pedig egy talajbaktérium. Természetes élőhelyén nincs szükség az oldhatatlan szénforrás gyors emulgeálására, elegendő az adszorpció a szénforrás felületéhez. A törzs gyenge emulzióképző képessége erre vezethető vissza.



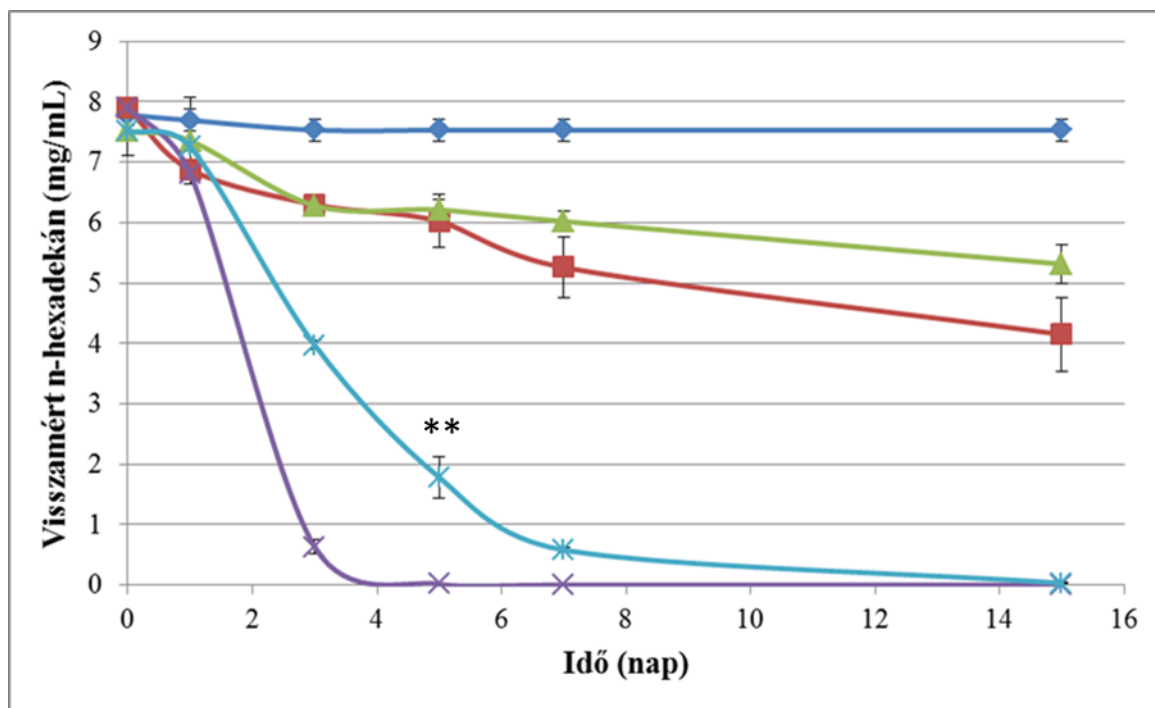
9. ábra: Az n-hexadekán tartalmú minimál tápoldatban szaporított *R. erythropolis* MK1 (A) és PR4 (B) törzsek fénymikroszkópos képe (400 x-os nagyítás). A képen látható olajcseppek alakja különböző attól függően, hogy melyik törzset oltottuk a tápoldatba.

6.2.2. A sókoncentráció hatása a két *R. erythropolis* törzs szénhidrogén-bontó képességére

Az olajszennyeződéseknek legjobban kitett területek a tengerek és óceánok. Ezért fontos, hogy a bioaugmentációra alkalmazott szénhidrogén-bontó törzsek képesek legyenek a magas sókoncentráció elviselésére. Ebben a kísérletsorozatban a két *Rhodococcus* törzset minimál tápoldatban és 3,5 % (m/v) NaCl tartalmú sós minimál tápoldatban szaporítottam. Szénforrásként 1 % (v/v) hexadekánt adtam a rendszerhez. Azért, hogy biztosítsam a folyamatos oxigén ellátást, a kísérleteket papírdugóval lezárt Erlenmeyer lombikokban végeztem. A kultúrákból a 0, 1, 3, 5, 7 és 15. napon 3-3 lombik hexadekán tartalmát extraháltam és gázkromatográf segítségével mértem.

A sejtmentes kontrollhoz viszonyítva mindkét törzs esetén jelentős n-hexadekán fogyást állapítottunk meg a tápoldatban az idő előrehaladtával (10. ábra). A *R. erythropolis* PR4 már a kísérlet 3. napjára elfogyasztotta a hexadekán jelentős részét minimál tápoldatban. Ezzel összevetve az MK1 törzs a 15. napra csak a rendelkezésére álló hexadekán 50 %-át bontotta le minimál tápoldatban. Erre az eredményre magyarázattal szolgálhat, hogy az MK1 törzs nem vagy csak igen gyengén képez emulziót, így kisebb felületen fér hozzá a szénforráshoz.

A nagy sókoncentráció mindkét törzs esetében csökkentette a n-hexadekán lebontásának sebességét, viszont egyik esetben sem gátolta azt. A *R. erythropolis* PR4 négy nappal később érte el a 90 %-os lebontási rátának megfelelő 0,8 mg/mL n-hexadekán koncentráció értéket sós tápoldatban, mint minimál tápoldatban. Az MK1 szénhidrogénbontó hatékonysága is közel 20 %-al csökkent. A 15. napra a kultúrákban a megmaradt n-hexadekán a kiindulási érték 69 %-a volt.



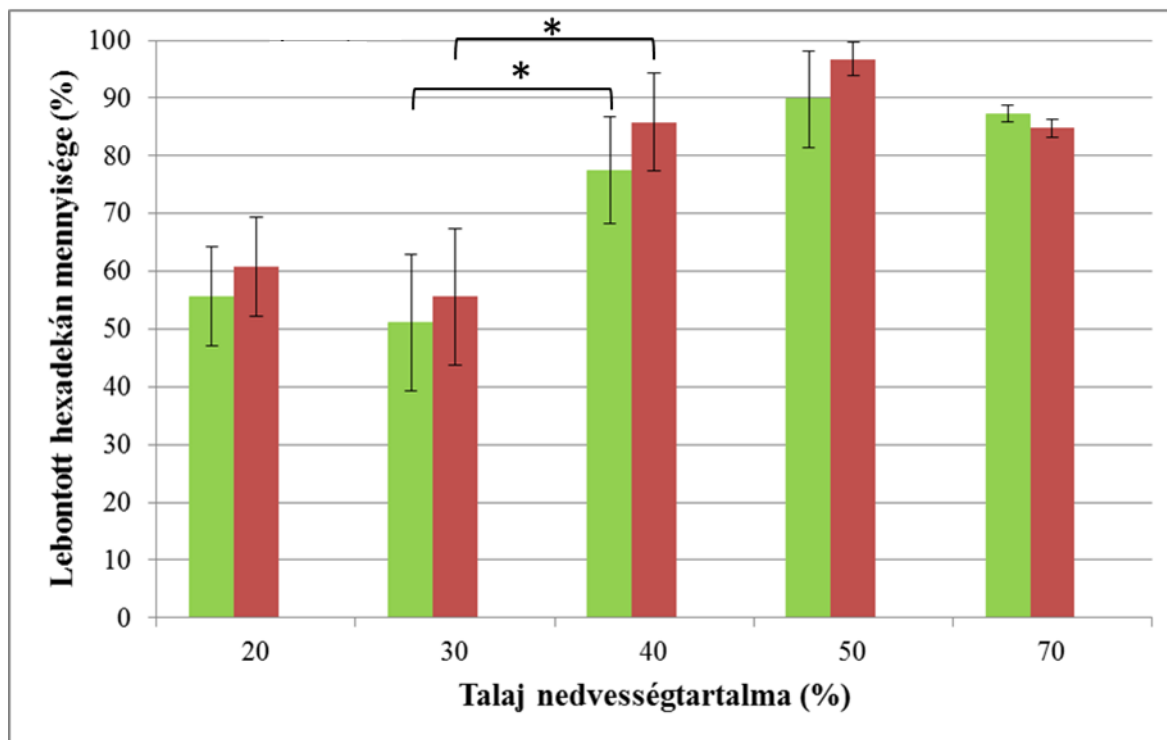
10. ábra: A só koncentráció hatása a *R. erythropolis* MK1 és PR4 törzsek szénhidrogén-bontó aktivitására. Sejtmentes kontroll (sötétkék), *R. erythropolis* MK1 minimál tápoldatban (piros), *R. erythropolis* MK1 sós tápoldatban (zöld), *R. erythropolis* PR4 minimál tápoldatban (lila), *R. erythropolis* PR4 sós tápoldatban (világoskék) ** $p < 0,01$

6.1.3. A talaj nedvességtartalom hatása a két *R. erythropolis* törzs szénhidrogén-bontó képességére

A talajban található szennyezőanyagok biológiai úton történő eltávolítására több környezeti tényező is hatással van. Ilyen a talaj pH értéke, a hőmérséklet, az oxigén ellátottság, illetve a nedvesség tartalom. Jelen kísérletben a talaj nedvességtartalmának hatását vizsgáltuk a szénhidrogénbontó hatékonyságra. A kísérlet másik célja, hogy összehasonlítsuk a két törzs viselkedését talaj közegben.

A kísérlet során a kiszáritott virágföld nedvességtartalmát minimál tápoldattal állítottuk be 10, 20, 30, 40, 50, és 70 %-os értékre. A szénhidrogének modellezésére n-hexadekánt alkalmaztunk. Az 5. napon a baktériumok által fel nem használt hexadekánt extrahálással nyertük vissza. A két törzs hexadekán-bontó aktivitása a 30 és 40 % nedvesség tartalmú talajok között szignifikánsan megemelkedik (11. ábra). A magasabb nedvességtartalmú virágföldben (40 %, 50 %, 70 %) magasabb a biodegradációs hatékonyság is, mint az alacsonyabb nedvességtartalmú (20, 30 %) mintákban. Mindkét törzs számára egyaránt az 50 %-os

talajnedvesség a legoptimálisabb a szénhidrogén-bontás szempontjából. Ebben az esetben a bontási hatékonyság 90-97 % közé tehető.



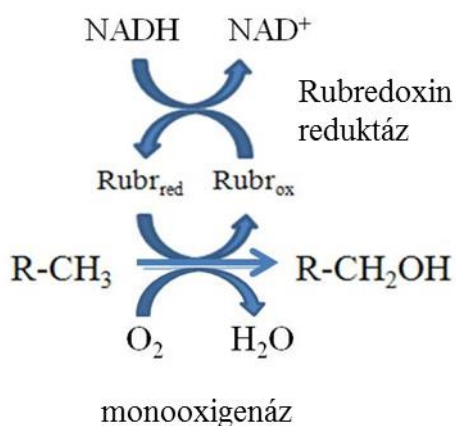
11. ábra: A talaj nedvességtartalmának hatása *R. erythropolis* MK1 és PR4 törzsek szénhidrogénbontó aktivitására. *R. erythropolis* MK1 (zöld oszlopok), *R. erythropolis* PR4 (piros oszlopok) * $p < 0,05$

Az eredmények alapján az is elmondható, hogy a két törzs szénhidrogén-bontó hatékonysága között nincs szignifikáns különbség egyik vizsgált talajnedvességi értéknél sem.

6.1.4. A *n*-hexadekán lebontásának oxigén és *n*-hexadekán mérlege a két *Rhodococcus* törzsben

Azért, hogy fényt derítsek az elfogyasztott *n*-hexadekán és a felvett oxigén sorsára anyagmérleget számoltam a két anyagra nézve. A kísérletet zárt hypo-vialben végeztem, virágföldben, sós és minimál tápoldatban. A virágföld nedvességtartalmát az előzetesen optimumként meghatározott 50 %-ra állítottam. A kultúrák légterének oxigén és szén-dioxid koncentrációját naponta mértem. Annak érdekében, hogy elkerüljem az oxigén kiürülését a rendszerből, minden mérés után átfúvattam a kultúrákat sűrített levegővel és a visszamaradó szén-dioxidot és az oxigént is újból lemértem, ezt tekintve kiindulási értéknek a következő napi mérésnél. Az ötödik napi gázmérést követően a visszamaradó hexadekánt extrahálással visszanyertem és koncentrációját gázkromatográf segítségével határoztam meg.

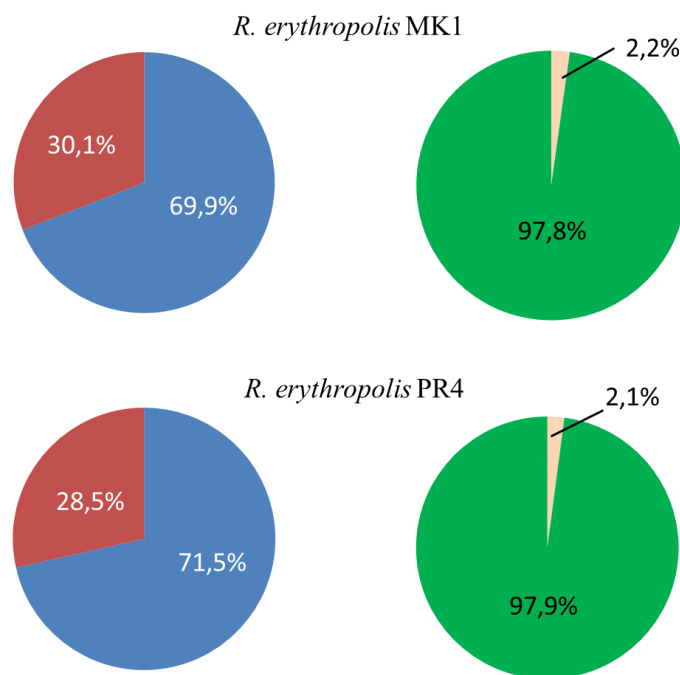
A mért adatokból számolt anyagmennyiségek alapján meghatároztam az oxigenáz reakcióban résztvevő oxigén hányadát. A monooxygenáz reakcióban egy alkán molekula oxidálására egy oxigén molekulát használ az enzim (12. ábra). Ez alapján a felvett hexadekán mennyisége megegyezik a monooxygenáz reakcióban felhasznált oxigén mennyiségével. A fennmaradó oxigén más oxidációs folyamatokban vesz részt, például az alkánok diterminális oxidációjában, vagy a légzési lánc elektron akceptoraként szerepel.



12. ábra: alkán-1-monooxygenáz (*alkB*) által katalizált n-alkán oxidáció [37]

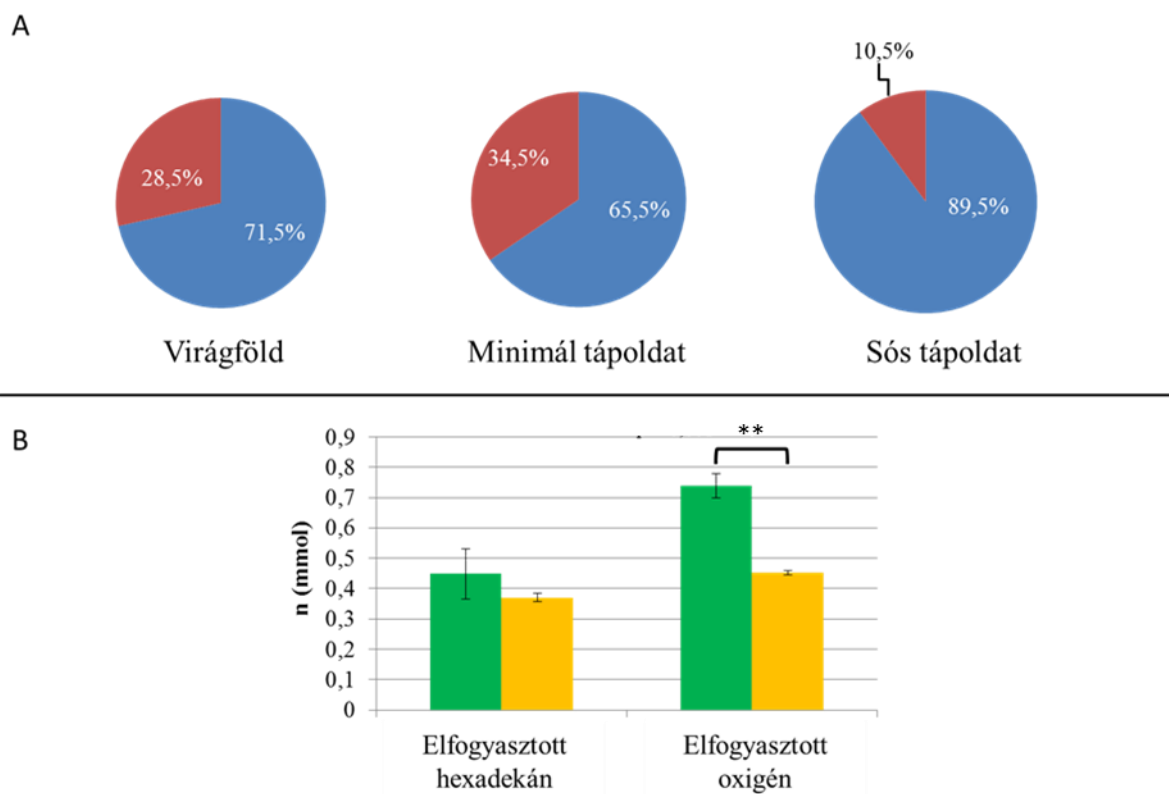
Az alkánok oxidációjának lehetséges útvonalait a 3. ábra mutatja be. Könnyű belátni, hogy akármelyik útvonalat követjük, 1 mol hexadekánból 8 mol acetyl-S-CoA képződik, ebből pedig összesen 16 mol CO_2 . Tehát a nem biomasszaként hasznosult, hanem szén-dioxid-termelésre fordított n-hexadekán mennyisége megegyezik a keletkezett szén-dioxid $1/16$ részével. A teljes felhasznált n-hexadekánnal molárisan egyenértékű mennyiségű oxigént használt fel a sejt az alkán monooxidálására.

Az előző kísérletek alapján a vártak megfelelően mindkét két törzs hasonlóan viselkedett talajban, a kísérlet 5 napja alatt hozzávetőlegesen ugyanolyan mennyiségű oxigént vettek fel illetve ugyanannyi hexadekánt bontottak el. A sejtek az oxigén megközelítőleg 70 %-át használták a n-hexadekán oxidálására (13. ábra). A fennmaradó 30 % oxigén egyéb folyamatokban vesz részt, például elektron akceptorként funkcionál vagy esetlegesen az n-hexadekán diterminális oxidációjában játszik szerepet. Mindkét törzs esetén a felvett hexadekán túlnyomó részét biomassza produkcóra használják fel a törzsek, mindössze 2 % alakul szén-dioxiddá.



13. ábra: A két *R. erythropolis* törzs oxigén és n-hexadekán mérlege virágföldben. A bal oldali kördiagramokon a monooxygenáz reakcióban felhasznált oxigén (kék), illetve az egyéb reakciókban felhasznált oxigén (piros) aránya látható. A jobb oldali diagramokon a szén-dioxiddá alakított n-hexadekán (sárga), valamint a biomasszává alakított hexadekán (zöld) jelenik meg.

A sós és a minimál tápoldatban is megmarad a hexadekán felhasználás aránya minimális eltéréssel. A legnagyobb különbség a *R. erythropolis* MK1 esetében tapasztalható sós tápoldatban, ahol a szén-dioxid termelésre fordított hexadekán 1,1 %-ra csökken a talajos mintában mért 2,2 %-hoz képest. Az oxigén egyensúly már másképpen alakul a különböző tápközegekben. *R. erythropolis* PR4 esetén minimális eltéréssel megmaradnak a virágföldben tapasztalható arányok minimál tápoldatban is. Azonban a nagy sókoncentráció hatására az oxigén egyensúly eltolódik a monooxygenáz reakció javára (14/A ábra). Ez azt jelenti, hogy az egyéb reakciókban felhasznált oxigén aránya a másik két tápközegekben tapasztalt 30 % körüli értékről 10,5 %-ra csökken. A felhasznált n-hexadekán mennyisége alig változik a nagy sókoncentrációjú tápoldatban a minimál tápoldathoz viszonyítva, viszont a felvett oxigén $\frac{2}{3}$ részére csökken (14/B ábra). Ez arra utal, hogy a sóstressz bizonyos oxigénfüggő folyamatokat gátolhat a sejtben.



14. ábra: A *R. erythropolis* PR4 oxigén egyensúly (A) a monooxygenáz reakcióban felhasznált oxigén aránya (kék), egyéb reakciókban felhasznált oxigént aránya (piros). A *R. erythropolis* PR4 által 5 nap alatt elfogyasztott hexadekán és oxigén mennyisége (B) minimál tápoldatban nevelt *R. erythropolis* PR4 (zöld), sós tápoldatban nevelt *R. erythropolis* PR4 (sárga) ** $p < 0,01$

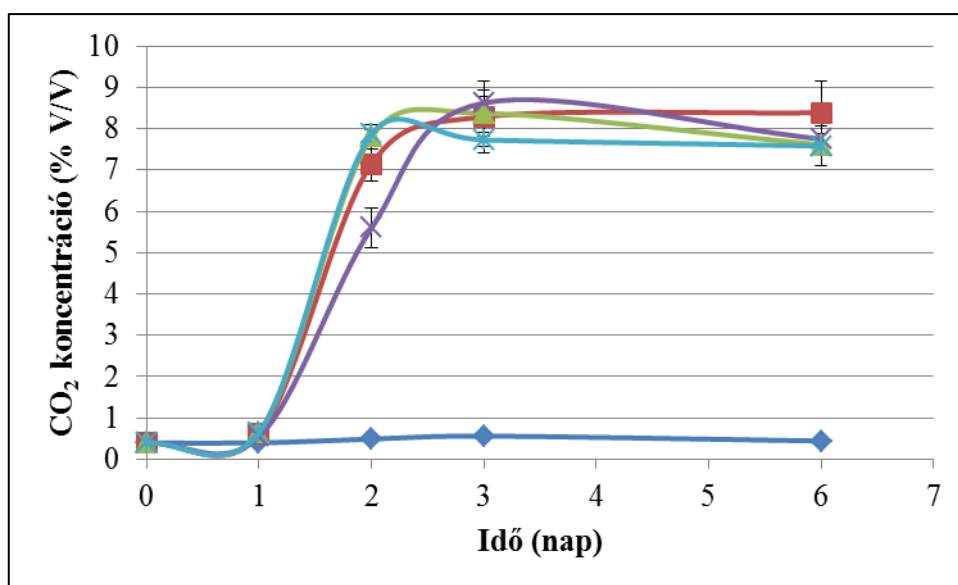
Más a helyzet a *R. erythropolis* MK1 esetében. Ellentétben a talajos mintákkal, csak tized-annyi n-hexadekánt képes felhasználni öt nap alatt minimál tápoldatban, mint a *R. erythropolis* PR4. Az oxigén mérleg is eltolódik, 90,7 % fordítódik a n-hexadekán alkohollá való oxidálására, míg csak 9,3 % vesz részt egyéb reakciókban.

A sós tápoldatban a *R. erythropolis* MK1 által felvett oxigén és n-hexadekán mennyisége a harmadára csökken a minimál tápoldatban nevelt kultúrákban mérthez képest. Az oxigén felhasználási arány viszont nem változik jelentősen, 91,4 % fordítódik a n-hexadekán alkohollá való oxidálására, és 8,6 % vesz részt egyéb reakciókban.

6.1.5. A két törzs szénhidrogén bontó képességének összehasonlítása dízelolaj frakciókon

A szénhidrogén szennyeződések a természetben mindig összetett formában fordulnak elő. Ezért fontos, hogy a szénhidrogének lebontását ne csak egyetlen tiszta modellvegyületen (n-hexadekán) vizsgáljuk, hanem összetett, a toxikus komponenseket is tartalmazó

szénforráson is. Esetünkben ez a dízel olaj. Előzetes kísérleteink alapján tudjuk, hogy mindkét törzs képes a dízel olaj biodegradációjára [118]. Ugyanakkor az irodalomból tudjuk, hogy nem minden alkán-bontó baktérium képes egyforma hatékonysággal lebontani a különböző lánc hosszúságú alkánokat [37]. Ebben a kísérletben összehasonlítottam a két törzs biodegradációs aktivitását négy különböző lánc hosszúságú szénhidrogéneket tartalmazó gázolaj frakción (petróleum: C₁₀-C₁₄, KGO: C₁₀-C₂₀, NGO: C₁₀-C₂₇, VGO: C₁₄-C₂₇). A törzsek aktivitását a CO₂ koncentráció változásának mérésével követtem nyomon, butil-gumival lezárt hypo-vialben.

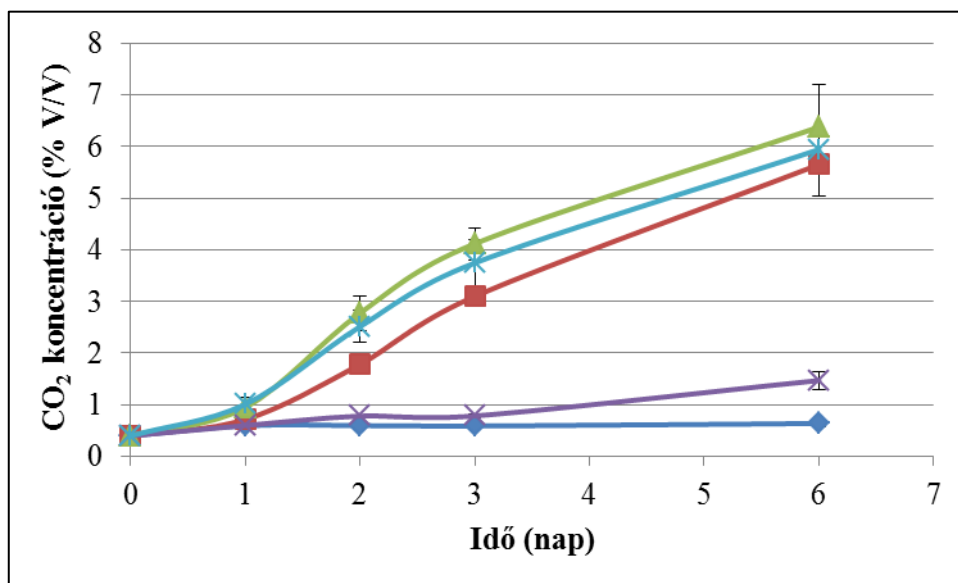


15. ábra: *R. erythropolis* PR4 szén-dioxid termelése gázolaj frakciókon. Petróleum frakció (lila), KGO (piros), NGO (zöld), VGO (viágos kék), sejtmentes kontroll (sötétkék)

A *R. erythropolis* PR4 kultúrák légterében egy napos lag fázis után gyors ütemben kezd termelődni a szén-dioxidot mind a négy szénforráson. VGO, NGO és KGO olajfrakciók jelenlétében a CO₂ koncentráció emelkedése a második napra eléri a plató fázist. Egyedül a 10-14 szénatomos alkánokat tartalmazó petróleum frakción marad el kis mértékben a szén-dioxid termelés a többi szénforráson mérttől. A petróleum frakción a harmadik napra éri el a törzs a 8,5 %-os maximális szén-dioxid koncentrációt (15. ábra). Az eredmények alapján a *R. erythropolis* PR4 gyorsan alkalmazkodik mind a négy szénforráshoz és hasonló ütemben képes metabolizálni őket.

Ezzel szemben a *R. erythropolis* MK1 törzs kultúráinak légterében az egy napos lag periódus után jóval lassabban emelkedik a szén-dioxid koncentrációja (16. ábra), mint *R. erythropolis* PR4 kultúráknál. A petróleum frakción a legalacsonyabb a biodegradációs

aktivitás. A szén-dioxid koncentráció csak lassan emelkedik és a 6. napra is csak 1,5 %-t (v/v) ér el. Ez az eredmény összhangban van azzal, hogy az MK1 törzs genomjában nem találtunk CYP153 családba tartozó monooxygenázt (ld később, 6.2 fejezet), ami az alacsonyabb szénatomszámú alkánok metabolizálásáért lenne felelős. Az, hogy a törzs mégis képes minimális szén-dioxid termelésre, arra utal, hogy a törzs AlkB monooxygenázai, vagy más monooxygenáz enzimek kis affinitással képesek oxidálni a 10-14 szénatomot tartalmazó alkánokat is.



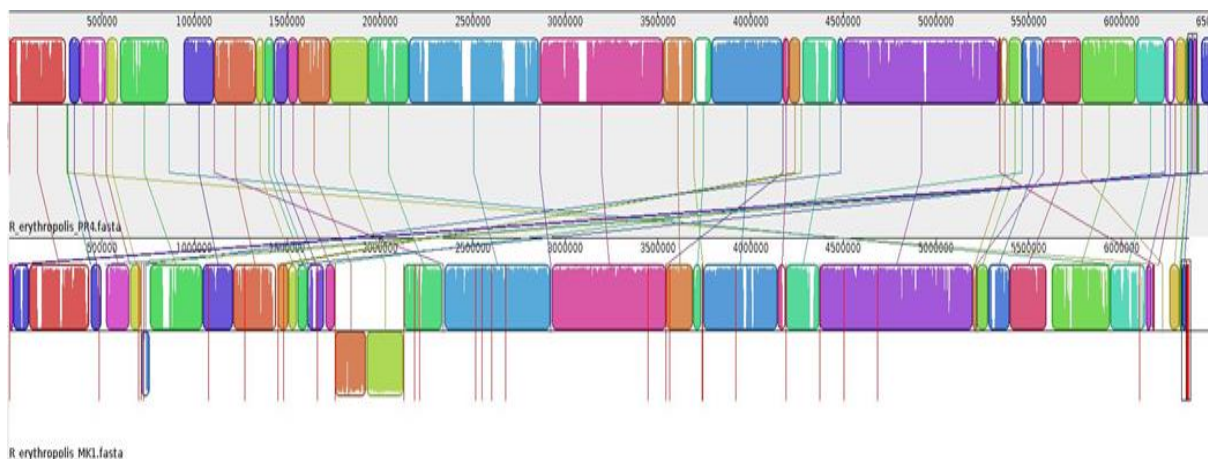
16. ábra: *R. erythropolis* MK1 szén-dioxid termelése gázolaj frakciókon. Petróleum frakció (lila), KGO (piros), NGO (zöld), VGO (viágos kék), sejtmentes kontroll (sötét kék)

6.2. A *R. erythropolis* MK1 genom szekvenálása

6.2.1. *R. erythropolis* MK1 genomjának de novo összeszerelése

A szénhidrogének lebontása során tapasztalt különbségek felvetik a kérdést, hogy a két törzs genetikai háttere mennyiben tér el egymástól. Annak érdekében, hogy az MK1 törzs teljes genomjának bázissorrendjét megismerhessük, szekvenálást végeztünk Illumina MiSeq új generációs szekvenáló platformon. A szekvenálásból kapott 978 788 párosított leolvasás összeszerelése után 40 különálló kontig keletkezett. A konszenzus teljes hossza 6 469 205 bp és a legnagyobb kontig 1 413 947 bp. A kontigokat RAST segítségével annotáltuk és 6 252 gént találtunk. Ez a szám összhangban van a teljes konszenzus méretével és a *R. erythropolis* PR4 törzs genomja alapján várható gének mennyiségével.

Az MK1 törzs genomja azonban megközelítőleg 0,5 Mbp-al rövidebb, mint a *R. erythropolis* PR4 teljes genomja. Ennek a méretkülönbségnek több oka van. A PR4 törzs 3 plazmidot is tartalmaz, amelyek egyike sem található meg az MK1 törzsben. Az MK1 genom szekvenciája még nem teljes, hiányoznak belőle a nehezen szekvenálható részek. Mindemellett az PR4 törzs rendelkezik a legnagyobb genommal az eddig teljesen megszekvenált *R. erythropolis* törzsek közül [7,73,143,144]. A PR4 törzs kromoszómája bár nagyobb, mint az MK1 törzs teljes meglévő genomja, nagymértékű hasonlóságot mutatnak egymással (17. ábra).



17. ábra: A *R. erythropolis* MK1 genom összehasonlítása a *R. erythropolis* PR4 kromoszómájával MAUVE szoftverrel. A referencia szekvenciaként használt *R. erythropolis* PR4 kromoszómája (felül), az *R. erythropolis* MK1 kontigjai (alul). A színes vonalak az egymáshoz hasonló részeket kötik össze. A függőleges piros vonalak a kontighatárokat jelölik.

Mindkét törzs kromoszómáján számos olyan gén található, amelyek részt vehetnek környezeti szennyezőanyagok lebontásában. Négy *alkB* típusú alkán monooxygenáz, 16 db *cyp* és számos más mono- és dioxigenázt kódoló gén található a PR4 törzs genomjában. Az MK1 genomjában 5db *alkB* gént és 11 db *cyp* gént azonosítottunk. A pREL1 plazmidon kódolt két CYP153 családba tartozó monooxygenáz ortológja azonban nem található meg az MK1 genetikai állományában. Mivel a kromoszómán sincsen CYP153 monooxygenázt kódoló gén, feltételezhető, hogy az MK1 nehezebben, vagy egyáltalán nem képes a rövidebb szénláncú alkánok lebontására. Ez feltételezés összhangban van a gázolaj frakciókon mért eredményekkel (15., 16. ábra).

A blastn programmal történt összehasonlítás eredmények alapján az MK1 törzs *alkB1* génjének nukleotidsorrendje 97 %-ban az *alkB2* 96 %-ban az *alkB3* 95 %-ban az *alkB4* pedig 98 %-ban megegyezik a PR4 genomjában található megfelelőjével. Az ötödik *alkB* gén 74 %-

os hasonlóságot mutat a PR4 *alkB3* génjével. Az *alkB1* és *alkB2* gének mellett megtalálható az elektrontranszportban résztvevő 2-2 rubredoxin gén is, valamint az *alkB1* operonban jelen van a rubredoxin reduktáz génje is. A másik három *alkB* gén mellett nem találhatók meg a kisegítő gének, úgy, ahogyan a PR4 törzs genomjában sem.

6.2.2. Az *R. erythropolis* MK1 és PR4 törzsek alkán-1-monooxygenáz génjeinek (*alkB*) filogenetikai vizsgálata

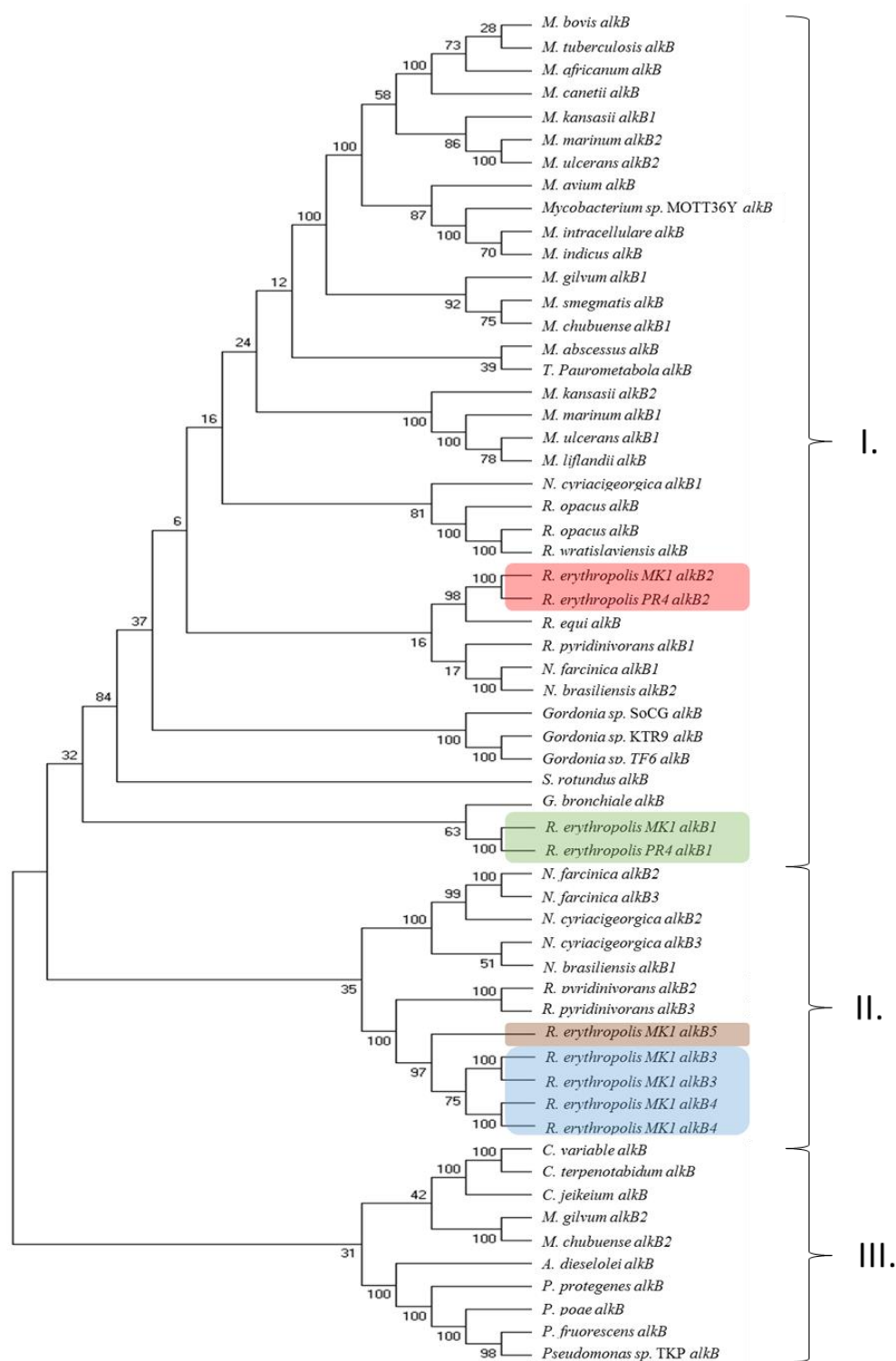
Az elvégzett filogenetikai analízis alapján a két törzs *alkB3* és az *alkB4* génjei szoros rokonsági kapcsolatot mutatnak egymással, illetve az *R. erythropolis* MK1 törzs *alkB5* génjével, míg a másik két *alkB* gén a filogenetikai fa más ágain található (18. ábra). A vizsgált 59 *alkB* szekvencia 3 elkülönülő csoportot alkot. Mindkét törzs *alkB1* génje az I. csoportban található a *Gordonia bronchiale* *alkB* génjével van egy ágon.

Az *alkB2* főleg *Rhodococcus* és *Gordonia* alkán-1-monooxygenázokat tartalmazó I. csoportba tartozik és egy ágon található a *R. equi* *alkB* génjével. A közeli rokonságot az is alátámasztja, hogy mindkét *alkB* operonból hiányzik a rubredoxin és a TetR transzkripciósz regulátor közül a rubredoxin reduktáz gén. A tény hogy a csoportot alkotó más *Rhodococcus* és *Gordonia* *alkB* gének operonjában megtalálható a rubredoxin reduktáz kódoló nyitott leolvasási keret azt sugallja, hogy a két operon közös ősében veszett el a hiányzó reduktáz gén.

Az *alkB3* és *alkB4* gének a II. csoportban foglalnak helyet (18. ábra) a filogenetikai fa azonos ágán. A két gén nukleinsav sorrendje 72,9 %-ban azonos egymással *R. erythropolis* PR4 törzsben, illetve 77,0 %-ban az *R. erythropolis* MK1-ben. A nagymértékű szekvencia azonosság a két gén között génduplikációra utalhat.

Az MK1 törzs kromoszómáján található ötödik *alkB* gén a bootstrap érték alapján egyértelműen elkülönül az *alkB3* és *alkB4* génektől, de szoros filogenetikai kapcsolat van közöttük (18. ábra).

Mivel az *alkB* gének filogenetikai kapcsolatai nem korrelálnak a gazdaajok 16S rDNS alapú rokonsági kapcsolataival és a genomban található paralógok is nagy mértékben divergensek, erősen feltételezhető, hogy horizontális géntranszferrel kerültek az *R. erythropolis*-ba [145].



18. ábra: Az *R. erythropolis* MK1 és PR4 törzsek *alkán-1-monooxygenáz* génjeinek filogenetikai kapcsolatai. A bootstrap értékek az elágazások megbízhatóságát jelölik az elágazás előtti arab számmal. A római számok jelölik az elkülönülő csoportokat. Az *alkB* génjek elhelyezkedését a színes keret jelzi: *alkB1* (piros), *alkB2* (zöld), *alkB3-4* (kék), *alkB5* (barna)

6.2.3. Plazmidok a *R. erythropolis* MK1 törzsben

Négy teljes *R. erythropolis* szekvencia érhető el a GenBank adatbázisában [7,73,143,144], ez 4 teljes kromoszómát és 9 plazmidot jelent. Mindemellett 3 másik teljes plazmid szekvencia is hozzáférhető. A MiSeq szekvenálásból származó leolvasásokat rátérképezve a kromoszómákra 90-94 %-ot fednek le 30-szoros átlagos lefedettséggel. Ez alátámasztja azon feltételezésünket, hogy a *R. erythropolis* MK1 a vizsgált törzsek (*R. erythropolis* PR4, *R. erythropolis* CCM2595, *R. erythropolis* BG4 és *R. erythropolis* R138) szoros rokoni kapcsolatban állnak egymással. Ugyanakkor a leolvasások csak 87-88 %-a térképeződik a kromoszómákra. Az irodalom alapján feltételezhető, hogy az MK1 törzs tartalmaz egy vagy akár több plazmidot is, mivel a *Rhodococcus* genusban általánosan elterjedt, hogy több különböző méretű lineáris és/vagy cirkuláris plazmid van jelen egyazon törzsben [73,98]. A leolvasások csupán 0,5 %-a vagy ennél is kevesebb térképeződött a 12 vizsgált plazmid szekvenciájára, azok is szigetszerűen. A plazmidok teljes hosszára számított átlagos lefedettség is kisebb, mint 1-szeres volt. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az MK1 törzs a vizsgált plazmidoktól különböző plazmidot hordozhat. A MiSeq leolvasások 12-13 %-a nem térképeződött a referencia kromoszómákra. Ezek egy része feltételezhetően az MK1 törzs kromoszómájának azon régióit fedi le, amelyek nem mutatnak hasonlóságot a referencia genomokkal, míg a másik részük építheti fel a plazmidot. A referenciákra nem térképeződő leolvasásokat visszatérképezve az MK1 genomját alkotó egyedi kontigokra találtunk egy 105 331 bp hosszú szekvenciát (20. kontig) melyre a leolvasások 18,31 %-a rátérképeződött. A leolvasások egyenletesen oszlottak el a szekvencia teljes hosszán és az átlagos lefedettség 46,26-szoros volt. A blastn-el végzett szekvenciaösszehasonlítás eredményei alapján a kontig részleges szekvencia egyezéseket mutat más *Rhodococcus* törzsekben megtalálható plazmidokkal. 117 nyitott leolvasási keret azonosítható rajta, melyek pl. nehézfém toleranciáért felelős gének, glükóamiláz, glukóz-6-foszfát dehidrogenáz és egy nagy affinitású szén transzporter génjei. Mindemellett DNS másosító enzimeket, integrázokat és mobil elemeket is kódol. Az *orf*-k nagyobb része hipotetikus fehérjét kódol. Saját *parA* és *parB* génnel is rendelkezik, amelyek a plazmidok partíciójában játszanak fontos szerepet. Ezek alapján feltételezhető, hogy a 20. kontig egy nagy plazmid, vagy annak egy része.

6.3. n-hexadekánon és gázolajon nevelt *R. erythropolis* PR4 összehasonlító transzkriptomikai analízise

A *R. erythropolis* genom számos olyan gént tartalmaz, amelyek potenciálisan részt vehetnek a szénhidrogének oxidációjában. Ilyenek az *alkB* gének, citokróm P450 gének és egyéb mono- és dioxigenázok génjei. Hogy fényt derítsünk arra, melyek azok az oxigenázok, amelyek ténylegesen aktiválódnak, illetve milyen más enzimszereket befolyásol a szénhidrogének jelenléte, teljes transzkriptom analízist végeztünk n-hexadekánon és gázolajon nevelt kultúrákon. Kontrollként Na-acetáton nevelt kultúrákat alkalmaztunk.

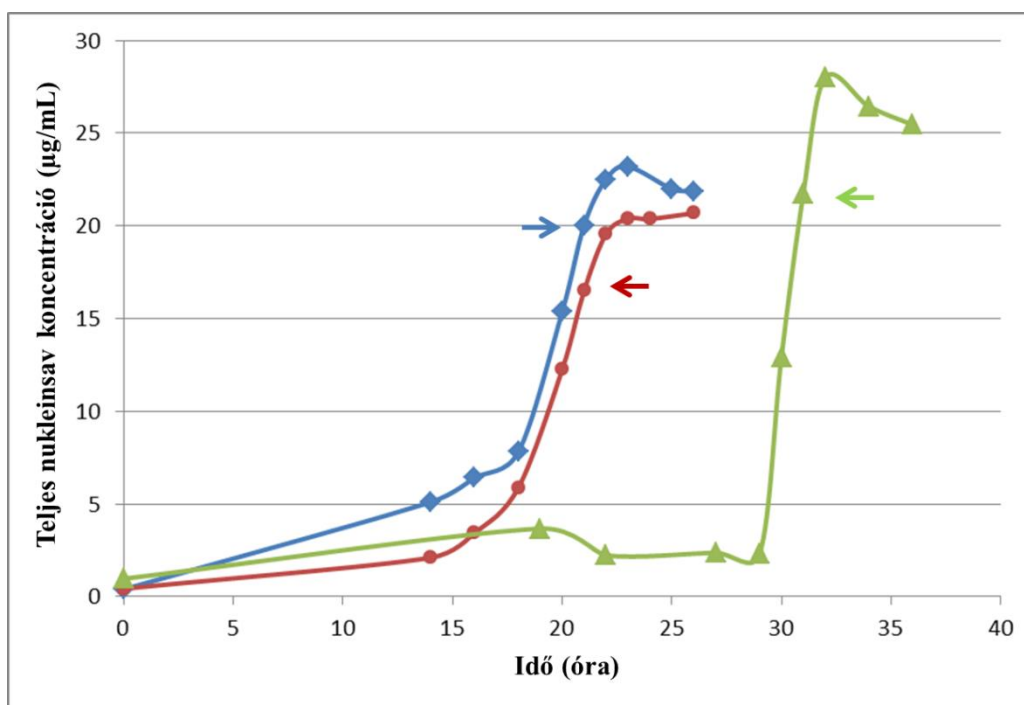
6.3.1. Sejtek növekedése a fermentáció során

Annak érdekében, hogy összehasonlítsuk a *Rhodococcus erythropolis* génexpressziós profilját n-hexadekán és dízel olaj jelenlétében, teljes transzkriptom analízist végeztünk *R. erythropolis* PR4 törzsön. Azért került erre a törzsre a választás, mert jobb hatékonysággal metabolizálja a szénhidrogéneket tápoldatban, mint a *R. erythropolis* MK1. Hogy minden paramétert a megfelelő értéken tarthassak a *R. erythropolis* PR4 törzset szabályozható fermentorokban szaporítottam minimál tápoldatban. A pH értéket, a hőmérsékletet és az oxigén telítettséget azonos szinten tartottam a kultúrákban. Szénforrásként n-hexadekánt, dízel olajat, vagy Na-acetátot alkalmaztam.

Mivel a *R. erythropolis* PR4 szaporodása a vízben oldhatatlan szénforrásokon biofilm képződéssel jár, a hagyományos telepképző egység vizsgálat, vagy az optikai sűrűség nyomon követése nem megfelelő módszerek a sejtszám meghatározására, illetve a kultúra szaporodásának nyomonkövetésére. Így a szaporodást a teljes nukleinsav koncentráció változásán keresztül jellemeztem.

A szénhidrogének jelenlétében jóval hamarabb beindult a növekedés, mint a Na-acetátos tápoldatban. Mind a n-hexadekánt, mind pedig a dízel olajat tartalmazó tápoldatban a 18. órában indult el a szaporodás exponenciális fázisa és 4-5 óra alatt el is érte a plató fázist (19. ábra). Ezzel szemben a Na-acetátos tápoldatban az intenzív szaporodás a 28. óra után indul el. A lehetséges ok, hogy az alkánokból származó zsírsavakat közvetlenül fel tudja használni a sejt a felépítő folyamataiban, míg az acetátból, mint két szénatomos molekulából meg kell szintetizálni a hosszabb szénláncú vegyületeket, aminek van extra energia igénye.

A teljes RNS kivonáshoz a mintákat minden esetben az exponenciális fázis második felében vettem le (19. ábra).

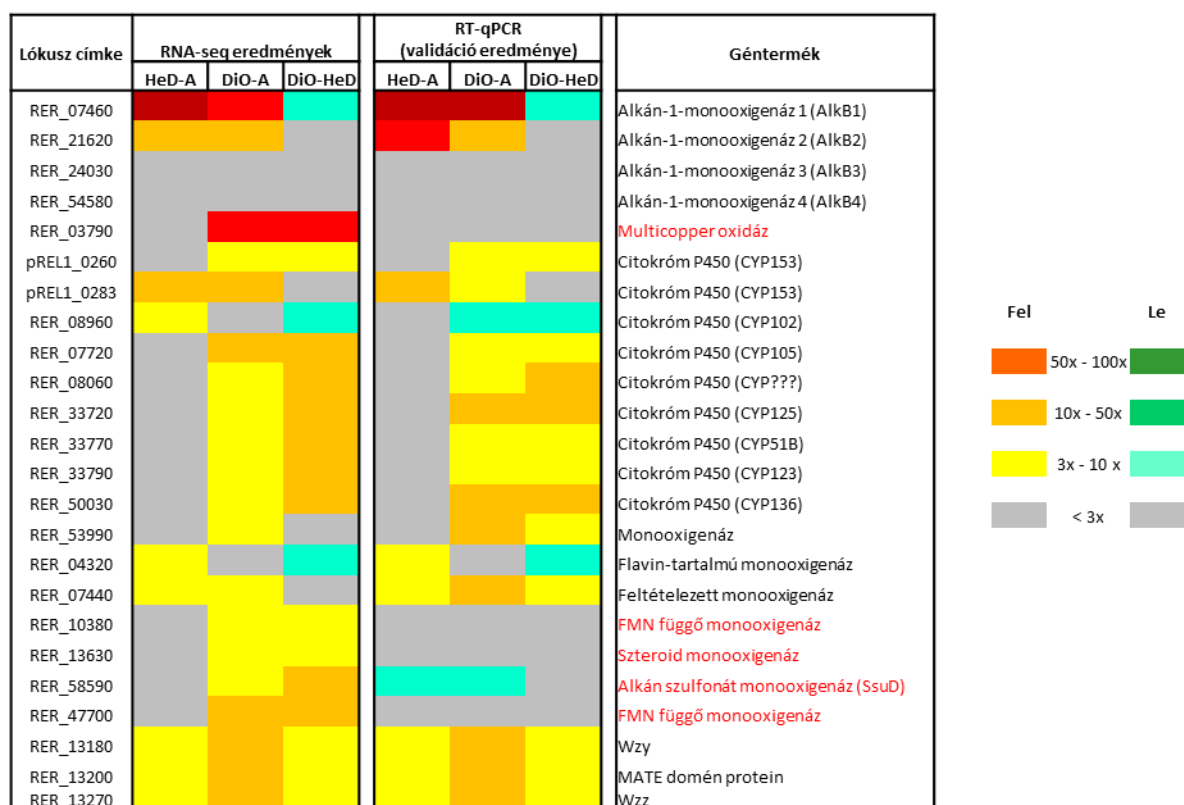


19. ábra: *R. erythropolis* PR4 szaporodása a fermentorban. A sejtszaporodást a n-hexadekán (kék), dízel olaj (piros) és Na-acetát (zöld) szénforrásokon teljes nukleinsav tartalom mérésével követtem nyomon. A nyilak a mintavétel időpontját jelzik a teljes RNS kivonáshoz.

6.3.2. A teljes transzkriptom analízis eredményei

A teljes transzkriptom analízis során legalább 20 millió leolvasást kaptunk minden mintából. A szénhidrogéneken nevelt kultúrák mintái esetén ez a szám még magasabb volt (pl.: 50 millió a dízeles mintákban). A leolvasások átlagos hossza 50 nukleotid volt. A leolvasásokat rátérképeztük a *R. erythropolis* PR4 genomjára. A leolvasások genom eloszlását meghatároztuk és az RPKM (*Reads Per Kilobase of gene model per Million mapped reads*) értékek összehasonlításával kiszámoltuk a relatív expressziót. Háromféle összehasonlítást végeztünk el: n-hexadekán az acetát ellenében, dízel olaj az acetát ellenében dízel olaj a n-hexadekán ellenében.

24 gén expressziós aktivitását RT-qPCR segítségével ellenőriztük. Ezek közül, 19 gén expressziós értéke volt összhangban a transzkriptom analízis eredményével. 5 gén transzkript szintje nem egyezett az RNA-seq eredményeivel (20. ábra). Ez az 5 gén alacsony RPKM értékkel rendelkezett (<1.5), mind acetát, mind pedig hexadekán jelenlétében, ezért minden ilyen alacsony RPKM értékkel rendelkező gént kihagytunk a további vizsgálatokból, illetve adatértékelésből.



20. ábra: Transzkriptom és RT-qPCR eredmények összehasonlítása hőtérképen. HeD-A oszlop: hexadekán acetáttal; DiO-A oszlop: dízelolaj acetáttal; DiO-HeD oszlop: dízelolaj hexadekánnal összehasonlítva. Az ábrán láthatóak a színek az indukciót ("fel"), a repressziót ("le") jelzik. A pirossal kiemelt géntermékek esetén az RT-qPCR nem bizonyítja a transzkriptom analízis eredményét.

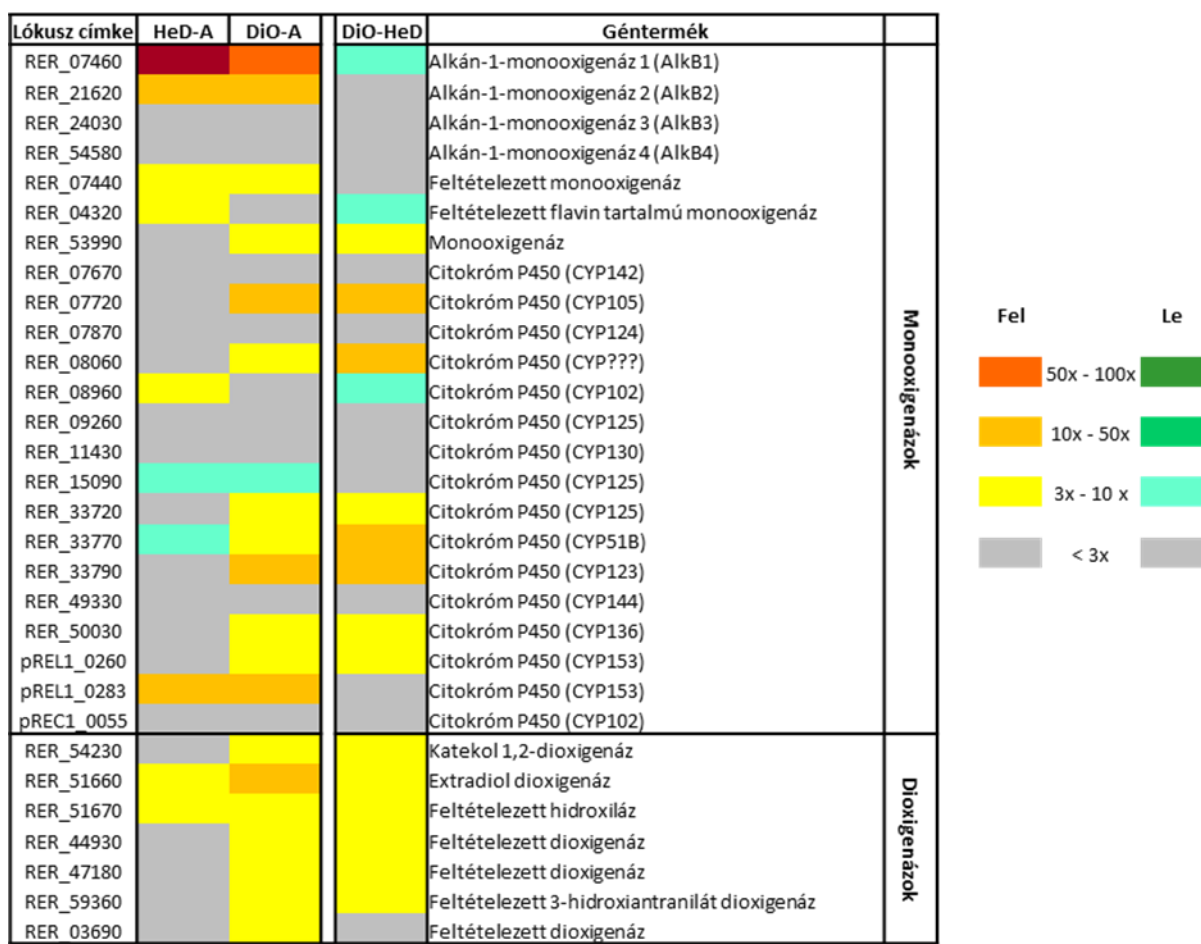
6.3.3. Szénhidrogének oxidációja

A genomban található négy alkán monooxygenáz közül csak kettő mutat emelkedett expressziós aktivitást a szénhidrogének jelenlétében. A RER_07460 (*alkB1*) and RER_21620 (*alkB2*) expressziója magas értékeket ért el mind n-hexadekán, mind pedig dízel olaj jelenlétében a kontrol, Na-acetátos mintákhoz viszonyítva (20., 21. és 27. ábra). Az *alkB1* gén kifejeződése egy nagyságrenddel nagyobb volt n-hexadekán jelenlétében, mint az *alkB2* géné. Ez az eredmény egybeesik a korábbi RT-qPCR mérésekkel. Ugyanakkor *alkB1* expressziója csökkent dízel olaj jelenlétében a n-hexadekánnal mért értékkel összehasonlítva. Az *alkB2* gén mind dízel olajon mind pedig n-hexadekánnal nevelt kultúrákban azonos szinten maradt. Meglepő módon a másik két *alkB* gén RER_24030 (*alkB3*) és RER_54580 (*alkB4*) expressziós aktivitása érdemben nem változott a kontroll mintákhoz képest.

Az *alkB1* és *alkB2* gének szomszédságában 2-2 rubredoxin gén RER_07470, RER_07480, RER_21630 és RER_21640 található, valamint az *alkB1* lókuszt tartalmaz egy

rubredoxin reduktázt is (RER_07590). A legmagasabb expressziós emelkedést az összes vizsgált gén közül a RER_07470 rubredoxin gén mutatta n-hexadekánon. A gén kifejeződési szintje 1 120 szor magasabb volt a Na-acetáton nevelt kultúrák mintáiban mérthez képest. Dízel olaj jelenlétében is ez maradt a legerősebben kifejeződő gén, ugyanakkor 75%-al csökkent kifejeződése az n-hexadekánon szaporított kultúrák mintáihoz viszonyítva.

Az *alkB1* lókuszban található rubredoxin reduktáz géntől (RER_07490) 3' irányban található három további nyitott leolvasási keret, rendre a RER_07500, RER_07510 és RER_07520 (22. ábra), amelyeknek magas expressziós aktivitásuk volt n-hexadekán jelenlétében. RER_07500 egy feltételezhetően a TetR családba tartozó szabályozó fehérjét kódol. Az ebbe a családba tartozó fehérjék olyan negatív regulátorként ismeretesek, amelyek nemcsak a szomszédságukban található operon, hanem önmaguk expresszióját is szabályozzák [146]. A TetR szabályozó fehérje szubsztrát jelenlétében nem képes kötődni a szabályozó régióhoz, így mind az *alkB* gén mind pedig az őt szabályozó *tetR* gén kifejeződése beindul. Ez magyarázatul szolgál a *tetR* gén mRNS szintjének megemelkedésére. A *tetR* gén genomi kontextusa az *alkB* operonok viszonylatában konzervált a *Rhodococcus* törzsek és más aktinobaktériumok körében is. A TetR szabályozó szerepét a genomi helyzetének alapján jósolták *Rhodococcus* sp-ben [147], illetve a transzkripciója alapján *Dietzia* sp-ben [148]. Jelen munka egy újabb közvetett bizonyítékul szolgál a TetR fehérje transzkripció szabályozó szerepére az *alkB* operon esetében, bár a hipotézist még közvetlen kísérletes bizonyítékokkal meg kell erősíteni.

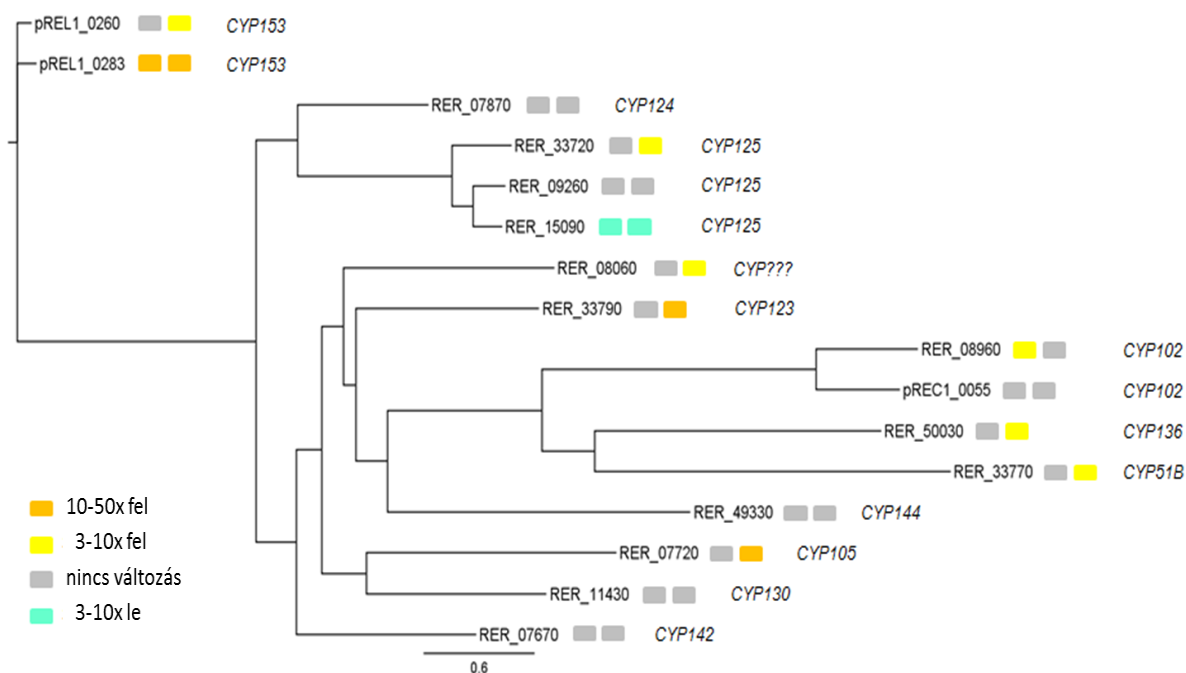


(egyszerű molekulaszerkezet vizsgáló eszköz) internetes keresőben megvizsgálva találtam egy 29 aminosav hosszúságú szignál peptidet az N-terminális régióban, ami azt sugallja, hogy ez egy szekretált fehérje. A fehérje funkciója azonban nem ismert.



22. ábra: Az *alkB1* operon és környezete

A citokróm P450 főcsaládba tartozó monooxygenázok sokféle metabolikus útvonalban vesznek részt, többek között katalizálhatják különféle aromás és alifás szénhidrogének oxidációját is [50,51]. A *Rhodococcus erythropolis* PR4 genomjába összesen 16 *cyp* gén található. Ebből 13 a kromoszómán található, 2 gént a nagyméretű lineáris plazmid, míg a fennmaradó egy gént a nagy cirkuláris plazmid kódolja. Ezek közül csak egy, a pREL1_0283 rendelkezett magas expressziós aktivitással mindkét szénhidrogén szénforráson. A gén expressziója mindkét esetben egy nagyságrenddel magasabb volt, mint a kontroll mintákban. Egy másik gén (RER_08960) csak n-hexadékan jelenlétében mutatott csekély emelkedést kifejeződésében (a kontroll mintákban mért érték 3,8 szorosa). Ezzel szemben a gázolajos mintákban 8 *cyp* gén kifejeződése emelkedett meg (21. ábra, 27. ábra). Ezen gének expressziós értékei 7.3 -17.4-szerese az acetátos minták megfelelő transzkript szintjeinek. A *cyp* gének filogenetikai analízise alapján az indukált gének eltérő csoportokba tartoznak a filogenetikai fán (26. ábra). Ez azzal magyarázható, hogy a dízel olajat alkotó sokféle komponenst más-más enzimek oxidálják. Az egyes *cyp* gének környezetében sokféle más-más funkciót betöltő gén található, például transzkripciós regulátorok (TetR), ABC transzporterek, aldehid dehidrogenázok, zsírsav CoA ligázok stb. Viszont a lineáris plazmidon kódolt két *cyp* gént egy-egy ferredoxin (pREL1_0259 és pREL1_0282) és egy-egy ferredoxin reduktáz (pREL1_0261 and pREL1_0284) génje fogja közre. Ezen gének termékei a citokróm P450 főcsalád I. osztályára jellemző NAD(P)H függő elektrontranszportban vesznek részt [49]. A ferredoxin és a ferredoxin reduktáz gének követik a szomszédságukban található *cyp* gén expressziós mintázatát.



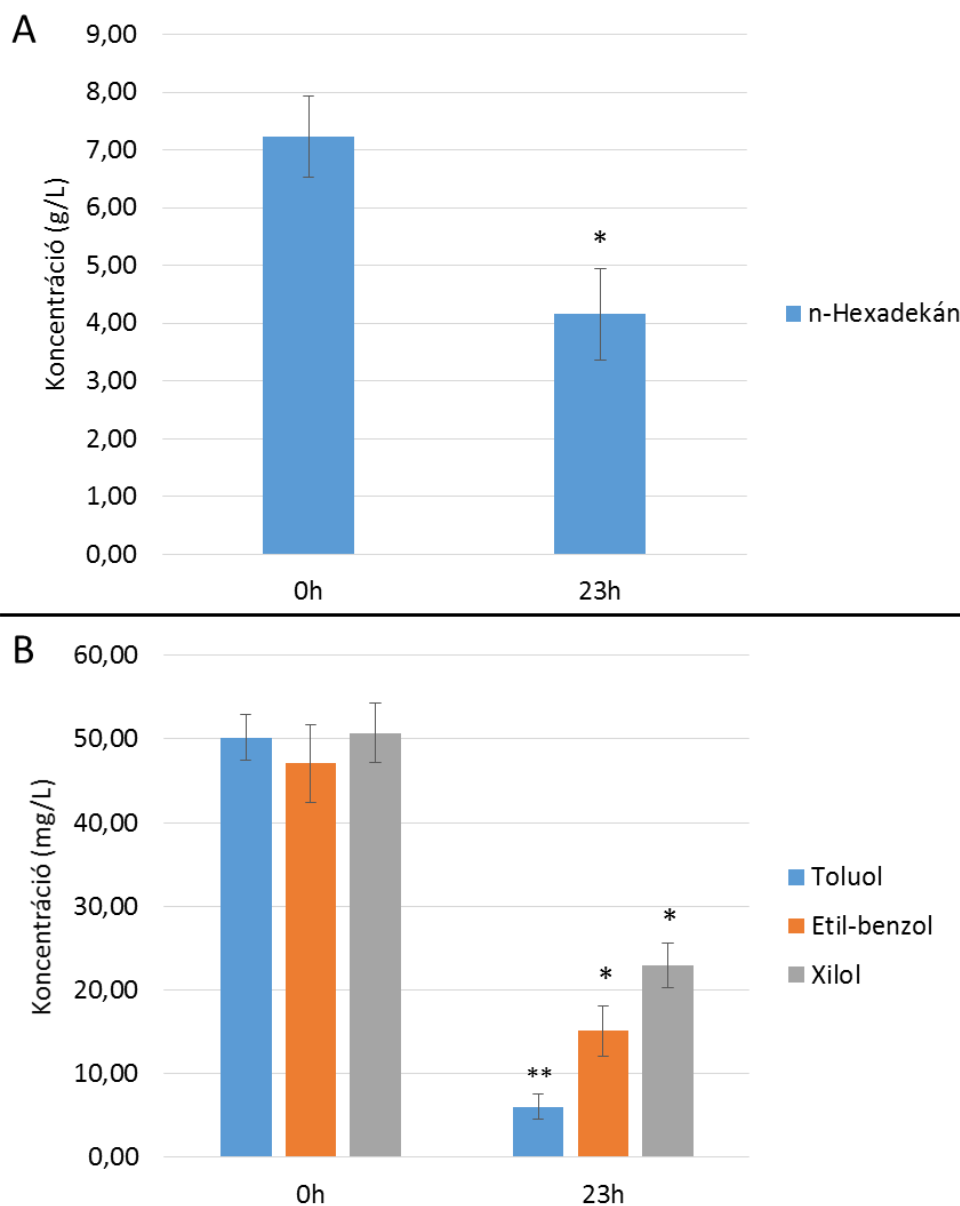
23. ábra: *R. erythropolis* PR4 CYP fehérjéinek filogenetikai fája. A színekódok az expressziós változásokat jelentik összhangban a 20. és 21. ábrákkal. Minden esetben az első kocka mutatja a hexadekánon és az acetáton szaporított sejtek közötti különbséget, míg a második a dízelolaj és az acetát esetében kapott eredményeket hasonlítja össze. CYP??? egy feltehetően eddig ismeretlen CYP család, amibe a RER_08060 tartozik.

A pREL1_0260 környezetében három másik gén is található, melyek feltehetően az alkán oxidáció következő lépéseiben vesznek részt. A pREL1_0257 egy cink tartalmú alkohol dehidrogenáz, ami az alkoholt aldehiddé alakítja, míg a pREL1_0258 egy aldehid dehidrogenáz kódol. Ez az enzim felelős az aldehid zsírsavvá oxidálásáért. A pREL1_0256 által kódolt zsírsav-CoA-ligáz a koenzim A-hoz kapcsolja a zsírsavakat, ezáltal aktiválva azokat. Mindhárom gén kizárólag gázolaj jelenlétében mutatott magas expressziós szintet.

6.3.4 Citokróm P450 monooxygenázok szerepe a gázolaj komponensek biodegradációjában

Hogy tisztázzuk, a gázolaj mely komponensei befolyásolják az egyes cyp gének expresszióját, további fermentációs kísérleteket végeztünk el. A fermentáció során a hexadekánhoz elágazó láncú szénhidrogéneket, vagy aromás szénhidrogéneket és cikloparaffinokat kevertünk. A kultúrák GC/MS analízise szerint az egyes komponensek átalakítása egy időben történik (24. ábra). Az ábrán feltüntetett reprezentatív komponensek mellett a többi hozzáadott komponens koncentrációja is szignifikánsan csökkent a tápoldatban.

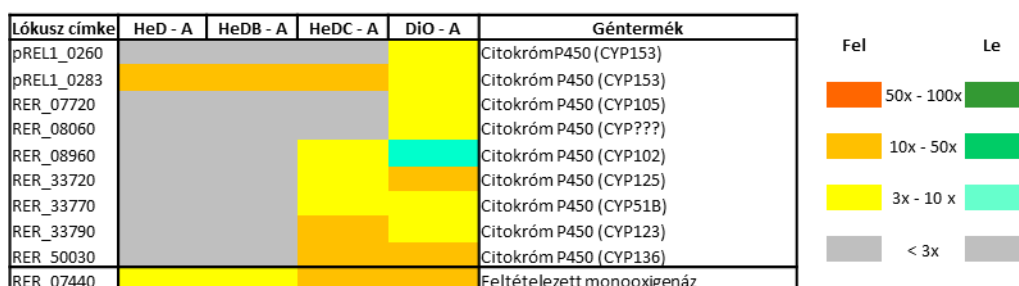
Ez azt sugallja, hogy a sejteknek látszólag nincs prioritási sorrendje a vizsgált komponensek felhasználására.



24. ábra: Szubsztrát koncentráció változása a fermentáció során. A: n-hexadekán, B: monoaromás szénhidrogének * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

A késői exponenciális fázisban tisztított RNS mintákkal RT-qPCR vizsgálatokat végeztünk. Kilenc *cyp* gén és egy feltételezett monooxygenáz (RER_07440) expresszióját is megvizsgáltuk. A kilencből hat *cyp* gén expressziója emelkedett meg cikloalkánok és aromás vegyületek hatására (25. ábra) az acetát jelenlétében mért érték 3,9-20 szorosára. A hat gén közül a pREL1_0283 expressziója minden vizsgált szénhidrogén szubsztráton emelkedett volt (25. ábra). A pREL1_0283 génen kívül a RER_07440 monooxygenáz indukciója volt

megfigyelhető az összes szénhidrogéneken nevelt kultúrában, de a gyűrűs vegyületek jelenlétében magasabb expressziós aktivitást mutatott, mint az elágazó alkánokkal kevert hexadékanon, vagy tiszta hexadékanon. RER_33720, RER_33770, RER_33790 és RER_50030 gének expressziója jelentősen megemelkedett gázolaj és gyűrűs vegyületekkel kiegészített hexadékan jelenlétében, míg a gyűrűs vegyületeket nem tartalmazó szubsztrátokon nem változott. Ezek a gének feltételezhetően az aromás szénhidrogének és a cikloalkánok oxidációjában vehetnek részt. A RER_08960 gén, amely egy CYP102 monooxygenázt kódol, csekély expressziós emelkedést mutatott gyűrűs szénhidrogénekkel kiegészített hexadékanon, viszont gázolajon csekély mértékben represszálódott. A gén expressziós változása mind negatív, mind pozitív irányban közel van a választott küszöbértékhez (3×). Három másik *cyp* gén (pREL1_0260, RER_07720 és RER_08060) csak gázolaj jelenlétében aktiválódott. Ezeknek a géneknek feltételezhetően más szerepe lehet.



25. ábra: Monooxygenázok expressziójának hőtérképes ábrázolása különböző szénhidrogén keverékek jelenlétében *R. erythropolis* PR4-ben. HeD-A oszlop: hexadékan acetáttal; HeDB-A oszlop: Elágazó szénhidrogénekkel kiegészített hexadékan acetáttal; HeDC-A oszlop: Aromás és telített gyűrűs szénhidrogénekkel kiegészített hexadékan acetáttal; DiO-A oszlop: gázolaj acetáttal összehasonlítva. Az ábrán láthatóak a színek az indukciót ("fel"), a repressziót ("le") jelzik.

6.3.5. Zsírsav metabolizmus

Az alkánok oxidációjából származó acil-CoA több útvonalon is hasznosul. Beépülhet a membránba, alapul szolgálhat a mikolsavak szintéziséhez vagy β -oxidációban acetyl-S-CoA keletkezhet belőle.

A β -oxidációért felelős gének expressziója megemelkedett mindkét szénhidrogén szénforrás jelenlétében. Több acil-CoA dehidrogenáz gén (RER_52580, RER_27750, és RER_50060) indukálódott alkánok jelenlétében. Ezen enzimek által katalizált reakcióban az

acil-CoA-ból 2,3-*trans*-enol-CoA képződik. A legmagasabb expressziós változást a RER_52580 (*fadE*) gén mutatta n-hexadékan jelenlétében, ugyanakkor kifejeződése felére csökkent a gázolajos mintákban. Egy másik acil-CoA dehidrogenáz (RER_57810) expressziója csak a gázolaj jelenlétében nevelt kultúrákban emelkedett meg jelentősen. Két másik gén (RER_28420 és RER_28430) is indukálták a szénhidrogének. RER_28420 egy FadJ fehérjét kódol, ami kettős aktivitással rendelkezik. Első lépésben a 2,3-*trans*-enol-CoA-ból 3-hidroxiacil-CoA keletkezik, ami tovább oxidálódik, belőle 3-ketoacil-CoA képződik. A RER_28230 gén terméke egy tioláz, ami a β -oxidációs ciklus befejező lépését katalizálja. A 3-ketoacil-CoA-ból egy acetil-CoA és egy két szénatommal rövidebb acil-CoA keletkezik.

Julia S. Sabirova és mtsai megfigyelték, hogy az n-hexadékan represszálja az acetil-CoA karboxilázok expresszióját *Alcanivorax burcumensis*-ben [40]. Ezek az enzimek felelősek a malonil-CoA szintéziséért, ami a zsírsav bioszintézis első lépése. Ezt a jelenséget azzal magyarázták, hogy a β -oxidációból származó emelkedett acetil-CoA koncentráció a glioxalát ciklus intenzív működéséhez vezet. A glioxalát ciklus a Szent-Györgyi-Krebs ciklus kerülőútja/rövidre zárása, mely során a glioxálsavból és acetil-CoA-ból malonil-CoA keletkezik. Sabirováék megfigyelésével ellentétben a *R. erythropolis* PR4 esetén a n-hexadékanak nem volt negatív hatása az acetil-CoA karboxiláz enzimek expressziójára, sőt a dízel olajon szaporított kultúrák esetében a RER_17540 és RER_17550 indukálódott. Ez a két gén kódolja az acetil-CoA karboxiláz alfa és béta alegységét *R. erythropolis*-ban. Egy másik génpár (RER_18300 és RER_18310), amik ugyancsak acetil-CoA karboxiláz alegységeket kódolnak gyenge expressziós emelkedést mutattak dízel olaj jelenlétében. A két munkacsoport megfigyelése közötti különbség abból ered, hogy Sabirova és munkatársai piruvátot használtak kontrollként, ami a Szent-Györgyi-Krebs ciklusban hasznosul, mi acetátot alkalmaztunk, ami hasonlóan a zsírsav oxidációból származó acetil-CoA-hoz aktiválja a glioxalát ciklust [149]. Ennek értelmében az acetil-CoA karboxilázok a kontroll mintáimban is represszált állapotban voltak.

Az I. típusú zsírsav szintáz enzim (FASII) génje (RER_38730), illetve a vele szomszédos acil-carrier protein transzaciláz gén (RER_38720) erős represszióját figyeltem meg az n-hexadékan hatására (30. ábra). A mikolsav tartalmú aktinobaktériumok egy jelentős részében két különálló zsírsav szintézis rendszer található. Az eukarióta típusú FASII egyetlen hatalmas polipeptid láncból áll, ami dimer formában aktív és az összes zsírsav szintézishez szükséges aktivitása megvan. Ez az enzim felelős a közepes szénláncú zsírsavak (C_{16-26}) szintéziséért *Mycobacterium tuberculosis*-ban és más *Mycobacterium* fajokban [150,151]. *R. erythropolis* PR4 törzs genomjában található *fasI* gén termékének aminosav szekvenciája 63-65%-ban

azonos a mikobakteriális homológokkal. A gén erős repressziója összhangban van azzal, hogy a n-hexadékanon szaporított baktériumban a zsírsav bioszintézisének igénye csökkent, hisz alternatív módon az alkánok oxidációjából jelentős mennyiségű zsírsavat állít elő. Ezzel szemben a dízel olaj jelenlétében a *fasI* 30-szor magasabb expressziót mutatott a n-hexadékanon nevelt kultúrákhoz viszonyítva, ugyanakkor ez az érték még mindig alacsonyabb volt, mint a kontroll mintákban. Feltételezésem szerint ez a különbség abból fakad, hogy a dízel olajban jóval alacsonyabb koncentrációban van jelen a hexadékan és a 16 szénatomnál hosszabb alkánok relatív koncentrációja is alacsony. Ebből adódóan a közepes lánc hosszúságú zsírsavakból is jóval kevesebb keletkezik az alkán oxidáció során, így a sejteknek meg kell szintetizálni a hiányzó zsírsavakat.

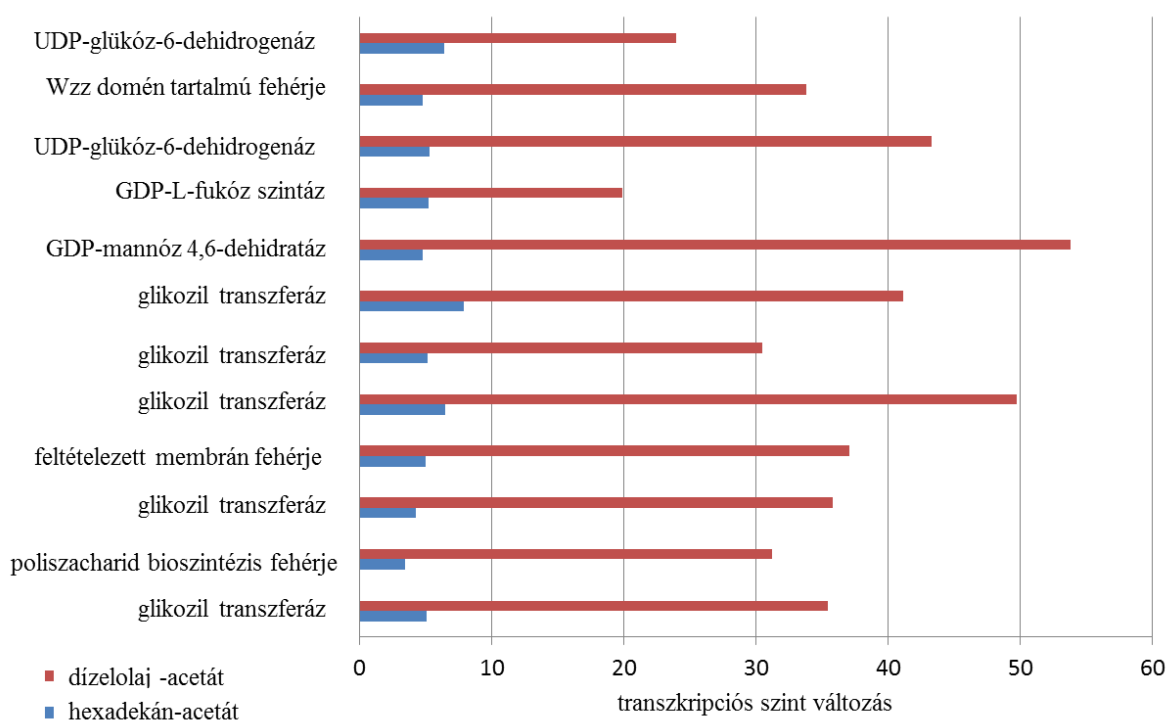
A prokarióta típusú több különálló enzimből felépülő zsírsav szintáz rendszer (FASII) eltérően a prokarióták többségében betöltött szerepétől a mikolsav szintetizáló aktinobaktériumokban a meromikolát lánc szintéziséhez adaptálódott [152,153]. A meromikolát lánc a mikolsav szintézis egyik kiindulási molekulája. A mikolsav szintézis végső lépésében egy meromikolil-ACP Claisen típusú kondenzáció során egyesül egy acil-CoA-val, amit a poliketid szintáz 13 katalizál [154–156]. Ellentétben a FASI-gyel, sem a FASII rendszer elemei sem pedig a poliketid szintáz 13 homológ gén nem mutatott csökkent expressziós értékeket egyik szénforráson sem. Ez azzal magyarázható, hogy a mikolsavak létfontosságú elemei a rhodococcus sejt falnak, tehát génjeinek expressziója konstitutív kell legyen.

6.3.6. *Exopoliszacharid szintézis*

Egy 15 kb hosszú genomi régióban RER_13170 és RER_13290 között a RER_13280 lókuszt kivételével minden gén indukálódott szénhidrogének hatására (26. ábra). A genom annotációja alapján a RER_13170, RER_13190, RER_13210, RER_13220 és RER_13230 nyitott leolvasási keretek különböző glikoziltranszferáz enzimeket kódolnak. Ezek a fehérjék különböző cukor molekulák átvitelét katalizálják a donor molekuláról egy fogadó molekulára. Nukleotid-difoszfát által aktivált cukor molekulákat módosító enzim génjei is megtalálhatók ebben a régióban: két UDP-glükóz 6-dehidrogenáz (RER_13260 and RER_13290) egy GDP-L-fruktóz szintáz (RER_13250) és egy GDP-mannóz 4,6-dehidrogenáz (RER_13240). A RER_13180 egy WzyC-szerű doménnel rendelkező fehérjét kódol, míg a RER_13270 terméke Wzz domént tartalmaz. A Wzy fehérje felelős az *Escherichia coli* O-antigénjének szintéziséért és a Wzz határozza meg az exopoliszacharid lánc hosszát [157]. A RER_13200 egy 403 aminosav hosszú hipotetikus fehérjét kódol. A fehérje 11 transzmembrán hélix-szel rendelkezik. Az NCBI konzervált domén adatbázisa alapján ez a fehérje egy multidrogot és

mérgező anyagot exportáló fehérje (*multidrug and toxic compound extrusion*, MATE). A MATE fehérjék elektrokémiai grádiens ellenében juttatnak ki molekulákat a sejtől [158].

A blastp programmal végrehajtott elemzések és a SMART domén jóslás eredményei alapján, azt feltételezem, hogy ebben a genomi régióban exopoliszacharid szintéziséért felelős gének találhatók. Urai és munkatársai azonosították és jellemezték a *R. erythropolis* PR4 által termelt exopoliszacharidokat [84,85]. Ezek a makromolekulák elősegítik a biofilm képződést, ezáltal megvédik a sejteket a mérgező anyagoktól. Bizonyos exopoliszacharidok a vízben nem oldható szubsztrátokat emulzióba viszik, így megkönnyítik azok felvételét. Az exopoliszacharid szintézisben résztvevő gének expressziója 4-10-szer magasabb volt dízel olaj jelenlétében, mint n-hexadekánon (25. ábra, 30. ábra). Feltételezésem szerint, a dízel olajban található mérgező anyagok miatt a sejteknek több exopoliszacharidra van szükségük, mint hexadekánon. Ezt a feltételezést támasztja alá az is, hogy a gyűrűs vegyületekkel kiegészített n-hexadekán szénforráson is elérte a Wzz domén tartalmú fehérje expressziója a dízel olajon mért expresszió szintjét, míg az elágazó alkánok jelenlétében nem különbözött a tiszta hexadekánon nevelt kultúrákban mért szinttől.



26. ábra: Az exopoliszacharid szintézisben szerepet játszó gének relatív transzkripciója.

6.3.7. Vas transzport és sziderofór szintézis

Több ABC transzporter gén emelkedett expressziós aktivitást mutatott szénhidrogének jelenlétében. A RER_01100 - RER_01130 közötti régió három ABC transzporter alegységet és egy MFS (*major facilitator superfamily*) transzportert kódol. Az aminosav szekvencia homológiák alapján az ABC transzporter egy hidroxamát sziderofór felvevő rendszer, amely a vastranszportban vesz részt. A RER_01100 által kódolt MFS transzporter 25 % azonosságot, illetve 41% hasonlóságot mutat a *Salmonella enterica* Ents enterobaktin export fehérjéjével, ami a sziderofór molekulák sejtből való kijuttatásában játszik szerepet [159].

Egy másik, 17 kb hosszú genomi régióban a RER_27010 és RER_27050 közötti gének expressziós aktivitása is megemelkedett szénhidrogének hatására. Ez a régió egy nem riboszómális peptid szintáz (RER_27010) és sziderofór transzportban résztvevő géneket kódol. Egy mostanában publikált tanulmányban bizonyították, hogy a RER_27010 gén terméke a heterobaktinok bioszintéziséért felelős [117]. A heterobaktinok vas sziderofórok, amelyek jelenlétét *R. erythropolis*-ban és *Nocardia tenerifensis*-ben is igazolták [160,161]. A vas transzport rendszerek génjeinek expressziós emelkedése szénhidrogének hatására azzal magyarázható, hogy az oxidációban szerepet játszó redox enzimek vasat tartalmaznak. Tehát a sejtek vas-igénye megnő szénhidrogénbontó körülmények között. Mason és munkatársai hasonló eredményre jutottak. Mikor megvizsgálták a BP Deepwater Horizont olajfúró torony balesete nyomán felszabadult olajfelhő metatranszkriptomját, a vas transzportban résztvevő gének expresszióját figyelték meg [162].

6.3.8. A génexpressziós vizsgálatok összefoglalása

A transzkriptomikai adatok (20., 23., 30. ábra) és a RT-qPCR vizsgálatok (20. ábra, 1. táblázat) eredménye alapján elmondható, hogy az *alkB1* operon kifejeződése emelkedik meg a legjobban szénhidrogének jelenlétében. Ez arra enged következtetni, hogy az *alkB1* operonról átíródó fehérjék játszik a fő szerepet az alkánok oxidációjában. Mindemellett az *alkB2* operon és a *cyp153* és kisegítő génjei is emelkedett expressziós aktivitással rendelkeznek alkánok jelenlétében. Az alkán oxidációból származó alkoholok több lépésen keresztül zsírsavakká alakulnak, majd a zsírsavak a β -oxidációban hasznosulnak. Az alkoholok oxidációját végző enzimek génjeinek aktivitása nem, vagy csak kis mértékben változik hexadékan jelenlétében az acetáton nevelt kontrolhoz viszonyítva, de a transzkriptomikai adatok alapján ezen enzimek expressziós értéke már eleve magas acetát jelenlétében is. Ezzel szemben dízel olajon nevelt

kultúrák esetén mind az alkohol dehidrogenáz, mind pedig az aldehid dehidrogenáz enzimek expressziós aktivitása megemelkedik (30. ábra). A β -oxidációban résztvevő gének expressziója hexadekán és dízel olaj jelenlétében is megemelkedik. Ezzel szemben a zsírsavak szintéziséért felelős enzimek expressziója jelentősen csökken az alkán oxidációból származó zsírsavak megjelenésének hatására.

1. Táblázat: Génexpresszió vizsgálata különböző szénforrásokon RT-qPCR segítségével

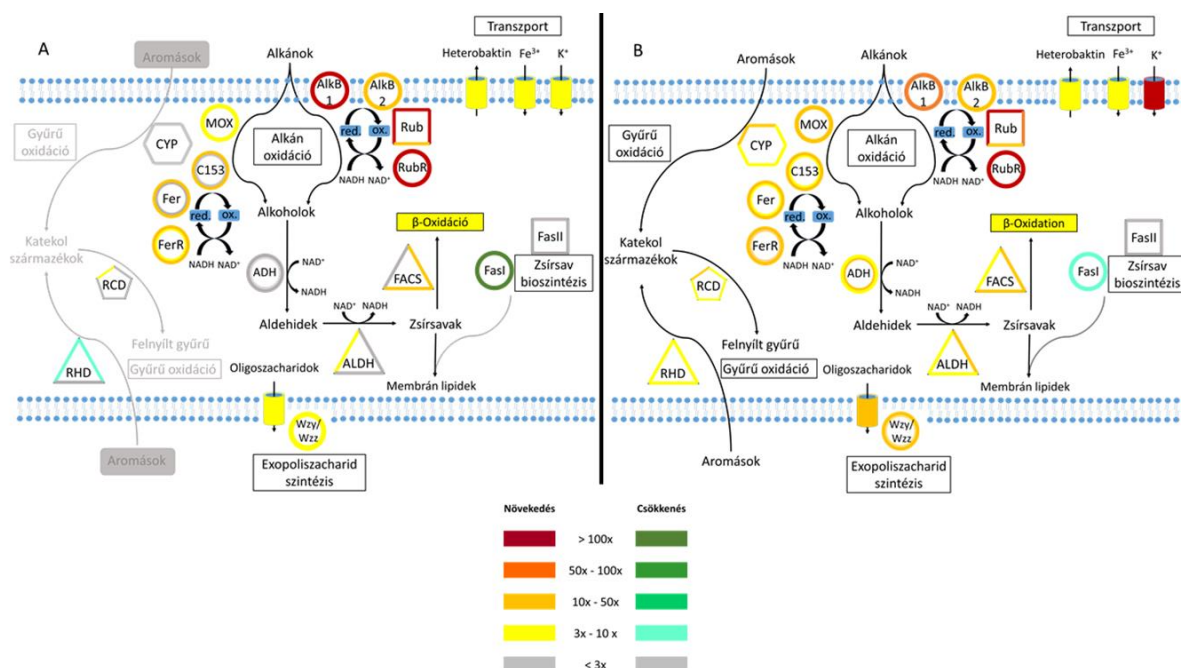
Lókuszcímke	HeD vs. A	HeDB vs. A	HeDC vs. A	DiO vs. A	Géntermék
	Expressziós változás	Expressziós változás	Expressziós változás	Expressziós változás	
RER_07460	2271,3 $\pm$ 79,8	1232,8 $\pm$ 292,9	558,2 $\pm$ 147,1	601,9 $\pm$ 12,9	alkán-1-monooxygenáz (alkB1)
RER_21620	53,1 $\pm$ 7,0	81,2 $\pm$ 17,0	97,8 $\pm$ 26,6	37,5 $\pm$ 3,3	alkán-1-monooxygenáz (alkB2)
RER_24030	-2,5 $\pm$ 0,1	Nem vizsgált	Nem vizsgált	-2,6 $\pm$ 0,2	alkán-1-monooxygenáz (alkB3)
RER_54580	1,5 $\pm$ 0,3	Nem vizsgált	Nem vizsgált	1,9 $\pm$ 0,2	alkán-1-monooxygenáz (alkB4)
RER_03790	1,8 $\pm$ 0,6	1,3 $\pm$ 0,2	-1,3 $\pm$ 0,1	2,9 $\pm$ 0,9	Multicopper oxydase
pREL1_0260	1,9 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 0,06	4,0 $\pm$ 0,4	CYP 153_1
pREL1_0283	11,2 $\pm$ 1,4	12,1 $\pm$ 0,7	14,3 $\pm$ 0,3	8,1 $\pm$ 0,2	CYP 153_2
RER_08960	2,0 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,1	3,9 $\pm$ 0,6	-3,1 $\pm$ 0,3	CYP 102
RER_07720	1,5 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,08	6,9 $\pm$ 0,3	CYP 105
RER_08060	-1,1 $\pm$ 0,9	-1,3 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,3	8,2 $\pm$ 2,5	CYP ???
RER_33720	-2,0 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,5	6,2 $\pm$ 0,5	10,0 $\pm$ 0,4	CYP125
RER_33770	-2,1 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,3	5,5 $\pm$ 0,6	3,7 $\pm$ 0,3	CYP51B
RER_33790	-2,0 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,4	11,2 $\pm$ 1,0	6,5 $\pm$ 0,3	CYP123
RER_50030	-1,1 $\pm$ 0,06	1,0 $\pm$ 0,08	20,3 $\pm$ 0,05	30,4 $\pm$ 1,6	CYP136
RER_07440	3,4 $\pm$ 0,5	4,1 $\pm$ 0,4	15,0 $\pm$ 1,3	25,4 $\pm$ 0,7	feltételezett monooxygenáz
RER_53990	2,8 $\pm$ 0,2	Nem vizsgált	Nem vizsgált	14,8 $\pm$ 0,3	monooxygenáz
RER_04320	11,2 $\pm$ 0,9	Nem vizsgált	Nem vizsgált	1,9 $\pm$ 0,3	flavin tartalmú monooxygenáz
RER_10380	1,1 $\pm$ 0,08	Nem vizsgált	Nem vizsgált	-1,3 $\pm$ 0,09	FMN függő monooxygenáz
RER_13630	-1,3 $\pm$ 0,2	Nem vizsgált	Nem vizsgált	-2,8 $\pm$ 0,5	szteroid monooxygenáz
RER_58590	-5,3 $\pm$ 1,3	Nem vizsgált	Nem vizsgált	-3,2 $\pm$ 0,3	ssuD (alkán szulfonát monooxygenáz)
RER_47700	-2,1 $\pm$ 0,1	Nem vizsgált	Nem vizsgált	-2,4 $\pm$ 0,2	FMN függő monooxygenáz
RER_13180	4,7 $\pm$ 0,2	Nem vizsgált	Nem vizsgált	43,9 $\pm$ 3,0	Wzy
RER_13200	8,0 $\pm$ 0,09	12,7 $\pm$ 0,8	90,4 $\pm$ 10,6	72,6 $\pm$ 1,1	MATE domén tartalmú fehérje
RER_13270	4,8 $\pm$ 1,4	Nem vizsgált	Nem vizsgált	18,2 $\pm$ 0,8	Wzz

Ha aromás és alifás gyűrűs szénhidrogének is megtalálhatóak a szénforrásban (dízel olaj vagy gyűrűs vegyületekkel kevert hexadekán esetén) egyéb citokróm P450 monooxygenázok expressziója is megemelkedik, amelyek sem hexadekán, sem pedig elágazó alkánok jelenlétében nem mutatnak magas expressziós aktivitást (25., 27. ábra és 1. táblázat). Ezek az enzimek vehetnek részt a gyűrűs vegyületek oxidálásában az ugyancsak magasabb expresszióval rendelkező gyűrű hidroxiláló és gyűrű hasító dioxigenázokkal együtt (23. és 27. ábra).

Az exopoliszaccharid szintézisben résztvevő gének expressziója is megemelkedik szénhidrogének jelenlétében. Azonban a gyűrűs alkánokat és aromás vegyületeket tartalmazó szénhidrogén keverékek jóval nagyobb mértékben indukálják az exopoliszaccharidok

szintézisét (26., 27. ábra és 1. táblázat), ami arra utal, hogy nemcsak emulgeálószerként játszanak fontos szerepet a vízben nem oldódó szubsztrátok biodegradációjában, hanem a toxikus komponensek elleni védelemben is elengedhetetlen a jelenlétük.

A szénhidrogének biodegradációja során az oxigenáz enzimek működéséhez elengedhetetlen a vas, így a transzportjáért felelős gének expressziója is megemelkedik (30. ábra).



27. ábra: A hexadekán, illetve a dízel olaj lebontásáért felelős anyagcsere útvonalak: A) n-hexadekán acetáttal szemben, B) dízel olaj acetáttal szemben, Az izoenzimeket kódoló géneket a következőképpen jelöltük: *alkB1* és *alkB2* külön van feltüntetve. Az egy vagy két izoenzimet kódoló géneket koncentrikus körök jelölik. Három vagy több izoenzim esetén a géneket sokszögekkel ábrázoltuk, amelyek minden éle egy enzimet képvisel. ADH: alkohol dehidrogenáz, ALDH: aldehyd dehidrogenáz, AlkB1-2: alkán-1-monooxygenáz, Cyp: citokróm P450 monooxygenáz, kivéve a CYP153 család, C153: CYP153 család, FACS zsírsav-CoA szintáz, FASI-II: Zsírsav szintézis fehérjék, Fer: ferredoxin, FerR: ferredoxin reduktáz, MOX: egyéb monooxygenázok, RCD: gyűrű hasító dioxigenáz, RHD: gyűrű hidroxiláló dioxigenáz, Rub: rubredoxin, RubR: rubredoxin reduktáz, Wzy: exopoliszacharid szintézis fehérje, Wzz: Wzz domén fehérje

7. Összefoglalás

- Kutatómunkámban két *Rhodococcus erythropolis* törzs szénhidrogén-bontó képességét hasonlítottam össze és megvizsgáltam a szénhidrogének lebontásának molekuláris biológiai hátterét.
- A két törzs szénhidrogén jelenlétében eltérően viselkedik. Míg a *R. erythropolis* PR4 emulzióba viszi a n-hexadekánt és a vizes fázisban szaporodik, a *R. erythropolis* MK1 biofilmet képez a n-hexadekán körül és a kultúra a két fázis határán gyűlik össze.
- A mikroszkópos vizsgálatok alapján a mindkét törzs a n-hexadekán cseppek felszínén szaporodik, viszont a cseppek alakja különbözik egymástól. *R. erythropolis* PR4 kultúrában az olajcseppeknek szabályos gömb alakja van, ezzel szemben az MK1 kultúrából származó olajcseppek alakja amorf.-
- A két törzs szénhidrogén-bontó képessége is eltér egymástól. A *R. erythropolis* PR4 már három nap alatt lebontja a rendelkezésére álló n-hexadekán 90 %-át, míg a MK1 csak a szubsztrát 50 %-át hasznosítja két hét alatt.
- A magas sókoncentráció mindkét törzs esetén lassítja a bontás sebességét, a PR4 csak a 7. napra érte el a 90 %-os bontási hányadot, míg az MK1 15 nap alatt csak 31 %-ot bontott le.
- A talajban mindkét törzs hasonló szénhidrogén-bontó aktivitást mutat.
- A talaj nedvességtartalma befolyásolja a szénhidrogén-bontás hatékonyságát. Az optimális 50 %-os nedvességtartalom mellett mindkét törzs 90-100 %-os bontási hatékonyságot ér el, míg 20 % és 30 % talajnedvesség értékek mellett a szénhidrogén bontási aktivitás 40 %-kal csökken.
- Az oxigén- és szén-mérleg alapján a felvett szénhidrogén hasznosulásának aránya mindkét törzsben hasonlóan alakul minden vizsgált tápközegeben. A n-hexadekán megközelítőleg 2%-a alakul át szén-dioxiddá, míg a szubsztrát 98 %-a a sejt felépítő folyamataiban vesz részt.
- A két törzs talajban hasonló arányban hasznosítja a felvett oxigént. Az n-hexadekán oxidálására az oxigén megközelítőleg 70 %-át fordítja, míg egyéb oxidatív folyamatokban 30 % vesz részt.
- A *R. erythropolis* PR4 törzs minimál tápoldatban hasonló arányban használja fel az oxigént, mint talajban, viszont a magas sókoncentráció hatására ez az arány eltolódik. Az eredmények alapján a sós tápoldatban szaporított kultúrák a felvett

oxigén 89,5%-át hasznosítják a monooxygenáz reakcióban. Ezzel szemben a *R. erythropolis* MK1 törzs mindkét tápoldatban az oxigén 90 %-át fordítja monooxygenáz reakcióra.

- A kultúrák szén-dioxid termelésének vizsgálata alapján a két *Rhodococcus* törzs eltérően viselkedik különböző gázolaj frakciók jelenlétében is. Az *R. erythropolis* MK1 sokkal lassabban szaporodik mind a négy szénforrásként alkalmazott frakción, mint a PR4. A törzs szaporodása a petróleum frakción a leglassabb. Ez magyarázható a *cyp153* gén hiányával, amik az alacsonyabb szénatom számú szénhidrogének oxidálására képesek.
- Az *R. erythropolis* MK1 genom *de novo* összerakásához hosszú párosított végű leolvasásokat eredményező szekvenálásokat végeztünk Illumina MiSeq új generációs szekvenáló rendszeren.
- A genom 40 kontigba szerelődött össze és 6 252 gén található rajta.
- A két törzs kromoszómája nagymértékben hasonlít. Ugyanakkor a *R. erythropolis* PR4 plazmidjaihoz hasonló szekvencia nem található az MK1 törzs genomjában.
- Mindkét törzs genomjában találhatók olyan monooxygenáz gének, amelyek az alkánok lebontását katalizálhatják. Ezek közül kiemelendők az *alkB* gének, melyekből a PR4 genomja négyet, az MK1 genomja pedig ötöt tartalmaz.
- A filogenetikai vizsgálatok alapján csak az *alkB3* és *alkB4* gén van közeli rokonságban egymással, a másik két *alkB* gén különböző csoportokba sorolható, ami felveti a horizontális géntranszfer lehetőségét.
- A szénhidrogének oxidációjában résztvevő másik enzim csoport a citokróm P450 monooxygenázok csoportja, melyekből a PR4 törzs genomja 16-ot, míg az MK1 törzs genomja csupán 11-t kódol.
- A citokróm P450 fehérjecsaládba tartozó Cyp153 génje két kópiában található meg a *R. erythropolis* PR4 nagy lineáris plazmidján. A szekvenálási eredmények alapján ezeknek a géneknek a szekvenciái hiányoznak a *R. erythropolis* MK1 genomjából.
- A megszekvenált *R. erythropolis* MK1 genomban található 20. kontig feltételezhetően egy óriásplazmid, melyhez egyetlen ismert *Rhodococcus* plazmid sem hasonlít.
- Az *R. erythropolis* PR4-et teljes transzkriptom analízise alapján mind hexadekán, mind pedig gázolaj jelenlétében az *alkB1* gén és a környezetében található kisegítő gének rendelkezett a legmagasabb expressziós aktivitással az oxigenázok közül.

- A genomban található másik három *alkB* gén közül csak az *alkB2* kifejeződése emelkedett meg szénhidrogének jelenlétében. Az *alkB3* és *alkB4* expressziója változatlan maradt.
- A gázolajon szaporított kultúrákban 9 *cyp* gén expressziója változott, ezzel szemben a hexadékanon mindössze 1.
- A 9 *cyp* génből 5 indukálódott gyűrűs szénhidrogénekkel kevert hexadékanon nevelt kultúrákban, amiből az a következtetés vonható le, hogy ezek a gének játszhatnak szerepet a gyűrűs szénhidrogének oxidációjában.
- Egy feltételezett monooxygenáz gén (RER_07440) kifejeződése is erősebb volt gyűrűs vegyületeket tartalmazó szénforrásokon, mint hexadékanon, vagy elágazó szénhidrogéneket tartalmazó szénforráson, ami arra utal, hogy ez a gén is a gyűrűs vegyületek oxidálásában játszik szerepet.
- A zsírsav metabolizmusban résztvevő gének közül azok expressziós aktivitása emelkedett meg mindkét szénhidrogén szénforráson, melyeknek termékei a β -oxidációban játszanak szerepet.
- A zsírsavak felépítésében résztvevő FASI enzimet kódoló gén kifejeződését erősen gátolta a szénhidrogének jelenléte.
- A mikolsavak szintézisében résztvevő FASII enzimrendszer és a poliketid szintáz 13 expressziója nem változott egyik szénforrás jelenlétében sem.
- Az exopoliszacharid szintézisért felelős gének kifejeződésének megemelkedését is megfigyeltük mind n-hexadékanon, mind pedig dízel olajon. A dízel olaj 4-10-szer erősebben indukálta ezeket a géneket, ami a dízel egyes komponenseinek toxikus hatására vezethető vissza.
- A fentieken kívül a vas transzportban és sziderofór szintézisben résztvevő géneket is indukálták a szénhidrogének.

8. Summary

- During my research, I compared the efficiency of hydrocarbon biodegradation by two *Rhodococcus erythropolis* strains and examined the molecular biological background of the biodegradation process.
- The strains had different appearance in the presence of hydrocarbons. *R. erythropolis* PR4 emulsified the hexadecane in water while *R. erythropolis* MK1 formed biofilm on the the n-hexadecane layer and grew on the border of the two phases.
- Light microscopic study of the cultures revealed that both strains have grown on the surface of the n-hexadecane droplets but the shapes of the droplets were different.
- The *R. erythropolis* PR4 degraded 90 % of n-hexadecane until the third day of the incubation in minimal medium, while the strain MK1 degraded only 50% of it in two weeks.
- The efficacy of biodegradation dropped under high salinity conditions for both strains. Strain PR4 reached 90 % biodegradation yield only in 7 days, while strain MK1 was able to utilize only 31 % of the n-hexadecane in 15 days.
- In potting soil, both strains had similar hydrocarbon degrading activity.
- Soil moisture influenced the efficacy of the degradation. At 50 % soil moisture, both strains reached 90-100 % biodegradation yield. This moisture value was optimal for the hydrocarbon biodegradation. At 20 % and 30 % moistness the efficacy decreased with 40 %.
- According to the calculations based on the oxygen and hexadecane consumption and CO₂ production, the utilization of the n-hexadecane had similar rates in both strains in all niches examined. Approximately 2 % of the n-hexadecane was converted into carbon dioxide, while the other 98 % was utilized in biomass formation.
- The strains could utilize the oxygen in various biochemical processes in similar ratios: 70 % of the consumed oxygen is used for the monoterminal/subterminal oxidation of n-hexadecane, while 30% is harnessed in other oxidative reactions.
- The *R. erythropolis* PR4 strain capitalized the oxygen in minimal medium similarly as compared to potting soil, however, the ratio mentioned above was shifted by high salinity. In salty medium 89.5 % of the oxygen is used in the monooxygenase

reaction. In contrast, this value is 90 % for *R. erythropolis* MK1 strain in both minimal and saltwater medium.

- Based on the carbon dioxide evolution of the cultures The two bacteria could distinctly grow on various gasoline fractions. The *R. erythropolis* MK1 could grow much slower on all the four diesel oil fractions than the PR4 strain could. The growth rate of the MK1 is the slowest on the petroleum fraction, which can be interpreted by the absence of the *cyp153* genes (see below).
- We performed a whole genome sequencing of *R. erythropolis* MK1 on Illumina MiSeq next generation sequencing platform, which yields long paired end reads suitable for *de novo* assembly.
- The genome was assembled into 40 contigs and 6`252 orfs could be identified by RAST.
- The chromosomes of the two strains highly substantially resembled, however there are no sequences could be detected in the *R. erythropolis* MK1 genome which are similar to the plasmids harboured by the strain PR4.
- Both genomes encode monooxygenases which may be involved in the oxidation of hydrocarbons. The *alkB* gene products can be the most relevant in alkane biodegradation from which there are 4 copies in the PR4 and 5 copies in the MK1 genome.
- Based on phylogenetic analysis, *alkB3* and *alkB4* are close to each other, while the other two *alkB* genes are on different branches of the phylogenetic tree. This suggests the possibility of horizontal gene transfer of *alkB* genes.
- The other enzyme group participating in hydrocarbon oxidation is the cytochrome P450 monooxygenase superfamily, the strain PR4 harbours 16 genes, while strain MK1 possesses only 11.
- Two *cyp153* cytochrome P450 monooxygenase genes are present on the large linear plasmid of *R. erythropolis* PR4. Sequencing data revealed that these genes are absent in the genome of *R. erythropolis* MK1.
- In the *R. erythropolis* MK1 genome, contig 20 is likely a megaplasmid which does not have similarity with any of known rhodococcal plasmids.
- Many genes involved in alkane oxidation had elevated mRNA level in the presence of diesel oil and n-hexadecane, as well. The *alkB1* possessed the highest expression level among monooxygenases on both carbon sources.

- From the other three *alkB* genes, only *alkB2* had elevated expression level in the presence of hydrocarbons. The *alkB3* and *alkB4* genes were not induced on any hydrocarbon carbon sources.
- In cells grown on diesel oil, there were 9 *cyp* genes which had elevated expression. In contrast, only one *cyp* gene was induced by n-hexadecane.
- Out of these 9 *cyp* genes, 5 were induced by aromatics and cycloalkanes. These five genes can be involved in the oxidation of aromatic or aliphatic rings.
- A putative monooxygenase gene (RER_07440) had stronger expression in the presence of aromatics and cycloalkanes compared to hexadecane and branched chain alkanes. We concluded that this monooxygenase is also involved in the oxidation of aromatics and cycloalkanes.
- Among the genes involved in fatty acid metabolism, only those were upregulated which were involved in the β -oxidation
- The gene coding for FASI enzyme, being responsible for fatty acid biosynthesis was extremely downregulated in the presence of hydrocarbons.
- The expression of FASII enzyme system and the polyketid synthase 13 was not changed in the presence of hydrocarbons.
- We observed an upregulation of the genes involved in exopolysaccharide biosynthesis in cells grown on all examined hydrocarbon carbon sources. Fold change of the gene expression was 4-10 times higher in the presence of diesel oil and the artificial mixture containing aromatics and cycloalkanes. These results can be explained by the toxicity of the aromatic cycloalkane components.
- In addition, the genes involved in iron transport and siderophore biosynthesis were also induced by hydrocarbons.

I. Függelék: Oligonukleotidok listája

Lókusz azonosító	Oligonukleotid neve	Bázissorrend (5'-3')
RER_07460	Oalkb1F3	GCCTTCTTCCTGTCCTGCTA
	Oalkb1R3	CTCGACGCTCTCCTTCTTGT
RER_21620	Oalkb2F	CTGCTCGAAACCGTCAACTA
	Oalkb2R	GGAAGATGTTGGTGCAGATG
RER_24030	OalkB3F	GCCAACTATCTCGAGCACTAC
	OalkB3R	CTGTGACGCTGAAGTTGATAGA
RER_54580	OalkB4F	TCTCTCTACGGGCACTTCTAC
	OalkB4R	AGAACCTCCAGAAGCTCTCA
RER_r0040	ORE16SF3	GAATCCGTGCCGTAGCTAAC
	ORE16SR3	AAGGTTCTTCGCGTTGCATC
RER_03790	Omco1_F3	TACGACCTCCTCGTCGATTT
	Omco1_R3	AACAGCGGCATAGTCACTTC
pREL1_260	OREL1_260F	ATGACCTGCCAAGGAATGAG
	OREL1_260R	GTCTGACCATTTCGACGAGTTTA
pREL1_283	OREL1_283F	GAGTTCCTGGGCAACTTGAT
	OREL1_283R	GGATTTCGCCTTGAGCTTCT
RER_04320	ORER_04320F	GCGCAGACAGGTGAAAGA
	ORER_04320R	AACCAGTCGTTGGACAGAAG
RER_07440	ORER_07440F	CCGAAATGCTCGAGAAGGAA
	ORER_07440R	GAACGTGTGGACTCGAAGAA
RER_07720	ORER_07720F	AGCGCCTATTTCTCCGTATG
	ORER_07720R	GTCGACGAGTTCCTGGATTG
RER_08060	ORER_08060F	GACTCTCGATAACCGAAACCTATTC
	ORER_08060R	GATCCATGATCTTGCGGTAGAG
RER_08690	ORER_08690F	CGGCAAGTATCCGATGAAGAA
	ORER_08690R	TTGATGTTGGCAGGTAGGAAG
RER_10380	ORER_10380F	GGAATTCCAACCTCTGGTCTAC
	ORER_10380R	TACGGGTTCGGGTGTACT

Lókusz azonosító	Oligonukleotid neve	Bázissorrend (5'-3')
RER_13180	ORER_13180F	GTTGCCTATCGCGGAATCT
	ORER_13180R	CATGAGCATGACAGCAACAAG
RER_13200	ORER_13200F	CACTTGCACCTCGTGACCTATAC
	ORER_13200R	GCAAACGGCACGGATCTAT
RER_13270	ORER_13270F	GCAGCGAGTTCTGTCCTATAC
	ORER_13270R	CCAACCTCTTCAGCCGACAT
RER_13630	ORER_13630F	ACGAACTACTACCAGAGCTACA
	ORER_13630R	GCCGTCTTGATTCCAGTCTC
RER_33720	ORER_33720F	ACACGTCCTCATCAACAAGG
	ORER_33720R	CCGACGCTATGTCTTCTGC
RER_33770	ORER_33770F	TTCATCTCGATGATGTTTCGC
	ORER_33770R	CGTCGGAGTACAGATTGTCTG
RER_33790	ORER_33790F	TACCACTTTCACGACGATCC
	ORER_33790R	GAGACGCTTGTTGTCCTTGA
RER_14080	ORER_14080F	CAGTATGCGGAGGCGATTT
	ORER_14080R	CTGATTCCCGGCAGAATCTT
RER_46450	ORER_46450F	TGTGGTCAATCCGATGTTCA
	ORER_46450R	ATGATTCCCGCAGGTGTATC
RER_46530	ORER_46530F	GGATTTCTACACCGACCTCAAA
	ORER_46530R	CAGAGCCTTCGCTTCTTCTT
RER_47700	ORER_47700F	GACACAGAACACCACGTACAA
	ORER_47700R	GGAAATTCTCTCCCGTCCAAG
RER_50030	ORER_50030F	GATTTGTTCTCCGTGCTTTGTC
	ORER_50030R	AAAGGGTGATCGTCGAAGTG
RER_53990	ORER_53990F	CTACAACCTACGACAAGGGCTAC
	ORER_53990R	CCGATGACCACTACCTTCTTTC
RER_58690	ORER_58690F	TTCCAACCAGGGTTCCTTC
	ORER_58690R	CCTCCACCACTGATGATGTT
RER_38730	FASIO03	CTGTGCGTACGTCATGGTCT
	FASIO04	ACGTTCGAACTTGGTCATCT

Irodalomjegyzék

1. National Research Council (US) Committee on Oil in the Sea: Inputs, Fates, and Effects. Oil in the Sea III: Inputs, Fates, and Effects. Washington (DC): National Academies Press; 2003. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK220703/>
2. International Maritime Organization. MARPOL: articles, protocols, annexes, unified interpretations of the International Convention for the Prevention of Pollution from Ships, 1973, as modified by the 1978 and 1997 protocols. Consolidated ed. 2011, 5th ed. London: IMO; 2011.
3. Yu H. Environmental Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Photochemistry and Phototoxicity. J. Environ. Sci. Health Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev. 2002; 20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3812823/>
4. Moolla R, Curtis CJ, Knight J. Occupational Exposure of Diesel Station Workers to BTEX Compounds at a Bus Depot. Int. J. Environ. Res. Public. Health. 2015;12:4101–15.
5. Shennan JL. Control of Microbial Contamination of Fuels in Storage. In: Houghton DR, Smith RN, Eggins HOW, editors. Biodeterior. 7 [Internet]. Springer Netherlands; 1988. p. 248–55. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-009-1363-9_32
6. Gai Z, Zhang Z, Wang X, Tao F, Tang H, Xu P. Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* DQ8, an Efficient Degradar of n-Alkanes and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. J. Bacteriol. 2012;194:6304–5.
7. Strnad H, Patek M, Fousek J, Szokol J, Ulbrich P, Nesvera J, et al. Genome Sequence of *Rhodococcus erythropolis* Strain CCM2595, a Phenol Derivative-Degrading Bacterium. Genome Announc. 2014;2.
8. Kriszt B, Táncsics A, Cserhádi M, Tóth Á, Nagy I, Horváth B, et al. De Novo Genome Project for the Aromatic Degradar *Rhodococcus pyridinivorans* Strain AK37. J. Bacteriol. 2012;194:1247–8.
9. Laczi K, Kis Á, Horváth B, Maróti G, Hegedüs B, Perei K, et al. Metabolic responses of *Rhodococcus erythropolis* PR4 grown on diesel oil and various hydrocarbons. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015;99:9745–59.

10. Treibs A. Chlorophyll- und Häminderivate in organischen Mineralstoffen. *Angew. Chem.* 1936;49:682–6.
11. Kvenvolden KA. Organic geochemistry – A retrospective of its first 70 years. *Org. Geochem.* 2006;37:1–11.
12. Petroleum. Wikipedia Free Encycl. 2014;4 Available from: <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Petroleum&oldid=606370010>
13. Solomons TWG, Fryhle CB. *Organic chemistry*. Hoboken, NJ: John Wiley; 2008.
14. Fuentes S, Méndez V, Aguila P, Seeger M. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014;98:4781–94.
15. Atlas RM, Hazen TC. Oil Biodegradation and Bioremediation: A Tale of the Two Worst Spills in U.S. History. *Environ. Sci. Technol.* 2011;45:6709–15.
16. Reyes-César A, Absalón ÁE, Fernández FJ, González JM, Cortés-Espinosa DV. Biodegradation of a mixture of PAHs by non-ligninolytic fungal strains isolated from crude oil-contaminated soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2014;30:999–1009.
17. Kvenvolden KA, Cooper CK. Natural seepage of crude oil into the marine environment. *Geo-Mar. Lett.* 2003;23:140–6.
18. Baek K-H, Kim H-S, Oh H-M, Yoon B-D, Kim J, Lee I-S. Effects of Crude Oil, Oil Components, and Bioremediation on Plant Growth. *J. Environ. Sci. Health Part A.* 2004;39:2465–72.
19. Henner P, Schiavon M, Druelle V, Lichtfouse E. Phytotoxicity of ancient gaswork soils. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on plant germination. *Org. Geochem.* 1999;30:963–9.
20. McHale CM, Zhang L, Smith MT. Current understanding of the mechanism of benzene-induced leukemia in humans: implications for risk assessment. *Carcinogenesis.* 2012;33:240–52.

21. Straif K, Baan R, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Coglianò V. Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Lancet Oncol.* 2005;6:931–2.
22. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, International Agency for Research on Cancer. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related occupational exposures. Lyon, France : Geneva: IARC Press ; Distributed by World Health Organization; 2010.
23. Jedrychowski WA, Perera FP, Camann D, Spengler J, Butscher M, Mroz E, et al. Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and cognitive dysfunction in children. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2014;1–9.
24. Polanska K, Dettbarn G, Jurewicz J, Sobala W, Magnus P, Seidel A, et al. Effect of prenatal polycyclic aromatic hydrocarbons exposure on birth outcomes: the polish mother and child cohort study. *BioMed Res. Int.* 2014;2014:408939.
25. Morris JG, Grattan LM, Mayer BM, Blackburn JK. Psychological Responses and Resilience of People and Communities Impacted by The Deepwater Horizon Oil Spill. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 2013;124:191–201.
26. Ramachandran SD, Hodson PV, Khan CW, Lee K. Oil dispersant increases PAH uptake by fish exposed to crude oil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2004;59:300–8.
27. Singer MM, George S, Jacobson S, Lee I, Weetman LL, Tjeerdema RS, et al. Comparison of Acute Aquatic Effects of the Oil Dispersant Corexit 9500 with Those of Other Corexit Series Dispersants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1996;35:183–9.
28. Rosales PI, Suidan MT, Venosa AD. A laboratory screening study on the use of solidifiers as a response tool to remove crude oil slicks on seawater. *Chemosphere.* 2010;80:389–95.
29. Jadhav SR, Vemula PK, Kumar R, Raghavan SR, John G. Sugar-Derived Phase-Selective Molecular Gelators as Model Solidifiers for Oil Spills. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010;49:7695–8.
30. Iqbal MZ, Abdala AA. Oil spill cleanup using graphene. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2013;20:3271–9.

31. Wu Z-Y, Li C, Liang H-W, Zhang Y-N, Wang X, Chen J-F, et al. Carbon nanofiber aerogels for emergent cleanup of oil spillage and chemical leakage under harsh conditions. *Sci. Rep.* 2014;4 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3921635/>
32. Zobell CE. Action of Microorganisms on Hydrocarbons 1. *Bacteriol. Rev.* 1946;10:1–49.
33. Kang JW. Removing environmental organic pollutants with bioremediation and phytoremediation. *Biotechnol. Lett.* 2014;36:1129–39.
34. Van Aken B, Correa PA, Schnoor JL. Phytoremediation of Polychlorinated Biphenyls: New Trends and Promises. *Environ. Sci. Technol.* 2010;44:2767–76.
35. Pavel LV, Gavrilescu M. Overview of ex situ Decontamination Techniques for soil cleanup. *Environ. Eng. Manag. J.* 2008;7:815–34.
36. Vogt C, Richnow HH. Bioremediation via in situ Microbial Degradation of Organic Pollutants. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2013;
37. van Beilen JB, Funhoff EG. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007;74:13–21.
38. Wentzel A, Ellingsen TE, Kotlar H-K, Zotchev SB, Throne-Holst M. Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007;76:1209–21.
39. Seo J-S, Keum Y-S, Li QX. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* 2009;6:278–309.
40. Sabirova JS, Ferrer M, Regenhardt D, Timmis KN, Golyshin PN. Proteomic Insights into Metabolic Adaptations in *Alcanivorax borkumensis* Induced by Alkane Utilization. *J. Bacteriol.* 2006;188:3763–73.
41. Komukai-Nakamura S, Sugiura K, Yamauchi-Inomata Y, Toki H, Venkateswaran K, Yamamoto S, et al. Construction of bacterial consortia that degrade Arabian light crude oil. *J. Ferment. Bioeng.* 1996;82:570–4.
42. Zampolli J, Collina E, Lasagni M, Di Gennaro P. Biodegradation of variable-chain-length n-alkanes in *Rhodococcus opacus* R7 and the involvement of an alkane hydroxylase system in

the metabolism. *AMB Express*. 2014;4. Available from: <http://www.amb-express.com/content/4/1/73>

43. Whyte LG, Hawari J, Zhou E, Bourbonnière L, Inniss WE, Greer CW. Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998;64:2578–84.

44. Murray LJ, Lippard SJ. Substrate trafficking and dioxygen activation in bacterial multicomponent monooxygenases. *Acc. Chem. Res.* 2007;40:466–74.

45. Li L, Liu X, Yang W, Xu F, Wang W, Feng L, et al. Crystal Structure of Long-Chain Alkane Monooxygenase (LadA) in Complex with Coenzyme FMN: Unveiling the Long-Chain Alkane Hydroxylase. *J. Mol. Biol.* 2008;376:453–65.

46. Wang W, Shao Z. Diversity of flavin-binding monooxygenase genes (*almA*) in marine bacteria capable of degradation long-chain alkanes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2012;80:523–33.

47. Hagelueken G, Wiehlmann L, Adams TM, Kolmar H, Heinz DW, Tuommler B, et al. Crystal structure of the electron transfer complex rubredoxin-rubredoxin reductase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007;104:12276–81.

48. Beilen JB van, Smits THM, Roos FF, Brunner T, Balada SB, Röthlisberger M, et al. Identification of an Amino Acid Position That Determines the Substrate Range of Integral Membrane Alkane Hydroxylases. *J. Bacteriol.* 2005;187:85–91.

49. Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.* 2000;1:REVIEWS3003.

50. van Beilen JB, Funhoff EG, van Loon A, Just A, Kaysser L, Bouza M, et al. Cytochrome P450 Alkane Hydroxylases of the CYP153 Family Are Common in Alkane-Degrading Eubacteria Lacking Integral Membrane Alkane Hydroxylases. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006;72:59–65.

51. Syed K, Porollo A, Lam YW, Grimmitt PE, Yadav JS. CYP63A2, a Catalytically Versatile Fungal P450 Monooxygenase Capable of Oxidizing Higher-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Alkylphenols, and Alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013;79:2692–702.

52. Lo Piccolo L, De Pasquale C, Fodale R, Puglia AM, Quatrini P. Involvement of an Alkane Hydroxylase System of *Gordonia* sp. Strain SoCg in Degradation of Solid n-Alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011;77:1204–13.
53. Wu P, Wang Y-S, Sun F-L, Wu M-L, Peng Y. Bacterial polycyclic aromatic hydrocarbon ring-hydroxylating dioxygenases in the sediments from the Pearl River estuary, China. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014;98:875–84.
54. Patrauchan MA, Florizone C, Eapen S, Gomez-Gil L, Sethuraman B, Fukuda M, et al. Roles of Ring-Hydroxylating Dioxygenases in Styrene and Benzene Catabolism in *Rhodococcus jostii* RHA1. *J. Bacteriol.* 2008;190:37–47.
55. Fetzner S. Ring-cleaving dioxygenases with a cupin fold. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012;78:2505–14.
56. Yam KC, D'Angelo I, Kalscheuer R, Zhu H, Wang J-X, Snieckus V, et al. Studies of a ring-cleaving dioxygenase illuminate the role of cholesterol metabolism in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 2009;5:e1000344.
57. Rojo F. Degradation of alkanes by bacteria. *Environ. Microbiol.* 2009;11:2477–90.
58. Ji Y, Mao G, Wang Y, Bartlam M. Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. *Front. Microbiol.* 2013;4. Available from: <http://www.frontiersin.org/Journal/10.3389/fmicb.2013.00058/full>
59. Maeng JH, Sakai Y, Tani Y, Kato N. Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of n-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp. strain M-1. *J. Bacteriol.* 1996;178:3695–700.
60. Kitayama A, Suzuki E, Kawakami Y, Nagamune T. Gene organization and low regiospecificity in aromatic-ring hydroxylation of a benzene monooxygenase of *Pseudomonas aeruginosa* JI104. *J. Ferment. Bioeng.* 1996;82:421–5.
61. Tao Y, Fishman A, Bentley WE, Wood TK. Oxidation of Benzene to Phenol, Catechol, and 1,2,3-Trihydroxybenzene by Toluene 4-Monooxygenase of *Pseudomonas mendocina* KR1 and Toluene 3-Monooxygenase of *Ralstonia pickettii* PKO1. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004;70:3814–20.

62. Choi EJ, Jin HM, Lee SH, Math RK, Madsen EL, Jeon CO. Comparative Genomic Analysis and Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and o-, m-, and p-Xylene (BTEX) Degradation Pathways of *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013;79:663–71.
63. Widdel F, Rabus R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001;12:259–76.
64. Rabus R, Wilkes H, Behrends A, Armstroff A, Fischer T, Pierik AJ, et al. Anaerobic initial reaction of n-alkanes in a denitrifying bacterium: evidence for (1-methylpentyl)succinate as initial product and for involvement of an organic radical in n-hexane metabolism. *J. Bacteriol.* 2001;183:1707–15.
65. Daffe M, McNeil M, Brennan PJ. Major structural features of the cell wall arabinogalactans of *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, and *Nocardia* spp. *Carbohydr. Res.* 1993;249:383–98.
66. Barry CE 3rd, Lee RE, Mdluli K, Sampson AE, Schroeder BG, Slayden RA, et al. Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog. Lipid Res.* 1998;37:143–79.
67. Hong S, Cheng T-Y, Layre E, Sweet L, Young DC, Posey JE, et al. Ultralong C100 Mycolic Acids Support the Assignment of *Segniliparus* as a New Bacterial Genus. Nigou J, editor. *PLoS ONE*. 2012;7:e39017.
68. Nishiuchi Y, Baba T, Yano I. Mycolic acids from *Rhodococcus*, *Gordonia*, and *Dietzia*. *J. Microbiol. Methods.* 2000;40:1–9.
69. Luz AP, Pellizari VH, Whyte LG, Greer CW. A survey of indigenous microbial hydrocarbon degradation genes in soils from Antarctica and Brazil. *Can. J. Microbiol.* 2004;50:323–33.
70. Heald SC, Brandão PF, Hardacre R, Bull AT. Physiology, biochemistry and taxonomy of deep-sea nitrile metabolising *Rhodococcus* strains. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2001;80:169–83.
71. Peressutti SR, Alvarez HM, Pucci OH. Dynamics of hydrocarbon-degrading bacteriogenesis of an experimental oil pollution in Patagonian soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2003;52:21–30.

72. McLeod MP, Warren RL, Hsiao WWL, Araki N, Myhre M, Fernandes C, et al. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006;103:15582–7.
73. Sekine M, Tanikawa S, Omata S, Saito M, Fujisawa T, Tsukatani N, et al. Sequence analysis of three plasmids harboured in *Rhodococcus erythropolis* strain PR4. *Environ. Microbiol.* 2006;8:334–46.
74. Satpute SK, Banat IM, Dhakephalkar PK, Banpurkar AG, Chopade BA. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnol. Adv.* 2010;28:436–50.
75. Sifour M, Al-Jilawi MH, Aziz GM. Emulsification properties of biosurfactant produced from *Pseudomonas aeruginosa* RB 28. *Pak. J. Biol. Sci. PJBS.* 2007;10:1331–5.
76. Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Smyth TJP, Banat IM. Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2010;112:617–27.
77. Joshi-Navare K, Khanvilkar P, Prabhune A. *Jatropha* Oil Derived Sophorolipids: Production and Characterization as Laundry Detergent Additive. *Biochem. Res. Int.* 2013. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bri/2013/169797/abs/>
78. Lang S, Philp JC. Surface-active lipids in rhodococci. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1998;74:59–70.
79. Tokumoto Y, Nomura N, Uchiyama H, Imura T, Morita T, Fukuoka T, et al. Structural characterization and surface-active properties of a succinoyl trehalose lipid produced by *Rhodococcus* sp. SD-74. *J. Oleo Sci.* 2009;58:97–102.
80. White DA, Hird LC, Ali ST. Production and characterization of a trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus* sp., strain PML026. *J. Appl. Microbiol.* 2013;115:744–55.
81. Inaba T, Tokumoto Y, Miyazaki Y, Inoue N, Maseda H, Nakajima-Kambe T, et al. Analysis of Genes for Succinoyl Trehalose Lipid Production and Increasing Production in *Rhodococcus* sp. Strain SD-74. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013;79:7082–90.

82. Pirog TP, Ignatenko SV. Scaling of the process of biosynthesis of surfactants by *Rhodococcus erythropolis* EK-1 on hexadecane. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2011;47:393–9.
83. Urai M, Anzai H, Ogihara J, Iwabuchi N, Harayama S, Sunairi M, et al. Structural analysis of an extracellular polysaccharide produced by *Rhodococcus rhodochrous* strain S-2. *Carbohydr. Res.* 2006;341:766–75.
84. Urai M, Yoshizaki H, Anzai H, Ogihara J, Iwabuchi N, Harayama S, et al. Structural analysis of mucoidan, an acidic extracellular polysaccharide produced by a pristane-assimilating marine bacterium, *Rhodococcus erythropolis* PR4. *Carbohydr. Res.* 2007;342:927–32.
85. Urai M, Yoshizaki H, Anzai H, Ogihara J, Iwabuchi N, Harayama S, et al. Structural analysis of an acidic, fatty acid ester-bonded extracellular polysaccharide produced by a pristane-assimilating marine bacterium, *Rhodococcus erythropolis* PR4. *Carbohydr. Res.* 2007;342:933–42.
86. Perry MB, MacLean LL, Patrauchan MA, Vinogradov E. The structure of the exocellular polysaccharide produced by *Rhodococcus* sp. RHA1. *Carbohydr. Res.* 2007;342:2223–9.
87. Auffret M, Labbe 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;75:7774–82.
88. Li C, Zhou Z-X, Jia X-Q, Chen Y, Liu J, Wen J-P. Biodegradation of crude oil by a newly isolated strain *Rhodococcus* sp. JZX-01. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2013;171:1715–25.
89. Maeda M, Chung SY, Song E, Kudo T. Multiple genes encoding 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase in the gram-positive polychlorinated biphenyl-degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* TA421, isolated from a termite ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995;61:549–55.
90. Kosono S, Maeda M, Fuji F, Arai H, Kudo T. Three of the seven bphC genes of *Rhodococcus erythropolis* TA421, isolated from a termite ecosystem, are located on an indigenous plasmid associated with biphenyl degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997;63:3282–5.

91. Zhang X, Huang Y, Harvey PR, Li H, Ren Y, Li J, et al. Isolation and characterization of carbendazim-degrading *Rhodococcus erythropolis* djl-11. *PloS One*. 2013;8:e74810.
92. Warton B, Matthiessen JN, Roper MM. The soil organisms responsible for the enhanced biodegradation of metham sodium. *Biol. Fertil. Soils*. 2001;34:264–9.
93. Kriszt R, Krifaton C, Szoboszlay S, Cserhádi M, Kriszt B, Kukolya J, et al. A new zearalenone biodegradation strategy using non-pathogenic *Rhodococcus pyridinivorans* K408 strain. *PloS One*. 2012;7:e43608.
94. Alberts JF, Engelbrecht Y, Steyn PS, Holzapfel WH, van Zyl WH. Biological degradation of aflatoxin B1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures. *Int. J. Food Microbiol*. 2006;109:121–6.
95. Takei T, Yamasaki M, Yoshida M. Cesium accumulation of *Rhodococcus erythropolis* CS98 strain immobilized in hydrogel matrices. *J. Biosci. Bioeng*. 2014;117:497–500.
96. Denome SA, Olson ES, Young KD. Identification and Cloning of Genes Involved in Specific Desulfurization of Dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. Strain IGTS8. *Appl. Environ. Microbiol*. 1993;59:2837–43.
97. Oldfield C, Wood NT, Gilbert SC, Murray FD, Faure FR. Desulphurisation of benzothiophene and dibenzothiophene by actinomycete organisms belonging to the genus *Rhodococcus*, and related taxa. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1998;74:119–32.
98. Alvarez HM, editor. *Biology of Rhodococcus*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-12937-7>
99. Park S-Y, Hwang B-J, Shin M-H, Kim J-A, Kim H-K, Lee J-K. *N*-acylhomoserine lactonase producing *Rhodococcus* spp. with different AHL-degrading activities. *FEMS Microbiol. Lett*. 2006;261:102–8.
100. Uroz S, Oger PM, Chapelle E, Adeline M-T, Faure D, Dessaux Y. A *Rhodococcus* qsdA-Encoded Enzyme Defines a Novel Class of Large-Spectrum Quorum-Quenching Lactonases. *Appl. Environ. Microbiol*. 2008;74:1357–66.
101. Cirou A, Mondy S, An S, Charrier A, Sarrazin A, Thoison O, et al. Efficient Biostimulation of Native and Introduced Quorum-Quenching *Rhodococcus erythropolis* Populations Is

Revealed by a Combination of Analytical Chemistry, Microbiology, and Pyrosequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012;78:481–92.

102. Barbey C, Crépin A, Bergeau D, Ouchiha A, Mijouin L, Taupin L, et al. In Planta Biocontrol of *Pectobacterium atrosepticum* by *Rhodococcus erythropolis* Involves Silencing of Pathogen Communication by the Rhodococcal Gamma-Lactone Catabolic Pathway. Kaufmann GF, editor. *PLoS ONE*. 2013;8:e66642.

103. Buckland BC, Drew SW, Connors NC, Chartrain MM, Lee C, Salmon PM, et al. Microbial conversion of indene to indandiol: a key intermediate in the synthesis of CRIXIVAN. *Metab. Eng.* 1999;1:63–74.

104. Priefert H, O'Brien XM, Lessard PA, Dexter AF, Choi EE, Tomic S, et al. Indene bioconversion by a toluene inducible dioxygenase of *Rhodococcus* sp. I24. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004;65:168–76.

105. Cameron GW, Jordan KN, Holt PJ, Baker PB, Lowe CR, Bruce NC. Identification of a heroin esterase in *Rhodococcus* sp. strain H1. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994;60:3881–3.

106. Wendel U, Hummel W, Langenbeck U. Monitoring of phenylketonuria: a colorimetric method for the determination of plasma phenylalanine using L-phenylalanine dehydrogenase. *Anal. Biochem.* 1989;180:91–4.

107. Alvarez HM, Mayer F, Fabritius D, Steinbüchel A. Formation of intracytoplasmic lipid inclusions by *Rhodococcus opacus* strain PD630. *Arch. Microbiol.* 1996;165:377–86.

108. Holder JW, Ulrich JC, DeBono AC, Godfrey PA, Desjardins CA, Zucker J, et al. Comparative and Functional Genomics of *Rhodococcus opacus* PD630 for Biofuels Development. Richardson PM, editor. *PLoS Genet.* 2011;7:e1002219.

109. Janßen HJ, Ibrahim MH, Bröker D, Steinbüchel A. Optimization of macroelement concentrations, pH and osmolarity for triacylglycerol accumulation in *Rhodococcus opacus* strain PD630. *AMB Express.* 2013;3:38.

110. Hetzler S, Broker D, Steinbüchel A. Saccharification of Cellulose by Recombinant *Rhodococcus opacus* PD630 Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013;79:5159–66.

111. Kurosawa K, Wewetzer SJ, Sinskey AJ. Engineering xylose metabolism in triacylglycerol-producing *Rhodococcus opacus* for lignocellulosic fuel production. *Biotechnol. Biofuels*. 2013;6:134.
112. Hetzler S, Steinbuchel A. Establishment of Cellobiose Utilization for Lipid Production in *Rhodococcus opacus* PD630. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013;79:3122–5.
113. Kis Á, Laczi K, Zsíros S, Rákhely G, Perei K. Biodegradation of animal fats and vegetable oils by *Rhodococcus erythropolis* PR4. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2015;105:114–9.
114. Iwabuchi N, Sharma PK, Sunairi M, Kishi E, Sugita K, Mei HC van der, et al. Role of Interfacial Tensions in the Translocation of *Rhodococcus erythropolis* during Growth in a Two Phase Culture. *Environ. Sci. Technol.* 2009;43:8290–4.
115. Takihara H, Ogihara J, Yoshida T, Okuda S, Nakajima M, Iwabuchi N, et al. Enhanced Translocation and Growth of *Rhodococcus erythropolis* PR4 in the Alkane Phase of Aqueous-Alkane Two Phase Cultures Were Mediated by GroEL2 Overexpression. *Microbes Environ.* 2014;29:346–52.
116. Classen T, Pietruszka J, Schuback SM. A new multicopper oxidase from Gram-positive bacterium *Rhodococcus erythropolis* with activity modulating methionine rich tail. *Protein Expr. Purif.* 2013;89:97–108.
117. Bosello M, Zeyadi M, Kraas FI, Linne U, Xie X, Marahiel MA. Structural Characterization of the Heterobactin Siderophores from *Rhodococcus erythropolis* PR4 and Elucidation of Their Biosynthetic Machinery. *J. Nat. Prod.* 2013;76:2282–90.
118. Kis Á, Laczi K, Hajdú A, Szilágyi Á, Rákhely G, Perei K. Efficient Removal of Unctuous Wastes from Wastewater. *Int. J. Biosci. Biochem. Bioinforma.* 2013;3:395–7.
119. Brenner S, Johnson M, Bridgham J, Golda G, Lloyd DH, Johnson D, et al. Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nat. Biotechnol.* 2000;18:630–4.
120. Mitra RD, Shendure J, Olejnik J, Edyta-Krzyszowska-Olejnik, Church GM. Fluorescent in situ sequencing on polymerase colonies. *Anal. Biochem.* 2003;320:55–65.

121. Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB, Lin X, McCutcheon JP, Rosenbaum AM, et al. Accurate Multiplex Polony Sequencing of an Evolved Bacterial Genome. *Science*. 2005;309:1728–32.
122. Ansorge WJ. Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnol*. 2009;25:195–203.
123. Zhou X, Ren L, Meng Q, Li Y, Yu Y, Yu J. The next-generation sequencing technology and application. *Protein Cell*. 2010;1:520–36.
124. Thompson JF, Steinmann KE. Single molecule sequencing with a HeliScope genetic analysis system. *Curr. Protoc. Mol. Biol*. Ed. Frederick M Ausubel Al. 2010;Chapter 7:Unit7.10.
125. Drmanac R, Sparks AB, Callow MJ, Halpern AL, Burns NL, Kermani BG, et al. Human Genome Sequencing Using Unchained Base Reads on Self-Assembling DNA Nanoarrays. *Science*. 2010;327:78–81.
126. Quail M, Smith ME, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*. 2012;13:341.
127. Wanunu M. Nanopores: A journey towards DNA sequencing. *Phys. Life Rev*. 2012;9:125–58.
128. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995;270:467–70.
129. Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science*. 1995;270:484–7.
130. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet*. 2009;10:57–63.
131. Raz T, Causey M, Jones DR, Kieu A, Letovsky S, Lipson D, et al. RNA Sequencing and Quantitation Using the Helicos Genetic Analysis System. In: Kwon YM, Ricke SC, editors. *High-Throughput Gener. Seq.*. Humana Press; 2011. p. 37–49. Available from: http://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-61779-089-8_3

132. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory; 1982.
133. Nagy I, Schoofs G, De Schrijver A, Vanderleyden J, De Mot R. New method for RNA isolation from actinomycetes: application to the transcriptional analysis of the alcohol oxidoreductase gene *thcE* in *Rhodococcus* and *Mycobacterium*. *Lett. Appl. Microbiol.* 1997;25:75–9.
134. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods.* 2001;25:402–8.
135. Chevreux B, Wetter T, Suhai S, others. Genome sequence assembly using trace signals and additional sequence information. *Ger. Conf. Bioinforma.* 1999;99:45–56.
136. Darling ACE, Mau B, Blattner FR, Perna NT. Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements. *Genome Res.* 2004;14:1394–403.
137. Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res.* 2014;42:D206–14.
138. Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998;95:5857–64.
139. Letunic I, Doerks T, Bork P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:D302–5.
140. Fülöp A, Béres R, Tengölics R, Rákhely G, Kovács KL. Relationship between PHA and hydrogen metabolism in the purple sulfur phototrophic bacterium *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *Int. J. Hydrog. Energy.* 2012;37:4915–24.
141. Notredame C, Higgins DG, Heringa J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* 2000;302:205–17.
142. Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 2010;59:307–21.

143. Kwasiborski A, Mondy S, Beury-Cirou A, Faure D. Genome Sequence of the Quorum-Quenching *Rhodococcus erythropolis* Strain R138. *Genome Announc.* 2014;2:e00224-14-e00224-14.
144. Rückert C, Birmes FS, Müller C, Niewerth H, Winkler A, Fetzner S, et al. Complete genome sequence of *Rhodococcus erythropolis* BG43 (DSM 46869), a degrader of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal molecules. *J. Biotechnol.* 2015;211:99–100.
145. Van Beilen, Beilen JBV, Li Z, Duetz WA, Smits THM, Witholt B. Diversity of Alkane Hydroxylase Systems in the Environment. *Oil Gas Sci. Technol.* 2003;58:14.
146. Ahn SK, Cuthbertson L, Nodwell JR. Genome Context as a Predictive Tool for Identifying Regulatory Targets of the TetR Family Transcriptional Regulators. *PLoS ONE.* 2012;7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3511530/>
147. Cappelletti M, Fedi S, Frascari D, Ohtake H, Turner RJ, Zannoni D. Analyses of both the *alkB* Gene Transcriptional Start Site and *alkB* Promoter-Inducing Properties of *Rhodococcus* sp. Strain BCP1 Grown on n-Alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011;77:1619–27.
148. Procopio L, de Cassia Pereira e Silva M, van Elsas JD, Seldin L. Transcriptional profiling of genes involved in n-hexadecane compounds assimilation in the hydrocarbon degrading *Dietzia cinnamomea* P4 strain. *Braz. J. Microbiol.* 2013;44:633–41.
149. Zheng J, Yates SP, Jia Z. Structural and mechanistic insights into the bifunctional enzyme isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase AceK. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2012;367:2656–68.
150. Vance DE, Mitsuhashi O, Bloch K. Purification and properties of the fatty acid synthetase from *Mycobacterium phlei*. *J. Biol. Chem.* 1973;248:2303–9.
151. Kikuchi S, Rainwater DL, Kolattukudy PE. Purification and characterization of an unusually large fatty acid synthase from *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* BCG. *Arch. Biochem. Biophys.* 1992;295:318–26.
152. Choi KH, Kremer L, Besra GS, Rock CO. Identification and substrate specificity of beta - ketoacyl (acyl carrier protein) synthase III (mtFabH) from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 2000;275:28201–7.

153. Cantaloube S, Veyron-Churlet R, Haddache N, Daffé M, Zerbib D. The Mycobacterium Tuberculosis FAS-II Dehydratases and Methyltransferases Define the Specificity of the Mycolic Acid Elongation Complexes. Cardona P-J, editor. PLoS ONE. 2011;6:e29564.
154. Gande R, Gibson KJC, Brown AK, Krumbach K, Dover LG, Sahm H, et al. Acyl-CoA carboxylases (accD2 and accD3), together with a unique polyketide synthase (Cg-pks), are key to mycolic acid biosynthesis in Corynebacteriaceae such as Corynebacterium glutamicum and Mycobacterium tuberculosis. J. Biol. Chem. 2004;279:44847–57.
155. Portevin D, De Sousa-D'Auria C, Houssin C, Grimaldi C, Chami M, Daffé M, et al. A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2004;101:314–9.
156. Gavalda S, Léger M, van der Rest B, Stella A, Bardou F, Montrozier H, et al. The Pks13/FadD32 crosstalk for the biosynthesis of mycolic acids in Mycobacterium tuberculosis. J. Biol. Chem. 2009;284:19255–64.
157. Whitfield C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in Escherichia coli. Annu. Rev. Biochem. 2006;75:39–68.
158. Omote H, Hiasa M, Matsumoto T, Otsuka M, Moriyama Y. The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. Trends Pharmacol. Sci. 2006;27:587–93.
159. Crouch M-LV, Castor M, Karlinsey JE, Kalhorn T, Fang FC. Biosynthesis and IroC-dependent export of the siderophore salmochelin are essential for virulence of Salmonella enterica serovar Typhimurium. Mol. Microbiol. 2008;67:971–83.
160. Carran CJ, Jordan M, Drechsel H, Schmid DG, Winkelmann G. Heterobactins: A new class of siderophores from Rhodococcus erythropolis IGTS8 containing both hydroxamate and catecholate donor groups. Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med. 2001;14:119–25.
161. Bergeron RJ, Singh S, Bharti N. Synthesis of Heterobactins A and B and Nocardia Heterobactin. Tetrahedron. 2011;67:3163–9.

162. Mason OU, Hazen TC, Borglin S, Chain PSG, Dubinsky EA, Fortney JL, et al. Metagenome, metatranscriptome and single-cell sequencing reveal microbial response to Deepwater Horizon oil spill. *ISME J.* 2012;6:1715–27.

Saját közlemények jegyzéke

Szakmai folyóiratban megjelent cikkek

A Ph.D. fokozatszerzéshez felhasznált publikációk

2015.

A dolgozat alapját képző elsőszerzős publikáció:

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.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. **99**:9745-59.

Impakt faktor: **3,337**

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

Ágnes Kis, Krisztián Laczi, Szilvia Zsíros, Gábor Rákhely, Katalin **Perei**. **Biodegradation of animal fats and vegetable oils by *Rhodococcus erythropolis* PR4.** *Int. Biodeter. Biodegr.* 2015. **105**:114-119

Impakt faktor: **2,131**

Egyéb publikációk

2014.

Gábor Rákhely, Balázs Bálint, Rita Béres, Ágnes Kis, Kornél Kovács, Krisztián Laczi, Andrea Nyilasi, András Fülöp, Zoltán Bagi, Etelka Kovács, Gergely Maróti, Katalin Perei. **Production of gaseous biofuels and fine chemicals from food industrial wastes.** *New Biotechnology* 2014. **31**:S103

Impakt faktor: **2,898**

2013.

Ágnes Kis; Krisztián Laczi; Andrea Hajdú; Árpád Szilágyi; Gábor Rákhely and Katalin Perei **Efficient Removal of Unctuous Wastes from Wastewater.** *Int J Biosci Biochem Bioinforma* 2013. **3**:395–397.

Tímea Mosolygó; Gabriella Spengler; Valéria Endrész; Krisztián Laczi; Katalin Perei and Katalin Burián. **IL-17E production is elevated in the lungs of BALB/c mice in the later stages of *Chlamydia muridarum* infection and re-infection.** 2013. *IN VIVO* 27:(6) pp. 787-792.

2012.

Krisztán Laczi; Ágnes Kis; Kornél L Kovács; Gábor Rákhely; Katalin Perei. **Biosurfactant synthesis in the oil eater *Rhodococcus erythropolis* MK1 strain**. Proceedings of the 17th International Symposium on Analytical and Environmental Problems. Szeged: *JATE Press*, pp. 129-133. (2012.) ISBN:978-963-315-066-5

Ágnes Kis; Krisztián Laczi; Roland Tengölics; Kornél L Kovács; Gábor Rákhely; Katalin Perei. **Biodegradation of unctuous wastes of food industry**. Proceedings of the 17th International Symposium on Analytical and Environmental Problems. Szeged: *JATE Press*, pp. 142-145. (2012.) ISBN:978-963-315-066-5

Konferencia absztraktok

Előadások

2015.

Rákhely, Gábor, Botond Hegedűs, Ágnes Kis, Krisztán Laczi, Gábor Bende, Attila Bodor and Katalin Perei (2015). **Metabolic insight into biodegradation of sulfonated aromatic and other industrial hydrocarbon wastes**.

Proc. 6th European Bioremediation Conference Chania, Crete, Greece, June 29-July 2, Eds.: N. Kalogerakis, F. Fava, E. Manousaki, p. 256, ISBN: 978-960-8475-23-6.

2014.

Laczi Krisztián, Kis Ágnes, Bodor Attila, Rákhely Gábor és Perei Katalin. (2014) **Két *Rhodococcus* törzs szénhidrogénbontó képességének összehasonlítása különböző közegekben**. Tavaszi Szél Konferencia 2014. március 21-23. Debrecen, Magyarország

Kis Ágnes, Laczi Krisztián, Zsíros Szilvia, Rákhely Gábor, Perei Katalin. (2014) **Hidrofób Szennyező Anyagok Biodegradációja**. Tavaszi Szél Konferencia 2014. március 21-23. Debrecen, Magyarország

Kis Ágnes; Laczi Krisztián; Zsíros Szilvia; Rákhely Gábor; Perei Katalin. (2014) **Új hatékony izolátum alkalmazása hidrofób szennyező anyagok lebontására.** Első Innováció a Természettudományban 2014- Doktorandusz Konferencia 2014. május 2-3. Szeged, Magyarország

2013.

Krisztián Laczi; Ágnes Kis; Attila Bodor; Gábor Rákhely and Katalin Perei. (2013) **Molecular and physiological comparison of two hydrocarbon degrading *Rhodococcus* strains;** *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 60:(suppl.1) pp. 171-172. IV. CEFORM 2013. október 16-18. Keszthely, Magyarország

Tímea Mosolygó; Gabriella Spengler; Emese Petra Balogh; Valéria Endrész; Krisztián Laczi; Katalin Perei; Katalin Burián. (2013) **IL-17E production is elevated in the lungs of BALB/c mice in the later stages of *Chlamydia muridarum* infection and reinfection.** *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 60:(suppl.1) pp. 189-190.

IV. CEFORM 2013. október 16-18. Keszthely, Magyarország

2012.

Krisztián Laczi; Ágnes Kis; Kornél L. Kovács; Gábor Rákhely; Katalin Perei. **Microbial tools for removal of unctuous pollutants.**

Lacremed 2012.08.31. Szeged, Magyarország

Krisztián Laczi. **Mycolic acid biosynthesis in *Rhodococcus erythropolis*.** *Acta Biologica Szegediensis* 56:(1) p. 84. (2012)

Krisztián Laczi; Ágnes Kis; Emese Bató; Kornél L. Kovács; Gábor Rákhely; Katalin Perei. (2012) **Biodegradation of food industrial and housekeeping wastes.**

Wastestorming "2012" An International Conference on Waste Management. 2012.03.01. Pécs, Magyarország

Ágnes Kis; Dominika Olasz; Krisztián Laczi; Gábor Rákhely and Katalin Perei. (2013) **Effect of immobilization of cells and/or presence of cyclodextrin on biodegradation of hydrophobic compounds.** *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 60:(Suppl.1) pp. 32-33.

A Magyar Mikrobiológiai Társaság Naggyűlése 2012.10.24-26. Keszthely, Magyarország

Ágnes Kis; Krisztián Laczi; Kovács L. Kornél; Gábor Rákhely; Katalin Perei. **Microbial solution for removal of hydrocarbon.**

Wastestorming "2012" An International Conference on Waste Management. 2012.03.01. Pécs, Magyarország

Kis Ágnes; Laczi Krisztián; Tengölics Roland; Zsíros Szilvia; Kovács L Kornél; Rákhely Gábor; Perei Katalin. **Kőolaj és élelmiszeripari hulladékok biodegradációja.** Környezettudományi Doktori Iskolák Konferenciája 2012.08.30-31. Budapest, Magyarország
ISBN: 978-963-315-066-5

Gábor Rákhely; B Hegedűs; M Magony; Krisztián Laczi; A Tóth; G Maróti; F K Medzihradzsky; K L Kovács; K Perei. (2012) **Metabolism of sulfonated aromatic compounds in *Novosphingobium subarcticum* SA1 strain;** *Environmental Engineering and Management Journal* 11:(3/Suppl.) p. S5.

Poszterek

2015.

Krisztián Laczi, Ágnes Kis, Katalin Perei and Gábor Rákhely (2015) **Expression profile of monooxygenases in *Rhodococcus erythropolis* PR4 grown on artificial hydrocarbon mixtures.**

European Bioremediation Conference Chania, Crete, Greece, June 29-July 2, Eds.: N. Kalogerakis, F. Fava, E. Manousaki, p. 182, ISBN: 978-960-8475-23-6.

Ágnes Kis, Krisztián Laczi, Attila Bodor, Gábor Rákhely and Katalin Perei (2015) **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, p. 61, ISBN: 978-960-8475-23-6

Katalin Perei, Ágnes Kis, Krisztián Laczi, Szilvia Zsíros and Gábor Rákhely (2015) **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, p. 79, ISBN: 978-960-8475-23-6.

Attila Bodor, Krisztián Laczi, Ágnes Kis, Sándor Mészáros, Nikolett Rácz, Gábor Rákhely, Katalin Perei (2015) **Microbial degradation of hydrophobic compounds under various environmental conditions.**

21th International Symposium on Analytical and Environmental Problems. Szeged, September 28. ISBN 978-963-306-411-5.

Bodor Attila, Mészáros Sándor, Kis Ágnes, Laczi Krisztián, Rákhely Gábor, Perei Katalin (2015) **Szénhidrogének biodegradációjára alkalmas baktérium törzsek izolálása bioremediációs eljárásokban.**

Innováció a természettudományban – Doktorandusz Konferencia, Szeged, 2015. szeptember 26. ISBN 978-963-9970-63-2.

2013.

Ágnes Kis; Krisztián Laczi; Andrea Hajdú; Árpád Szilágyi; Gábor Rákhely; Katalin Perei. (2013) **Efficient removal of unctuous wastes from wastewater.**

APCBEES 2013.04.21 Peking, Kína

2012.

Krisztián Laczi; Ágnes Kis; K L Kovács; G Rákhely; Katalin Perei. (2013) **Biodegradation of food industrial wastes by Rhodococcus sp.;** *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 60:(Suppl. 1.)

A Magyar Mikrobiológiai Társaság Naggyűlése 2012.10.24-26. Keszthely Magyarország

András Tóth; Krisztián Laczi; Gábor Rákhely and Kornél L. Kovács. **Production of glycoamylase enzyme variants in *Pichia pastoris* expression systems.**

Pichia 2012 Conference 2012.02.29-03.03. Alpbach, Austria

Botond Hegedűs; Katalin Perei; Mónika Magony; Krisztián Laczi; András Tóth; Kornél L Kovács; Gábor Rákhely. **Metabolic and protein-protein interactions of sulfanilic acid**

catabolism in *Novosphingobium subarcticum* SA1; ENVIRONMENTAL ENGINEERING AND MANAGEMENT JOURNAL 11:(3/Suppl.) p. S20. (2012)

Egyéb közlemények

Laczi Krisztián; Kis Ágnes; Bodor Attila; Rákhely Gábor és Perei Katalin. **„Olajfaló” baktériumokkal a szénhidrogén szennyeződések elleni harcban.** Zöld Újság XI. évfolyam 3. szám (2013)