

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

Doktori (Ph.D.) értekezés

Erdeiné Kis Ágnes

Témavezető: Dr. Perei Katalin

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Biofizikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Környezettudományi Doktori Iskola

Szeged

2016

TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés.....	6
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1. Olajszennyezések problémaköre	7
2.2. Zsíros hulladékok problémaköre.....	8
2.3. A hidrofób szennyezőanyagok biológiai lebontása: biodegradáció	10
2.3.1. A mikrobiológiai lebontást befolyásoló tényezők.....	11
2.4. Biodegradáción alapuló kármentesítési eljárások.....	13
2.5. Szénhidrogének aerob mikrobiális lebontása	16
2.6. Zsíros hulladékok mikrobiális kezelése	19
2.7. Oldószer toleráns baktériumok.....	22
2.8. A <i>Rhodococcus</i> nemzetség általános jellemzése.....	24
3. Célkitűzések.....	26
4. Anyagok és módszerek.....	28
4.1. A kísérletek során felhasznált anyagok.....	28
4.2. A törzsek növesztési körülményei	29
4.3. Gázolaj bontási körülményeinek vizsgálata	29
4.3.1. Laboratóriumi mikrokozmosz kísérletek	30
4.3.2. Terepi kísérletek.....	31
4.4. Zsírok bontási körülményeinek vizsgálata	33
4.5. MK1 törzs genomi DNS vizsgálata.....	33

4.5.1. Genomi DNS izolálás.....	33
4.5.2. Genomi DNS szekvenálása	34
4.5.3. Bioinformatikai módszerek.....	34
4.6. Új baktérium törzsekkel végzett kísérletek.....	34
4.6.1. A törzsek izolálása, szelektálása, azonosítása	34
4.6.2. Az azonosított törzsek morfológiai-és fenotípusos vizsgálata.....	36
4.6.3. Oldószer tolerancia vizsgálata.....	36
4.7. Analitikai módszerek.....	37
4.7.1. Szénhidrogének kimutatása	37
4.7.2. Zsírok mennyiségi analízise metilészterek képzése révén	38
4.7.3. Oxigén- és szén-dioxid kimutatása a kultúrák légtéréből.....	39
4.8. Adatok kiértékelése	40
5. Eredmények és megvitatásuk.....	41
5.1. Gázolaj biodegradációjának vizsgálata.....	41
5.1.1. Laboratóriumi mikrokozmosz kísérletek	41
5.1.1.1. Gázolaj biodegradációjának vizsgálata folyadékkultúrában.....	41
5.1.1.2. Gázolajjal szennyezett talaj laboratóriumi modellkísérlete.....	46
5.1.2. Gázolajjal szennyezett talaj <i>on site</i> kezelése	48
5.2. Csirke-és sertészsír biodegradációjának vizsgálata.....	51
5.2.1. Lipáz enzimek kimutatása	52
5.2.2. A törzs anyagcsere aktivitásának vizsgálata zsírokon	53
5.2.3. Lebontási körülmények optimalizálása.....	54
5.2.4. Sertés-és csirkezsír lebontási kinetikája	56
5.2.5. A trigliceridek- és a közti termékek vizsgálata vékonyréteg kromatográfiával ...	59

5.3. A hidrofób szennyező anyagok bontásában részt vevő gének vizsgálata, a <i>R. erythropolis</i> MK1 törzs genomszekvenálása.....	60
5.4. Új baktérium törzsek azonosítása	62
5.4.1. A törzsek morfológiai sajátosságai	65
5.4.2. Fiziológiai- és biokémiai sajátosságok	65
5.4.3. A törzsek gázolaj tolerancia vizsgálata	67
6. Összefoglalás	69
7. Summary.....	74
8. Köszönetnyilvánítás	78
9. Hivatkozások jegyzéke	80
10. Mellékletek.....	96

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

RMCD: Véletlenszerűen metilezett ciklodextrin

CFU: Kolónia formáló egység (*Colony forming unit*)

EDTA: Etilén-diamin-tetraecetsav (*Ethylene diamine tetraacetic acid*)

FID: Lángionizációs detektor (*Flame ionization detector*)

FOG: Zsír, olaj, háj (*Fats, Oils and Grease*)

GC: Gázkromatográfia (*Gas chromatography*)

GC-MS: gázkromatográfiaval kapcsolt tömegspektrométer
(*Gas chromatography-mass spectrometry*)

hpsz: Helyrajzi szám

IMB: Immobilizált baktérium

LB: Luria-Bertani tápoldat

MOL: Magyar Olaj- és Gázipari Nyrt.

MSD: Tömegszelektív detektor (*Mass selective detector*)

MST: Minimál sós tápoldat (*Minimal salt medium*)

OD: Optikai denzitás (*Optical density*)

OPRC: Egyezmény az olajszennyezés elleni felkészültségről,
intézkedésről és együttműködésről

(*International Convention on Oil Pollution Preparedness, Response and Co-operation*)

PCR: Polimeráz láncreakció (*Polymerase chain reaction*)

rpm: Percenkénti fordulatszám (*Revolutions per minute*)

RT: Retenció idő (*Retention time*)

SDS: Nátrium-dodecil-szulfát (*Sodium dodecyl-sulfate*)

TAE: Tris-acetát-EDTA (*Tris-acetate-EDTA*)

TPH: Összes szénhidrogén (*Total petroleum hydrocarbons*)

1. BEVEZETÉS

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

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

Környezetünkben számos olyan mikroorganizmus él, melyek változatos enzimkészletüknek köszönhetően jó hatékonysággal alkalmazhatóak különböző szennyező anyagok lebontására. Remekül hasznosítható törzseket találunk a *Rhodococcus* nemzetség egyes tagjai között is.

Rendkívül változatos enzimeik, felületaktív anyag termelő tulajdonságuk alkalmassá teszi őket arra, hogy akár olyan hidrofób tulajdonságú szennyező anyagokat is lebontsanak, mint a kőolaj eredetű szénhidrogének és az élelmiszeripari zsíros hulladékok.

A szennyező anyagok környezetbarát ártalmatlanítása azonban ma már nem elegendő. Törekednünk kell arra, hogy mindezen túllépve olyan technológiai eljárásokat fejlesszünk, melyek nemcsak egy, hanem együttesen akár több adott problémára is átfogó megoldást kínálnak.

Dolgozatomban a hazánkat leginkább érintő hidrofób szennyező anyagok (gázolaj, sertés- és csirkezsír) biológiai lebontását vizsgálom. Kutatásaimban egy olyan törzset szeretnék bemutatni, mely komplex megoldást nyújthat e szennyező anyagok által felmerülő problémákra.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Napjaink környezetszennyező, környezetterhelő anyagainak jelentős hányadát a különböző típusú hidrofób szennyező anyagok adják. Magyarországon a hidrofób szennyező anyagok közül a legnagyobb problémát az ipari balesetektől, helytelen tárolásból kikerülő gázolaj és az élelmiszeriparban a feldolgozási technológiák során melléktermékként és hulladékként keletkező csirke- és sertészsír jelentik.

2.1. OLJASZENNYEZÉSEK PROBLÉMAKÖRE

A kőolajat és származékait a legelterjedtebb szennyező anyagok között tartják nyilván napjainkban. Leggyakrabban a kőolaj kitermelése során jelentkeznek, amikor a kutak fúrásának hatására az olaj robbanásszerűen a felszínre kerül és annak egy része elárasztja a környező talajt. További talajszennyezés következhet be az olaj elszállítása vagy tárolása során, a töltőállomások közvetlen környezetében is. Szárazföldi szennyezések esetén az olaj a talajba jutva a talajszemcsékhez kötődik, terméketlenné téve azt, továbbterjedése esetén pedig számolni kell a talajvíz elszennyeződésével is (Leahy és Colwell, 1990).

Napjainkban egyre komolyabb nemzetközi aggodalomra adnak okot a tengereket ért olajszennyezések is (Bao és mtsai., 2012). Az 1970-es évektől napjainkig több mint 5,6 millió tonna olaj került a tengerekbe. A kiömlött olaj tengeri környezetre gyakorolt hatása igen jelentős. Az olaj egy része lesüllyed a tengerek aljára, ahol a mélytengeri szervezeteket veszélyezteti, egy része a szél által keltett hullámozás hatására apró cseppekre szakadva emulzióként a víztestbe kerül (Harayama és mtsai., 1999), míg a víz felszínén szétterülő olajfolt elzárja az oxigén útját a tenger felsőbb régiójában élő szervezetek előtt. A tengereket ért olajszennyezések jelentős hal-, emlős- és madárpusztulással járnak. Annak érdekében, hogy minimálisra csökkentsék a tengeri olajszennyezések környezetre gyakorolt hatását, sok ország aláírta az *“International Convention on Oil Pollution Preparedness, Response and Co-operation”* (OPRC) nemzetközi egyezményt, mely szennyeződések esetén előírja a

nemzeti készenléti és felkészülési tervek készítését, adott esetben beleértve az olajszenyeződés kezelésére szolgáló termékek alkalmazását is (Kirby és Law, 2008).

Az olajszenyeződések nem csak az állatok és növények egészségét veszélyeztetik, de az emberi egészséget is. Ennek oka főként az aromás szénhidrogén tartalom. Káros hatásai között tartják számon a különböző máj és vese problémákat (gyulladás, fibrózis, vérvizelés), légzési nehézséget, bőrirritációt, methemoglobinémiát, csontvelő károsodást is (Bordás, 2005; Lewander és Aleguas, 2007; Lee és mtsai., 2013).

Hazánk a rendszerváltás idején számos olajszenyezett területet örökölt a kivonult szovjet csapatoktól. Ezek jellemzően a repülőterek, laktanyák gázolaj szennyezései. Becsült adatok szerint ezek a szennyező anyagok összmenyisége mintegy 5-6 ezer m³-re tehető, s ezekkel 2-3 millió m³ talajt szennyeztek el (Endrédi, 1992; Szoboszlay és Kriszt, 2010). Bár a szennyezések jelentős része az elmúlt 30 évben megszüntetésre került, azonban még mindig vannak kármentesítésre szoruló területek. Környezetből való eltávolításának nehézségét összetételbeli változatossága adja, jellemezően alkánokat, izoalkánokat, cikloalkánokat és aromás szénhidrogéneket tartalmaz (Durand és mtsai., 1995; Marchal és mtsai., 2003; Montadert, 2003).

Hazánkban 6/2009. (IV. 14.) KvVM-EüM-FVM *“A földtani közeg és a felszín alatti vízszennyezéssel szembeni védelméhez szükséges határértékekről és a szennyezések méréséről”* együttes rendelet határozza meg a szennyezettségi határértékeket és szennyezés mérési elveit.

2.2. ZSÍROS HULLADÉKOK PROBLÉMAKÖRE

A zsíros hulladékok együttesen „FOG Wastes” kifejezésként ismertek az angol nyelvű szakirodalomban. A rövidítés magába foglalja mindazon növényi és állati eredetű zsírt (Fat), olajat (Oil) és hájat (Grease) tartalmazó hulladékokat (Wastes), melyek a háztartásokból, hús- és élelmiszeriparból, vágóhidakból és az éttermekből kerülnek ki (Li és mtsai., 2002; Battimelli és mtsai., 2009).

A vágóhidak és a húsfeldolgozó iparágak termelnek a legnagyobb mennyiségben zsírtartalmú hulladékokat. Egy átlagos vágóhídi szennyvíz zsírtartalma 40-410 mg/L között

mozog (Massé és mtsai., 2001). A hús alapanyagok feldolgozási lépései során, pl. az állatok megtisztítása, nyúzása és felaprítása, jelentős mennyiségű elfolyó víz keletkezik, mely nagy mennyiségben tartalmaz biológiailag lebontható szerves anyagokat (Salminen és Rintala, 2002; Masse és Massé, 2005). Az elfolyó víz szerves anyagainak legnagyobb részét a fehérjék és a zsírok teszik ki (Gannoun és mtsai., 2009), mely utóbbiak a flotálódott anyagok átlagosan 60-65%-át alkotják. (Li és mtsai., 2002). A húsipari szennyvizek kezelésében a legnagyobb problémát e magas szuszpendált szilárd anyag tartalom jelenti, mely lassítja a természetes bomlási sebességet (Hejnfelt és Angelidaki, 2009).

Nagy szennyezési potenciált rejt magában a gazdasági szektor egy másik ágazata is, a tejipar. Problémát a fehérjék, a laktóz, a zsírok és annak fő komponensei, a palmitinsav, olajsav, mirisztinsav és a sztearinsav jelentik (Leal és mtsai., 2006). Egy átlagos tejipari szennyvíz >100 mg/L koncentrációban tartalmaz zsírokat (Saifuddin és Chua, 2006).

Az utóbbi évtizedekben nőtt a háztartásokban a különböző növényi olajok felhasználása is. Nem meglepő, hogy külön iparág szakosodott előállításukra. A növények feldolgozása során az olaj a szennyvízben is megjelenik, melynek kinyerése igen komoly problémát jelent (Brozzoli és mtsai., 2009; Koutrouli és mtsai., 2009).

Hazánkban, legnagyobb mennyiségben szilárd zsíros hulladékot a hús- és baromfiipar termel. Becsült adatok szerint az éves technológiai hulladék mennyisége ~210 ezer tonna, melyből a zsíros hulladék ~12 ezer tonnát tesz ki. A vágóhídi és húsipari szennyvíz 200-600 mg/L, a tejipari 200-550 mg/L, a konzervgyári 50-150 mg/L zsíradékot/olajat tartalmaz (Cserhalmi és mtsai., 1997). A zsíros hulladékok közül a sertés- és baromfiszír (elsősorban csirkezsír) jelent leginkább feladatot a szennyvízkezelőknek. Összetételét tekintve a sertészsír 40% telített zsírsavat (25-27% palmitinsav, 12-14% sztearin sav) és 60% telítetlen zsírsavat (44-47% olajsav, 8-10% linolénsav, 3-4% palmitoleinsav, 1% mirisztinsav) tartalmaz (Bitman, 1976). A csirkezsír ezzel szemben kevesebb telített zsírsavat tartalmaz, 29%-ot (22-25% palmitinsav, 12-14% sztearinsav), telítetlen zsírsav tartalma 65% (37-43% olajsav, 16-20% linolénsav, 6-8% palmitoleinsav) (Bitman, 1976; Pipek és mtsai., 2012; Rohman és mtsai., 2012; Lisitsyn és mtsai., 2013).

Az ipari szennyvizeken túl a lakossági szennyvíz is jelentősen terhelt olajos és zsíros hulladékokkal. Tudatos odafigyeléssel azonban ennek koncentrációja jelentősen csökkenthető lenne. Magyarországon a Magyar Olaj- és Gázipari Nyrt. (MOL) országosan több mint 170 töltőállomáson biztosít ingyenesen speciális gyűjtőedényt a lakosság számára, melyben a háztartási zsírt és olajat elhelyezhetik. Sajnos ezzel a lehetőséggel ma még igen kevesen élnek.

A szennyező forrástól függetlenül tehát igen komoly problémával állunk szemben. A szennyvízben végbemenő szaponifikációs, biokalcifikációs folyamatok együttesen járulnak hozzá a szennyvízelvezető rendszer műtárgyaiban, csővezetékeiben a FOG szennyeződések lerakódásához (Ashley és mtsai., 2000; Williams és mtsai., 2012). Ezek az anyagok filmréteggént kerülnek el az eleven iszap felszínén is, mellyel akadályozzák az oxigén diffúzióját. Mindezekon túl a zsírok jelenléte ösztönzően hat a fonalas mikroorganizmusok (*Sphaerotilus natans*, *Microthrix* sp., *Beggiatoa* sp.) növekedésére is, melyek további problémákat okoznak a szennyvízkezelő rendszerekben (Wanner, 1994; Cammarota és Freire, 2006).

Hazánkban a „28/2004. (XII.25.) KvVM rendelet a vízszennyező anyagok kibocsátásaira vonatkozó határértékekről és alkalmazásuk egyes szabályairól” határozza meg a közcatornába bevezethető szennyvíz szennyező anyag tartalmára vonatkozó határértékeket.

2.3. A HIDROFÓB SZENNYEZŐANYAGOK BIOLÓGIAI LEBONTÁSA: BIODEGRADÁCIÓ

A hidrofób szennyező anyagok eltávolításának egyik lehetséges módja a bioremediációs eljárások alkalmazása. A bioremediációs technológiák élő szervezeteket vagy azok komponenseit alkalmazzák a szennyező anyagok ártalmatlanítására, lebontására, a környezet megtisztítására. Céljuk elsősorban a szennyező anyagok koncentrációjának olyan elfogadható szintre csökkentése, mely már nem toxikus a környező ökoszisztéma számára.

A szennyező anyagok lebontását legtöbb esetben mikroorganizmusok végzik enzimrendszereik segítségével. Az enzimek szubsztrátspecifitásuknak megfelelően, katalizálják különféle szerves anyagok lebontását, transzformációját. A lebontás során a szennyező anyag szén- és energiaforrásként szolgál a lebontó mikroorganizmusok számára. A folyamat összességét nevezzük biodegradációnak (Szoboszlai és Kriszt, 2010; Szeberényi, 2011). A biodegradáció végeredményétől függően megkülönböztetünk részleges és teljes biodegradációt. Teljes biodegradáció esetén végtermékként CO₂, víz és biomassza keletkezik, és a kiindulási anyagoktól függően szervesetlen sók és egyéb ártalmatlan szerves anyagok, pl. szerves savak is felszabadulhatnak az átalakítás során. Részleges biodegradáció esetén a lebontási folyamat nem jut el a teljes mineralizációig, így különböző köztitermékek keletkezhetnek. Ezek a köztitermékek jobb esetben kevésbé toxikusak, mint a kiindulási anyag. Részleges lebontást legtöbbször az optimális környezeti feltételek (megfelelő hőmérséklet, oxigén hiánya) vagy specifikus enzim(rendszer)ek hiánya okoz (Perfumo és mtsai., 2007; Perei és mtsai., 2013).

2.3.1. A MIKROBIOLÓGIAI LEBONTÁST BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK

A biodegradáció sikerességét elsősorban a mikroorganizmusok határozzák meg. Optimális működésüket azonban számos tényező befolyásolja (Norris, 1993; Alexander és mtsai., 2009).

Biológiai hozzáférhetőség

Egy szennyező anyag biológiai hozzáférhetőségét alapvetően (i) a szennyező anyag vízoldékonysága, (ii) szilárd anyaghoz való szorpciós képessége és (iii) a lebontó mikroorganizmus felületaktív anyag termelő képességének megléte vagy hiánya befolyásolja. Amennyiben egy vegyület vízben jól oldódik, akkor a mikroorganizmusok számára könnyen hozzáférhetővé válik, míg ezzel szemben vízben nem oldódó (hidrofób) molekulák esetén a mikrobiális hozzáférés korlátozott. Ez a biológiai hozzáférés azonban a mikrobák által termelt felületaktív anyagokkal növelhető. A felületaktív anyagok olyan molekulák, melyek hidrofób és hidrofil részből állnak. Felépítésüknek köszönhetően

képesek a hidrofób vegyületek egy részét körbevenni, növelve ezzel a vegyület oldhatóságát (Kosswig, 2000).

Egy vegyület szorpciós tulajdonsága szintén meghatározza a biológiai hozzáférést. Általánosságban igaz, hogy a hidrofóbicitás növekedésével nagyobb arányú a talajszemcsékhez való megkötődés is (Volkering és mtsai., 1997; Marschner és Kalbitz, 2003; Semple és mtsai., 2004).

Környezeti paraméterek

A szennyezett közeg hőmérséklete elsősorban a szennyező anyag fizikai állapotának megváltoztatásával befolyásolja a mikroorganizmusok lebontó képességét. A mikroorganizmusok ugyanis tág hőmérséklettartományban képesek a szerves anyagok lebontására. Általánosságban igaz, hogy a bontás sebessége, ezáltal a bontási hatékonyság a hőmérséklet növekedésével nő. Ennek háttérében a vegyületek viszkozitása, oldódási képessége, valamint a biokémiai reakciók sebességének növekedése áll. Magas hőmérsékleten a hidrofób anyagok viszkozitása csökken, mely a mikroorganizmusok számára jobb hozzáférést tesz lehetővé (Atlas, 1981; Niehaus és mtsai., 1999; Whyte és mtsai., 1999; Müller és mtsai., 2006).

A mikroorganizmusok pH tűrése széles tartományban mozog, az acidofil szervezeteken át az alkalofil szervezetekig találhatunk mikroorganizmusokat. Leghatékonyabb szerves anyag lebontás mégis semleges, fiziológiás körülmények között megy végbe, így savanyú talajok esetén gyakran használnak meszet a biodegradáció gyorsítása érdekében (Stapleton és mtsai., 1998; Gemmell és Knowles, 2000; Margesin és Schinner, 2001).

Egy szennyezett terület gázösszetétele (különös tekintettel az oxigénre) alapvetően meghatározza a mikrobiális közösség összetételét. Aerob környezetben elsősorban azok a lebontó szervezetek dominálnak, melyek molekuláris oxigént használnak a szerves anyagok oxidációjához. Anaerob körülmények között azonban alternatív elektron akceptorok (nitrát, vas- és mangán oxidok, szulfát vagy a szén-dioxid) szükségesek az anaerob szervezetek számára. Vannak fakultatív anaerob mikroorganizmusok is, melyek mind oxigéndús, mind oxigén hiányos környezetben egyaránt képesek szaporodni és a szennyező anyagokat bontani (Boopathy, 2000; Vidali, 2001; Landmeyer és Bradley, 2003).

Tápanyagok

A mikrobák megfelelő működéséhez a szénforrást biztosító szennyező anyagon túl makro- (nitrogén, foszfor, kálium) és mikroelemek (kalcium, magnézium, nyomelemek) egyaránt szükségesek. Szennyezett közegekben általában a mikrobiális aktivitásnak köszönhetően a nitrogén és foszfor gyorsan limitáló elemmé válik, melynek hatására csökken a bontás hatékonysága. Annak érdekében, hogy növeljék a lebontó szervezetek aktivitását nitrogén- és foszfát tartalmú műtrágyákat alkalmaznak. Ezek használata azonban gondos odafigyelést igényel, mert nyílt rendszerekben könnyen kimosódhatnak. (Leahy és Colwell, 1990; Lacotte és mtsai., 1995; Alexander, 1999; Vidali, 2001).

2.4. BIODEGRADÁCIÓN ALAPULÓ KÁRMENTESÍTÉSI ELJÁRÁSOK

Egy szennyezett közeg biológiai kármentesítésekor szükséges mérlegelni a megtisztított terület későbbi felhasználásának jellegét és az egészséget veszélyeztető tényezőket. Abban az esetben, ha a talajt nagymértékű szennyezés éri, mely már akár ivóvízbázisokat is elérhet, akkor mindenképpen a szennyezett közeg *ex situ* kezelése indokolt. Ilyen esetekben a szennyezett közeget kitermelik megakadályozva ezzel a szennyező anyag továbbterjedését, majd azt vagy helyben (*on site*) vagy elszállítását követően (*off site*) kezelik (Gruiz, 2003; Atlas és Philp, 2005; Perei és mtsai., 2013). *Ex situ* kármentesítési eljárások során biohalmozást (biopile), komposztálást, agrotechnikát (landfarming) illetve bioreaktorokat használnak leggyakrabban. A szennyező anyag lebontását minden esetben elsősorban levegő, víz, tápanyagok, akár mikroorganizmusok bejuttatásával gyorsítják.

Az *ex situ* eljárásokhoz képest lényegesen olcsóbb a talaj eredeti helyén történő (*in situ*) kezelése. Nagyobb kiterjedésű szennyezett terület kármentesítésére használják a leggyakrabban költséghatékonysági szempontok miatt, ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy az *ex situ* eljárásokhoz képest lényegesen hosszabb időt vehetnek igénybe. Az *in situ* eljárások három alapvető változata ismert.

(i) A szennyező anyagok lebontása természetes körülmények között, külső beavatkozás nélkül végbemenő folyamat is lehet, ekkor természetes csillapításról, csökkenésről (attenuáció) beszélünk. Ebben az esetben olyan mikroorganizmusok szaporodnak el a szennyezett közegben, melyek egy része képes adaptálódni a szennyező anyaghoz, képesek azt szén- és energiaforrásként hasznosítani (Spain és van Veld, 1983). Ekkor elegendő lehet a természetes szennyező anyag csökkenés monitorozása.

(ii) Amennyiben a természetes biodegradáció folyamata nem megy végbe, akkor az adaptált mikrobiális közösség stimulálása (biostimuláció) megfelelő megoldás lehet. A mikroorganizmusok aktivitása ugyanis jelentősen javítható ásványi anyagokkal (nitrogén, foszfor vagy kálium tartalmú műtrágyákkal), növekedési faktorokkal, a megfelelő oxigén koncentráció (Dupont, 1993) és nedvesség tartalom beállításával (Nikolopoulou és Kalogerakis, 2009).

A tápanyagokon túl egyéb adalékanyagok is kijuttathatóak, melyek elsősorban a biológiai hozzáférést növelik. Ezen adalékanyagok lehetnek mikrobák által szintetizált *felületaktív anyagok* (biotenzidek) is. A felületaktív anyagok termelésére számos mikroorganizmus képes (Banat és mtsai., 2010). Használatuk előnye, hogy segítik a hidrofób vegyületekhez való hozzáférést, diszpergálják azokat, növelve a mikrobák által elérhető felületet. Ennek kiemelkedő jelentősége a vizek kármentesítése során van (Rosen és Kunjappu, 2012).

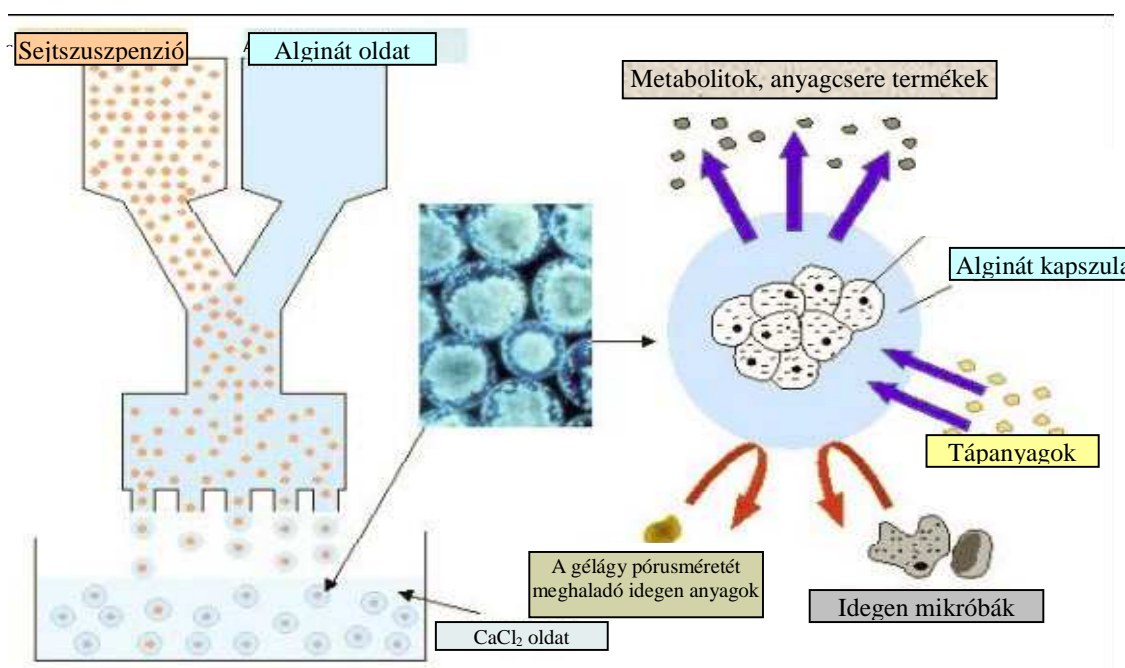
A biológiai hozzáférés növelésének másik lehetséges módja a *ciklodextrin* alkalmazása.

A ciklodextrin gyűrűként záródó oligoszacharid, melynek belső apoláros ürege képes más hidrofób molekulákat reverzibilisen magába zárni. Felületén hidroxil csoportok helyezkednek el, hidrofil tulajdonságot kölcsönözve a molekulának. A ciklodextrin hidrofób komponensekkel alkotott komplexe amfil tulajdonsága miatt növeli azok oldhatóságát, melynek következtében a lebontást végző szervezetek számára könnyebb hozzáférést biztosít a szubsztráthoz (Oláh és mtsai., 1988; Szejtli, 1988; Bardi és mtsai., 2000; Loftsson és mtsai., 2005; Leitgib és mtsai., 2008).

(iii) Sok esetben előfordul, hogy a közegben nincs a szennyező anyag lebontására képes mikroorganizmus vagy bár jelen van, de azok csíraszama alacsony. Ez esetben törzsgyűjteményből származó- (Singer és mtsai., 2005) vagy a szennyezett területről izolált

(Belotte és mtsai., 2003) mikroorganizmusok nagy mennyiségű bejuttatása szükséges (bioaugmentáció) (Perei és mtsai., 2013).

A mikroorganizmusok reakció térben való tartásának kiemelt jelentősége lehet kármentesítések során (Bayat és mtsai., 2015). Erre alkalmas megoldás a sejtek hordozóba zárása (*immobilizálása*). Az immobilizálás során a sejtek polimerekbe (alginát, pektin, karragén) csomagolása nem csökkenti azok anyagcsere aktivitását, de megakadályozza kimosódásukat (Lin és Wang, 1991; Cassidy és mtsai., 1996; Cunningham és mtsai., 2004).



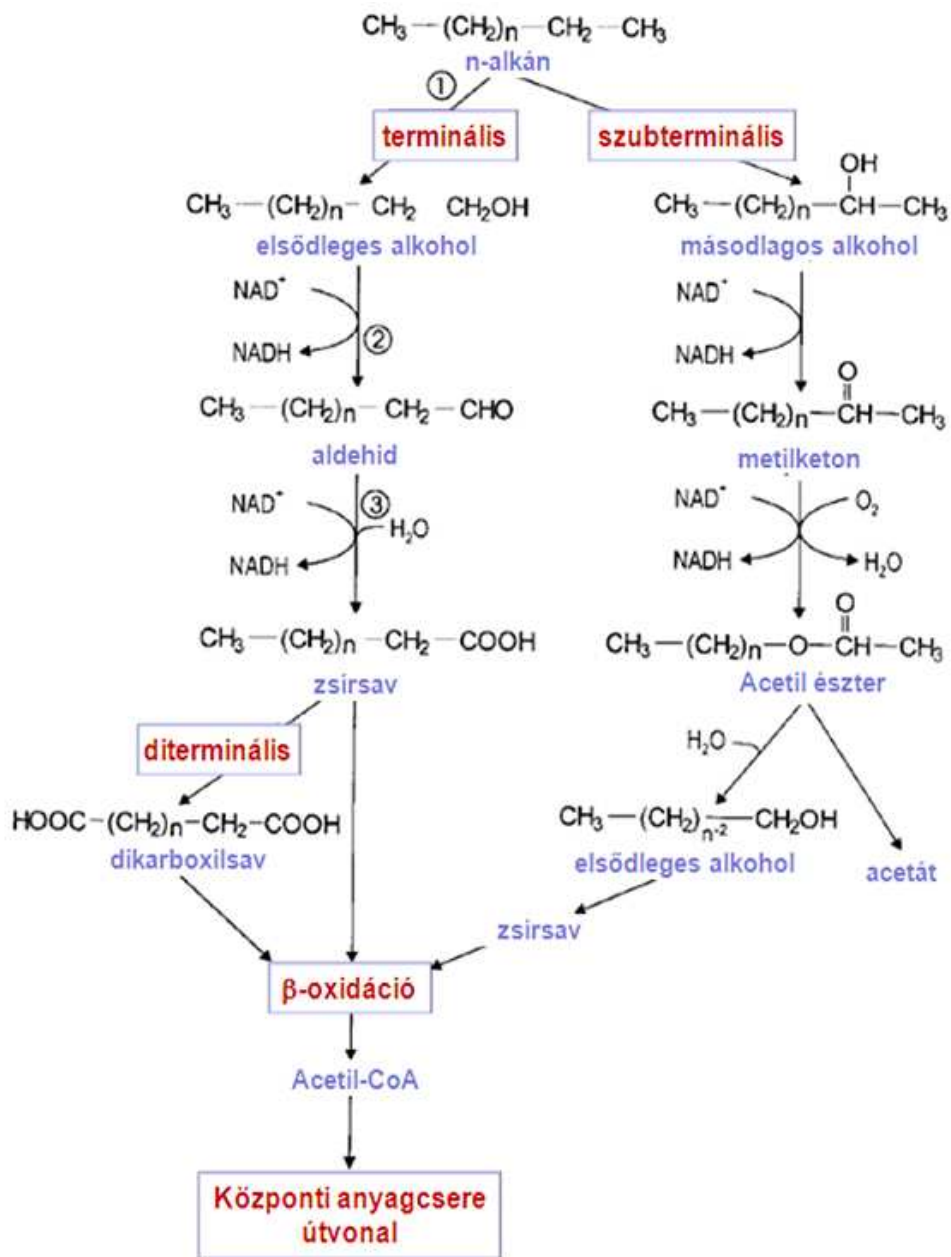
1. ábra: Mikrobiális sejtek alginát gélbe zárásának folyamata és előnyei sematikusán ábrázolva (Internetes hivatkozás 1., 2016)

A fenti lehetőségek közül a megfelelő eljárás kiválasztása nagyon fontos a gyors és kielégítő eredmény eléréséhez.

2.5. SZÉNHIDROGÉNEK AEROB MIKROBIÁLIS LEBONTÁSA

A szénhidrogének mikrobiális lebontása elsősorban a mikroorganizmusoktól és a szénhidrogének fizikai-kémiai tulajdonságaitól függ. A szakirodalom a legkiemelkedőbb szénhidrogén lebontó szervezetek között tartja számon az *Alcanivorax*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Oleispira*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, nemzetségek egyes fajait, de találhatunk szénhidrogén bontókat a *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Halomonas*, *Lysinibacillus*, *Ochrobactrum* nemzetségekben is (Al-Hadhrami és mtsai., 1996; Nazina és mtsai., 2005a, 2005b; Arulazhagan és Vasudevan, 2009; Reddy és mtsai., 2010; Mnif és mtsai., 2011; Song és mtsai., 2011; Hassanshahian és mtsai., 2012; Patel és mtsai., 2013). E szénhidrogén bontó szervezetek változatos metabolikus aktivitással rendelkeznek, elsősorban specifikus enzimeik segítségével képesek a szénhidrogének lebontására.

A gázolaj gyakori szennyezőanyag, legnagyobb mennyiségben n-alkánokat tartalmaz, melyek biokonverziójában leggyakrabban oxidoreduktáz (EC: 1) enzimek, elsősorban oxigenázok (EC: 1.13) vesznek részt. Az alkánok oxidációját általában monooxigenázok (EC: 1.13.12) katalizálják (van Beilen és Funhoff, 2005). A reakciót katalizáló monooxigenáz enzim oxigén molekulát felhasználva alakítja át az alkánokat terminális útvonalon keresztül, mely folyamat során primer alkohol képződik, ami több enzimreakción keresztül aldehiddé majd zsírsavvá alakul, és végül a β -oxidációs útvonalon metabolizálódik (2. ábra) (Ji és mtsai., 2013). Nagyon ritkán találkozunk szubterminális oxidációval is. Egyes *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* törzsek esetén mutatták ki ezt a sajátos lépést (Singh, 2006). Ennek során az oxigenáz enzim az utolsó előtti szénatomot oxidálja, melynek következtében másodrendű alkohol képződik, ami ketonná majd észterré alakul. Az észter ezután tovább oxidálódik primer alkohollá majd zsírsavvá ecetsav kilépése közben (Rojo, 2009). Diterminális oxidáció során az alkánok oxidációja a zsírsavig a monoterminális útvonalon keresztül zajlik. Ezt követően a zsírsav ω szénatomjának hidroxilációja majd további oxidációja történik meg α,ω -dikarbonsav keletkezését eredményezve (Rojo, 2009).



2. ábra: Alkánok oxidációja (Rehm és Reed, 1999 alapján)

A monooxygenáz enzimek között a rövid szénláncú alkánok átalakításában a metán, propán, és bután monooxygenázok vesznek részt, mely enzimeket elsősorban a *Gordoria*-, *Pseudomonas*-, *Methylisinus* és *Methylococcus* egyes törzseiben mutatták ki (Sluis és mtsai.,

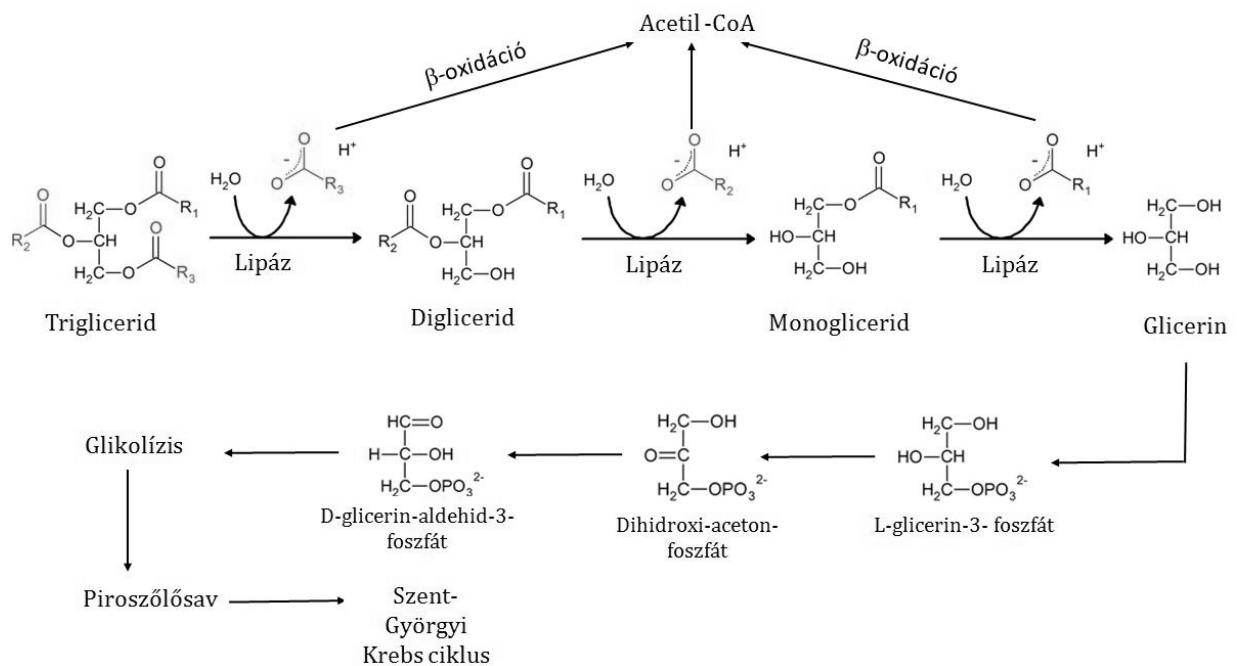
2002; Baik és mtsai., 2003; Kotani és mtsai., 2003). A hosszabb szénláncú szénhidrogének lebontásáért a citokróm P450 monooxygenázok és az AlkB típusú alkán-1-monooxygenázok a felelősek, melyeket legnagyobb számban az *Acinetobacter*, *Alcanivorax*, *Pseudomonas* és *Rhodococcus* törzsekben azonosítottak (Maier és mtsai., 2001; Whyte és mtsai., 2002). A 20 szénatomszám feletti alkánok lebontásában szintén szerepet játszhatnak egyes AlkB típusú monooxygenázok, de találhatunk AlmA típusú enzimeket is pl. a legkiválóbb alkánbontóként számontartott *Alcanivorax borkumensis* törzsben (Wang és Shao, 2012). A gázolaj monoaromás szénhidrogénjeinek lebontása, szintén oxigenáz katalizálta reakcióban, az oxigén molekulából keletkező hidroxilgyökök egyikének vagy mindkettőnek aromás gyűrűbe való beépülésével kezdődik (monooxygenáz, gyűrű hidroxiláló dioxigenáz), melynek következtében katekol származék keletkezik. Utóbbit gyűrűhasító dioxigenáz bontja tovább (Harayama és mtsai., 1992; Díaz, 2004; Chandrakant és Shwetha, 2011).

Bár a szénhidrogének széles skálájának lebontására képes mikroorganizmusokat találhatunk a környezetünkben, ugyanakkor legtöbbször egy mikroorganizmus csak egy adott szénhidrogén csoport vagy csak egy adott vegyület lebontására képes. Ennek következtében a legtöbb szénhidrogén lebontó organizmus csak speciális esetekben és nem általánosan használható. A szénhidrogén szennyezések közvetlen környezetében, a világon legnagyobb számban kimutatott *Oleispira*-, *Marinobacter*-, *Thalassolituus*-, *Alcanivorax* és *Cycloclasticus* törzsekről (Brooijmans és mtsai., 2009; Yakimov és mtsai., 2007) is vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy a szénhidrogéneket csak szelektíven képesek bontani (Harayama és mtsai., 2004). Dyksterhouse és munkatársai (1995) vizsgálataikban rávilágítottak, hogy az aromás szénhidrogén bontó *Cycloclasticus*-ok naftalint, fenantrént, antracént és toluolt használnak szén- és energiaforrásként, míg az *Oleispira* és *Oleiphilus* törzsek túlnyomó részt az alifás szénhidrogéneket hasznosítják (Harayama és mtsai., 2004). Az *Alcanivorax borkumensis* elsősorban alkánokat, izopréneket (például a fitán), alkilaminokat és alkil-cikloalkánokat használ szén- és energiaforrásként. Sabirova és munkatársai (2006) által végzett vizsgálatok szerint az *A. borkumensis* proteomjának annotálása felvetette annak a lehetőségét, hogy az alkán degradáció megvalósulhat a terminális oxidáció több útvonalán keresztül, melyben szerepet játszanak alkán-

hidroxilázok (AlkB), flavin kötő monooxygenázok és citokróm P450 oxigenázok, így a mikroorganizmust potenciális ökológiai előnyhöz juttatja a többi szénhidrogén lebontó organizmushoz képest. Ezt támasztja alá Head és munkatársai 2006-os tanulmánya is, mely szerint az *Alcanivorax* baktériumok szelektív előnnyel bírnak a többi szénhidrogén bontó organizmushoz képest, mivel olajszennyezések esetén a számuk napokon belül jelentősen megnő, ugyanakkor a populáció mérete a szénhidrogének eltávolításával arányosan csökken is (Head és mtsai., 2006). Mindezen okok miatt és globális elterjedésének köszönhetően máig a legjelentősebb szénhidrogén bontó nemzetségeként jegyzi a szakirodalom.

2.6. ZSÍROS HULLADÉKOK MIKROBIÁLIS KEZELÉSE

Napjainkban széleskörű vizsgálatok folynak a zsíros hulladékok mikrobiológiai lebontása kapcsán. A zsíros hulladékok lebontására potenciálisan alkalmas jelöltként írják le az *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Microthrix*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Yarrowia* nemzetségek egyes fajait (Markossian és mtsai., 2000; Suzuki és mtsai., 2001; Sugimori és mtsai., 2002; Hasanuzzaman és mtsai., 2004; El-Bestawy és mtsai., 2005; Dominguez és mtsai., 2010; Prasad és Manjunath, 2011). A mikroorganizmusok lipáz enzimeik (EC 3.1.1.3) révén katalizálják a FOG hulladékok hidrolízisét vagy biokonverzióját (Pandey és mtsai., 1999, Sharma és mtsai., 2001; Jaeger és Egger, 2002). A trigliceridek a lipáz enzimek hatására vízmolekulák segítségével először digliceridekké-, monogliceridekké majd gliceridekké és zsírsavakká hidrolizálnak. A gliceridek lebontását egy több lépcsős oxidációs folyamat követi, majd a glikolízisen át piroszőlősavon keresztül belép a Szent-Györgyi-Krebs ciklusba. A zsírsavak lebontása β -oxidációval történik, mely során a szénlánc lerövidül és acetyl-koenzim-A-n keresztül a Szent-Györgyi Krebs ciklusba jut (3. ábra) (Jaeger és Egger, 2002; Ruggieri és mtsai., 2008).



3. ábra: Trigliceridek lebontási útvonala (Jáger és mstai., 2013 alapján)

Az elmúlt évtizedben a kutatók számos törzset izoláltak különböző környezeti mintákból, melyeket már hatékonyan alkalmaztak laboratóriumi körülményeken túl FOG hulladékokkal terhelt szennyvizek kezelésében is (Wakelin és Forster, 1997; Becker és mtsai., 1999; Čipinyté és mtsai., 2009; Matsuoka és mtsai., 2009; Prasad és Manjunath, 2011; Kumar és mtsai., 2012; Facchin és mtsai., 2013). Ugyanakkor a kutatók jelentősebb eredménnyel járó biodegradációt csak konzorciumok alkalmazása esetén értek el (Wakelin és Forster, 1997; Keenan és Sabelnikov, 2000; Mongkolthanaruk és Dharmstithi, 2002). Tano-Debrah és munkatársai (1999) 15 különböző bakétriomot tartalmazó kultúra olajbontó képességének vizsgálata során megállapították, hogy a kevert kultúra a kezdeti 20 g olaj 73%-át elbontotta 7 nap alatt. Wakelin és Forster (1997) gyorséttermi FOG hulladékok lebontását tesztelték tiszta és kevert kultúrákban. A vizsgálatok során megállapították, hogy konzorciumok használatával eredményes biodegradáció érhető el, de a tiszta kultúráként alkalmazott *Acinetobacter* sp. törzs is elbontotta a kezdeti 8 g/L zsír 60-65%-át. Keenan és Sabelnikov (2000) *Acinetobacter* sp., *Rhodococcus* sp. és *Caseobacter* sp.

törzseket tartalmazó kultúrával ért el hatékony lipid biodegradációt. Monkolthanaruk és Dharmsthiti (2002) *Pseudomonas aeruginosa* LP602, *Acinetobacter calcoaceticus* LP009 és a *Bacillus* sp. B304 törzseket tartalmazó sejt-kultúrát használt sikeresen zsírban gazdag szennyvíz biokémiai oxigén igényének csökkentése érdekében. A vizsgálatok során jobb eredményt kaptak abban az esetben, ha a *Bacillus* és *Pseudomonas* törzseket együttesen alkalmazták, mint tiszta kultúráként. Az *A. calcoaceticus* LP009 hozzáadása szintén növelte a zsírok eltávolítási hatékonyságát. Ipari szennyvíz zsíros, olajos szennyezéseinek lebontását vizsgálták El-Bestawy és munkatársai (2005) Gram-negatív baktériumok (*Pseudomonas* sp. L1, *P. diminuta* L2, *P. pseudoalkaligenes* L3 és *Escherichia* sp. L4) felhasználásával. A törzsek képesek voltak a pálmaolaj teljes lebontására és a szabad zsírsavak szénforrásként való hasznosítására, de magasabb degradációs aktivitást detektáltak az L1 és L2 törzsek együttes alkalmazásakor. Tejipari szennyvízből izolált *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. és *Acinetobacter* sp. törzsek zsír-bontó képességét vizsgálva Loperena és munkatársai (2009) a kevert kultúrával 93%-os fehérje- és 75%-os zsír biodegradációt értek el laboratóriumi körülmények között. Prasad és Manjunath (2011) *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *Serratia marsescens* baktériumok egyedi és kevert kultúráinak biodegradációs hatékonyságát értékelte. A legjobb zsír-bontó törzsnek a *P. aeruginosa* törzs bizonyult, de a bakteriális konzorcium ennél az egyedi kultúrájánál is hatékonyabbnak bizonyult, a szennyvíz zsírtartalma 25000 mg/L-ről 80 mg/L-re csökkent 12 nap alatt.

A gombák között is találhatunk hatékony zsír-bontó organizmusokat. Bednarski és munkatársai (1994) munkájukban *Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum* és *Mucor miehei* marha- és baromfiszír (30 g/L) lebontását vizsgálták. A gombák a marhafaggyú 18%-át, a baromfiszír 36%-át bontották el 5 nap alatt. Davin és Quilty (2001) 75%-os marhafaggyú, *Yarrowia lipolytica* törzs általi lebontásáról számolt be. Túlnyomó részt saláta olajat és zsírt tartalmazó élelmiszeripari szennyvíz biológiai kezelését vizsgálta Wu és Wan (2009). A *Y. lipolytica* W29 az olaj kezdeti 2 g/L-es koncentráció 93%-át, míg a zsír 85%-át eltávolította optimális körülmények között 50 óra alatt.

A vizsgálataim tárgyát képező sertés- és baromfiszőr lebontásáról csak igen kevés tanulmány áll rendelkezésünkre (Walkelin és Forster 1997; Brooksbank és mtsai., 2007), mely alátámasztja kutatásom jelentőségét.

2.7. OLDÓSZER TOLERÁNS BAKTÉRIUMOK

Az oldószer toleráns baktériumok viszonylag új csoportja az extremofil mikroorganizmusoknak. Ismert tény ugyanis, hogy már igen alacsony oldószer koncentráció is mérgező a legtöbb mikroorganizmus számára, mivel az oldószerek felhalmozódnak a membrán lipid kettős rétegben megváltoztatva a sejtek struktúrális és funkcionális integritását (de Bont, 1998; Sardessai és Bhosle, 2004). Bár vannak olyan mikroorganizmusok, melyek képesek a toxikus szerves oldószerek asszimilálására, de csak abban az esetben, ha az adott vegyület nagyon alacsony koncentrációban van jelen. Az oldószer toleráns baktériumok különböző adaptációs folyamataik révén (kisebb permeabilitás, rigidebb membrán, csökkent hidrofób sejt felszín jelleg) képesek tolerálni a nagy toxikus anyag koncentrációt (Sardessai és Bhosle, 2004). A legtöbb eddig leírt szerves oldószer toleráns baktérium a *Pseudomonas* nemzetségbe tartozik, többek között az 1989-ben elsőként Inoune és Horikoshi által leírt *Pseudomonas putida* IH-2000 törzs is, mely bár képes volt 50% toluol koncentráció jelenlétében szaporodni, de azt szén- és energiaforrásként hasznosítani nem (Inoue és Horikoshi, 1989). A 90-es évek elején Cruden-, Weber-, Ramos- és munkatársai további olyan *P. putida* törzseket írtak le, melyek kétfázisú (oldószer-víz) rendszerekben tolerálták a xilolt, toluolt és sztírolt, de a benzolt nem (Cruden és mtsai., 1992; Weber és mtsai., 1993; Ramos és mtsai., 1995). Ezzel szemben Moriya és munkatársai (1993) benzol toleráns *Flavobacterium*-ról számoltak be, a törzs 5% benzol jelenlétében képes volt növekedni, de lebontani azt nem. Ogino kutatócsoportja olyan *P. aeruginosa* törzseket mutatott be, melyek oldószer toleráns lipolitikus- és proteolitikus enzimek termelésére is képesek voltak (Ogino és mtsai., 1994;1995). Benzol toleráns *Rhodococcus* fajhoz tartozó törzset izolált Paje és munkatársai (1997) szennyezett talajból. A törzs a kezdeti 200 ppm benzol jelenlétében jól növekedett, sőt 95%-os lebontást is eredményezett. Na és munkatársai (2005) 22 db benzol toleráns *Rhodococcus opacus* törzset izoláltak, melyek közül egy törzs, a *R. opacus* B4 törzs a benzolon túl képes volt

további olyan aromás és alifás szénhidrogének 10%-os koncentrációjának jelenlétében növekedni, mint a toluol, etil-benzol, xilol, hexán, dekán, oktán, ciklohexán. Oldószer toleráns *Bacillus* törzseket is leírtak a kutatók az elmúlt évtizedekben. A *Bacillus* sp. BC1 törzs kloroform- (Sardessai és Bhosle, 2003), a *Bacillus* sp. SB1 butanol- (Sardessai és Bhosle, 2002), míg a *Bacillus cereus* R1 hexán és toluol (Matsumoto és mtsai., 2002) toleránsnak bizonyult.

A kutatók sok éven át azt gondolták, hogy olyan környezetben ahol nagy mennyiségben van jelen szerves oldószer, ott mikroorganizmusok nem élnek meg a szélsőséges környezet miatt. A legújabb kutatási eredmények azonban e hipotézist cáfolják.

A BP brit olajipari vállalat Deepwater Horizon olajkitermelő platformjának 2010-es katasztrófájakor több százmillió liter olaj ömlött a Mexikói-öböl vizébe (Hayworth és mtsai., 2011). A Federal Interagency Solutions csoport 2010-es adatai szerint a kiömlő olaj mennyisége 779 millió liter volt, melynek egy része 1000-1300 m mélységbe is lejutott a tengerbe. A magas szénhidrogén tartalom drámai hatással volt az őshonos mikrobiális közösség összetételére (Hazen és mtsai., 2010; Redmond és Valentine, 2012). A kutatók legnagyobb számban *Oceanospirillum* sp., *Cycloclasticus* sp., *Colwellia* sp., *Rhodobacterales* sp., *Pseudoalteromonas* sp. törzseket azonosítottak a szennyeződés környezetében (Mason és mtsai., 2012; Reddy és mtsai., 2012; Redmond és Valentine, 2012), melyek feltételezhetően nem csak tolerálták a nagy koncentrációban jelenlévő toxikus szénhidrogéneket (Camilli és mtsai., 2010; Hazen és mtsai., 2010), de részt is vettek azok lebontásában – de csak nagyon lassan.

Meckenstock és munkatársai 2014-es munkájukban bemutatták a világ egyetlen természetes aszfalt lelőhelyéből, a dél-nyugat Trinidadban található Pitch Lake-ből (Szurok tó) vett minta mikrobiális összetételét. Feltételezték, hogy magában az olajtestben és az abban található vízcseppekben mikrobiális élet lehetséges. A vizsgálati eredmények igazolták feltételezéseiket, jelentős számú mikrobát detektáltak a vízcseppekben és az azt körülvevő olajban is. A mikrobiológiai diverzitást megvizsgálva megállapították továbbá, hogy azok változatos összetételt mutatnak. A vízcseppekben, legnagyobb számban a *Burkholderiales*- és *Enterobacteriales* rend tagjait mutatták ki, de nagy számban detektáltak

a *Bacteriodales*-, *Rhodospirillales*- és *Sphingomonadales* rendekbe tartozó baktériumokat is. Lényegesen kisebb számban a *Thermotogales*- és *Nitrosomonadales* rendbe tartozó mikroorganizmusokat is azonosítottak. Az olajminták mikrobiális összetétele a vízcseppekben azonosítottakkal nagyfokú hasonlóságot mutatott (Meckenstock és mtsai., 2014).

Gázolajból és fáradtolajból izolált törzseket mind ez idáig nem írtak le.

2.8. A *RHODOCOCCUS* NEMZETSÉG ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE

A *Rhodococcus* nemzetség az *Actinobacteria* osztály, *Actinomycetales* rend, *Nocardiaceae* családjába tartozik és több mint 40 baktérium fajt foglal magába. A *Rhodococcusok* aerob, Gram-pozitív, nem mozgékony baktériumok, morfológiájukat tekintve pálca formájúak, melyekre a szakirodalomban a nocardioform kifejezés utal (Bell és mtsai., 1998; Su és mtsai, 2016). Széles körben elterjedtek, a legkülönbözőbb helyekről izoláltak már törzseket, pl: talajból, talajvízből, tengeri üledékből, állati trágyából, növényekből, de még egészséges és beteg állatokból is. Ezek a baktériumok rendkívül ellenállóak, könnyen adaptálódnak a kedvezőtlen körülményekhez, így nem meglepő, hogy izoláltak már törzseket szennyezett területekről is (Warhurst és Fewson, 1994; Bell és mtsai., 1998). A *Mycobacterium* nemzetséghez hasonlóan sejtfaluk mikolsavakat tartalmaz, melyek hosszú szénláncainak hidrofóbicitása segíti a hidrofób vegyületekhez való hozzáférésben (Daffe és mtsai., 1993; Barry és mtsai., 1998). Felületaktív anyagok (trehalolipidek) termelésére is képesek, melyek túlnyomó részt sejtfal-kötöttek, de egyes fajai képesek a sejtfal-független forma termelésére is. Ezen felületaktív anyagok szintén segítik a sejteket a vízdoldhatatlan vegyület hozzáférésében. Fajai gazdag enzimmérettel rendelkeznek, melynek köszönhetően képesek például oxidációs folyamatok katalizálására is. A *Rhodococcus erythropolis* DCL 14 törzsben azonosítottak olyan monoxigenáz enzimeket, melynek segítségével a törzs képes volt a motorolaj szénhidrogénjeinek a lebontására (de Carvalho és da Fonseca, 2005a). Egyes fajai egyedi dehidrogenáz enzimeket termelnek. A *R. erythropolis* SQ1 törzs három olyan dehidrogenáz enzimmel is rendelkezik, melyek a tiokarbamát típusú eptám lebontásában játszanak szerepet (van der Geize és

mtsai., 2008). Kulikova és Bezborodov (1999) az epoxidáció folyamatát is azonosították *R. erythropolis* 3/89 törzsben, melynek enzimeit az etilén epoxidációját végzik. *R. erythropolis* 1CP törzs a dehalogenizáció folyamatára is képes. A törzs dehalogenáz enzimeit segítségével fluormentesíti a fluorofenolt (Bondar és mtsai., 1998). A deszulfuriláció folyamatát azonosították a *Rhodococcus* sp. IGTS8 törzsben, mely kénigényét heterociklusos vegyületekből képes biztosítani (Gray és mtsai., 1996).

A fentiekben említett tulajdonságoknak köszönhetően a *Rhodococcus* nemzetség biotechnológiai-, bioremediációs jelentősége egyre nagyobb teret nyer napjainkban. Egyes fajok képesek az olyan toxikus vegyületeket szén- és energiaforrásként hasznosítani, mint az alifás- és aromás szénhidrogének, halogénezett vegyületek, klórozott policiklikus aromás szénhidrogének, poliklórozott bifenilek, nitroaromások, nitrilek (Di Gennaro és mtsai., 2001; Nga és mtsai., 2004; Takeda és mtsai., 2004; de Carvalho és da Fonseca, 2005b; Lee és mtsai., 2009).

Meglepő, hogy a legfrissebb tanulmányokat áttekintve, a nemzetségnek szinte csak a szénhidrogén bontó képességét tanulmányozták (Kim és mtsai., 2002; Karpenko és mtsai., 2006; Huang és mtsai., 2008; Auffret és mtsai., 2009; Kuyukina és Ivshina, 2010; Liu és Liu, 2011; Song és mtsai., 2011, Laczi et al., 2015). A *Rhodococcus*-ok lipidbontó képességét mind ez idáig nem aknázták ki. Dolgozatomban elkészültéig csupán két publikáció született (Wakelin és Forster, 1997; Nagarajan és mtsai., 2014), melyek a nemzetség két eltérő fajának élelmiszeripari hulladékbontó képességét vizsgálták.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A környezetünkben megjelenő hidrofób tulajdonságú szennyező anyagok a mai napig komoly természetvédelmi és egészségügyi problémát jelentenek. Hazánkat e tekintetben, legnagyobb mennyiségben a kőolaj eredetű gázolaj és az élelmiszeripari zsíros hulladékok (elsősorban sertés- és baromfiszőr) érintik.

Munkám során elsődleges célom, hogy e szennyező anyagok eltávolítására környezetbarát megoldást kínáljak. Vizsgálataim alapját a mikroorganizmusokat felhasználó bioremediációs eljárások képezik. Modellorganizmusom a *Rhodococcus* nemzetségbe tartozó *Rhodococcus erythropolis* MK1 törzs.

Dolgozatom négy nagyobb egységre bontható. Ezen egységeken belül az alábbi specifikus céljaim a következők:

I. Gázolaj mikrobiális bontása

A gázolaj lebontásának vizsgálata során elsőként a *R. erythropolis* MK1 törzs aktív anyagcseréjét kívánom igazolni, majd a léptéknövelés elvét alkalmazva mikrokozmosz kísérletek segítségével fogom vizsgálni a törzs gázolajbontó képességét vizes- és talajos fázisban egyaránt. A terepi viszonyok szempontjából komoly jelentősége van az alkalmazott mikroorganizmusok adott térben való tartásának illetve a hidrofób komponensekhez való hozzáférhetőség biztosításának. Ennek érdekében célom tanulmányozni, hogy a szénhidrogén bontás hatékonysága vizes fázisban növelhető-e ciklodextrin hozzáadásával valamint azt, hogy a sejtek hordozóba zárása befolyásolja-e a biodegradáció hatékonyságát. Kutatásom egyik alapvető célja egy gázolajjal szennyezett talaj kármentesítésére alkalmas bioremediációs eljárás kidolgozása. A kármentesítésben használni kívánt bioremediációs technológiákat (bioaugmentáció, biostimuláció) laboratóriumi körülmények között tervezem modellezni. Ezen eredményekre támaszkodva célom egy gázolajjal régóta elszennyezett talaj gyors és hatékony kármentesítése. Kutatásaimat bővíteni szeretném egy friss szennyezést és annak kármentesítését modellező kísérlettel is. Ennek oka, hogy mindennapjainkban az üzemanyagok transzportja, helytelen tárolása során a mai napig előfordul nagyobb mennyiségű nyersolaj, gázolaj környezetbe jutása, melyre gyors

remediációs beavatkozást célszerű alkalmazni a környezet jelentősebb károsodásának elkerülése miatt.

II. Csirke- és sertézsír mikrobiális bontása

A munka során következő célom, hogy bebizonyítsam az MK1 törzs – a dízel olaj típusú szennyeződésekén kívül képes lehet olyan zsíros hulladékok hasznosítására is, mint a csirke- és sertézsír. Elsőként vizsgálni fogom a bontásban résztvevő lipáz enzimek jelenlétét, majd célom tanulmányozni, hogy a törzs képes-e aktív anyagcserét folytatni az egyedüli szén- és energiaforrásként alkalmazott zsíros hulladékok jelenlétében. Célom megvizsgálni továbbá a biokonverzió kinetikáját illetve azt, hogy a zsírsavösszetétel hogyan befolyásolja a biodegradációt. Az MK1 törzs zsírbontó képességét egy alternatív törzsszel kívánom összehasonlítani. Vizsgálataimat kiterjesztem a bontási körülmények optimalizálására is az elérhető legjobb biodegradáció érdekében.

III. A hidrofób szennyező anyagok bontásában részt vevő gének vizsgálata, a *R. erythropolis* MK1 törzs genomszekvenálása

A hidrofób szennyező anyagok sikeres lebontását követően további célom, hogy megismerjem a vizsgált törzs genomját, melynek segítségével átfogó képet kaphatok a szennyező anyagok átalakításában részt vevő enzimeket kódoló génekről.

IV. Élet az olajban: új extremofil baktérium törzsek izolálása, jellemzése

Hidrofób környezetet kedvelő mikroorganizmusoknak jelentős szerepe lehet biokonverziós eljárásokban, ezért célom gázolajból és fáradt olajból mikroorganizmusok izolálása, majd az új izolátumok fiziológiai- és fenotípusos tulajdonságainak meghatározása. Fő célom megvizsgálni, hogy az izolált mikroorganizmusok milyen mértékben képesek a gázolajat tolerálni, képesek-e aktív anyagcserét folytatni akár „tömény” (vizet nem tartalmazó) gázolajban is.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. A KÍSÉRLETEK SORÁN FELHASZNÁLT ANYAGOK

Luria-Bertani tápoldat (későbbiekben LB): 10 g/L tripton, 5 g/L élesztőkivonat, 10 g/L NaCl.

LB táplemez: Luria-Bertrani Broth tápoldat 15 g/L Bacto agarral kiegészítve.

Minimál sós tápoldat (későbbiekben MST): 0,68 g/L KH_2PO_4 , 0,87 g/L K_2HPO_4 , 0,58 g/L NaCl, 0,125 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,044 g/L $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,0012 g/L NH_4NO_3 , 0,014 g/L FeSO_4 és 2 ml/L SL 6 mikroelem törzsoldat, melynek összetevői 0,1 g/L $\text{Zn SO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,03 g/L $\text{MnCl}_2 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,3 g/L H_3BO_4 ; 0,2 g/L $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g/L $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0,02 g/L $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 0,03 g/L $\text{NaMoO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$. A tápoldat kémhatását semleges értékre állítottam (pH=7,0).

MST táplemez: Minimál sós tápoldat 15 g/L Bacto agarral kiegészítve.

Fiziológiás sóoldat: 9 g/L NaCl

Sertés- és csirkezsír: Bolti forgalmazású termékek (Magyarország).

Gázolaj: MOL Nyrt, (Magyarország). A minták egyedi analitikáját nem adták meg, saját mérésem alapján főként C_8 - C_{22} szénatomszámú szénhidrogéneket tartalmaz.

Fáradt olaj: Az Új Élet Mezőgazdasági Szövetkezet (Székkutas, Magyarország) gépjavitó telephelyéről származik. A fáradt olaj pontos összetételét nem adták meg, főként a gépjárművek kopáscsökkentéséhez használt kenőolajokat és kenőzsírokat tartalmaz.

Véletlenszerűen metilezett ciklodextrin (későbbiekben RMCD): Munkám során véletlenszerűen metilezett β -ciklodextrint használtam hozzáférést javító adalékanyagként, melyet Dr. Fenyvesi Éva biztosította a számomra, melyet ezúton is köszönök (Cyclolab Ciklodextrin Kutató, Fejlesztő Laboratórium Kft. Budapest).

Immobilizáló mátrix: Nátrium-alginát (Molar Chemicals Kft, Magyarország)

A kísérletekben felhasznált mikroorganizmus törzsek

Rhodococcus erythropolis MK1 törzs (későbbiekben MK1 törzs): A törzs a Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai Tanszék törzsgyűjteményéből származik. A törzset a tanszék munkatársai izolálták szennyezett talajból.

Rhodococcus erythropolis PR4 törzs (későbbiekben PR4 törzs): A törzs a japán National Institute of Technology and Evaluation Biological Resource Center gyűjteményéből származik (NBRC 100887). A törzset Komukai-Nakamura és munkatársai izolálták a Csendes-óceánból, a japán Okinawa sziget déli partjainál (Komukai-Nakamura és mtsai., 1996).

Szénhidrogént tartalmazó közegekből izolált *Rhodococcus*- és *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó KAF és KAG jelzéssel ellátott törzsek: Jelen tanulmány.

4.2. A TÖRZSEK NÖVESZTÉSI KÖRÜLMÉNYEI

A törzseket LB táplemezen tartottam fenn 4 °C-on a napi munkákhoz, majd a kísérletekhez a sejteket minden esetben LB tápoldatban szaporítottam fel (starter kultúra) 24 °C-on 150 rpm rázatási sebesség mellett, 1 nap alatt. A felnövesztett starter kultúrákat ezt követően 13.000 rpm sebességgel, 4 °C-on 10 percig centrifugáltam, majd kétszer fiziológiás sóoldattal (0,9% m/v) mostam. E baktérium inokulumok optikai denzitását minden esetben $OD_{600}=1,0$ értékre állítottam be a kísérlet céljától függően minimál sós tápoldattal (MST) vagy fiziológiás sóoldattal. A továbbiakban a kísérletekhez az inokulumokból 1% (v/v) koncentrációban oltottam le.

4.3. GÁZOLAJ BONTÁSI KÖRÜLMÉNYEINEK VIZSGÁLATA

A gázolaj biológiai lebontásához a MK1 törzset használtam. A gázolaj lebontását laboratóriumi mikrokozmosz kísérletekben és terepen is megvizsgáltam, a kísérleti elrendezéseket az alábbi alfejezetekben foglalom össze.

4.3.1. LABORATÓRIUMI MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEK

Az MK1 törzs gázolajbontó képességét MST tápoldatban és talajban is megvizsgáltam laboratóriumi aerob körülmények között.

Folyadékkultúrával végzett kísérletek

Az MK1 törzset 1% (v/v) koncentrációban szabadsejtes vagy immobilizált (bezárásos) formában (1 g nedves súlyú gyöngy) oltottam le 20 ml MST tápoldatba. Egyedüli szénforrásként 1% (v/v) gázolajat alkalmaztam. A kísérlet céljától függően a mintáimat 0,1 g/L koncentrációban véletlenszerűen metilezett β -ciklodextrinnel (RMCD) egészítettem ki. A mintákat 24 °C-on 1 hétig rázatva növesztettem (150 rpm) majd a sejtek respirációs aktivitását gázkromatográfval (GC) vizsgáltam, míg a gázolaj koncentrációját gázkromatográfval kapcsolt tömegspektrométerrel (GC-MS).

Immobilizált sejtek létrehozása: A sejtek immobilizálása során első lépésként 1,5%-os nátrium-alginát oldatot (100 mg/l Na₂EDTA oldatban oldva) készítettem. Az oldathoz 5:1 (oldat:sejt) arányban hozzákevertem a sejteket (10⁶ db sejt/ml). Az elegyet óvatosan homogenizáltam, majd 1 mm átmérőjű kapilláris segítségével 1,5%-os CaCl₂ oldatba csepegtetéssel gyöngyöket hoztam létre (Smidsrod és Skjak-Break, 1990). A gyöngyöket ezt követően 50 mM CaCl₂ oldatban két órán keresztül szobahőmérsékleten lassú keverés mellett inkubáltam, majd 150 mM NaCl és 5 mM CaCl₂ tartalmú oldattal kétszer alaposan átmostam, a gyöngyök felületére kitapadt sejtek eltávolításának érdekében. 20 ml MST tápoldathoz 1 g nedves súlyú gyöngyöt adtam.

Talajos közeggel végzett kísérletek

Laboratóriumi kísérletek során 160 ml-es hypo-vial üvegekbe 50 g sterilizálatlan talajt 1% (v/v) gázolajjal elszennyeztem, majd fiziológiás sóoldatban felvett 1% (v/m) baktérium szuszpenzióval egészítettem ki. A talaj nedvességtartalmát csapvízzel 20%-ra állítottam be. A kontroll minták MK1 törzset nem tartalmaztak. A tápanyaggal elősegített biodegradációt modellező minták esetén az MK1 törzset MST tápoldatban felvett szuszpenzió formájában adtam a talajhoz 1% (v/m) mennyiségben. A mintákat 24 °C-on 1 hétig inkubáltam. A talaj gázolaj tartalmát egy hét után extrakciót követően GC-MS készülékkel vizsgáltam.

4.3.2. TEREPI KÍSÉRLETEK

A terepi kísérletek során gázolajjal szennyezett talaj mikrobiológiai kármentesítését valamint friss gázolajszennyezés modellezését hajtottam végre, melyet az Új Élet Mezőgazdasági Szövetkezet (Székkutas 361/1 hrsz, Magyarország) telephelyén állítottam össze.

A terepi kármentesítési munkálatok kivitelezése

A terepen modellezett kármentesítési munkáról készített szemléltető képeket az 1. számú melléklet tartalmazza (1-8. képek). A kísérleteimhez a szövetkezet gépjavító telephelyéről származó gázolajjal szennyezett talajt (TPH=671 mg/kg) használtam (1. kép). A munkálatok során a talajból, egyenként 2 m³-es halmokat alakítottam ki (4. kép), melyeket egymástól 30 cm távolságra helyeztem el (5. kép) az előzetesen 3 mm vastagságú PVC fóliával lefedett munkaterületre (2. kép). A halmok kialakítását megelőzően a szennyezett talajt 5 g/kg szalmával kevertem be (3. kép). Két halomba a friss szennyezés modellezéséhez 2800 mg/kg gázolajat juttattam ki 30-35 cm mélységű, egymástól 20 cm távolságra elhelyezett, 5 db furaton keresztül (6. kép).

A szennyezett halmok kármentesítésére biostimulációt és bioaugmentációt használtam. Biostimuláció során a talajt 1 L MST tápoldattal locsoltam (8. kép) úgy, hogy egyidejűleg a talaj nedvességtartalmát is beállítottam (az 1 L MST tápoldatot kiegészítettem annyi csapvízzel, mely a 20% nedvességtartalom beállításához szükséges, mellyel a tápanyagok

jobb eloszlását is biztosítottam). Bioaugmentáció során a halmokat $5 \cdot 10^8$ db sejt/ml MK1 törzset tartalmazó oltóanyaggal kezeltem (7. kép). A kísérlet keretében kialakított halmok összetételét és az alkalmazott kezeléseket a 1. táblázat mutatja be.

1. táblázat: A terepi kísérlet során kialakított halmok összetétele és az alkalmazott kezelések. +: jelöli a szennyezést illetve a kezelés típusát. -: jelöli, ha a halomra nem igaz az adott paraméter

Halmok sorszám	Régi szennyezés (TPH=671 mg/kg)	Mesterséges szennyezés (TPH=3471 mg/kg)	Bioaugmentáció	Biostimuláció
1.	+	-	-	-
2.	+	-	-	+
3.	+	+	-	+
4.	+	-	+	+
5.	+	+	+	+

Környezeti mintavételezés

A földhalmokból történő mintavételezéskor az MSZ 21470-1:1998, MSZ EN ISO 5667-1:2007 magyar szabványokban foglaltak voltak az irányadók. A bolygatatlan mintavételezést 3 hetente végeztem egy munkahalom 9 különböző pontján (2. számú melléklet). A talajminták laborba szállítását követően a horizontálisan egybetartozó mintavételi pontokban gyűjtött talajmintákat homogenizáltam, majd 100 g talajminta szénhidrogén tartalmát extrakciót követően GC-MS készülékkel vizsgáltam. A szénhidrogén koncentrációk minden esetben a kromatogramok összes csúcsa alatti területéből lettek számolva. Az analitikai folyamat validálásához az elméleti és a gyakorlatban, gázolajjal frissen szennyezett talajban kísérletesen mért szénhidrogén koncentrációk lettek összehasonlítva (a kapcsolat lineáris volt a 0-10000 mg/kg tartományban ($r^2=0,999$)). Egy tipikus kromatogram és kalibrációs görbe a 3. melléklet A és B ábráin láthatóak.

4.4. ZSÍROK BONTÁSI KÖRÜLMÉNYEINEK VIZSGÁLATA

A zsírok (csirke- és sertészsír) lebontásának vizsgálatához az MK1 törzset és PR4 alternatív törzset használtam.

Az MK1 törzs lipáz enzimeinek jelenlétét Rajan és mtsai., 2011-es leírása alapján végeztem. A korábbiakban starter kultúrából előkészített inokulumokat (4.2. fejezet) 20 ml, MST tápoldatba oltottam. Egyedüli szén- és energiaforrásként 1% (m/v)-ban sertés- vagy csirkezsírt adtam a tápoldathoz. A zsírokat felhasználás előtt autoklávban 1 órán át sterilizáltam. A sejtek respirációs aktivitását 125 ml-es zárt hypo-vial üvegekben vizsgáltam fiziológias körülmények (pH=7,0) között.

A bontási körülmények optimalizálása során a tápoldat pH-ját NaHCO₃-al (10,08 g/L) stabilizáltam.

A bontás során a trigliceridekben bekövetkező változásokat valamint a keletkező közti termékeket vékonyréteg kromatográfiával vizsgáltam Čipinytė és munkatársai, 2009-es leírása alapján.

A minták összeállítását követően a sejteket minden esetben 1 hétig, 150 rpm sebesség mellett rázatva növesztettem 24 °C-on.

4.5. MK1 TÖRZS GENOMI DNS VIZSGÁLATA

A törzs genomi vizsgálatához tartozó munkákat Laczi Krisztiánnal közösen végeztük, azonban a későbbiekben más-más céllal analizáltuk a genomot.

4.5.1. GENOMI DNS IZOLÁLÁS

Az MK1 törzs genomi DNS izolálását Maniatis és munkatársai, 1982-es leírásai alapján végeztük az alábbi módosításokkal. Az előzetesen LB tápoldatban felnövesztett sejteket 1 mg/ml ampicilin jelenlétében szobahőmérsékleten 2 órán keresztül inkubáltuk. A kultúra centrifugálását (13.000 rpm, 10 perc, 4 °C) követően a sejteket 50 mg/ml lizozim oldattal kezeltük 37 °C-on. A sejtek ismételt centrifugálását követően a csapadékot genomi

I. oldatban (10 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,5% SDS) vettük fel, majd alacsony rázatási sebesség mellett 30 percig inkubáltuk. A proteáz K és Rnáz A kezelést követően a mintát fenol: kloroform (1:1) elegyével ötször kezeltük, majd a DNS-t 90% -os (v/v) jéghideg etanollal csaptuk ki, 300 mM nátrium-acetát jelenlétében. 70% (v/v)-os etanos mosást követően a tisztított DNS-t vízben feloldottuk, majd felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

4.5.2. GENOMI DNS SZEKVENÁLÁSA

A genomi DNS-t a Roche leírásai alapján nebulizátor készülékkel (Rapid Library Preparation Manual GS FLX+/XL+, May 2011) daraboltuk fel. A könyvtár készítését TruSeq DNA PCR Free Library Preparation LT Kittel (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) készítettük a leírásoknak megfelelően, a szekvenálást az Illumina MiSeq készülékkel végeztük MiSeq Reagent Kit v3 segítségével.

4.5.3. BIOINFORMATIKAI MÓDSZEREK

A FASTQ formátumban kapott szekvencia adatok összeszerelése MIRA 4 assembler (Chevreux és mtsai., 1999) segítségével történt. A szekvenálás során nyert szekvenciák minőségi analízise és térképezése CLC Genomic Workbench 7.5 program (Qiagen Aarhus A/S, Aarhus Denmark) segítségével történt. A térképezés során a program alapbeállításait használtuk és a nem térképeződött szekvenciákat külön összegyűjtöttük. Az összerakott szekvenciákat a RAST 2.0 szerveren annotáltuk (Overbeek és mtsai., 2014), a szekvencia illesztéshez a BLAST adatbázist használtuk (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.6. ÚJ BAKTÉRIUM TÖRZSEKKEL VÉGZETT KÍSÉRLETEK

4.6.1. A TÖRZSEK IZOLÁLÁSA, SZELEKTÁLÁSA, AZONOSÍTÁSA

Gázolajból és fáradt olajból 10-10 µl-t LB táplemezre szélesztettem, majd a felnőtt telepekből többszörös átoltást követően tiszta tenyészeteket hoztam létre. Az egyes

lemezeken felnőtt unikális tenyészeteket 1% (v/v) gázolajat tartalmazó MST táplemezen szelektáltam.

Az új baktérium törzsek azonosításához azok 16S rDNS szekvenciáit használtam. Az LB tápoldatban felszaporított tiszta tenyészetekből a DNS-t GenElute Bacterial Genomic DNA Kit-el (Sigma, kat. szám: NA2110-1KT) a gyártó előírásainak megfelelően tisztítottam. A DNS szakasz polimeráz láncreakcióval (PCR) történő felsokszorozásához f27 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') és r1492 (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') univerzális primereket használtam. A PCR reakció elegy összetétele az alábbi volt: 1 µl templát DNS, 5 µl f27 primer, 5 µl r1492, 5 µl dNTP, 0,5 µl DyNAzyme enzim (Finnzymes), 5 µl DyNAzyme puffer (Finnzymes). A reakciót Eppendorf RS 232 típusú készülékben végeztem az alábbi körülmények között 30 ciklussal: denaturáció 95 °C-on 1 percig, hibridizáció/annealing 52 °C-on 1 percig, elongáció 72 °C-on 1 percig majd a reakciót 1 ciklusú 5 perces 72 °C-os lépéssel fejeztem be. A PCR termékeket horizontális agaróz-gélelektroforézissel vizsgáltam 1xTAE pufferben (4 mM TRIS-acetát, 1 mM EDTA pH = 8,0) 1%-os agaróz gélben 100 mV feszültség mellett. A DNS gélből történő izolálását a Fermentas DNA Extraction Kittel (kat.szám: K0513) végeztem a gyártó előírásait követve. A minták szekvencia meghatározását a Macrogen Corporation (Amszterdam, Hollandia) végezte. A kapott szekvenciákat az NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) adatbázisában található rDNS szekvenciákkal hasonlítottam össze.

A 16S rDNS szekvenciák filogenetikai vizsgálata MEGA 6.06 szoftver segítségével történt. A szekvenciák többszörös illesztését a szoftverbe beépített ClustalW algoritmussal hajtottam végre az alapértelmezett beállításokkal. A filogenetikai fa megrajzolása a Maximum likelihood módszerrel történt. A filogenetikai tesztet Bootstrap módszerrel végeztem el 100 ismétléssel.

4.6.2. AZ AZONOSÍTOTT TÖRZSEK MORFOLÓGIAI-ÉS FENOTÍPUSOS VIZSGÁLATA

A törzsek sejteinek morfológiáját 1 napos LB tápoldatban történő tenyésztést követően Olympus BX 53 típusú mikroszkóp segítségével-, míg a kolóniákat két napos tenyésztést követően LB tápagon vizsgáltam.

A törzsek hőmérsékleti preferenciáját 1 napos tenyészeteken, LB tápoldatban tanulmányoztam 5- 42 °C inkubációs hőmérséklet között.

A nagy sókoncentráció (3,5% (m/v) NaCl) növekedésre gyakorolt hatását LB tápoldatban történő egy napos növesztést követően vizsgáltam. A szénhidrátokból történő savtermelést (metilvörös reakció), kataláz-, oxidáz tesztet, ureáz aktivitást, a nitrát-nitrit redukciót, keményítő hidrolízist, a glükóz aerob és anaerob fermentációját (OF teszt), továbbá az indol termelés vizsgálatát Cowan és munkatársai, 2004-ben megjelent publikációja alapján végeztem. A törzsek lipáz aktivitását agar lemezen Rajan és munkatársai (2011) leírása alapján tanulmányoztam két napos növesztést követően.

4.6.3. OLDÓSZER TOLERANCIA VIZSGÁLATA

A 4.2. pontban leírtaknak megfelelően előkészített inokulumot és 1% (v/v) koncentrációban 20 ml sterilre szűrt (0,22 µm) gázolajat tartalmazó 120 ml-es hypo-vial üvegekbe oltottam. A kísérlet céljától függően mintáimat az MST tápoldatnak megfelelő koncentrációban ásványi sók vizes oldatával egészítettem ki, melynek víztartalma így a teljes térfogat 11,3%-a volt. Az üvegek lezárását követően 25 °C-on, 150 rpm rázatási sebesség mellett egy hétig növesztettem. Egy hét után mértem a minták gázterének szén-dioxid koncentrációját gázkromatográf segítségével.

A legnagyobb aktivitást mutató KAG C törzs szaporodási dinamikájának vizsgálatát olajos fázisban Goldman és Green, 2008-as élősejtszám meghatározás módszerének (CFU) leírása alapján végeztem.

4.7. ANALITIKAI MÓDSZEREK

4.7.1. SZÉNHIDROGÉNEK KIMUTATÁSA

A minták szénhidrogén tartalmát folyadékminták és talajminták esetén is 1:1 arányú diklórmetánnal extraháltam 2 órán keresztül intenzív rázatás mellett. Talajminták esetén az extraktumot a talajszemcséktől szűréssel (2 µm szűrő) választottam el. A minták szénhidrogén tartalmára minden esetben a kromatogram csúcs alatti összterület nagyságából következtettem. A mérési paramétereket az alábbi táblázat foglalja össze.

2. táblázat: Szénhidrogén mérési paraméterei

Mérési paraméterek	
Készülék	Agilent 6890 gázkromatográfval kapcsolt 5975C VL MSD típusú tömegspektrométer
Vivőgáz	Hélium 6.0
Detektor	FID és MSD (1:1 arányban megosztva)
Kolonna	HP-5MS (30 m x 250 µm x 0,25 µm)
Áramlási sebesség	2 ml/perc
Kályha hőmérséklete	50 °C (2 percig), 13 °C/perc 280 °C-ig (3 percig)
Detektor/injektor hőmérséklete	FID: 350/250 °C
Vizsgált szénhidrogén tartomány	C ₅ -C ₄₀

4.7.2. ZSÍROK MENNYISÉGI ANALIZISE METILÉSZTEREK KÉPZÉSE RÉVÉN

A minták zsírtartalmát 7 ml kloroformmal extraháltam (2 órás intenzív rázatás mellett). A kloroform maradéktalan elpárologtatását követően zsírsav metilésztereket képeztem.

A zsírsav metilészterek képzése

A metilészterek képzésekor Braunegg és mtsai. 1978-as savkatalizátoros metilészterezési munkáját vettem alapul. Az eljárás során a mintákhoz 2 ml reagens oldatot (10% (v/v) H₂SO₄, 90% (v/v) CH₃OH) adtam, majd két órán át 100 °C-on forraltam. Az észterezés során a mintákat 30 percnként intenzív keverésnek vettem alá, majd a mintákat 1 ml kloroformmal és 1 ml desztillált vízzel egészítettem ki. 2 perces ismételt keverést követően a minták szerves fázisát 100x hígítottam, majd 1 µl-t injektáltam Agilent GC-MS készülékbe Agilent 7683B típusú automata adagoló segítségével. A zsírsav metilésztereket NIST08 könyvtár alapján azonosítottam, mennyiségükre a csúcs alatti területek nagyságából következtettem. A zsírsav metilészterek mérési paramétereit a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat: Zsírsav metilészterek meghatározási paramétereit

Mérési paraméterek	
Készülék	Agilent 6890 gázkromatográfjal kapcsolt 5975C VLMSD típusú tömegspektrométer
Vivőgáz	Hélium 6.0
Detektor	FID és MSD (1:1 arányban megosztva)
Kolonna	HP-5MS (30 m*250 µm*0,25 µm)
Áramlási sebesség	1,5 ml/perc
Kályha hőmérséklete	150 °C (1,8 percig) 6,5 °C/ perc 210 °C-ig, 25 °C/ perc 265 °C-ig (3 percig)
Detektor/injektor hőmérséklet	FID: 350/250 °C
Azonosított zsírsavak	palmitinsav, oleinsav, linolénsav, sztearinsav, palmitoleinsav

4.7.3. OXIGÉN- ÉS SZÉN-DIOXID KIMUTATÁSA A KULTÚRÁK LÉGTERÉBŐL

A minták gázterének oxigén- és szén-dioxid tartalmát gázkromatográffal követtem nyomon. Mennyiségi változásuk a sejtek respirációs aktivitására utal. A gáztérből 200 µl mintát Hamilton fecskendővel vettem ki és injektáltam a gázkromatográfba. A mérés paramétereit a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat: Az oxigén- és szén-dioxid mérés paramétereit

Mérési paraméterek		
	Oxigén	Szén-dioxid
Készülék	Agilent 6890 GC	Shimadzu 2010 GC
Vivógáz	Argon (5.0)	Nitrogén (5.0)
Detektor	Hővezető- képességi	
Kolonna	HP Molesieve 5A (30 m x 0,53 mm x 25 µm)	HP PlotQ (30 m x 0,5 x 40 µm)
Áramlási sebesség	16,8 ml/perc	8,44 ml/perc
Kályha/detektor / injektor hőmérséklete	60/150/150 °C	90/150/200 °C
Üzem mód	Split (0,2:1)	Split (0,5:1)

4.8. ADATOK KIÉRTÉKELÉSE

Kísérleti eredményeim három független mérésből (egy mérésen belül 3 párhuzamos mintából) származnak a terepi talajos kísérleteket kivéve. Az utóbbiak esetén párhuzamos halmok kialakítására nem volt lehetőség, azonban a heterogenitást figyelembe véve a halmokból minden egyes mintavétel során 3 x 3 mintát vettem (2. számú melléklet) és ezek átlagát vettem figyelembe az eredmények kiértékelésekor. Eredményeimet átlag érték \pm S.E.M. formában adtam meg (az átlag standard hibája).

A biodegradáció mértékét a következő képlet segítségével számítottam ki:

$$\text{Biokonverzió (\%)} = \frac{\text{Kontroll minta} - \text{Kezelt minta}}{\text{Kontroll minta}} \times 100$$

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

Kutatásaim egy részében a *R. erythropolis* MK1 törzs hidrofób szennyező anyag bontó képességét vizsgáltam. A törzset a Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai Tanszék munkatársai azonosították szennyezett talajból. Ipari érdeklődésre való tekintettel kezdtem el vizsgálni a törzs hidrofób szennyező anyag bontó képességét.

5.1. GÁZOLAJ BIODEGRADÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA

Az egyik leggyakoribb szennyezést napjainkban az olajszennyezések okozzák. A világ többi országához hasonlóan hazánk is érintett e tekintetben. Az ország számos területén találhatunk friss szennyeződések (pl. töltőállomások, kőolaj és gázolajvezetékek környékén) de sajnos még mindig vannak kármentesítésre váró régen elszennyezett területek is. Ezen okok miatt, valós probléma megoldásához kezdtem el laboratóriumi körülmények között az MK1 törzs gázolajbontó képességét vizsgálni, majd ezen eredményekre alapozva hajtottam végre egy gázolajjal szennyezett talaj *on site* kezelését.

5.1.1. LABORATÓRIUMI MIKROKOZMOSZ KÍSÉRLETEK

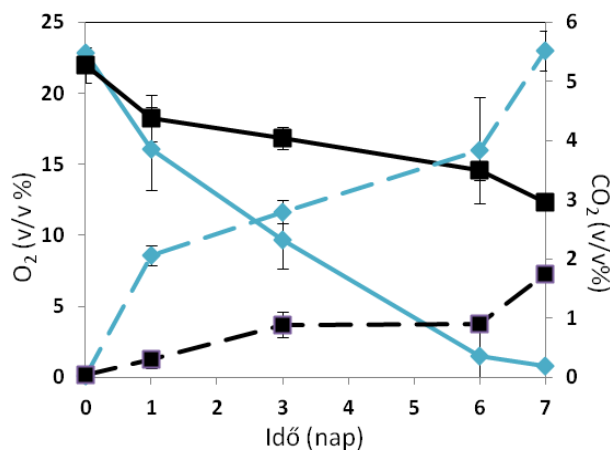
A mikrokozmosz kísérletek fő célja volt, hogy kontrollált körülmények között vizsgáljam a gázolaj lebontásának körülményeit. Segítségükkel könnyebben megérthető a lebontást befolyásoló folyamatok, optimalizálhatóak a paraméterek, megfelelő alapot biztosítva a későbbi kármentesítési eljáráshoz (Fernández és mtsai., 2005; Molnár, 2006).

5.1.1.1. GÁZOLAJ BIODEGRADÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA FOLYADÉKKULTÚRÁBAN

Kísérleteimben először vizsgáltam, hogy a sejtek képesek-e egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítani a gázolajat. Mindehhez 20 ml MST tápoldatban, 1% gázolajjal kiegészített mintákban vizsgáltam a sejtek respirációs aktivitását zárt üvegekben, megfelelő méretű gáztér (5:1 = gáztér:tápoldat) jelenlétében. Egy hét alatt az MK1 törzs a

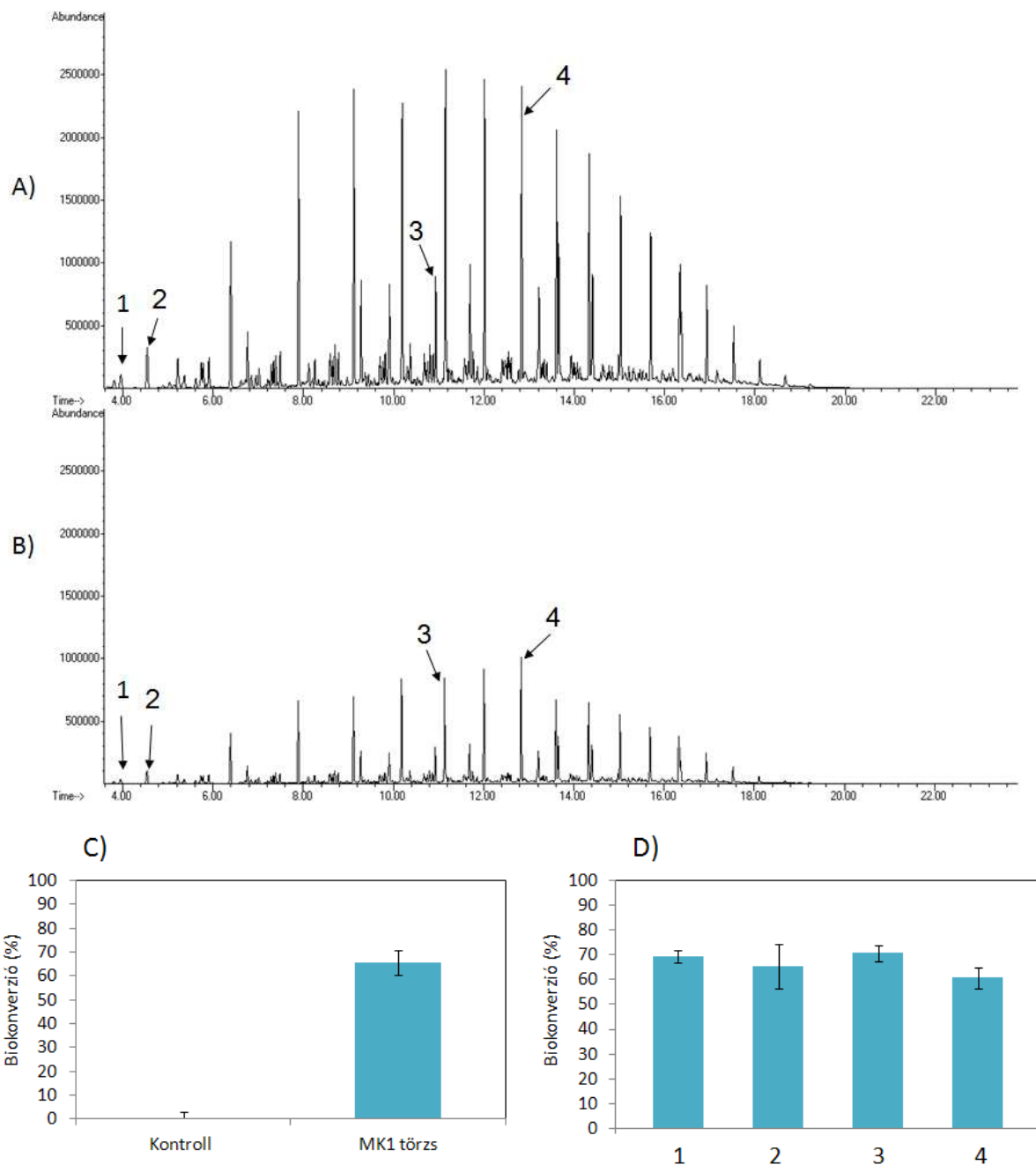
kultúra gázterében jelenlévő teljes oxigén mennyiséget felhasználta és ezzel egyidejűleg jelentős mennyiségű szén-dioxidot szabadított fel (4. ábra).

Meglepő eredménynek mondható, hogy a MK1 törzssel nem kiegészített, kontroll mintákban is jelentős oxigén felhasználás és szén-dioxid felszabadulás volt megfigyelhető. Ennek hátterében feltételezhetően mikrobiológiai aktivitás állhat. A feltételezés alátámasztására irányuló kísérleteket a későbbiekben mutatom be dolgozatomban (5.4. fejezet).



4. ábra: Az MK1 törzs (**kék vonalak**) és a kontroll minta (**fekete vonalak**) respirációs aktivitása gázolaj jelenlétében folyadék kultúrákban
Oxigén szint: Folyamatos vonalak, **Szén-dioxid szint:** Szaggatott vonalak

A gázolaj biodegradációjának mértékét egy hetes inkubációt követően GC-MS készülék segítségével vizsgáltam. Annak érdekében, hogy kizárjam a gázolaj mikrobiális fertőzöttségét, a minták összeállításakor minden esetben a gázolajat 0,22 µm szűrő segítségével sterilizáltam közvetlenül felhasználás előtt. Egy hét után az MK1 törzssel kezelt minták kromatogramjában (5. ábra A) látványos változás figyelhető meg a kontroll mintához (5. ábra B) képest. A kromatogramok össz csúcsterületét (5. ábra A) figyelembe véve megállapítható, hogy az MK1 törzs a gázolaj közel 70%-át lebontotta (5. ábra C, MK1 törzs). A gázolaj szénhidrogén komponensei közül négy, tulajdonságaikban jelentősen különböző vegyület mennyiségi fogyását is megvizsgáltam. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a p-xilolt (1), n-nonánt (2), 2,6,10-trimetil-tetradekánt (3) és n-hexadekánt (4) az MK1 törzs hasonló mértékben bontotta (5. ábra D).



5. ábra: A sejtmentes kontroll minta (A) és az MK1 törzset tartalmazó minta (B) kromatogramja. Gázolaj- (C) és egyes komponenseinek (D) biodegradációja minimál sós tápoldatban.

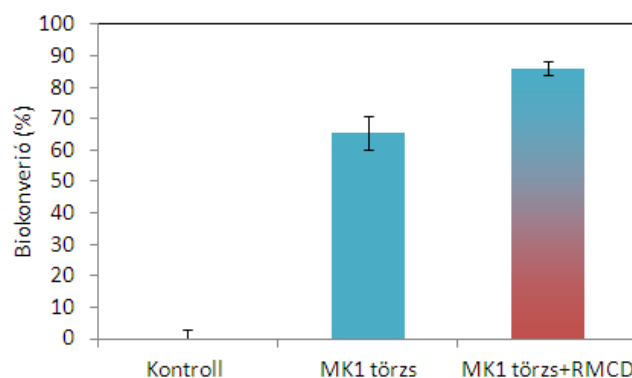
Kontroll: Sejtmentes minta; **MK1 törzs:** MK1 törzset tartalmazó minta, **1:** p-xilol (RT: 3.96 perc), **2:** n-nonán (RT:4,54 perc), **3:** 2,6,10-trimetil-tetradekán (RT: 11,69 perc), **4:** n-hexadekán (RT: 12,83 perc)

Mindezen eredmények kiemelkedő jelentőséggel bírnak az *Alcanivorax borkumensis* törzshez képest, melyet az egyik legjobb olajbontóként jegyez a szakirodalom. Az *A. borkumensis* törzs ugyanis elsősorban csak alkánok lebontására képes (Sabirova és mtsai., 2011; Neather és mtsai., 2013), szénhidrogén keverékek együttes lebontására nem.

Általánosságban elmondható, hogy a szénhidrogének biodegradációját számos tényező befolyásolja, köztük a vegyület biológiai hozzáférhetősége is (McGenity, 2014). A gázolaj hidrofóbicitása, alkotó komponenseinek vízben való oldhatatlansága miatt a mikroorganizmusok számára nehezen hozzáférhető, így jelen esetben az egy hét alatt elért, közel 70%-os biodegradáció jó eredménynek mondható.

További kísérleteim azt célozták, hogy a biodegradáció hatékonyságát tovább növeljem. Ennek elérése érdekében környezetbarát véletlenszerűen metilezett β -ciklodextrint (RMCD) adtam (0,1 g/L) a rendszerhez. A ciklodextrin olyan környezetbarát adalékanyag, mely képes a hidrofób tulajdonságú anyagok oldhatóságát- és ezzel egyidejűleg a biológiai hozzáférést növelni (Fenyvesi és mtsai., 1996, 2002).

A rendszerhez hozzáadott ciklodextrin (6. ábra, MK1 törzs+RMCD) 20%-al növelte a bontás hatékonyságát a ciklodextrint nem tartalmazó mintához képest (6. ábra, MK1 törzs). Az elért biodegradáció közel 90% volt egy hét után.



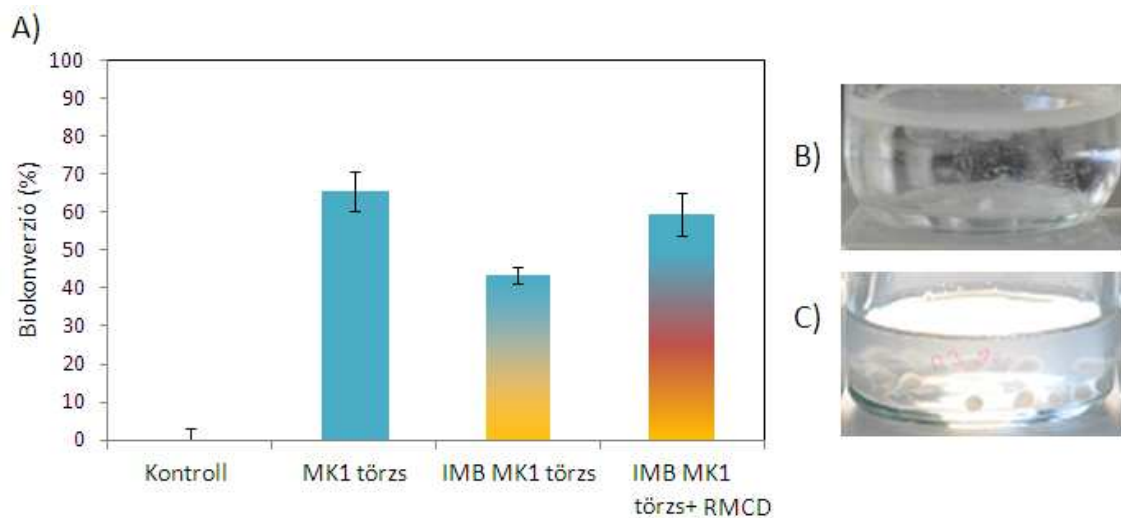
6. ábra: Gázolaj biodegradációja minimál sós tápoldatban a szénhidrogének hozzáférhetőségét elősegítő ciklodextrin nélkül, és annak jelenlétében
Kontroll: MK1 törzset nem tartalmazó minta; **MK1 törzs:** MK1 törzset tartalmazó minta;
MK1 törzs+RMCD: véletlenszerűen metilezett β -ciklodextrinnel kiegészített MK1 törzset tartalmazó minta

A fenti eredmények alapján a RMCD használata olajszennyezett vizek kármentesítésében jelentősen gyorsíthatja a folyamatot, a bioremediáció időigénye akár egyharmaddal csökkenhet.

Sok esetben bár jelen van a szennyezett közegben a szennyező anyag bontására képes mikroorganizmus, mikrobiális közösség mégis az adott környezeti körülményektől függően fennállhat annak az esélye, hogy kimosódnak a térből. Ebben az esetben a biodegradáció hatékonyságának fenntartására egy lehetőség, ha a bioaugmentációt megelőzően a sejteket hordozóba zárjuk (immobilizáljuk) (Lin és mtsai., 1991; Cassidy és mtsai., 1996; Cunningham és mtsai., 2004).

Ezen okok miatt vizsgáltam, hogy a sejtek hordozóba zárása hogyan befolyásolja a gázolaj biodegradációját (7. ábra). Az immobilizált sejtek hatékonysága (7. ábra A, IMB MK1 törzs) nagymértékben csökkent a szabadsejtek aktivitásához képest (7. ábra A, MK1 törzs). Ennek oka feltételezhetően az, hogy a sejtek nem tudnak közvetlenül hozzákapcsolódni a víz felszínén úszó gázolajhoz. A kultúrákat megfigyelve megállapítható ugyanis, hogy míg a szabad sejtek jelentős része a víz felszínén úszó gázolajhoz kapcsolódva van jelen (7. ábra B), addig immobilizált sejtek esetén ez a kapcsolódás nem jön létre (7. ábra C). Az immobilizálás jelentősen korlátozta tehát a hidrofób szubsztrát hasznosítását (7. ábra A, IMB MK1 törzs).

Az RMCD biodegradációra gyakorolt pozitív hatása ugyanakkor immobilizált sejtek alkalmazása esetén is megfigyelhető (7. ábra A, IMB MK1 törzs + RMCD).



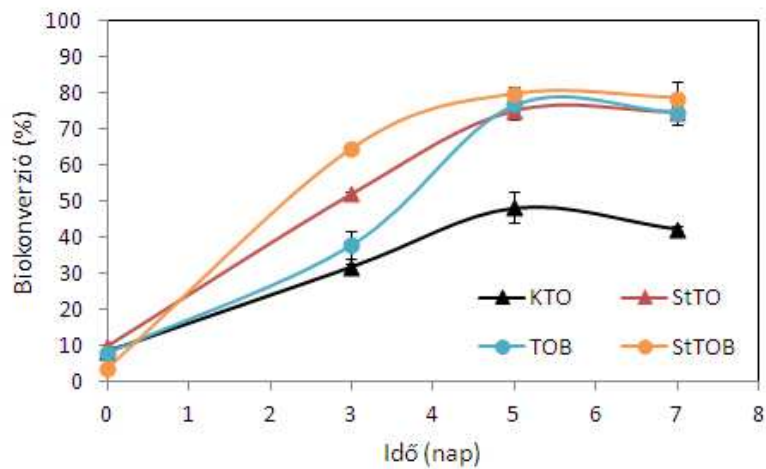
7. ábra: A sejtek immobilizációjának hatása a gázolaj biodegradációjára RMCD nélkül, és annak jelenlétében (A). Szabadsejtes kultúra (B) és immobilizált sejtes kultúra (C) gázolaj jelenlétében

Kontroll: Sejtmentes minta; **MK1 törzs:** MK1 törzset tartalmazó minta; **IMB MK1 törzs:** Immobilizált MK1 törzset tartalmazó minta; **IMB MK1 törzs + RMCD:** Immobilizált MK1 törzset tartalmazó minta kiegészítve véletlenszerűen metilezett β -ciklodextrinnel

5.1.1.2. GÁZOLAJJAL SZENNYEZETT TALAJ LABORATÓRIUMI MODELLKÍSÉRLETE

A kutatómunka következő fázisában laboratóriumi körülmények között modelleztem egy gázolajjal szennyezett talaj megtisztítását. Kettő talajremediációs módszert, a biostimulációt és a bioaugmentációt alkalmaztam (8. ábra).

Jelentős, közel 80%-os biodegradáció volt megfigyelhető mind a bioaugmentált (B), mind a biostimulált (St) minták esetén. A kezeletlen kontroll, de nem sterilizált mintában (KTO) 40%-os biodegradációt detektáltam. Az eredmény a természetes csillapítás jelenségével magyarázható, mely szerint a talajban élnek olyan mikroorganizmusok, melyek képesek a gázolaj lebontására (Rittmann, 2004).



8. ábra: Gázolaj biokonverziója talajban laboratóriumi körülmények között
KTO: kontroll (**K**) minta, csak talajt (**T**) és gázolajat (**O**) tartalmaz, **StTO:** tápanyagokkal stimulált minta, talajt és gázolajat valamint tápsókat (**ST**) tartalmaz, **TOB:** bioaugmentált minta, talajt, olajat és hozzáadott MK1 törzset (**B**) tartalmaz, **StTOB:** bioaugmentált és biostimulált minta, TOB minta tápanyagokkal kiegészítve

A helyi/őshonos mikroba közösség aktivitását ugyanakkor az tápanyagok jelenléte vagy hiánya nagyban befolyásolhatja (Alvarez és Illman, 2006). A mikroorganizmusoknak energia- és szénforráson (gázolaj) túl egyéb makro- és mikroelemekre is szükségük van életfolyamataikhoz. Hosszú ideje fennálló szennyezettség esetén a talajos közeg minősége romlik, a mikroorganizmusok a szennyezőanyag bontásához intenzíven használják a rendelkezésre álló tápanyagokat, így a talaj ásványi anyag „készlete” jelentősen csökken. Ez negatívan hat a szennyezőket bontó mikroorganizmusokra, a biodegradáció folyamata lassul, sőt leáll, ami nem jelenti azt, hogy el is pusztulnak ezek a mikrobák.

Ezen állítást a biostimulált mintákkal végzett kísérleti eredményeim alátámasztják. A tápanyagokkal kiegészített talajmintában (StTO) közel 80%-os biodegradációt ért el a bennszülött mikroflóra egy hét alatt. A bioaugmentációs kezelés, vagyis a hozzáadott MK1 törzs (TOB) nem növelte jelentősen a bontás hatékonyságát a bennszülött mikrobaközösség biostimulációjához (StTO) képest. A bioaugmentáció (TOB) biostimulációval való kombinálásának (StTOB) pozitív hatása csak a lebontás kezdeti fázisában figyelhető meg. A két módszer együttes alkalmazása gyorsabb biodegradációt eredményezett, melynek kiemelt jelentősége lehet *in situ* és *on site* kármentesítések során.

5.1.2. GÁZOLAJJAL SZENNYEZETT TALAJ *ON SITE* KEZELÉSE

A laboratóriumi mikrokozmosz kísérletek eredményeire támaszkodva egy gázolajjal szennyezett talaj *on site* remediálását hajtottam végre.

Előzmények, a terület szennyezettségének jellemzői

Az Új Élet Mezőgazdasági Szövetkezet a gépjavító telephelyén az 1980-as években földalatti tartályokban tárolta a gázolajat. A tartályok az üzemeltetés során megsérültek, melynek következtében talaj- és talajvízszennyezés következett be. Az Alsó-Tisza-vidéki Környezetvédelmi, Természetvédelmi és Vízügyi Felügyelőség 2007. évi határozata alapján a tartályokat kiemelték a földből, valamint a szennyezés lehatárolását követően a szennyezett talajt is. Az akkreditált talaj- és talajvíz vizsgálatok során megállapították (A10 Környezetvédelmi Zrt.) a kitermelés után a munkagödör oldalából vett talajminta, a munkagödörben összegyűlt talajvíz, valamint a kitermelt talaj szennyezettségét (5. táblázat) is. A vizsgálati eredmények alapján kijelentették, hogy a talaj kitermelésével a kármentesítésre a munkagödörben nincs szükség, mert határérték alatti szennyezettséget mutat. A kitermelt talaj és talajvíz szakszerű kezelése azonban indokolt volt. Az érvényben levő 10/2000. (VI.2) KvVM-EüM-FVM kormányrendeletben foglalt határértékek (5. táblázat) alapján a talaj és talajvíz komoly határérték túllépést mutatott. A szövetkezet azonban sem a talaj, sem a talajvíz kármentesítését nem végezte el.

5. táblázat: A mintavételi pontokban mért szennyezési koncentrációk és a vonatkozó határértékek

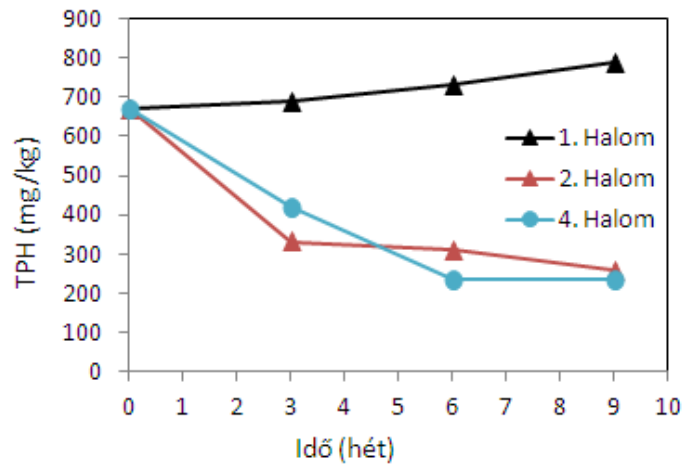
Minta típusa	TPH	Vonatkozó határértékek (TPH)
Munkagödör aljából vett talajminta	<50 mg/kg	Földtani közegre: 100 mg/kg
Kitermelt talaj	671 mg/kg	
Munkagödörben jelenlévő talajvíz	4950 µg/dm ³	Felszín alatti vízre: 100 µg/L

Munkám során a már régóta fennálló talajszennyezés megszüntetését tűztem ki célul. Minderre a kárfelmérés után 3 évvel került sor. A talajvíz kármentesítése nem volt része a feladatomnak.

A kísérleti elrendezésemet a 1. táblázat mutatja (Anyag és módszerek fejezet, 4.3.2. alfejezete). A táblázatban az 1, 2, 4-es halom jelzi a régi szennyeződést tartalmazó talajból készített halmok összetételét. A kármentesítési eljárás során bioaugmentációt és biostimulációt alkalmaztam. Biostimuláció esetén az első, kezeletlen kontroll halom kivételével minden halomba ásványi sós tápoldatot juttattam, míg bioaugmentáció esetén a 4-es halmot MK1 törzssel kezeltem. A kontroll, azaz kezeletlen halom reprezentálja a természetes szennyező anyag csökkenés folyamatát (monitorozott szennyező anyag csökkenés).

A kezeletlen kontroll halomban (9. ábra, 1. halom), melybe sem mikroorganizmust sem ásványi sós tápoldatot nem juttattam, a vizsgált 9 hét alatt nem történt a szénhidrogének koncentrációjában változás. A szénhidrogének mennyiségének egyenletes csökkenése figyelhető meg a biostimulált 2. halomban, mely csak a régi szennyeződést tartalmazta. Ennek oka, hogy a szennyezett talaj tápanyagban szegény, ezért az ásványi sók hozzáadása fokozta az adaptálódott mikroba közösség működését. Összevetve a biostimuláció és bioaugmentáció (9. ábra, 2. és 4. halom) kezelés hatását, megállapítható, hogy jelentős különbség nincs, a 9. hét végére a két halom szénhidrogén koncentrációja közel megegyező szintet mutat. Ezen eredmények alapján megállapítható, hogy a talajban régóta jelenlévő szennyezőanyagok elbontásához elegendő a helyi mikroflóra ásványi sós tápoldattal történő stimulálása. A bioaugmentáció nem növelte a bontás hatékonyságát, gyorsaságát.

A kezelésekre hatására sikerült jelentősen, harmadára csökkenteni a szennyező anyag koncentrációját 3 hónap alatt. A kezelt halmokban mért TPH koncentráció alig haladta meg a földtani közegre előírt határértéket (100 mg/kg). Az időjárási viszonyok változása miatt (száraz időjárás, majd erős lehűlés) lassult a biodegradáció, ugyanakkor további tápanyagok adagolásával és a hőmérséklet növekedésével a kármentesítés befejezhető, a szennyezőanyag koncentrációja határérték alá csökkenthető.

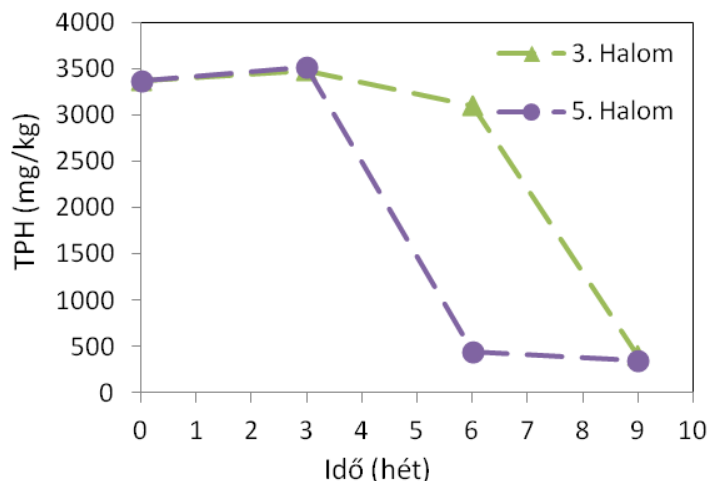


9. ábra: A TPH koncentráció alakulása a régi szennyeződést tartalmazó halmokban biostimulációt (**2. halom**) és a bioaugmentációval kombinált kezelést (**4. halom**) követően a kezeletlen kontroll halomhoz (**1. halom**) képest

A mindennapokban az üzemanyagutak környékén gyakran, akár egy adott helyen többször is előforduló szénhidrogén szennyezések indokolták egy friss szennyeződés lebontásának modellezését is. Ezen okok miatt friss gázolajszennyezett talaj bioremediációjának modellezését is elvégeztem (10. ábra). Mindehhez a régi szennyeződést tartalmazó talajból két halmot (3. és 5. halom) gázolajjal dúsítottam, a szennyezési koncentrációt több mint ötszörösére emeltem. Ez utóbbi két halom szolgált a friss szennyeződés eltávolításának modellezésére (TPH=3471 mg/kg). A halmok kialakítását követően a fentiekben említett módon bioaugmentációs és biostimulációs kezeléseket hajtottam végre. Fontos megjegyezni, hogy az előző kísérlethez képest két fontos különbség van: i) a szennyeződés kora és ii) koncentrációja.

Biostimuláció esetén (3. halom) közel 6 hetes lag fázis figyelhető meg, mely feltehetően azzal magyarázható, hogy az őshonos mikroorganizmusoknak adaptálódniuk kellett a megnövekedett szénhidrogén koncentrációhoz és az eltérő szénhidrogén tartalomhoz. Ezzel szemben a bioaugmentált, MK1 törzsszel kezelt halomban (5. halom) a szénhidrogének koncentrációjában már a 3. hét után csökkenés figyelhető meg. A 9. hét végére a két, eltérően kezelt halom szénhidrogén koncentrációja között különbség nem mutatkozott. A

halmokat nem mozgattam (a megfelelő levegőzést szalma talajhoz keverésével oldottam meg), így az illékony komponensek eltávozása minimális abiotikus veszteséget jelentett. A halmokban jelenlévő mikroorganizmusok képesek voltak 9 hét alatt egy nagyságrenddel csökkenteni a TPH tartalmat.



10. ábra: A TPH koncentráció alakulása a friss szennyezést modellező halmokban biostimulációt (**3. halom**) és a bioaugmentációval kombinált (**5. halom**) kezelést követően

Mindezen eredmények alapján megállapítható, hogy régóta fennálló relatíve alacsony koncentrációjú szennyezés esetén a helyi, szennyezőanyaghoz adaptálódott mikroba közösség ásványi sós tápoldattal történő stimulálása elegendőnek bizonyult. Bár friss szennyezés esetén is jelentős szennyezőanyag mennyiség csökkenés érhető el biostimuláció alkalmazásával, azonban a gyorsabb lebontási sebesség miatt a bioaugmentációs kezelés bizonyult hatékonyabbnak. Az eredmények továbbá rávilágítottak arra, hogy a szennyezőanyag koncentrációja is fontos szerepet játszhat a bioremediáció sebességében.

5.2. CSIRKE-ÉS SERTÉSZSÍR BIODEGRADÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA

Hazánk hústermelésének és fogyasztásának túlnyomó többségét a sertés- és baromfi (elsősorban csirke) teszi ki. A húsok feldolgozásának és fogyasztásának egyik velejárója a magas zsírtartalmú szennyvizek, melyek igen komoly gondot jelentenek az ipari- és

kommunális szennyvíztisztításban. Ezen aktuális probléma megoldásának érdekében kezdtem el vizsgálni az MK1 törzs zsírbontó képességét is.

5.2.1. LIPÁZ ENZIMEK KIMUTATÁSA

Az MK1 törzs zsírbontó képességének vizsgálatát megelőzően elsőként lipáz enzimek meglétét igazoló kísérletet végeztem el. Lipáz enzimek jelenléte és aktivitása révén a táplemezhez hozzáadott Tween 80 hidrolízise következik be, melynek eredményeként a felszabadult szabad zsírsavak hozzákötődnek a táptalajban jelenlévő kalcium ionokhoz, csapadékot képezve azzal. A baktérium kolóniák körül megjelenő kalcium sós kiválás igazolja a baktérium törzs lipáz enzim termelő képességét.



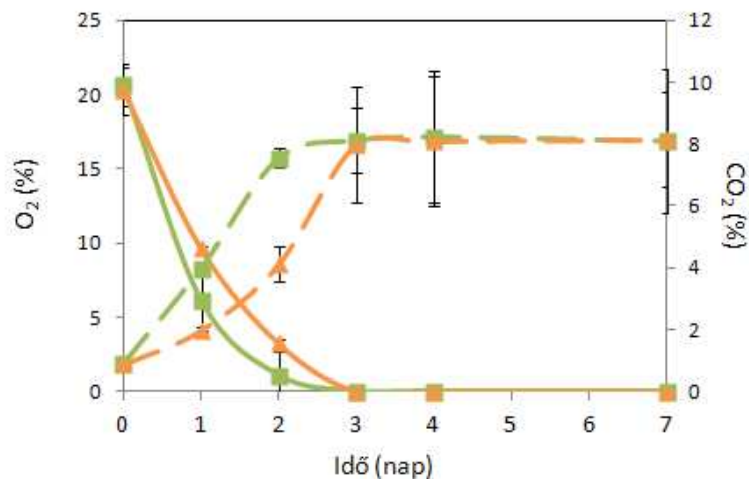
1. kép: A *Rhodococcus erythropolis* MK1 törzs lipáz aktivitásának igazolása Tween 80-at tartalmazó táplemezen

A Tween 80-at tartalmazó táplemezre vitt MK1 kultúra egyedi telepei körül kialakult jelentős átmérőjű só kiválás (1. kép) az MK1 törzs hatékony lipolitikus aktivitására utal. Ilyen mértékű hidrolizáló képesség alapján feltételezhető, hogy a törzs jó hatékonysággal alkalmazható zsíros hulladékok lebontására is.

5.2.2. A TÖRZS ANYAGCSERE AKTIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATA ZSÍROKON

A mikrobiális lipolitikus aktivitás legtöbb mikroorganizmus esetén az elhidrolizált szerves anyag hasznosításával, az anyagcsere folyamatokba való beépítésével jár együtt. Annak érdekében, hogy kiderítsem az MK1 törzs valóban képes-e szén- és energiaforrásként hasznosítani a bontani kívánt zsíros szubsztrátokat megvizsgáltam a törzs respirációs aktivitását zárt hypo-vial üvegekben. A csirke- vagy sertészsírt egyedüli szén-és energiaforrásként biztosítottam a sejtek számára. Egyéb szerves anyag hiányában a sejtek respirációja csak akkor intenzív, ha képesek hasznosítani a tápoldatban jelenlévő egyetlen (féle) szerves anyagot.

Zárt rendszerben az oxigén felhasználás és a szén-dioxid termelés már az első napon jelentős volt, melyet a 11. ábra szemléltet. Mindkét szubsztrát esetén elfogyott a minták légterében rendelkezésre álló oxigén a 3. napra, és ezzel egyidejűleg jelentős mennyiségű szén-dioxid szabadult fel. Ilyen mértékű respirációs aktivitás nem jelentkezhet pusztán a sejtek túlélési törekvéséből, csak a jelenlévő szerves anyag intenzív felhasználásából, így a kapott eredmények igazolják a törzs aktív anyagcseréjét lipid jellegű szerves anyagokon.



11. ábra: Az MK1 törzs respirációs aktivitása csirkezsír (zöld vonalak) és sertészsír (sárga vonalak) jelenlétében minimál sós tápoldatban fiziológiás körülmények között
Oxigén szint: folyamatos vonalak, **Szén-dioxid szint:** szaggatott vonalak

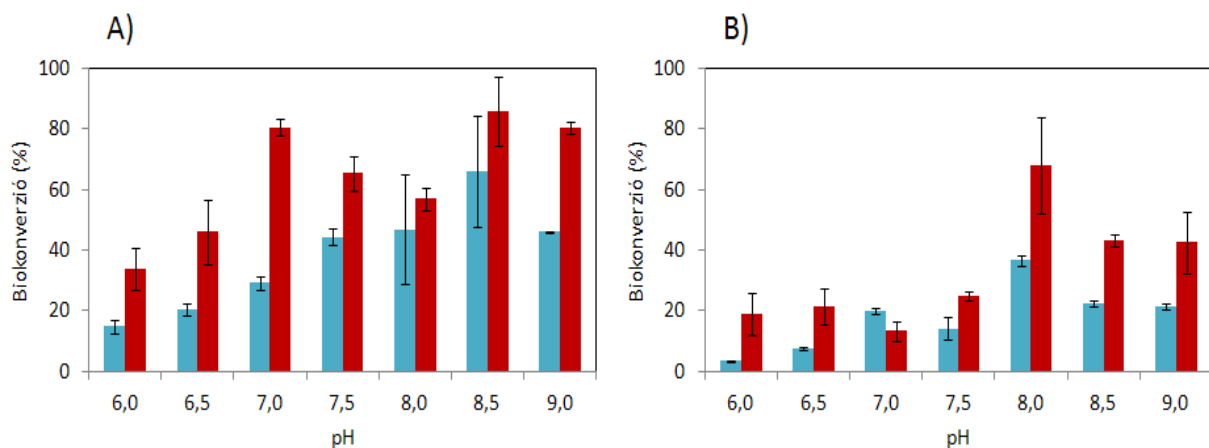
5.2.3. LEBONTÁSI KÖRÜLMÉNYEK OPTIMALIZÁLÁSA

Az MK1 törzs respirációs aktivitásának vizsgálata nem ad információt a biodegradáció tényleges mértékéről, így további kísérletekben nyomon követtem a zsírok mennyiségi változását, melyet az azokból származtatott metilésztereken keresztül mértem GC-MS készülékkel.

A fermentációs közeg fiziko-kémiai paramétereit drámai hatással lehetnek enzimek működésére, különösen a közeg kémhatása. Ennek megfelelően tanulmányoztam a tápoldatok kémhatásának a sejtek zsírbontására gyakorolt hatását (12. ábra). A vágóhídi, húsipari szennyvizek esetén a szennyvíz kémhatása pH=6,5-8,5 között változik (Massé és Masse, 2000; Bazrafsha és mtsai., 2012), ezt figyelembe véve, ennél szélesebb tartományban vizsgáltam a törzs zsírbontó aktivitását.

Alternatív törzsként a *R. erythropolis* PR4 (NBRC 100887) rokon törzset használtam, melynek genomjában bizonyítottan találhatóak lipáz gének (Sekine és mtsai., 2006).

A pH=6,0-9,0 tartományt felölelő kultúrákban mindkét törzs esetén a lúgos tartományban figyelhető meg a leghatékonyabb zsírbontás (12. ábra).



12. ábra: A csirkezsír (A) és sertészsír (B) biokonverziója különböző kémhatású minimál sós tápoldatokban

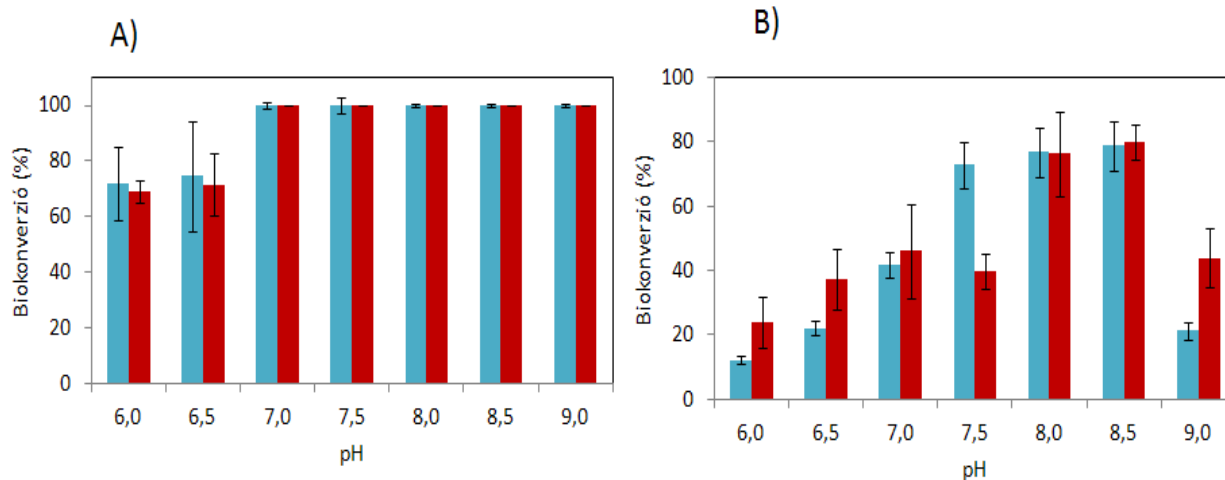
MK1 törzs: kék oszlopok, **PR4 törzs:** piros oszlopok

MK1 törzs jelenlétében az elért legmagasabb biodegradáció csirkezsír esetén (12. ábra A, kék oszlopok) 65% volt (pH=8,5), míg sertészsír esetén közel 40% (pH=8,0) (12. ábra B, kék oszlopok). A PR4 törzssel beoltott kultúrákban 80% volt (pH=8,5) a legmagasabb biodegradáció csirkezsír szubsztrát jelenlétében (12. ábra A, piros oszlopok) egy hét után, míg sertészsír esetén 70% (pH=8,0) (12. ábra B, piros oszlopok).

Egy hét után megvizsgálva a tápoldatok kémhatását elmondható, hogy azok kezdeti pH-ja (pH=6,0-9,0) minden esetben jelentősen csökkent (az adatok nincsenek feltüntetve), melynek oka feltételezhetően abban rejlik, hogy a tápoldat pufferelő kapacitása nem elegendő. A változó kémhatás okozhat anyagcsere aktivitás romlást, így a fent részletezett batch elrendezésű sejt kultúrákban kapott eredmények valószínűleg elmaradtak a maximális teljesítménytől.

Annak érdekében, hogy stabilizáljam a tápoldatok kémhatását és ezzel egyidejűleg növeljem a biodegradáció hatékonyságát, mintáimat NaHCO_3 -al egészítettem ki. A karbonát lúgos pH-n csapadékos formában van jelen, így nem zavarja az anyagcsere folyamatokat, a tápoldat savanyodása esetén folyamatosan oldódik, és kationjai semlegesítik a tápoldatban megjelenő savas karakterű anyagcseretermékeket.

A karbonát hozzáadása jelentősen növelte a bontás hatékonyságát mind a kettő zsíros szubsztrátot illetően (13. ábra). Csirkezsír esetén már fiziológiás körülmények között (és a fölött) végbement a teljes biodegradáció (13. ábra A), míg sertészsír vonatkozásában az elért legmagasabb biodegradáció 80% volt pH=8,0 és pH=8,5 kémhatású tápoldatokban egy hét alatt (13. ábra B). A karbonát hozzáadása alacsonyabb pH körülmények között is jobb lebontást eredményezett.



13. ábra: A csirkezsír (A) és sertészsír (B) biokonverziója különböző kémhatású NaHCO₃-al kiegészített minimál sós tápoldatokban
MK1 törzs: kék oszlopok, **PR4 törzs:** piros oszlopok

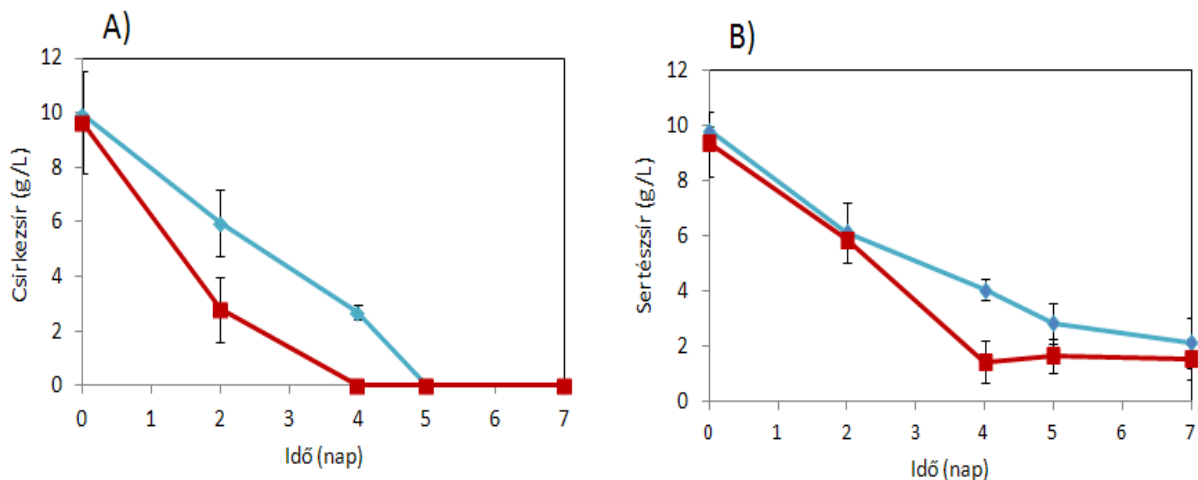
Összehasonlítva a 12. és 13. ábrán feltüntetett eredményeimet, megállapítható a bontás hatékonyságának javulása, gyakorlatilag azonos idő alatt dupla mennyiségű zsírt tudtak elbontani a törzsek a tápoldatból. A sertészsír szubsztrát esetén láthatóan elmarad a hatékonyságuk a csirkezsírhez képest, azonban karbonáttal való pufferelés mellett szélesebb pH tartományban jelentősen javult a biodegradáció.

A két törzs teljesítménye közel azonos volt csirkezsír esetén, ugyanakkor PR4 törzs által az adott körülmények között elért legmagasabb biodegradáció sertészsír jelenlétében szűkebb tartományban mozgott (8,5 < pH < 9,0), mint az MK1 törzsé (7,5 < pH < 8,5).

5.2.4. SERTÉS-ÉS CSIRKEZSÍR LEBONTÁSI KINETIKÁJA

A fenti kísérletsorozatban megállapításra került, hogy a hatékony biodegradáció elérése érdekében a tápoldat pufferelő kapacitását növelni kell. A karbonát hozzáadására jelentősen javult a biodegradáció, jelen körülmények között a csirkezsír lebontása leghatékonyabban pH=7,0-9,0 kémhatás között megy végbe, míg sertészsír esetén pH=8,0-8,5 között.

A tápoldat megfelelő kémhatásának megállapítása után vizsgáltam a bontás időbeli változását (14. ábra) csirkezsír esetén pH=7,0, sertészsír esetén pH=8,0 kémhatás mellett. Bár egy hét után gyakorlatilag azonos eredményt mutat a biodegradáció mértéke mindkét törzsnél ugyanakkor a szubsztrátok bontásának időbeli alakulása eltérő. A csirkezsír (14. ábra A) maradéktalan lebontása már 4 nap alatt végbement a PR4 törzssel kezelt mintákban, míg az MK1 törzs esetén a teljes biodegradáció csak az 5. napra következett be. A sertészsír bontási görbéjének (14. ábra B) lefutása hasonló, a PR4 törzs ezen szubsztrát esetén is gyorsabb lebontást eredményezett, mint az MK1 törzs. Feltételezhető, hogy sertészsír esetén is elérhető teljes biodegradáció, de ehhez hosszabb idő szükséges. Feltételezéseim szerint annak háttérében, hogy a sertészsír szubsztráton nevelt törzsek biodegradációja az adott időn belül a csirkezsírhoz képest lassabb, vagy nem teljes, az állhat, hogy a telített és telítetlen zsírsavak lebontása eltérő ütemű.



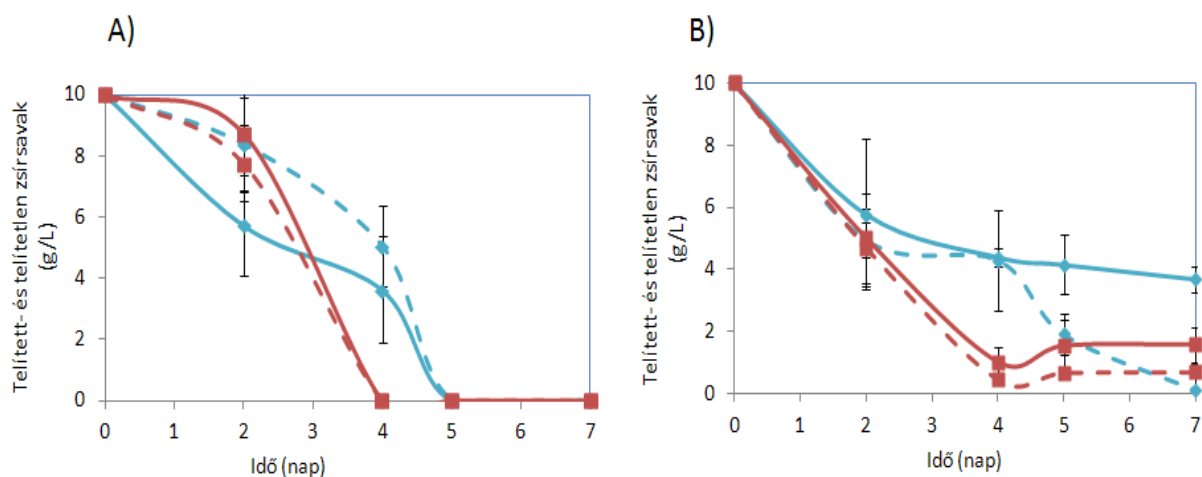
14. ábra: A csirkezsír (A) és sertészsír (B) lebontás kinetikája
MK1 törzs: kék vonalak, **PR4 törzs:** piros vonalak

Ahogy azt korábban az irodalmi áttekintésben már láthattuk, a sertészsírnak magasabb a telített zsírsav tartalma (40%), mint a csirkezsírnek (29%), míg a telítetlen zsírsav tartalmuk közel azonos (sertészsír: 60%, csirkezsír: 65%). Ez az eltérő zsírsavösszetétel

okozhat időben eltérő lebontást. Feltételezésem alátámasztásául tanulmányoztam a telített- és telítetlen zsírsavak lebontásának időbeli változását (15. ábra).

A csirkezsír telítetlen zsírsavainak lebontása eleinte jelentősen elmarad a telített zsírsav komponensek bontásától MK1 törzs esetén, míg PR4 törzsnél a telített- és telítetlen zsírsavkomponensek lebontása közel azonos ütemű (15. ábra).

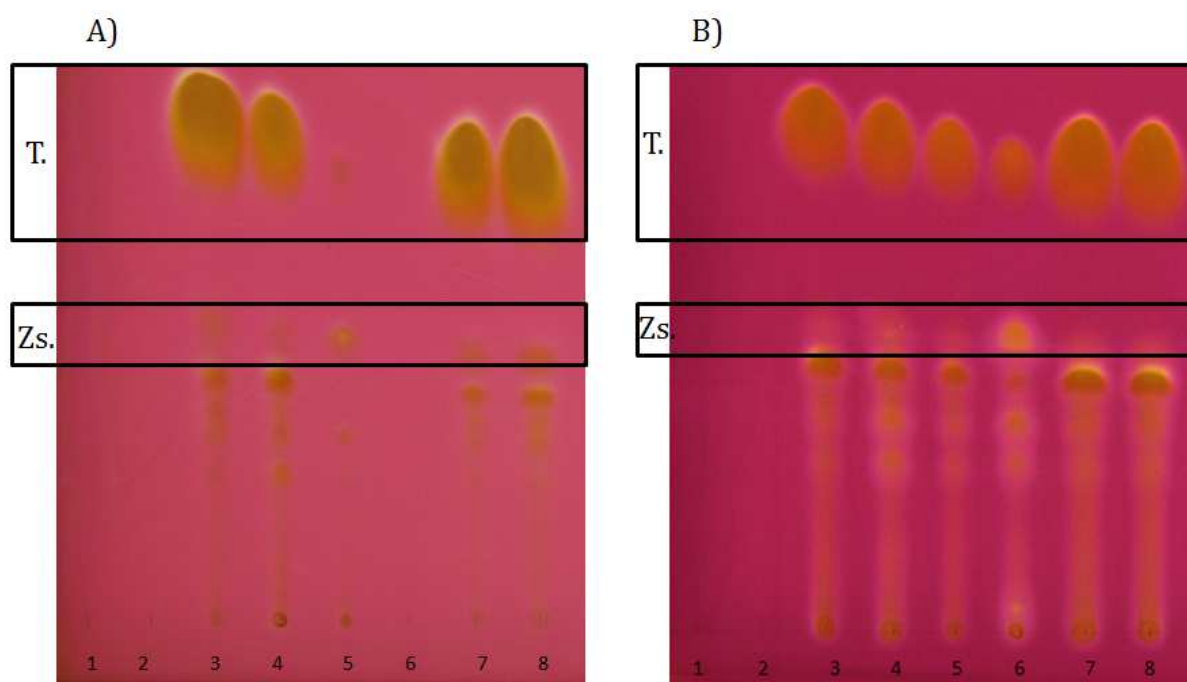
Sertészsír szubsztrát telített- és telítetlen zsírsavainak egyidejű bontása figyelhető meg (15. ábra B) az első napokban mindkét törzs esetén, ezt követően a telített zsírsavak lebontásának üteme lassul, míg a telítetlen zsírsavak lebontása közel teljesen végbemegy. Mindezen eredmények igazolják hipotézisemet, hogy a sertészsír lassabb lebontásának háttérében a magasabb telített zsírsavtartalom áll.



15. ábra: A telített zsírsavak (folyamatos vonalak) és telítetlen zsírsavak (szaggatott vonalak) lebontásának időbeli változása csirkezsír (A) és sertészsír (B) esetén
MK1 törzs: kék vonalak, PR4 törzs: piros vonalak

5.2.5. A TRIGLICERIDEK- ÉS A KÖZTI TERMÉKEK VIZSGÁLATA VÉKONYRÉTEG KROMATOGRÁFIÁVAL

Kutatásaimban vizsgáltam a trigliceridek lebontásának időbeli változását, valamint a bontás következtében megjelenő közti termékeket vékonyréteg kromatográfiával Čipinytè és mtsai., 2009-es leírásai alapján. A 16. ábra jól szemlélteti a trigliceridek mennyiségének csökkenését és a közti termékek megjelenését MK1 törzs esetén.



16. ábra: A csirkezsír (A) és sertészsír (B) lebontásának vizsgálata vékonyréteg kromatográfiával

Zsírmentes, MK1 törzset tartalmazó minta a leoltás pillanatában (1) és az inkubációs idő végén (2); 1% zsírt tartalmazó MK1 törzsszel kezelt minta a leoltás pillanatában (3), az inkubáció első napján (4), az inkubációs idő harmadik napján (5) és az inkubációs idő végén (6). A sejtmentes kontroll minta a leoltás pillanatában (7) és az inkubációs idő végén (8)

A csirkezsírt tartalmazó és MK1 törzsszel kezelt mintákban (16. ábra A, 3-6) az idő előrehaladtával a trigliceridek (T) mennyisége csökken és zsírsav intermedierek (Zs)

jelennek meg. A sertészsírt (16. ábra B) tartalmazó mintákban a trigliceridek (T) mennyisége szintén csökken (16. ábra B, 3-6), de a degradáció üteme lényegesen lassabb. A kezeletlen, sejteket nem tartalmazó kontroll mintákban (16. ábra A és B, 7-8) a zsírsavösszetételben nem látható változás.

A vékonyréteg kromatográfia eredményei összhangban vannak a dolgozatomban korábbiakban bemutatott eredményekkel.

5.3. A HIDROFÓB SZENNYEZŐ ANYAGOK BONTÁSÁBAN RÉSZT VEVŐ GÉNEK VIZSGÁLATA, A *R. ERYTHROPOLIS* MK1 TÖRZS GENOMSZEKVENÁLÁSA

A korábbi vizsgálatok során bizonyítást nyert, hogy az MK1 törzs hatékony gázolaj- és zsíros hulladékokat bontó mikroorganizmus. Annak érdekében, hogy átfogó képet kapjak a vizsgálataim tárgyát képező gázolaj- és zsíros hulladékok bontásában potenciálisan résztvevő génekről, vizsgáltam az MK1 törzs genomját.

Az MK1 törzs genomjának szekvenálását követően, a szekvenáló olvasatok összerakása a MIRA 4 szoftverrel történt, melyből 40 kontig jött létre. A genom GC tartalma 62,5%, a teljes genom konszenzus teljes mérete 6.469.205 bázispár volt. A kontigokat annotáltam a RAST szerver segítségével, mely 6252 nyitott leolvasási keretet talált. Ezek 33%-a hipotetikus fehérjéket kódol, míg a fennmaradó 67% valamilyen funkcióhoz rendelhető.

A gázolaj fő komponenseit alkotó alkánok lebontásának kulcsfontosságú lépése az oxidáció, melyet oxigenáz enzimek katalizálnak (Beilen és Funhoff, 2005). Az MK1 törzs genom szekvenálását követően 5 olyan gént találtunk, melyek alkán-1-monooxigenáz enzimeket (*alkB*) kódoltak (6. táblázat). Ezek a fehérjék hem csoportot nem tartalmazó sejtmembrán fehérjék, melyek rubredoxint és rubredoxin reduktázt használnak, mint elektron transzfer fehérjéket az oxidációs reakciókban. A rubredoxin csak két *alkB* operonban van jelen, míg a rubredoxin reduktáz csak egyben. Ennek kulcsfontosságú jelentősége van, mivel korábbi kutatásokban már bizonyítást nyert, hogy azok az *alkB* gének aktiválódnak szénhidrogének jelenlétében melyek szomszédságában megtalálhatóak az elektrontranszportért felelős fehérjéket kódoló gének (Laczi és mtsai., 2015). Az *alkB* monooxigenáz enzimek mellett 11db citokróm P450 családba tartozó fehérjét kódoló gén és számos egyéb mono- és

dioxigenáz található a genomban. Az alkánok mellett aromás vegyületet is tartalmaz a gázolaj, mely lebontásában a genomban található gének közül potenciálisan 77 db vehet részt. Ezek közül 12 gén terméke lehet érintett az aromás vegyületek lebontásának perifériális útvonalában, míg 57 gént a RAST szervert a centrális útvonalba jósolt. A fennmaradó 8 gén kapcsolatban áll az aromás vegyületek biokonverziójában, de nem sorolható egyik fent említett csoportba sem.

6. táblázat: A MK1 törzs hidrofób szennyező anyagok bontásában részt vevő géntermékei

Lókusz címke	Géntermék	Lókusz címke	Géntermék
peg.5155	Alkán-1-monooxigenáz	peg.117	Lipáz 1
peg.2272	Alkán-1-monooxigenáz	peg.3090	Lipáz 1
peg.278	Alkán-1-monooxigenáz	peg.3107	Triacilglicerol lipáz
peg.3403	Alkán-1-monooxigenáz	peg.3500	Lipáz 1
peg.5300	Alkán-1-monooxigenáz	peg.3528	Lizofoszfolipáz/monoglicerid lipáz
peg.1023	Citokróm P450 IgrA	peg.3584	Monoacilglicerol lipáz
peg.2546	Citokróm P450	peg.3960	Lipáz 1
peg.405	Feltételezett citokróm P450	peg.5969	Triacilglicerol lipáz prekursor
peg.1827	Feltételezett citokróm P450	peg.2608	Lipáz (II. típusú)
peg.1861	Feltételezett citokróm P450	peg.2956	Triacilglicerol lipáz prekursor
peg.298	Feltételezett citokróm P450		
peg.3257	Feltételezett citokróm P450		
peg.3961	Feltételezett citokróm P450		
peg.2899	Feltételezett citokróm P450		
peg.2904	Feltételezett citokróm P450		
peg.2906	Feltételezett citokróm P450		

A zsírok fő alkotói a trigliceridek, melyek lebontásában az észterázok közé sorolható lipázok vesznek részt. Az MK1 törzs genomjában 10 olyan nyitott leolvasási keret található

(6. táblázat), amelyek lipáz enzimeket kódolnak és részt vehetnek a zsírsav glicerinné észterek elhasításában. Ezeknek többsége triacil-glicerol lipáz, de két monoacil-glicerol lipáz is található köztük, amelyek az utolsó zsírsav lehasításáért felelnek. A glicerinnél leválasztott zsírsavak metabolizációjában további 87 gén terméke vehet részt.

5.4. ÚJ BAKTÉRIUM TÖRZSEK AZONOSÍTÁSA

A gázolaj biológiai bontásának vizsgálata (5.1.1.1. fejezet) során a kezeletlen, hozzáadott mikroorganizmust nem tartalmazó kontroll mintákban szén-dioxid termelődést detektáltam, melynek háttérében mikrobiológiai aktivitást feltételeztem.

Kutatómunkám fontos területe volt, hogy feltételezéseimet - miszerint a gázolajban élnek mikroorganizmusok - bebizonyítsam. Ennek igazolása érdekében sterilizálatlan gázolajat LB táplemezre szélesztettem és 25 °C-on egy hétig növesztettem. Feltételeztem, hogy a gázolajon túl más, akár nehézfémeket, szerves szennyező anyagokat tartalmazó olajokban is képesek mikroorganizmusok élni, így a fent említett kísérleteket fáradt olajjal is elvégeztem.

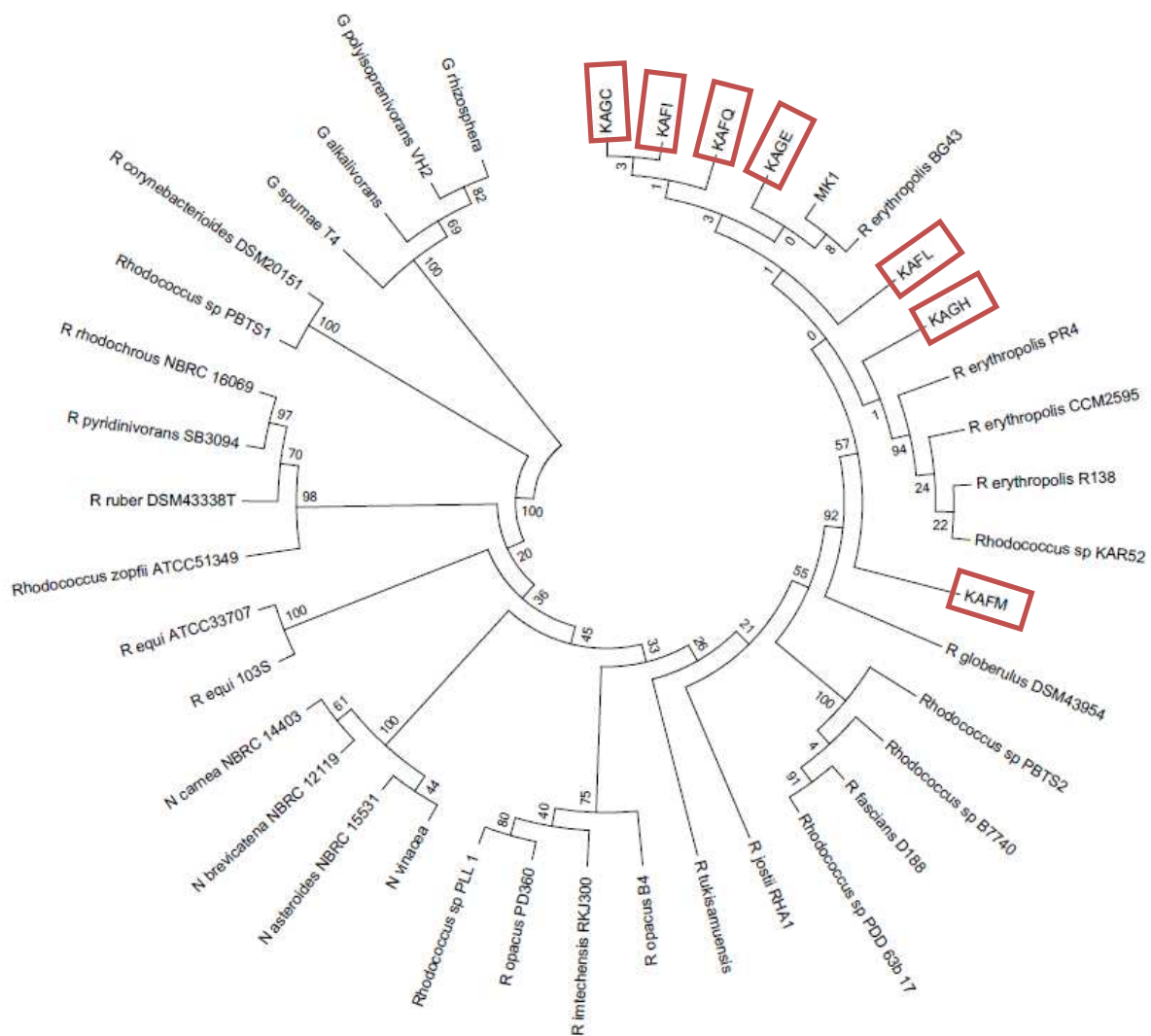
Egy hét után a lemezekon különböző morfológiájú telepeket figyelhettem meg, mely alátámasztotta korábbi feltételezéseimet. A telepekből többszörös átoltást követően tiszta tenyészeteket hoztam létre.

További célom volt, hogy a tápanyagokban gazdag táptalajon növesztett törzseket gázolaj bontási képességük szerint szelektáljam. Ennek érdekében az egyedi telepekről vett inokulumokat gázolajat tartalmazó MST tápagarra oltottam. A szelektív tápagaron 8 törzs volt képes fennmaradni és szaporodni. Ezeket a törzseket az alábbi jelöléssel láttam el: KAG C, KAF I, KAF Q, KAG E, KAF L, KAG H, KAF M, KAF B. A KAG jelzésű törzseket gázolajból, míg a KAF jelzésű törzseket fáradt olajból izoláltam.

A szénhidrogén bontó törzseket a szelektálást követően 16S rDNS alapú szekvencia analízisnek vettem alá, mely során a törzsek bázissorrendjét nemzetközi adatbázisban (GenBank) szereplő törzsek bázissorrendjével hasonlítottam össze. A vizsgálat alapján

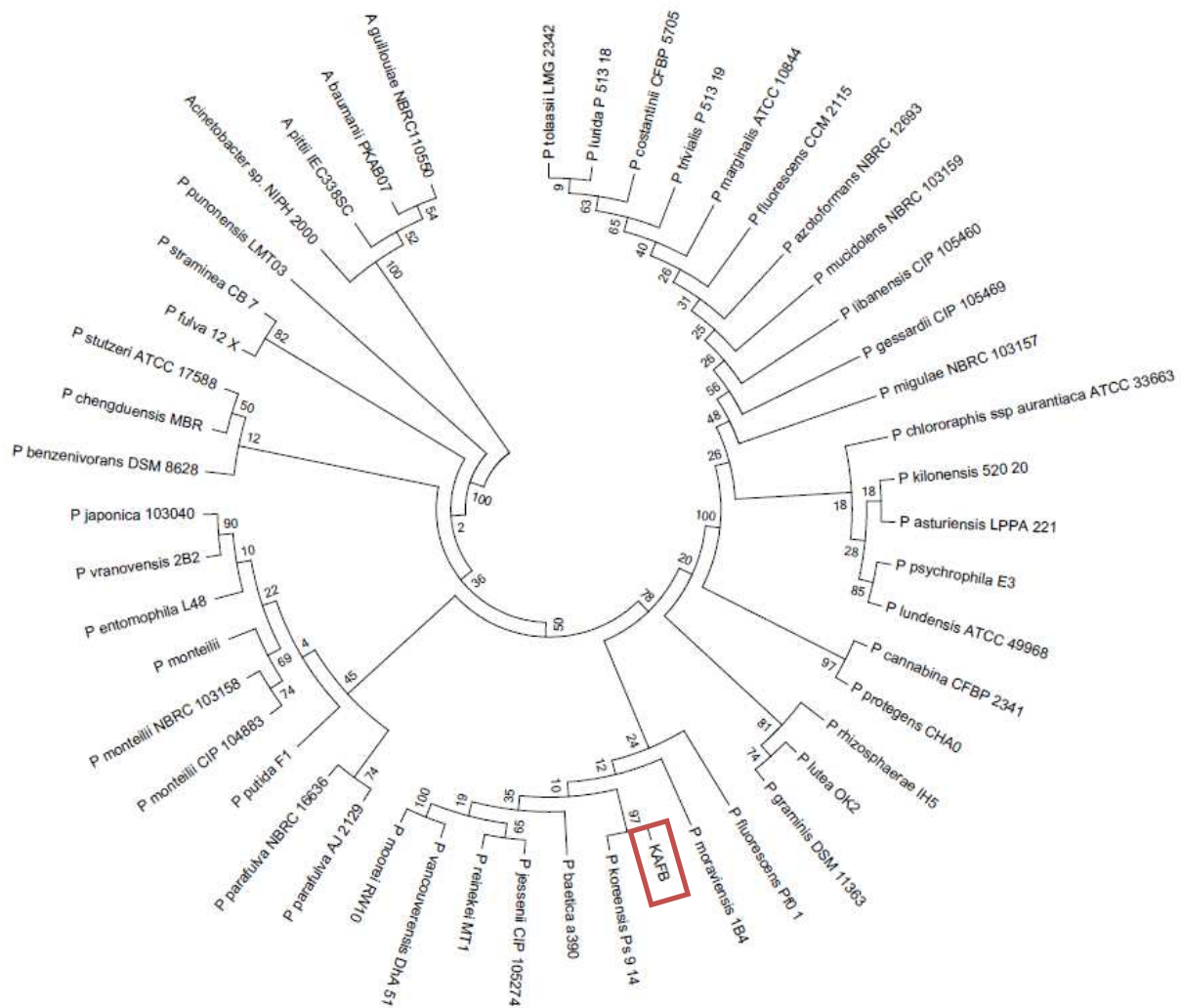
megállapítást nyert, hogy a szelektált törzsek közül egy törzs (KAF B jelű) a *Pseudomonas* nemzetségbe tartozik, míg a fennmaradó további hét törzs a *Rhodococcus* nemzetségbe.

Az izolált törzseket filogenetikai fán is elhelyeztem. A 16S rRNS gén szekvenciáikat alapul vevő filogenetikai törzsfák (17. és 18. ábra) alapján megállapítható, hogy a szelektált *Rhodococcus* törzsek mindegyike a legközelebbi hasonlóságot *R. erythropolis* törzsekkel mutatott, azon belül is a BG43-as törzszel (17. ábra), továbbá az izolált törzsek szoros rokoni kapcsolatban vannak egymással.



17. ábra: Az izolált *Rhodococcus* törzsek (pirossal keretezett) filogenetikai helyzete. Az elágazásoknál jelölt számok a bootstrap értékek (%).

A *Pseudomonas sp.* KAFB törzs taxonómiai helyzetét a 18. ábra mutatja a *Pseudomonas* nemzetség tagjaihoz viszonyítva – igen alacsony bootstrap értékekkel. A törzsfa alapján megállapítható, hogy legközelebbi rokonnak a *Pseudomonas koreensis* faj Ps 914 törzse tekinthető.



18. ábra: Az izolált *Pseudomonas* törzs (pirossal keretezett) filogenetikai helyzete. Az elágazásoknál jelölt számok a bootstrap értékek (%).

Újonnan izolált baktérium fajok bemutatása esetén elengedhetetlen a törzsek alapvető morfológiai, fiziológiai és biokémiai jellemzőinek a meghatározása. Ezen vizsgálatok eredményeit a következő alfejezetekben mutatom be.

5.4.1. A TÖRZSEK MORFOLÓGIAI SAJÁTOSSÁGAI

Az izolált nyolc törzs mindegyike aerob, lekerekített végű pálca, 24 órás növesztést követően mikroszkópos vizsgálatuk alapján eltérő méreteket mutatnak (7. táblázat) százszoros nagyítás mellett.

LB tápagon 48 órás inkubáció után kerek, de (*Pseudomonas sp.* KAF B törzset kivéve) nem határozott körvonalú telepeket képeznek. A kolóniák színét tekintve változatosak: A *Rhodococcus* törzsek matt felszínű, sárga színű telepeket képeznek, kivéve a *Rhodococcus sp.* KAF I jelű törzset, mely fényes, fehéres sárga- és a *Pseudomonas sp.* KAF B törzset, mely fényes felszínű, elefántcsont fehér telepeket képez.

7. táblázat: Az izolált törzsek morfológiai tulajdonságai

Törzs neve	Kolóniák		Sejt	
	Szín	Forma	Méret (µm)	Forma
<i>Pseudomonas sp.</i> KAF B	fényes, elefántcsont fehér	kerek	2.4 x 0.6	pálca
<i>Rhodococcus sp.</i> KAF Q	matt, sárga	kerek	4.5 x 0.9	pálca
<i>Rhodococcus sp.</i> KAF M	matt, sárga	kerek	1.4 x 0.5	pálca
<i>Rhodococcus sp.</i> KAF L	matt, sárga	kerek	4.2 x 0.7	pálca
<i>Rhodococcus sp.</i> KAF I	fényes, fehéres-sárgás	kerek	3.3 x 0.7	pálca
<i>Rhodococcus sp.</i> KAG C	matt, sárga	kerek	4 x 0.8	pálca
<i>Rhodococcus sp.</i> KAG H	matt, sárga	kerek	2.4 x 0.6	pálca
<i>Rhodococcus sp.</i> KAG E	matt, sárga	kerek	3 x 0,6	pálca

5.4.2. FIZIOLÓGIAI- ÉS BIOKÉMIAI SAJÁTOSSÁGOK

Az izolált *Rhodococcus* törzsek Gram-pozitív, míg a *Pseudomonas* törzs Gram-negatív, mezofil baktériumok. A KAG C és KAF Q törzs 15-30°C között képes szaporodni, míg a KAG E és a KAG H törzs gyenge növekedést mutat még 10 és 38 °C-on is. A *Pseudomonas sp.* KAF B, és a *R. erythropolis* KAF I, KAF M és KAF L törzsek 10-38 °C tartományban szaporodnak, de gyenge növekedést még 40 °C-on is mutatnak LB tápoldatban egy napos növesztést követően. A *Pseudomonas sp.* KAF B, *Rhodococcus sp.* KAF I, KAF M, KAG E, KAG H törzsek 3,5%-os sókoncentráció mellett képesek a szaporodásra,

míg a KAF Q, és a KAG C törzs nem, a KAF L törzs csak gyenge növekedést mutat ilyen nagy sókoncentráció jelenlétében.

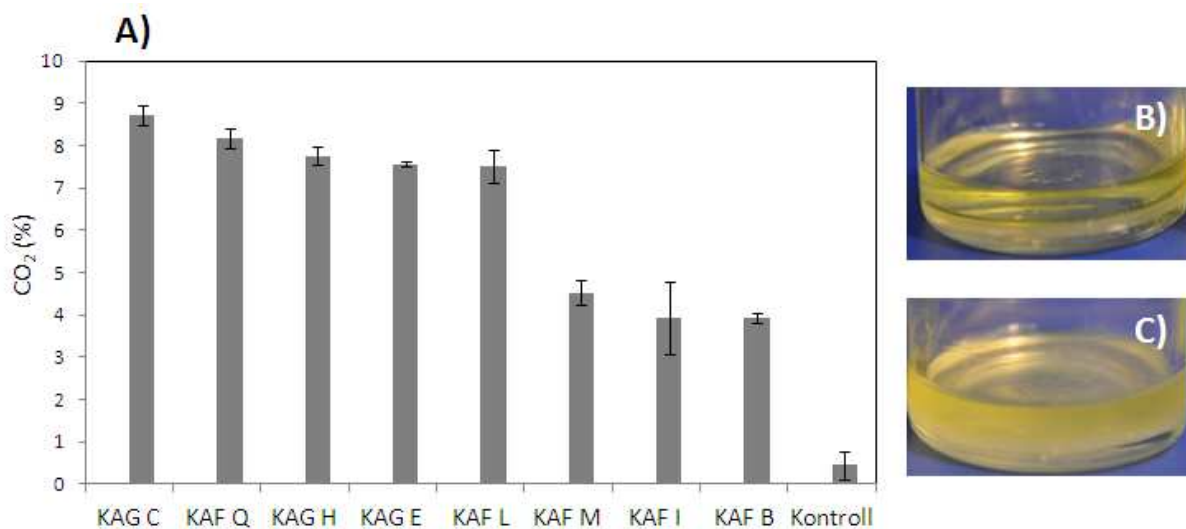
A vizsgált törzsek mindegyike oxidáz pozitív, az KAF M, KAG C, KAG H kataláz pozitív, míg a KAF Q csak gyenge kataláz aktivitást mutat. Nitrát redukcióra az KAG E törzs kivételével mindegyik képes, bár a KAF B törzs csak gyenge nitrát reductáz aktivitással rendelkezik. A nitrit redukálására, indol termelésre, a keményítő hidrolízisére és a glükózból történő savtermelésre egyik törzs sem képes. Oxidatív úton egyik törzs sem bontja a glükózt, míg fermentatív úton csak a KAG E törzs. Ureáz aktivitással csak a KAF Q törzs rendelkezik. A Tween 80 hidrolízisére a KAF B törzs képes, míg a KAF M, I, és a KAG C és E törzs csak gyenge aktivitást mutat. β -galaktozidáz aktivitása egyik törzsnek sincs, a zselatin bontására a KAF B, L, I és a KAG E törzs adott pozitív eredményt (8. táblázat).

8. táblázat: Az izolált törzsek biokémiai jellemzői
+ pozitív reakció, -: negatív reakció, Gy: gyenge pozitív reakció

Tulajdonság	Törzs jele							
	KAF B	KAF Q	KAF M	KAF L	KAF I	KAG C	KAG H	KAG E
Oxidáz aktivitás	+	+	+	+	+	+	+	+
Kataláz aktivitás	Gy	-	+	+	-	-	-	+
Ureáz aktivitás	-	+	-	-	-	-	-	-
β -galaktozidáz	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrát redukció	+	+	+	+	+	-	+	Gy
Nitrit redukció	-	-	-	-	-	-	-	-
Kazein hidrolízis	-	-	-	-	-	-	-	-
Keményítő hidrolízis	-	-	-	-	-	-	-	-
Tween 80 hidrolízis	+	-	Gy	-	Gy	Gy	-	Gy
Zselatin hidrolízis	+	-	-	+	+	-	-	+
Indol termelés	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil vörös (glükóz)	-	-	-	-	-	-	-	-
OF teszt (glükóz)								
aerob (oxidáció)	-	+	-	-	-	-	-	+
anaerob (fermentáció)	-	Gy	-	-	-	+	-	-

5.4.3. A TÖRZSEK GÁZOLAJ TOLERANCIA VIZSGÁLATA

A fent jellemzett mikroorganizmusok izolálási körülményei felvetették annak a kérdését, hogy a törzsek milyen koncentrációig tudják tolerálni a gázolajat? Vajon képesek-e aktív anyagcserét folytatni akár „tömény” (vízmentes) gázolajban is? A kérdések megválaszolása érdekében a törzseket 1% (v/v) koncentrációban 20 ml sterilre szűrt gázolajat tartalmazó zárt hypo-vial üvegekbe oltottam, és vizsgáltam a sejtek aktív anyagcseréjének következtében felszabaduló szén-dioxid koncentrációját. A zárt rendszerekben egy hét után a kiindulási állapothoz képest nem detektáltam változást (az adatok nincsenek feltüntetve). Feltételeztem, hogy makro- és mikroelemek hozzáadása szükséges a sejtek anyagcseréjének beindításához, így következő kísérletemben már a 20 ml gázolajat ásványi sók vizes oldatával egészítettem ki. Az így létrejött kétfázisú oldat 88,7%-ban tartalmazta a gázolajat és 11,3%-ban az ásványi sók vizes oldatát.

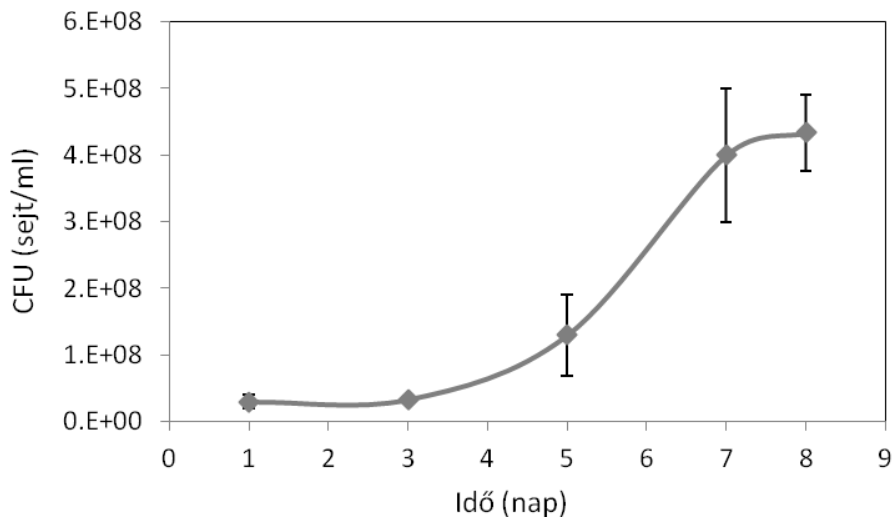


19. ábra: A törzsek által egy hét alatt termelt szén-dioxid ásványi sók hozzáadását követően (A). A gázolajban növesztett *Rhodococcus sp.* KAG C törzs a leoltás pillanatában (B) és egy hét után (C)

Az ásványi sók hozzáadására megindult a sejtek anyagcseréje, a kezeletlen kontroll mintához képest jelentős zavarosság volt megfigyelhető a gázolajban is, életterük nem

korlátozódott csupán a vizes fázisra (példaként kiemelve a KAG C törzs: 18. ábra C). Egy hét után jelentős mennyiségű szén-dioxidot detektáltam a rendszerben a sejteket nem tartalmazó kontroll mintához képest (19. ábra A).

Annak bizonyítására, hogy a törzsek valóban képesek az olajos fázisban szaporodni, vizsgáltam a fenti kísérletben legnagyobb aktivitást mutató KAG C törzs szaporodási dinamikáját élő sejszám meghatározás módszerével az olajos fázisban. A kísérleti eredmények megerősítették vizuális megfigyeléseimet (19. ábra C), a 20. ábrán jól látható az élő sejszám növekedése az idő előrehaladtával, mely bizonyítja, hogy a törzs képes szaporodni az olajos fázisban is.



20. ábra: A KAG C törzs szaporodási dinamikája gázolajban

Az eredmények alapján megállapítható, hogy új, oldószer toleráns extremofil baktériumokat sikerült izolálni.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatómunkám során a hazánkat leginkább érintő hidrofób szennyező anyagok, a gázolaj valamint csirke- és sertézsír mikrobiológiai bontását vizsgáltam, lebontó szervezatként a *Rhodococcus erythropolis* MK1 törzset felhasználva. Megvizsgáltam a törzs biodegradációs aktivitását befolyásoló paramétereket, valamint ötvöztem a különböző bioremediációs technológiákat, melyek eredményeként sikeres gázolaj, csirke- és sertézsír lebontást mutattam be laboratóriumi körülmények között. A laboratóriumi eredményekre alapozva egy gázolajjal szennyezett talaj kármentesítését is sikeresen hajtottam végre.

Eredményeimrel rávilágítottam, hogy napjaink legkiemelkedőbb olajbontójaként számon tartott *Alcanivorax borkumensis* törzshöz képest az általam vizsgált *R. erythropolis* MK1 törzs lényegesen hatékonyabb szénhidrogén bontó. Lebontó képessége nem korlátozódik csupán az alkánok bontására, hanem egy adott időben valamennyi szénhidrogén párhuzamos lebontásra képes.

A *Rhodococcus* nemzetség sertés- és csirkezsír bontó képességét mind ez idáig nem vizsgálták, így e téren elért kutatási eredményeim - mint új elemek - bővítették a *Rhodococcus* nemzetségről eddig ismerteket.

Nagy gázolajkoncentráció jelenlétében is bontásra képes baktériumot a szakirodalom még nem tart számon. Munkám során sikeresen izoláltam gázolajból és fáradt olajból olyan mikroorganizmusokat, melyek kétfázisú rendszerekben közel 90%-os gázolaj koncentráció mellett is képesek aktív anyagcserét folytatni.

Az elért kutatási eredményeimet részletesen, a célkitűzéseimmel összhangban az alábbi pontokban foglalom össze.

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

A gázolaj lebontásának vizsgálata során a fokozatos léptéknövelés elvét követtem.

A kutatómunka kezdetén igazoltam, hogy a MK1 törzs aktív anyagcserét folytat gázolaj jelenlétében, képes azt szén- és energiaforrásként hasznosítani.

Laboratóriumi körülmények között mikrokozmosz kísérletek segítségével megvizsgáltam a bontás körülményeit vizes és talajos fázisban egyaránt. Minimál sós tápoldatban a törzs a gázolaj közel 70%-át bontotta el egy hét alatt, ugyanakkor megállapítást nyert, hogy a bontás hatékonysága tovább növelhető, a biodegradáció mértéke 20%-al javult ciklodextrin hozzáadásával.

Kutatásaim során vizsgáltam a sejtek hordozóba zárásának a gázolaj bontására gyakorolt hatását is. Az eredmények alapján fény derült arra, hogy a szakirodalomban többféle fajra leírt tapasztalatokkal ellentétben, az MK1 törzs bezárásos immobilizálása nem javítja a bontás hatékonyságát, sőt ellenkezőleg, jelentősen csökkentette azt. Egy hét után közel 20%-al maradt el az aktivitása az immobilizált sejtes kultúráknak a szabadsejtes kultúrákhoz képest.

Talajos mikrokozmosz kísérletek segítségével modellezni kívántam egy gázolajjal szennyezett talaj kármentesítését is. E célnak megfelelően mesterségesen elszennyezett talajban vizsgáltam a biostimuláció, valamint a bioaugmentáció gázolaj bontására gyakorolt hatását. A vizsgálatok során a természetes szennyező anyag csökkenés jelenségét tapasztaltam, közel 40%-os biodegradáció volt megfigyelhető a kezeletlen kontroll mintákban, melybe mikroorganizmust nem juttattam. Biostimulációs kezelés hatására a gázolaj lebontás mértéke jelentősen nőtt, egy hét után közel 80%-os biodegradációt detektáltam. A bioaugmentáció során hozzáadott mikroorganizmus (MK1 törzs) nem növelte a bontás hatékonyságát, azonban a bioaugmentáció biostimulációval való kombinálása a lebontás sebességét nagymértékben javította.

A laboratóriumi eredményekre támaszkodva egy régóta fennálló gázolajjal szennyezett talaj kármentesítését is végrehajtottam. A kármentesítés során kapott eredmények

megerősítették a korábbi laboratóriumi modellkísérletek eredményeit. A bennszülött mikroflóra ásványi sós tápoldattal történő stimulálása megfelelő kezelésnek bizonyult több éve bekövetkezett és még fennálló szennyezés esetén. A bioaugmentáció nem növelte a szénhidrogénbontás hatékonyságát ebben az esetben.

Vizsgálataimat kiterjesztettem egy friss szennyezés kármentesítésének modellezésére is. Bizonyítást nyert, hogy a helyi mikroba közösség stimulálása elegendő, ugyanakkor a bioaugmentáció lényegesen gyorsabb megoldásnak bizonyult, ezért további szempontok figyelembevételével (időfaktor, gazdaságosság) a friss szennyezések kármentesítése során a bioaugmentáció előnyösebb.

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

Enzimaktivitás vizsgálatok során bizonyítottam, hogy a vizsgált MK1 törzs rendelkezik a zsíros hulladékok lebontásához szükséges lipáz enzimekkel, majd a törzs anyagcsere folyamatait körbejáró vizsgálatok segítségével megállapítottam, hogy a törzs képes egyedüli szén- és energiaforrásként hasznosítani a csirke- és sertészsírt.

Modellorganizmusom zsírbontó képességét egy alternatív törzs zsírbontó képességével hasonlítottam össze.

A zsírok biodegradációjának vizsgálata során bebizonyítottam, hogy a tápoldat pH-ja jelentős befolyásoló tényezője a degradációs folyamatnak. A felismerést követően sikeresen optimalizáltam a bontási körülményeket, melynek köszönhetően csirkezsír esetén teljes-, sertészsír esetén 80%-os biodegradációt sikerült elérni néhány nap (4-5 nap) alatt. Modellorganizmusom és a PR4 törzs zsírbontó képessége között a tápoldat optimalizálása után jelentősebb eltérést nem tapasztaltam, a két törzs közel azonos mértékben volt képes a zsíros szubsztrátok lebontására.

A zsírok lebontási kinetikáját tanulmányozva megállapítottam a bontás időbeli függését, valamint rávilágítottam arra, hogy a bontás sebessége nagyban függ a vizsgált zsírok zsírsav összetételétől. Csirkezsír esetén a teljes biodegradáció már 5 nap alatt bekövetkezett, míg a

sertészsír magasabb telített zsírsav tartalma miatt e szubsztrát lebontásához hosszabb idő szükséges. A PR4 törzs bár mindkét szubsztrát esetében gyorsabb biodegradációt eredményezett, mint az MK1 törzs, de a hatékony biodegradáció az adott körülmények között szűkebb pH tartományt mutatott PR4 törzs esetében. A trigliceridek mennyiségi fogyását és a keletkező intermediereket vékonyréteg kromatográfiával is detektáltam.

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

Az MK1 törzs genomjában számos olyan gént találtam, melyek az általam vizsgált gázolaj és zsíros hulladékok lebontásában részt vehetnek. A genomban található gének közül 5 gén *alkB* enzimeket kódol, melyek feltételezhetően a gázolaj alkán komponenseinek a lebontásában vesznek részt. További 11 db citokróm P450 fehérjecsaldába tartozó fehérjét kódoló géneket is sikerült kimutatni. A gázolaj aromás vegyületeinek bontásában potenciálisan 77 db gén terméke vehet részt.

A zsírokat alkotó trigliceridek lebontásában szerepet játszó lipáz enzimek közül 10 db triacil-glicerol lipázt és 2 db monoacil-glicerol lipázt azonosítottam. További 87 db olyan feltételezett fehérjét kódoló szekvenciát találtam a genomban, melyek szerepet játszhatnak a zsírsavak lebontásában.

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

Mikrokozmosz kísérletek során a gázolajat tartalmazó mintában mikrobiális aktivitást detektáltam. Ennek alapján sikeresen izoláltam és szelektáltam gázolajból és fáradt olajból életképes baktérium törzseket. Az izolált törzsek mindegyike egy kivétellel a legközelebbi rokonságot a *Rhodococcus* nemzetséggel mutatta. Egy törzs az előzőektől

eltérően Gram-negatív, és a *Pseudomonas koreensis* fajjal mutatott legnagyobb hasonlóságot.

A szelektált törzsek taxonómiai besorolását elvégezve megállapítottam filogenetikai helyzetüket, alapvető fiziológiai-, fenotípusos és biokémiai karakterisztikájukat.

Megállapítottam továbbá, hogy a szelektált törzsek igen magas gázolaj toleranciával rendelkeznek. Kétfázisú (gázolaj/víz) rendszerben 88,7%-os gázolaj koncentráció mellett is képesek aktív anyagcserét folytatni ásványi sók jelenlétében.

Következtetések

Eredményeim új lehetőségeket nyitnak a *Rhodococcus* nemzetség ipari alkalmazásában. Az általam vizsgált *Rhodococcus erythropolis* MK1 törzssel végzett kísérletek eredményei felvetik annak a lehetőségét, hogy e törzs gázolajjal szennyezett talajok és zsíros hulladékokkal terhelt szennyvizek kezelésére egyaránt jó hatékonysággal alkalmazható lesz a jövőben.

A gázolajból és fáradt olajból izolált törzsek segítenek bővíteni az eddigi ismereteinket az extremofil mikroorganizmusokról. Oldószer toleranciájukat kihasználva új lehetőségeket teremtenek a bioremediációs, biokatalitikus folyamatokban. A fáradt olajból szelektált törzsek potenciális fémtoleránsak lehetnek, melynek kiemelkedő jelentősége lehet bioremediációs eljárásokban a jövőben.

7. SUMMARY

During my research on hydrophobic pollutants primarily affecting our country, I studied the microbial degradation of diesel oil, lard and poultry fat using *Rhodococcus erythropolis* MK1 strain. The parameters, affecting the biodegradation activity of the strain, were analyzed, and various bioremediation technologies were applied and combined. Finally a successful procedure was developed to degrade diesel oil, lard and poultry fat under laboratory conditions. Based on the results of these laboratory tests, remediation of diesel oil contaminated soil was also performed.

My results have highlighted that - compared to *Alcanivorax borkumensis* considered as today's most prominent oil-degrading strain - the *Rhodococcus erythropolis* strain examined here can degrade hydrocarbons more effectively. These degrading capabilities were not restricted only to alkanes, but enable the strain to degrade all hydrocarbons simultaneously.

The lard and poultry fat degrading capabilities of the *Rhodococcus* genus has not been examined so far, thus my relevant results widened our knowledge on this genus.

In the literature, bacteria capable to degrade diesel oil at high concentration have not been published yet. During my work, I have successfully isolated microorganisms from diesel and dead oil that are capable of an active metabolism in two-phase systems with a gasoline concentration close to 90%.

My results are summarized in details in the following sections.

I. Findings based on the results from the degradation of diesel oil as hydrophobic pollutant

During the analysis of diesel oil degradation, I applied a gradual scale-up strategy.

At the beginning of my research, I demonstrated that the MK1 strain engaged in active metabolism in the presence of diesel oil as a carbon and energy source.

I examined the conditions of oil degradation using microcosm experiments in both liquid and soil phases.

The MK1 strain degraded 70% of diesel oil in minimal salt medium in a week, but as a conclusion, it was found that by the addition of randomly methylated cyclodextrin, the rate of the bioconversion can be further enhanced by 20%.

I also studied the effects of encapsulation of cells on diesel oil degradation. The results revealed that in case of our MK1 strain, cell immobilization – contrary to the available literature on this topic – does not improve the biodegradation efficiency but, on the contrary, it caused a significant reduction. After one week, the biodegradation yield was nearly 20% lower in case of immobilized cells as compared to the free cell cultures.

With soil microcosm experiments, I intended to model the bioremediation of diesel oil contaminated soil. In accordance with this objective, I investigated the effects of biostimulation as well as bioaugmentation on artificially contaminated soil. During the tests, the concentration of the original pollutants decreased and nearly 40% biodegradation was observed in the control samples without externally added microorganisms. After biostimulation, there was a significant increase in biodegradation; nearly 80% bioconversion could be achieved in a week. Bioaugmentation by MK1 strain – did not cause any increase in degradation efficiency, but combining bioaugmentation with biostimulation resulted in significantly increased degradation speed.

Based on these laboratory results, the bioremediation of soil - containing a long-existing diesel oil contamination - was performed. The results coincided with the data obtained in the laboratory model experiments. In case of old contamination, stimulating the indigenous microflora with mineral salts proved to be an appropriate treatment. Bioaugmentation did not cause any increase in the efficiency of hydrocarbon degradation in this case.

My experiments were also extended for modelling of the remediation of soil containing fresh contaminations. It has been demonstrated that the stimulation of the local microbial community was enough; however, in order to achieve faster remediation, bioaugmentation was definitely proved to be a better treatment.

II. Conclusions from the study of degradation of lard- and poultry fat, as a hydrophobic pollutants wastes

During enzyme activity tests, it was successfully demonstrated that the MK1 strain and another similar *R. erythropolis* PR4 strain had lipase enzymes capable of degrading fatty wastes. Using metabolic studies I confirmed that these strains could utilize lard and poultry fat as sole energy sources.

The fat degrading ability of my model organism was compared to the *R. erythropolis* PR4 strain both strains had similar activities.

I proved that the biodegradation was largely affected by the pH of the nutrient solution. Consequently, I optimized the conditions of fat degradation to achieve a complete biodegradation of poultry fat and 80% lard conversion in a few (4-5) days. No significant differences were observed between the fat degrading abilities of the strains under optimum conditions, the fatty substrate degrading ability of the two strains was almost equal.

Based on the kinetics of fat degradation, I pointed out that biodegradation rate is largely dependent on the type of the fatty acid of interest. In case of poultry fat, biodegradation was completed in 5 days, while, because of the larger saturated fatty acid content of the lard, more time is required for the biodegradation of this substrate. Although, in case of both substrates, the PR4 strain accomplished a bit faster biodegradation than the MK1 strain, this high activity showed a narrower pH range. Triglycerides and the intermediates - resulting from their degradation - were also detected with a thin layer chromatography.

III. Conclusions from *Rhodococcus erythropolis* MK1 strain genome analysis

In the genome of the MK1 strain, I have found a number of genes possibly responsible for the degradation of diesel oil and oily wastes of interest. Five genes in the genome code for AlkB enzymes and presumably involved in the degradation of the alkane components of diesel oil. Another 11 cytochrome P450 genes were also detected. Moreover, products of 77 genes might be likely involved in the degradation of aromatic hydrocarbons.

I identified 10 genes encoding triacylglycerol lipases and 2 genes of monoacyl-glycerol lipases by a comparison to the known lipase enzymes involved in the degradation of fat forming triglycerides. Another 87 protein coding sequences were also identified, which could be involved in the degradation of fatty acids.

IV. Findings and achieved results during the examination of new solvent-tolerant bacteria

During microcosm experiments, I detected microbes originated from pure diesel oil. Based on these findings, I successfully isolated and selected viable bacterial strains from diesel oil and dead oil. All but one of the isolated strains showed a close kinship with the *Rhodococcus* genus. One strain, unlike the previous ones, was Gram-negative and resembled a *Pseudomonas koreensis* strain.

After the taxonomic classification of the selected strains, I determined their phylogenetic position, their fundamental physiological, phenotypic and biochemical characteristics.

The selected strains were highly active in a two-phase (diesel oil/aqueous) system with 88,7% diesel oil concentration, they were able to engage in active metabolism in the presence of mineral salts.

Conclusions

My results open new possibilities in the industrial application of the *Rhodococcus* genus. The examined *Rhodococcus erythropolis* MK1 strain is a good candidate for remediation of both diesel oil contaminated soils and fatty waste polluted sewages with high efficiency.

The strains isolated from diesel and dead oil can help to expand our contemporary knowledge of extremophile microorganisms. Taking the advantages of their solvent tolerance, new possibilities open up in bioremediation and bio-catalytic processes. Strains isolated from dead oil are potentially metal tolerant, even possess metal accumulating properties, having a great significance in bioremediation applications.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Őszinte hálával tartozom mindazoknak, akik valamilyen formában hozzájárultak ahhoz, hogy ez a munka megszülethessen.

Kitüntetett köszönettel tartozom elsőként témavezetőmnek, **Dr. Perei Katalinnak**. Köszönöm, hogy mentoromként hosszú éveken át fáradozott azon, hogy elméleti és gyakorlati tudását - a bioremediáció területén - átadja nekem. Hálás vagyok szakmai segítségéért, irántam tanúsított végtelen türelméért és nem utolsósorban belém vetett bizalmáért. Személyének sorsdöntő szerepe volt abban, hogy erre a pályára léptem évekkkel ezelőtt.

Köszönetemet szeretném kifejezni **Dr. Rákhely Gábornak**, aki bár hivatalosan nem volt a kutatásaim szakmai vezetője, még is legalább olyan figyelemmel és felelősséggel kísérte munkámat. Mindenre kiterjedő szakmai tudása, értékes tanácsai nélkül kutatási eredményeim (a dolgozaton túl is) nem születhettek volna meg. Köszönöm neki továbbá, hogy a legreménytelenebbnek tűnő pillanatban biztatott, hogy nézzem meg a Kelly hőseit!
☺

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Kovács Kornélnak**, hogy a kezdetekkor megteremtette és biztosította annak a lehetőségét, hogy elkezdhessem kutatásaimat a Biotechnológiai Tanszéken. Hálás köszönöm neki továbbá, hogy a hosszú évek alatt mindig számíthattam a szemináriumokon értékes tanácsaira, szakmai észrevételeire.

Hálás köszönettel tartozom **Dr. Tengölics Rolandnak**, hogy nemcsak igaz barátként támogatott a sokszor rögös úton, hanem értékes szakmai tanácsaival is segítette kutatásaimat. Hálás vagyok kendőzetlen őszinte véleményeiért, éles kritikáiért is, melyek mind hozzájárultak szakmai fejlődésemhez.

Külön köszönettel tartozom **Zsíros Szilviának**, a hosszú éveken át tartó áldozatos munkájáért. Köszönöm szívből jövő szeretetét is, mellyel az első naptól kezdve megajándékozott.

Köszönöm egykori és jelenlegi kollégáimnak, hogy segítségemre voltak a kísérletek kivitelezésében. Külön köszönet illeti **Kériné Sós Ildikót, Papp Saroltát, Bodor Attilát, Laczi Krisztiánt** és **Szilágyi Árpádot**.

Köszönettel tartozom a **Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézetének**, hogy Fiala Kutatói ösztöndíjjal támogatott, és az **Új Élet Mezőgazdasági Szövetkezetnek**, hogy lehetőséget és anyagi támogatást biztosított a terepi kísérleteim elvégzéséhez.

Köszönettel tartozom **barátaimnak** (Zsófinak, Zsoltinak, Szilvinek, Rolandnak, Andinak, Julinak, Petrának, Enikőnek, Sacinak, Attilának, Árpának, Norbinak és Gyuszinak) szeretetükért és támogatásukért. Humoruk, biztató szavaik (olykor egy ölelésük) is elegendő volt ahhoz, hogy átlendüljek a nehéz pillanatokon.

Őszinte hálával tartozom családomnak, **anyukámnak, apukámnak** és **nővéremnek**. Hálás vagyok nekik azért, mert sohasem támasztottak elvárásokat velem szemben, ugyanakkor mindig is hittek bennem és biztattak, bármibe is vágtam bele. Szeretetük és támogatásuk nélkül számomra nem lenne élet, az Élet!

Végezetül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom **férjemnek** és egyben életem mozgatórugójának, **Erdei Sándornak**. Köszönöm szerető támogatását és végtelen türelmét, mellyel hosszú éveken át viselte sokszor szeszélyes természetemet. Ő az a személy, aki mindig is többet látott és lát ma is bennem, mint aki valójában vagyok. Ez az, ami engem mindig is többre és jobbra sarkall az élet minden területén. Hálás vagyok az Életnek és a Sorsnak, amiért azon a bizonyos napon egymás elé sodort minket.

9. HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE

Alexander, M., Bloom, B.R., Hopwood, D.A., Hull, R., Iglewski, B.H., Laskin, A.I., Oliver, S.G., Schaechter, M., és Summers, W.C.: Encyclopedia of Microbiology, Four-Volume Set, Academic Press, (2009) ISBN 978-0-12-373944-5.

Alexander, M.: Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, (1999) ISBN13:978-0-12-049861.

Al-Hadhrami, M.N., Lappin-Scott, H.M., és Fisher, P.J.: Effects of the addition of organic carbon sources on bacterial respiration and n-alkane biodegradation of Omani crude oil, Marine Pollution Bulletin, 32, (1996) 351–357.

Alvarez, P.J., és Illman, W.A.: Bioremediation and natural attenuation, Process Fundamentals and Mathematical Models, (2006) On-line ISBN 9780471738626.

Arulazhagan, P., és Vasudevan, N.: Role of a moderately halophilic bacterial consortium in the biodegradation of polyaromatic hydrocarbons, Marine Pollution Bulletin, 58, (2009) 256–262.

Ashley, R.M., Fraser, A., Burrows, R., és Blanksby, J.: The management of sediment in combined sewers, Urban Water, 2, (2000) 263–275.

Atlas, R.M., és Philp, J.C.: Bioremediation of contaminated soils and aquifers. In Bioremediation (American Society of Microbiology), ASM Press, Chapter 5, (2005) 139–236.

Atlas, R.M.: Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective, Microbiological Reviews, 45, (1981) 180–209.

Auffret, M., Labbé, D., Thouand, G., Greer, C.W., és Fayolle-Guichard, F.: Degradation of a mixture of hydrocarbons. Gasoline and diesel oil additives by *Rhodococcus aetherivorans* and *Rhodococcus wratislaviensis*, Applied and Environmental Microbiology, 75, (2009) 7774–7782.

Baik, M.H., Newcomb, M., Friesner, R.A., és Lippard, S.J.: Mechanistic studies on the hydroxylation of methane by methane monooxygenase, Chemical Review, 103, (2003) 2385–2419.

Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J., és Marchant, R.: Microbial biosurfactants production, applications and future potential, Applied Microbiology and Biotechnology, 87, (2010) 427–444.

Bao, M., Wang, L., Sun, P., Cao, L., Zou, J., és Li, Y.: Biodegradation of crude oil using an efficient microbial consortium in a simulated marine environment, *Marine Pollution Bulletin*, 64, (2012) 1177–1185.

Bardi, L., Mattei, A., Steffan, S., és Marzona, M.: Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with β -cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability, *Enzyme Microbial Technology*, 27 (9), (2000) 709-713.

Barry, C.E. C.E., Lee, R.E., Mdluli, K., Sampson, A.E., Schroeder, B.G., Slayden, R.A., és Yuan, Y.: Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions, *Lipid Research*, 37 (2-3), (1998) 143-179.

Battimelli, A., Carrère, H., és Delgenès, J.-P.: Saponification of fatty slaughterhouse wastes for enhancing anaerobic biodegradability, *Bioresource Technology*, 100, (2009) 3695–3700.

Bayat, Z., Hassanshahian, M., és Cappelo, S.: Immobilization of microbes for bioremediation of crude oil polluted environments, A mini review, *Open Microbiology Journal*, 9, (2015) 48-54.

Bazrafshan, E., Mostafapour F.K., Farzadkia, M., Ownagh, K.A., és Mahv, A.H.: Slaughterhouse wastewater treatment by combined chemical coagulation and electrocoagulation process, *Plos One*, 7 (6), (2012) 4108.

Becker, P., Koster, D., Popov, M.N., Markossian, S., Antranikian, G., és Markl, H.: The biodegradation of olive oil and the treatment of lipid-rich wool scouring wastewater under aerobic thermophilic conditions, *Water Research*, 33 (3), (1999) 653-660.

Bednarski, W., Adamczak, M., Kowalewska-Piontas, J. és Zadernowski, R.: Biotechnological methods for the up-grading and modification of animal waste fats, *Acta Biotechnologica*, 14(4), (1994) 387-393.

Bell, K. S., Philp, J.C., D., és Christofi, N.: The genus *Rhodococcus*, *Journal of Applied Microbiology*, 85, (1998) 195-210.

Belotte, D., Curien, J.B., Maclean, R.C., és Bell, G.: An experimental test of local adaptation in soil bacteria, *Evolution*, 57, (2003) 27–36.

Bhumibhamon, O., Kopraserstak, A., és Funthong, S.: Biotreatment of high fat and oil wastewater by lipase producing microorganisms, *Kasetsart Journal, Natural Sciences*, 36, (2002) 261–267.

Bitman, J.: Status report on the alteration of fatty acid and sterol composition in lipids in meat, milk, and eggs, *Fat Content and Composition of Animal Products, Proceedings of a Symposium*, (1976) 200–237.

Bondar, V.S., Boersma, M.G., Golovlev, E.L., Vervoort, J., Berkel, W.J.H.V., Finkelstein, Z.I., Solyanikova, I.P., Golovleva, L.A., és Rietjens, I.M.C.M.: ¹⁹F NMR study on the biodegradation of fluorophenols by various *Rhodococcus* species, *Biodegradation*, 9, (1998) 475–486.

Boopathy, R.: Factors limiting bioremediation technologies, *Bioresource Technology*, 74, (2000) 63–67.

Bordás, I.: Kémiai biztonság és toxikológia, Medicina Könyvkiadó, Budapest, (2005) ISBN 963-242-926-5.

Braunegg, G., Sonnleitner, B. és Lafferty, R.M.: A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass, *European Journal Applied Microbiology Biotechnology*, 6, (1978) 29–37.

Britton, L. N.: Microbial degradation of organic compounds, Marcel Dekker editons, New York, (1984) 89-129.

Brooijmans, R.J.W., Pastink, M.I., és Siezen, R.J.: Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew, *Microbial Biotechnology*, 2, (2009) 587–594.

Brooksbank, A.M., Latchford, J.W., és Mudge, S.M.: Degradation and modification of fats, oils and grease by commercial microbial supplements, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, (2007) 977–985.

Brozzoli, V., Crognale, S., Sampedro, I., Federici, F., D'Annibale, A., és Petruccioli, M.: Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor, *Bioresource Technology*, 100, (2009) 3395–3402.

Camilli, R., Reddy, C.M., Yoerger, D.R., Mooy, B.A.S.V., Jakuba, M.V., Kinsey, J.C., McIntyre, C.P., Sylva, S.P., és Maloney, J.V.: Tracking Hydrocarbon Plume Transport and Biodegradation at Deepwater Horizon, *Science*, 330, (2010) 201–204.

Cammarota, M.C., és Freire, D.M.G.: A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content, *Bioresource Technology*, 97, (2006) 2195–2210.

Cassidy, M.B., Lee, H., és Trevors, J.T.: Environmental applications of immobilized microbial cells: A review, *Journal of Industrial Microbiology*, 16, (1996) 79–101.

Chandrakant, S. K., és Shwetha, S. R.: Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review, *Enzyme Research*, 11, (2011).

Chen, J., Wong, M.H., Wong, Y.S., és Tam, N.F.Y.: Multi-factors on biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Sphingomonas* sp. a bacterial strain isolated from mangrove sediment, *Marine Pollution Bulletin*, 57, (2008) 695–702.

Chevreur, B., Wetter, T. és Suhai, S.: Genome sequence assembly using trace signals and additional sequence information. *Computer Science and Biology: Proceedings of the German Conference on Bioinformatics*, 99, (1999) 45-56.

Čipinytė, V., Grigiškis, S., és Baškys, E.: Selection of fat-degrading microorganisms for the treatment of lipid-contaminated environment, *Biologija*, 55, (2009) 84–92.

Cowan, S.T., Barrow, G.I., Steel, K.J., és Feltham, R.K.A.: *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*, Cambridge University Press, (2004) ISBN 0521543282.

Cruden, D.L., Wolfram, J.H., Rogers, R.D., és Gibson, D.T.: Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which grows with p-xylene in a two-phase (organic-aqueous) medium, *Applied and Environmental Microbiology*, 58, (1992) 2723–2729.

Cunningham, C.J., Ivshina, I.B., Lozinsky, V.I., Kuyukina, M.S., és Philp, J.C.: Bioremediation of diesel-contaminated soil by microorganisms immobilised in polyvinyl alcohol, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54, (2004) 167–174.

Cserhalmi, Zs., Éliás, I., és Tóthné, Sz.K.: Hús- és baromfiipar környezeti hatásai, *Zöld belépő kiadvány sorozat, IX. Élelmiszeripar*, (1997).

Daffe, M., McNeil, M., és Brennan, P.J.: Major structural features of the cell wall arabinogalactans of *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, and *Nocardia* spp., *Carbohydrate Research*, 249, (1993) 383–398.

Davin, S., és Quilty, B.: Identification and characterisation of a yeast isolated from activated sludge capable of growth on tallow, *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy*, 101 (3), (2001) 263.

de Bont, J.A.M.: Solvent-tolerant bacteria in biocatalysis, *Trends in Biotechnology*, 16, (1998) 493–499.

de Carvalho, C.C.C.R., és da Fonseca, M.M.R.: Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* DCL 14 to growth on n-alkanes, alcohols and terpenes, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, (2005a) 383-388.

de Carvalho, C.C.C.R., és da Fonseca, M.M.R.: The remarkable *Rhodococcus erythropolis*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, (2005b) 715–726.

Di Gennaro, P., Rescalli, E., Galli, E., Sello, G., és Bestetti, G.: Characterization of *Rhodococcus opacus* R7, a strain able to degrade naphthalene and o-xylene isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil, *Research in Microbiology*, 152, (2001) 641–651.

Díaz, E.: Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility, *International Microbiology*, 7(3), (2004) 173–180.

Dominguez, A., Deive, F.J., Sanromán, M.A., és Longo, M.: Biodegradation and utilization of waste cooking oil by *Yarrowia lipolytica* CECT 1240, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, (2010) 1200-1208.

Dupont, R.R.: Fundamentals of bioventing applied to fuel contaminated sites, *Environmental Progress*, 12, (1993) 45-53.

Durand, J.P., Béboulène, J.J., és Ducrozet, A.: Detailed characterization of petroleum products with capillary GC analyzers, *Analysis*, 10, (1995) 481-483.

Dyksterhouse, S. E., Gray, J. P., Herwig, R. P., Lara, J. C. és Staley, J. T.: *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments, *International Journal of Systematic Bacteriology* 45, (1995) 116-123.

El-Bestawy, E., El-Masry, M.H., és El-Adl, N.E.: The potentiality of free Gram-negative bacteria for removing oil and grease from contaminated industrial effluents, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, (2005) 815-822.

Endrédi, I.: A volt szovjet laktanyák környezeti kárai és felszámolásuk, *Környezet és fejlődés*, 3, (1992) 89-92.

Facchin, S., Alves, P.D.D., Siqueira, F. de F., Barroca, T.M., Victoria, J.M.N., és Kalapothakis, E.: Biodiversity and secretion of enzymes with potential utility in wastewater treatment, *Open Journal of Ecology*, 3, (2013) 34-37.

Fenyvesi, E., Csabai, K., Molnár, M., Gruiz, K., Murányi, A., és Szejtli, J.: Quantitative and qualitative analysis of RAMEB in soil, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 44, (2002) 413-416.

Fenyvesi, É., Szemán, J., és Szejtli, J.: Extraction of pahs and pesticides from contaminated soils with aqueous CD solutions, *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry*, 25, (1996) 229-232.

Fernández, M.D., Cagigal, E., Vega, M.M., Urzelai, A., Babín, M., Pro, J., és Tarazona, J.V.: Ecological risk assessment of contaminated soils through direct toxicity assessment, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62, (2005) 174-184.

Gannoun, H., Bouallagui, H., Okbi, A., Sayadi, S., és Hamdi, M.: Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of biologically pretreated abattoir wastewaters in an upflow anaerobic filter, *Journal of Hazardous Materials*, 170, (2009) 263-271.

Gemmell, R.T., és Knowles, C.J.: Utilisation of aliphatic compounds by acidophilic heterotrophic bacteria. The potential for bioremediation of acidic wastewaters contaminated with toxic organic compounds and heavy metals, *FEMS Microbiology Letters*, 192, (2000) 185-190.

Gray, K.A., Pogrebinsky, O.S., Mrachko, G.T., Xi, L., Monticello, D.J., és Squires, C.H.: Molecular mechanisms of biocatalytic desulfurization of fossil fuels, *Nature Biotechnology*, 14, (1996) 1705–1709.

Goldman, E., és Green, L.H.: *Practical Handbook of Microbiology*, Second Edition, CRC Press (2008) ISBN 13: 9780849393655.

Gruiz, K.: A területhasználat, a környezeti kockázat és a természetes szennyező anyag csökkenés összefüggései, *Környezetvédelmi Füzetek*, BME OMIKK, Budapest, (2003) ISBN 9634207561.

Gruiz, K., és Molnár, M.: Biodegradáción alapuló remediáció, *Szerves szennyező anyagok biodegradációja*, BME, Oktatási segédlet
<http://oktatas.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/mezgaz/kornybio/elm/biodegradacio.doc>

Harayama, S., Kasai, Y., és Hara, A.: Microbial communities in oil-contaminated seawater, *Current Opinion in Biotechnology*, 15, (2004) 205–214.

Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y., és Shutsubo, K.: Petroleum biodegradation in marine environments, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1, (1999) 63–70.

Harayama, S., Kok, M., és Neidle, E.L.: Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases, *Annual Review of Microbiology*, 46, (1992) 565–601.

Hasanuzzaman, M., Umadhay, B. K. M., Zsiros, S.M., Morita, N., Nodasaka, Y., Yumoto, I., és Okuyama, H.: Isolation, identification and characterization of a novel oil degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* T1, *Current Microbiology*, 49 (2), (2004) 108-114.

Hassanshahian, M., Emtiazi, G., és Cappello, S.: Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea, *Marine Pollution Bulletin*, 64, (2012) 7–12.

Hayworth, J. S., Clement, T. P., és Valentine, J. F.: Deepwater Horizon oil spill impacts on Alabama beaches, *Hydrology and Earth System Sciences*, 15(12), (2011) 3639.

Hazen, T.C., Dubinsky, E.A., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Piceno, Y.M., Singh, N., Jansson, J.K., Probst, A., Borglin, S.E., és Fortney, J.L.: Deep-Sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria, *Science*, 330, (2010) 204–208.

Head, I.M., Jones, D.M., és Röling, W.F.M.: Marine microorganisms make a meal of oil, *Nature Reviews Microbiology*, 4, (2006) 173–182.

Hejnfelt, A., és Angelidaki, I.: Anaerobic digestion of slaughterhouse by-products, *Biomass and Bioenergy*, 33, (2009) 1046–1054.

Huang, L., Ma, T., Li, D., Liang, F., Liu, R.-L., és Li, G.: Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Rhodococcus erythropolis*, *Marine Pollution Bulletin*, 56, (2008) 1714–1718.

Inoue, A., és Horikoshi, K.A.: *Pseudomonas putida* thrives in high concentrations of toluene. *Nature*, 338, (1989) 264-266.

Jaeger, K.-E., és Eggert, T.: Lipases for biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology*, 13, (2002) 390–397.

Jáger, K., Borsodi, A., Felföldi, T., Makk, J., Márialigeti, K., Romsics, Cs., Tóth, E., Bánfi, R., Pohner, Zs., Vajna, B.: Bevezetés a prokarióták világába, (2013)
<http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/BevProkariotakVilagaba/index.html>

Ji, Y., Mao, G., Wang, Y., és Bartlam, M: Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases, *Front Microbiology*, 4:58 (2013).

Karpenko, E.V., Vil'danova-Martshishin, R.I., Shcheglova, N.S., Pirog, T.P., és Voloshina, I.N.: The prospects of using bacteria of the genus *Rhodococcus* and microbial surfactants for the degradation of oil pollutants, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42, (2006) 156–159.

Keenan, D., és Sabelnikov, A.: Biological augmentation eliminates grease and oil in bakery wastewater, *Water Environment Research*, 72, (2000) 141–146.

Kim, D., Kim, Y.-S., Kim, S.-K., Kim, S.W., Zylstra, G.J., Kim, Y.M., és Kim, E.: Monocyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, (2002) 3270–3278.

Kirby, M.F., és Law, R.J.: Oil spill treatment products approval: the UK approach and potential application to the Gulf region, *Marine Pollution Bulletin*, 56, (2008) 1243–1247.

Komukai-Nakamura, S., Sugiura, K., Yamauchi-Inomata, Y., Toki, H., Venkateswaran, K., Yamamoto, S., Tanaka, H., és Harayama, S.: Construction of bacterial consortia that degrade Arabian light crude oil. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82, (1996) 570–574.

Kosswig, K.: Surfactants. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, DOI: 10.1002/14356007.a25_747, (2000).

Kotani, T., Yamamoto, T., Yurimoto, H., Sakai, Y., és Kato, N.: Propane monooxygenase and NAD(+)-dependent secondary alcoholdehydrogenase in propane metabolism by *Gordonia* sp. strain TY-5, *Journal of Bacteriology*, 185, (2003) 7120-7128.

Koutrouli, E.C., Kalfas, H., Gavala, H.N., Skiadas, I.V., Stamatelatou, K., és Lyberatos, G.: Hydrogen and methane production through two-stage mesophilic anaerobic digestion of olive pulp, *Bioresource Technology*, 100, (2009) 3718–3723.

Kulikova, A.K., és Bezborodov, A.M.: Ethylene epoxidation by native and immobilized cells of the propane-assimilating culture *Rhodococcus erythropolis* 3/89, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 35, (1999) 543-547.

Kumar, S., Mathur, A., Singh, V., Nandy, S., Khare, S.K., és Negi, S.: Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease, *Bioresource Technology*, 120, (2012) 300–304.

Kuyukina, M.S., és Ivshina, I.B.: Application of *Rhodococcus* in bioremediation of contaminated environments, In *Biology of Rhodococcus*, *Microbiology Monograph*, 16, (2010) 231-262.

Lacotte, D. J., Mille, G., Acquaviva, M., és Bertrand, J.-C.: In vitro biodegradation of Iranian light 250 by a marine mixed culture using fertilizers as nitrogen and phosphorous sources, *Chemosphere*, 31, (1995) 4351–4358.

Laczi, K., Kis, Á., Horváth, B., Maróti, G., Hegedüs, B., Perei, K., és Rákhely, G.: Metabolic responses of *Rhodococcus erythropolis* PR4 grown on diesel oil and various hydrocarbons, *Applied Microbiology Biotechnology*, 99, (2015) 9745–59.

Landmeyer, J.E., és Bradley, P.M.: Effect of hydrologic and geochemical conditions on oxygen-enhanced Bioremediation in a gasoline-contaminated aquifer, *Bioremediation Journal*, 7, (2003) 165–177.

Leahy, J.G., és Colwell, R.R.: Microbial degradation of hydrocarbons in the environment, *Microbiological Reviews*, 54, (1990) 305–315.

Leal, M.C.M.R., Freire, D.M.G., Cammarota, M.C., és Sant'Anna Jr., G.L.: Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater, *Process Biochemistry*, 41, (2006) 1173–1178.

Lee, D.C.: Hydrocarbons, *Rosen's Emergency Medicine: Concepts and Clinical Practice*, 8th edition, Philadelphia, Elsevier Mosby, 158, (2013) ISBN 978-1-4557-0605-1.

Lee, E.-H., Kim, J., Cho, K.-S., Ahn, Y.G., és Hwang, G.-S.: Degradation of hexane and other recalcitrant hydrocarbons by a novel isolate, *Rhodococcus* sp. EH831, *Environmental Science and Pollution Research*, 17, (2009) 64–77.

Leitgib, L., Gruiz, K., Fenyvesi, É., Balogh, G., és Murányi, A.: Development of innovative soil remediation: „Cyclodextrin-enhanced combined technology”, *Science of The Total Environment*, 392, (2008) 12-21.

Lewander, W.J., és Aleguas, A. Jr.: Petroleum distillates and plant hydrocarbons, *Haddad and Winchester's Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose*. 4th edition, Philadelphia, Saunders Elsevier, 92, (2007) ISBN-13: 978-0721606934

Li, Y.Y., Sasaki, H., Yamashita, K., Seki, K., és Kamigochi, I.: High-rate methane fermentation of lipid-rich food wastes by a high-solids co-digestion process, *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 45, (2002) 143–150.

Lin, J.E., és Wang, H.Y.: Use of co-immobilised biological systems to degrade toxic organic compounds. *Biotechnology and Bioenergy*, 38, (1991) 273-279.

Lisitsyn, A.B., Chernukha, I.M., és Ivankin, A.N.: Comparative study of fatty acid composition of meat material from various animal species, *Scientific Journal of Animal Science*, 2, (2013) 124–131.

Liu, C.-W., és Liu, H.-S.: *Rhodococcus erythropolis* strain NTU-1 efficiently degrades and traps diesel and crude oil in batch and fed-batch bioreactors, *Process Biochemistry*, 46, (2011) 202–209.

Loftsson, T., Jarho, P., Másson, M., és Järvinen, T.: Cyclodextrins in drug delivery, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2, (2005) 335–351.

Loperena, L., Ferrari, M. D. és Diaz, A. L.: Isolation and selection of native microorganisms for the aerobic treatment of simulated dairy wastewaters, *Bioresource technology*, 100 (5), (2009)1762-1766.

Maier, T, Foerster, H.H., Asperger, O., és Hahn, U.: Molecular characterization of the 56-kDa CYP153 from *Acinetobacter* sp. EB104, *Biochemical Biophysics Research Communications*, 285, (2001) 652-658.

Maniatis T, Fritsch EF., és Sambrook J.: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory, (1982) DOI: 10.1002/jobm.19840240107.

Marchal, R., Penet, S., Solano-Serena, F., és Vandecasteele, J.P.: Gasoline and diesel oil biodegradation, *Oil & Gas Science and Technology*, 58, (2003) 441–448.

Margesin, R., és Schinner, F.: Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, (2001) 650–663.

Markossian, S., Becker, P., Märkl, H., és Antranikian, G.: Isolation and characterization of lipid-degrading *Bacillus thermoleovorans* IHI-91 from an icelandic hot spring, *Extremophiles*, 4, (2000) 365–371.

Marschner, B., és Kalbitz, K.: Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved organic matter in soils, *Geoderma*, 113, (2003) 211–235.

Mason, O.U., Hazen, T.C., Borglin, S., Chain, P.S.G., Dubinsky, E.A., Fortney, J.L., Han, J., Holman, H.-Y.N., Hultman, J., és Lamendella, R.: Metagenome, metatranscriptome and single-cell sequencing reveal microbial response to Deepwater Horizon oil spill, *The ISME Journal*, 6, (2012) 1715–1727.

Massé, D.I., és Masse, L.: Characterization of wastewater from hog slaughterhouses in Eastern Canada and evaluation of their in-plant wastewater treatment systems, *Canadian Biosystems Engineering*, 42 (3), (2000) 139-146.

Massé, D. I., Masse, L., Verville, A. és Bilodeau, S.: The start-up of anaerobic sequencing batch reactors at 20 °C and 25 °C for the treatment of slaughterhouse wastewater, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 76, (2001) 393–400.

Masse, L., és Massé, D.I.: Effect of soluble organic, particulate organic, and hydraulic shock loads on anaerobic sequencing batch reactors treating slaughterhouse wastewater at 20 °C, *Process Biochemistry*, 40, (2005) 1225–1232.

Matsumoto, M., de Bont, J.A.M., és Isken, S.: Isolation and characterization of the solvent-tolerant *Bacillus cereus* strain R1, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94, (2002) 45–51.

Matsuoka, H., Miura, A., és Hori, K.: Symbiotic effects of a lipase-secreting bacterium, *Burkholderia arboris* SL1B1, and a glycerol-assimilating yeast, *Candida cylindracea* SL1B2, on triacylglycerol degradation, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107, (2009) 401–408.

McGenity, T.J.: Hydrocarbon biodegradation in intertidal wetland sediments, *Current Opinion in Biotechnology*, 27, (2014) 46–54.

Meckenstock, R.U., von Netzer, F., Stumpp, C., Lueders, T., Himmelberg, A.M., Hertkorn, N., Schmitt-Kopplin, P., Harir, M., Hosein, R., Haque, S., és Schulze-Makuch, D.: Oil biodegradation, Water droplets in oil are microhabitats for microbial life, *Science*, 345, (2014) 673–676.

Mnif, S., Chamkha, M., Labat, M., és Sayadi, S.: Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria, *Journal of Applied Microbiology*, 111, (2011) 525–536.

Molnár M.: Szennyezett talaj ciklodextrinnel intenzifikált bioremediációja- tervezéstől az alkalmazásig, Ph.D. értekezés, Budapest (2006).

Mongkolthanaruk, W., és Dharmstithi, S.: Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50, (2002) 101–105.

Montadert, L.: From the field to the model bernard tissot's path, *Oil and Gas Science and Technology*, 58, (2003) 179–182.

Moriya, K., Horikoshi, K.: Isolation of a benzene-tolerant bacterium and its hydrocarbon degradation, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76, (1993) 168-173.

Müller, R., Antranikian, G., Maloney, S., és Sharp, R.: Thermophilic degradation of environmental pollutants, In *Biotechnology of Extremophiles*, *Biochemical Engineering/Biotechnology*, 61, (2006) 155–169.

Na, K., Kuroda, A., Takiguchi, N., Ikeda, T., Ohtake, H., és Kato, J.: Isolation and characterization of benzene-tolerant *Rhodococcus opacus* strains, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99, (2005) 378–382.

Naether, D.J., Slawtschew, S., Stasik, S., Engel, M., Olzog, M., Wick, L.Y., Timmis, K.N., és Heipieper, H.J.: Adaptation of the hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis* SK2 to alkanes and toxic organic compounds: a physiological and transcriptomic approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, (2013) 4282–4293.

Nagarajan, J., Nawawi, N., és Ibrahim, A.: *Rhodococcus* UKMP-5M, an endogenous lipase producing actinomycete from Peninsular Malaysia, *Biologia*, 69, (2014).

Nazina, T.N., Sokolova, D.S., Grigoryan, A.A., Shestakova, N.M., Mikhailova, E.M., Poltarau, A.B., Tourova, T.P., Lysenko, A.M., Osipov, G.A., és Belyaev, S.S.: *Geobacillus jurassicus* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a high-temperature petroleum reservoir, and the validation of the *Geobacillus* species, *Systematic and Applied Microbiology*, 28, (2005a) 43–53.

Nazina, T.N., Sokolova, D.S., Shestakova, N.M., Grigoryan, A.A., Mikhailova, E.M., Babich, T.L., Lysenko, A.M., Tourova, T.P., Poltarau, A.B. és Feng, Q.: The phylogenetic diversity of aerobic organotrophic bacteria from the dagang high-temperature oil field, *Microbiology*, 74, (2005b) 343–351.

Nga, D.P., Altenbuchner, J., és Heiss, G.S.: NpdR, a repressor involved in 2,4,6-trinitrophenol degradation in *Rhodococcus opacus* HL PM-1, *Journal of Bacteriology*, 186, (2004) 98–103.

Naether, D.J., Slawtschew, S., Stasik, S., Engel, M., Olzog, M., Wick, L.Y., Timmis, K.N., és Heipieper, H.J.: Adaptation of the hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis* SK2 to alkanes and toxic organic compounds: a physiological and transcriptomic approach, *Applied and Environmental Microbiology*, 79, (2013) 4282–4293.

Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M., és Antranikian, G.: Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, (1999) 711–729.

Nikolopoulou, M., és Kalogerakis, N.: Biostimulation strategies for fresh and chronically polluted marine environments with petroleum hydrocarbons, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84, (2009) 802–807.

Norris, D. R.: *Handbook of bioremediation*, CRC Press, (1993) ISBN 9781566700740.

Ogino, H., Miyamoto, K., és Ishikawa, H.: Organic solvent tolerant bacterium which secretes organic solvent stable lipolytic enzyme, *Applied and Environmental Microbiology*, 60, (1994) 3884–3886.

Ogino, H., Yasui, K., Shiotani, T., Ishihara, T., és Ishikawa, H.: Organic solvent tolerant bacterium which secretes an organic solvent stable proteolytic enzyme, *Applied and Environmental Microbiology*, 61, (1995) 4258–4262.

Oláh, J., Cserhádi, T., és Szejtli, J.: β -cyclodextrin enhanced biological detoxification of industrialwastewaters, *Water Research*, 22 (11), (1988) 1345–1352.

Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G.D., Olsen, G.J., Davis, J.J., és Disz, T.: The SEED and the rapid annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research*, 42, (2014) D206–14.

Paje, M.L.F., Neilan, B.A., és Couperwhite, I.: A *Rhodococcus* species that thrives on medium saturated with liquid benzene, *Microbiology*, 143, (1997) 2975–2981.

Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N., és Soccol, V.T.: The realm of microbial lipases in biotechnology, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29 (2), (1999) 119–131.

Patel, V., Patel, J., és Madamwar, D.: Biodegradation of phenanthrene in bioaugmented microcosm by consortium ASP developed from coastal sediment of Alang-Sosiya ship breaking yard, *Marine Pollution Bulletin*, 74, (2013) 199–207.

Perei, K., Pernyeszi, T., és Lakatos, Gy.: Bioremediáció, (2013)
http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011_0025_kor_4/adatok.html

Perfumo, B.R., Schieche, D.R., Grazia, P.M., Werner, J. és Palmer, S.: Microbial desulfurization of alkylated dibenzothiophenes from a hydrodesulfurized middle distillate by *Rhodococcus erythropolis* I-19, *Applied Environmental Microbiology*, 65, (2007) 4967–4972.

Pipek, P., Rohlík, B.-A., Potůček, P., és Šimoniová, A.: The composition of pork lard as a raw material in meat production, *Maso International*, (2012) 115–119.

Prasad, M.P. és Manjunath, K.: Comparative study on biodegradation of lipid-rich wastewater using lipase producing bacterial species, *Indian Journal of Biotechnology*, 10, (2011) 121–124.

Rajan, A., Kumar, D.R.S., és Nair, A.J.: Isolation of a novel alkaline lipase producing fungus *Aspergillus fumigatus* MTCC 9657 from aged and crude rice bran oil and quantification by HPTLC, *International Journal of Biological Chemistry*, 5, (2011) 116–126.

Ramos, J.L., Duque, E., Huertas, M.J., és Haïdour, A.: Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons, *Journal of Bacteriology*, 177, (1995) 3911–3916.

Reddy, C.M., Arey, J.S., Seewald, J.S., Sylva, S.P., Lemkau, K.L., Nelson, R.K., Carmichael, C.A., McIntyre, C.P., Fenwick, J., és Ventura, G.T.: Composition and fate of gas and oil released to the water column during the Deepwater Horizon oil spill, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, (2012) 20229–20234.

Reddy, M.S., Naresh, B., Leela, T., Prashanthi, M., Madhusudhan, N.C., Dhanasri, G., és Devi, P.: Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of *Brevibacillus* sp., *Bioresource Technology*, 101, (2010) 7980–7983.

Redmond, M.C., és Valentine, D.L.: Natural gas and temperature structured a microbial community response to the Deepwater Horizon oil spill, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, (2012) 20292–20297.

Rehm, H.-J., és Reed G.: *Biotechnology 11b, Environmental Processes*, Wiley-VCH, 150. oldal, (1999) ISBN 3-527-28323-4.

Rittmann, B.E.: Definition, objectives, and evaluation of natural attenuation, *Biodegradation*, 15, (2004) 349–357.

Rohman, A., Triyana K., Sismindari, és Erwanto Y.: Differentiation of lard and other animal fats based on triacylglycerols composition and principal component analysis, *International Food Research Journal*, 19 (2), (2012) 475-479.

Rojo, F.: Degradation of alkanes by bacteria, *Environmental Microbiology*, 11, (2009) 2477-2490.

Rosen, M.J., és Kunjappu, J.T.: *Surfactants and interfacial phenomena*, 4th edition, Wiley & Sons, (2012) ISBN 9780470541944.

Ruggieri, L., Artola, A., Gea, T., és Sánchez, A.: Biodegradation of animal fats in a co-composting process with wastewater sludge, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62, (2008) 297–303.

Sabirova, J. S., Ferrer, M., Regenhardt, D., Timmis, K. N. és Golyshin, P. N. Proteomic insights into metabolic adaptations in *Alcanivorax borkumensis* induced by alkane utilization. *Journal of Bacteriology*, 188, (2006) 3763–3773.

Sabirova, J.S., Becker A., Lünsdorf H., Nicaud J-M., Timmis K.N., és Golyshin P.N.: Transcriptional profiling of the marine oil-degrading bacterium *Alcanivorax borkumensis* during growth on n-alkanes: Transcriptomic responses of *Alcanivorax borkumensis*, *FEMS Microbiology Letters*, 319, (2011) 160–168.

Saifuddin, N., és Chua K.H.: Biodegradation of lipid-rich waste water by combination of microwave irradiation and lipase immobilized on chitosan, *Biotechnology*, 5, (2006) 315–323.

Salminen, E.A., és Rintala, J.A.: Semi-continuous anaerobic digestion of solid poultry slaughterhouse waste: effect of hydraulic retention time and loading, *Water Research*, 36, (2002) 3175–3182.

Sardessai, Y., és Bhosle, S.: Isolation of an organic-solvent-tolerant cholesterol-transforming *Bacillus* species, BC1, from coastal sediment, *Marine Biotechnology*, 5, (2003) 116–118.

Sardessai, Y.N. és Bhosle, S.: Organic solvent tolerant bacteria in mangrove ecosystem, *Current Science*, 82, (2002) 622–623.

Sardessai, Y.N., és Bhosle, S.: Industrial potential of organic solvent tolerant bacteria, *Biotechnology Progress*, 20, (2004) 655–660.

Sekine, M., Tanikawa, S., Omata, S., Saito, M., Fujisawa, T., Tsukatani, N., Tajima, T., Sekigawa, T., Kosugi, H., Matsuo, Y., Nishiko, R., Imamura, K., Ito, M., Narita, H., Tago, S., Fujita, N., és Harayama, S.: Sequence analysis of three plasmids harboured in *Rhodococcus erythropolis* strain PR4, *Environmental Microbiology*, 8, (2006) 334–346.

Semple, K.T., Doick, K.J., Jones, K.C., Burauel, P., Craven, A., és Harms, H.: Peer: Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated, *Environmental Science & Technology*, 38, (2004) 228 – 231.

Sharma, R., Chisti, Y., és Banerjee, U.C.: Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19, (2001) 627–662.

Singer, A.C., van der Gast, C.J., és Thompson, I.P.: Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation, *Trends in Biotechnology*, 23, (2005) 74–77.

Singh, H.: *Mycoremediation*, John Wiley and Sons, New Jersey, (2006) ISBN-13: 978-0-474-75501-2.

Sluis, M.K., Sayavedra, S.L.A., és Arp, D.J.: Molecular analysis of the soluble butane monooxygenase from *Pseudomonas butanovora*, *Microbiology*, 148, (2002) 3617–3629.

Smidsrod, O., és Skjak-Break, G.: Alginate as immobilization matrix for cells, *Trends in Biotechnology*, 8, (1990) 71–78.

Song, X., Xu, Y., Li, G., Zhang, Y., Huang, T., és Hu, Z.: Isolation, characterization of *Rhodococcus* sp. P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons, *Marine Pollution Bulletin*, 62, (2011) 2122–2128.

Spain, J. C., és van Veld, P. A.: Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: Effects of concentration, exposure time, inoculum, and chemical structure, *Applied Environmental Microbiology* 45, (1983) 428–435.

Stapleton, R.D., Savage, D.C., Sayler, G.S., és Stacey, G.: Biodegradation of aromatic hydrocarbons in an extremely acidic environment, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, (1998) 4180–4184.

Su, X., Guo, L., Ding, L., Qu, K., és Shen, C.: Induction of viable but nonculturable state in *Rhodococcus* and transcriptome analysis using RNA-seq, *Plos One*, 11 (1) (2016).

Sugimori, D., Nakamura, M., és Mihara, Y.: Microbial degradation of lipid by *Acinetobacter* sp. strain SOD-1, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66, (2002) 1579–1582.

Suzuki, T., Nakayama, T., Kurihara, T., Nishino, T., és Esaki, N.: Cold-active lipolytic activity of psychrotrophic *Acinetobacter* sp. strain no. 6, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92, (2001) 144–148.

Szeberényi, J.: Molekuláris sejtbiológia, Dialóg Campus Kiadó, (2011) ISBN 9789639950542.

Szejtli, J.: Cyclodextrin technology, 1st Edition, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, (1988) ISBN 9027723141.

Szoboszlai, S., és Kriszt, B.: Környezeti elemek védelme, Szent István Egyetemi Kiadó, (2010) ISBN I 978-963-269-177-0.

Takeda, H., Yamada, A., Miyauchi, K., Masai, E., és Fukuda, M.: Characterization of transcriptional regulatory genes for biphenyl degradation in *Rhodococcus* sp. strain RHA1, *Journal of Bacteriology*, 186, (2004) 2134–2146.

Tano-Debrah, K., Fukuyama, S., Otonari, N., Taniguchi, F., és Ogura, M.: An inoculum for the aerobic treatment of wastewaters with high concentrations of fats and oils, *Bioresource Technology*, 69, (1999) 133–139.

van Beilen, J.B., és Funhoff, E.G.: Expanding the alkane oxygenases toolbox: new enzymes and application, *Current Opininion in Biotechnology*, 16, (2005) 308-314.

van der Geize, R., Hessels, G.I., Nienhuis-Kuiper, M., és Dijkhuizen, L.: Characterization of a second *Rhodococcus erythropolis* SQ1 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase activity comprising a terminal oxygenase homologue, KshA2, active with oxygenase-reductase component KshB, *Applied and Environmental Microbiology*, 74, (2008) 7197–7203.

Vidali, M.: Bioremediation, An overview, *Pure and Applied Chemistry*, 73, (2001) 1163–1172.

Volkering, F., Breure, A.M., és Rulkens, W.H.: Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation, *Biodegradation*, 8, (1997) 401–417.

Wakelin, N.G., és Forster, C.F.: An investigation into microbial removal of fats, oils and greases, *Bioresource Technology*, 59, (1997) 37-43.

Wang, W., és Shao, Z.: Diversity of flavin-binding monooxygenase genes (AlmA) in marine bacteria capable of degradation long-chain alkanes, *FEMS Microbiology and Ecology*, 80, (2012) 523–33.

Wanner, J.: *Activated Sludge: Bulking and foaming control*, CRC Press, (1994) ISBN 12566761212.

Warhurst, A.M., és Fewson, C.A.: Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus*, *Critical Reviews in Biotechnology*, 14, (1994) 29–73.

Weber, F.J., Ooijkaas, L.P., Schemen, R.M., Hartmans, S., és de Bont, J.A.: Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to high concentrations of styrene and other organic solvents, *Applied and Environmental Microbiology*, 59, (1993) 3502–3504.

Whyte, L.G., Bourbonnière, L., Bellerose, C., és Greer, C.W.: Bioremediation assessment of hydrocarbon-contaminated soils from the high arctic, *Bioremediation Journal*, 3, (1999) 69–80.

Whyte, L.G., Smits, T.H.M., Labbe, D., Witholt, B., Greer, C.W. és Van Beilen, J.B: Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15 and NRRL B-16531, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, (2002) 5933-5942.

Williams, J.B., Clarkson, C., Mant, C., Drinkwater, A., és May, E.: Fat, oil and grease deposits in sewers: characterisation of deposits and formation mechanisms, *Water Research*, 46, (2012) 6319–6328.

Wu, L., Ge, G. és Wan, J.: Biodegradation of oil wastewater by free and immobilized *Yarrowia lipolytica* W29, *Journal of Environmental Sciences*, 21(2), (2009) 237-242.

Yakimov, M.M., Timmis, K.N., és Golyshin, P.N.: Obligate oil-degrading marine bacteria, *Current Opinion in Biotechnology*, 18, (2007) 257–266.

Internetes hivatkozás 1.: <http://www.novamatrix.biz/applications/alginate-applications/cell-encapsulation/>

10. MELLÉKLETEK

1. melléklet: Kármentesítési munkálatok kivitelezése terepen



1. kép: A kísérlethez felhasznált gázolajjal szennyezett talaj a székkutasi Új Élet Mezőgazdasági Szövetkezet telephelyén



2. kép: A PVC fóliával lefedett munkaterület



3. kép: A szennyezett talaj szalmával történő bekeverése



4. kép: A halmok kialakítása



5. kép: A kialakított halmok



6. kép: A gázolaj kijuttatása



7. kép: Oltóanyag kimérése

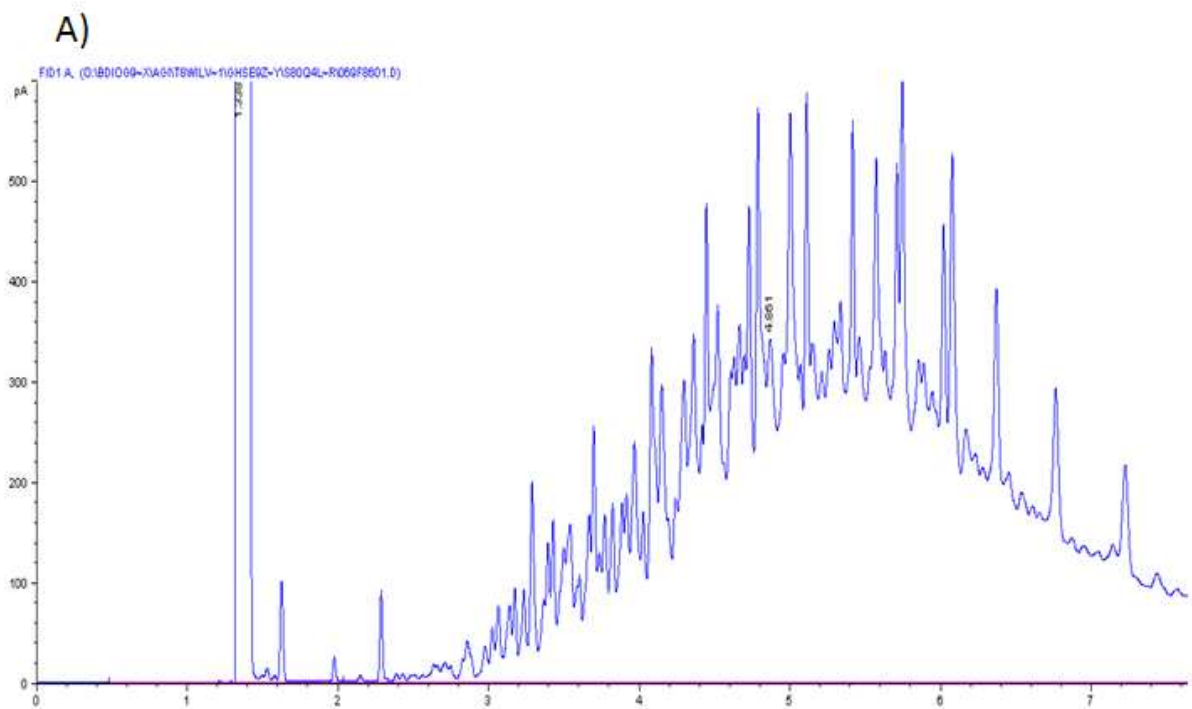


8. kép: A szennyezett halom minimál sós tápoldattal történő locsolása

2. számú melléklet: Mintavételi pontok kijelölése



3. számú melléklet: A gázolaj GC-MS analitikája. A) Gázolaj minta kromatogramja. B) Kalibráció: Elméleti- és mért szénhidrogén koncentráció a talajban



B)

