

**Mikroorganizmusok alkalmazása az olajiparban –  
az *Acinetobacter haemolyticus* AR-46 jelű, új *n*-alkánbontó  
törzs izolálása és karakterizálása**

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS**

**Szegedi Tudományegyetem**

**Környezettudományi Doktori Iskola**

**Készítette: Bihari Zoltán**

**Témavezető: Dr. Mécs Imre**

***Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közalapítvány***

***Biotechnológiai Intézet***

Szeged, 2006

# 1. TARTALOMJEGYZÉK

1. TARTALOMJEGYZÉK	2
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
2.1 A SZÉNHIDROGÉNEK ELŐFORDULÁSA KÖRNYEZETÜNKBEN	7
2.1.1 A szénhidrogének eredete és az általuk okozott környezetvédelmi problémák	7
2.1.2 A szénhidrogének főbb szennyező forrásai és csoportosításuk	8
2.2 A SZÉNHIDROGÉNEK MIKROBIÁLIS DEGRADÁCIÓJA	10
2.2.1 A poliaromás szénhidrogének lebontása	10
2.2.2 A monoaromás szénhidrogének biodegradációja	11
2.2.3 Az alifás szénhidrogének lebontása	12
2.2.3.1 Az aliciklusos szénhidrogének biodegradációja	12
2.2.3.2 Az olefinek (alkének) katabilizmusa	13
2.2.3.3 Az izoalkánok biodegradációja	13
2.3 A NORMÁL ALKÁNOK MIKROBIÁLIS LEBONTÁSA	14
2.3.1 A citokróm P450 (P-450) típusú enzimek	14
2.3.2 Szubterminális oxidációs enzimek	15
2.3.3 Vasat nem formában tartalmazó oxigenázok (non-heme iron oxygenases)	15
2.3.3.1 Rövid láncú szénhidrogéneket bontó, a vasat nem hem formában tartalmazó oxigenázok (short-chain non-heme iron oxygenases)	16
2.3.3.2 Membrán-kötött, integrális, a vasat nem hem formában tartalmazó oxigenázok (non-heme iron integral membrane oxygenases)	17
2.3.4 A normál alkánok anaerob lebontása	19

2.3.5 A normál alkánokbiodegradációjában szerepet játszó egyéb faktorok	19
2.4 AZ <i>ACINETOBACTER</i> TÖRZSEK <i>N</i> -ALKÁN BIODEGRADÁCIÓJA	21
2.4.1 Általános jellemzők	21
2.4.2 Az <i>Acinetobacter</i> törzsek által hasznosítható <i>n</i> -alkánok	22
2.4.3 A <i>n</i> -alkánbontás sebessége és kinetikai paraméterei	23
2.4.4 Alkánfelvételi mechanizmusok az <i>Acinetobacter</i> genusban	25
2.4.4.1 Alkán szolubilizáló anyagok szekréciója	25
2.4.4.2 Specifikus kitapadás	29
2.4.5 Az <i>Acinetobacter</i> törzsek <i>n</i> -alkán katabolizmusa	33
2.4.5.1 Citokróm P450-függő oxidáció	33
2.4.5.2 Membrán-kötött, integrális, a vasat nem hem formában tartalmazó oxigenázok	34
2.4.5.3 A Finnerty-lebontási út	34
2.4.6 Az <i>Acinetobacter</i> spp. alkán hidroxiláz-iniciált katabolizmusában szerepet játszó gének funkcionális analízise	35
2.4.6.1 Az <i>A. sp ADPI</i>	35
2.4.6.2 Az <i>A. sp M-1</i>	36
2.4.6.3 Az <i>A. venetianus 6A2</i>	37
2.5 MIKROORGANIZMUSOK OLAJIPARI ALKALMAZÁSA	40
2.5.1 Az olajipari biotechnológiai kutatások jövője	40
2.5.2 Az olajipari biotechnológia mai állása hazánkban	41
2.5.3 Bioremediációs kutatások Intézetünkben	42
2.6 CÉLKITŰZÉS	43

<b>3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b>	<b>44</b>
3.1 TAXONÓMIAI KARAKTERIZÁLÁS	44
3.1.1 Biokémiai meghatározás	44
3.1.2 16S rDNS analízis	45
3.2 A BAKTÉRIUMTÖRZSEK NÖVESZTÉSI KÖRÜLMÉNYEI	46
3.2.1 Az üzemi technológiák során használt törzsek növesztési körülményei	46
3.2.2 Az AR-46 jelű törzs növesztése	47
3.3 ALKALMAZOTT ANALITIKAI ELJÁRÁSOK	49
3.3.1 Analitika a bakteriális kútkezelési technológia hatásainak értékelésére	49
3.3.1.1 Gázkromatográfiás mérések	49
3.3.1.2 Termelvényminták viszkozitásának mérése	50
3.3.1.3 Termelvényminták bakteriális emulzióbontásának mérése	50
3.3.1.4 Vízminták oldott oxigén-tartalmának mérése	50
3.3.1.5 Vízminták anion-összetételének mérése	51
3.3.2 Analitika az AR-46 jelű törzs alkán-degradációs folyamatának nyomonkövetésére	51
3.3.2.1 Degradációsebesség és intermedie- analízis gázkromatográfiás mérésekkel	51
3.3.2.2 A növekedési kinetika és a sejtek hidrofobicitásának spektrofotometriás mérése	52
3.3.2.3 A n-hexadekánon növesztett AR-46 törzs felülűszóinak analízise a termelődő extracelluláris anyagok kimutatására	53
3.3.2.4 Az AR-46 sejtekben jelen lévő alkán oxidázok enzimaktivitásának mérése	54
3.4 FOTOGRAFÍÁS ÉS MIKROSKÓPIÁS DOKUMENTÁCIÓ	56
3.5 MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREK	57

3.5.1 DNS manipuláció	57
3.5.1.1 Általános technikák	57
3.5.1.2 Az AR-46 jelű törzs <i>alkM</i> génjének amplifikálása	58
3.5.1.3 A teljes <i>alkM</i> gén és a vele szomszédos gének amplifikálása inverz PCR-rel	59
3.5.2 A kapott szekvenciák szoftveres analízise	59
3.5.3 <i>alkM</i> -paralógok keresése az AR-46 genomjában	60
3.5.3.1 A PCR termék denaturáló gradien elektroforetikus analízise	60
3.5.3.2 Southern hibridizáció	61
3.5.4 Az <i>alkM</i> gén funkcionális analízise	61
3.5.4.1 Northern blot analízis	61
3.5.4.2 Kísérlet az AR-46 jelű törzs <i>alkM</i> knock-out mutánsának előállítására	62
<b>4. EREDMÉNYEK</b>	<b>65</b>
4.1 A KÚTKEZELÉSI TECHNOLÓGIA EREDMÉNYEI	65
4.1.1 Az üzemi kísérletek megalapozása, előzmények	65
4.1.2 A paraffinmentesítési technológia vázlata	68
4.1.3 A technológia eredményeinek értékelése	70
4.2 AZ AR-46 JELŰ TÖRZS IZOLÁLÁSA ÉS IDENTIFIKÁLÁSA	79
4.2.1 Izolálás screenvizsgálatokkal	79
4.2.2 16S rDNS alapú identifikálás	80
4.2.3 A törzs biokémiai identifikálása	81
4.3 AZ AR-46 JELŰ TÖRZS ALKÁNBONTÁSI MECHANIZMUSA	83
4.3.1 A szénhidrogénbontó képesség vizsgálata	83
4.3.2 Az <i>A. haemolyticus</i> AR-46 <i>n</i> -alkánfelvételi mechanizmusa	88
4.3.3 Az <i>A. haemolyticus</i> AR-46 <i>n</i> -hexadekán katabolizmusa	90

4.3.3.1 Az oxigenázok enzimaktivitásának vizsgálata	90
4.3.3.2 Lebontási intermedierek kimutatása	91
<b>4.4 AZ AR-46 JELŰ TÖRZS ALKÁNBONTÓ KÉPESSÉGÉNEK</b>	
<b>GENETIKAI HÁTTERE</b>	94
4.4.1 Az <i>alkM</i> gén azonosítása	94
4.4.2 Az <i>alkM</i> gén paralógjainak keresése az AR-46 jelű törzsben	96
4.4.3 Az <i>alkM</i> gén funkcionális analízise	98
4.4.4 Az <i>alkM</i> génnel szomszédos, az alkánbontásban valószínűleg szerepet játszó gének azonosítása	100
<b>5. DISZKUSSZIÓ</b>	102
<b>6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	110
<b>7. IRODALOMJEGYZÉK</b>	112
<b>8. ÖSSZEFOGLALÁS</b>	128
<b>9. SUMMARY</b>	133

## **2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS**

### **2.1. A SZÉNHIDROGÉNEK ELŐFORDULÁSA KÖRNYEZETÜNKBEN**

#### **2.1.1. A szénhidrogének eredete és az általuk okozott környezetvédelmi problémák**

Szénhidrogéneknek nevezzük a szűkebb értelemben kizárólag szénből és hidrogénből felépülő szerves vegyületeket. Keletkezésüknek alapvetően három típusát ismerjük. Geokémiai folyamatok során, magas nyomáson és hőmérsékleten, évmilliók alatt keletkeztek legfontosabb fosszilis energiahordozóink, a kőolaj és a földgáz. Szénhidrogének ma is hatalmas mennyiségben keletkeznek élő rendszerekben, ilyen például a mikróbák, vagy a kérődző állatok anyagcseréje során felszabaduló metán, vagy pl. a növényi eredetű gyanták. A harmadik típusba a modern vegyipar által előállított anyagok, pl. a műanyagok és egyéb szintetikus szerves vegyületek tartoznak.

Az emberi tevékenységnek azonban nemcsak a szénhidrogének keletkezésére, hanem azok környezetbe való kikerülésére is igen jelentős hatása van. Az üvegházhatást előidéző metán koncentrációja az elmúlt 200 évben duplájára emelkedett (Mancinelli, 1995), és emellett évente kb. 35 millió tonna olaj jut a tengerekbe. Meglepő módon a környezetbe kikerülő olaj döntő többsége kommunális és ipari szennyvizekből, vezeték és tartályszivárgásokból származik, az óriás tankerhajók katasztrófáiból „csak” 1 millió tonna olaj károsítja környezetünket.

Hazánkban a hivatalos adatok szerint (Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium honlapja, 2005) a regisztrált legalább 30-40000 szennyező forrás döntő többsége

szénhidrogén-szennyezés, az összes 29%-a ásványolaj eredetű. Az Országos Környezeti Kármentesítési Program adatai szerint 2005-re a szénhidrogén-szennyezés 2.7-3 millió m<sup>3</sup> talajra és 1-1.2 millió m<sup>3</sup> talajvízre terjedt ki. Csak a talajvíz felszínén úszó szénhidrogén mennyisége 5500-6000 m<sup>3</sup>-re tehető. A remediációs munkálatok a várakozások szerint legalább 30-40 évig fognak tartani, amelynek becsült költsége 1000 milliárd forint.

### **2.1.2 A szénhidrogének főbb szennyező forrásai és csoportosításuk**

A legfontosabb források a szovjet csapatok távozásával itt maradt, főleg kerozinnal szennyezett talajok, az olajipari technológiák során fellépő tartályszivárgások, a csővezetékek „megfűrése” során kiömlő, illetve az ipari üzemek (finomítók, vegyipari cégek, gyógyszergyárak) területéről kiinduló talaj- és vízszennyezések.

A szénhidrogének döntő többsége a szénhidrogén-bányászat során kerül a felszínre, mely a két legfontosabb természetes forrás, a kőolaj és a földgáz kitermelésére és földolgozására épül. A kőolaj (ásványolaj) elemi összetétel szerint 83,9-86,8 m% C-t, 11,1-14,0 m% H-t, 0,08-1,82 m% O-t, 0,02-1,70 m% N-t, 0,06-8,00 m% S-t és 0-0,14 m% fémet tartalmaz (Magyar Ásványolaj Szövetség honlapja, 2006). A rendkívül bonyolult összetételű kőolajat az olajvizsgáló laboratóriumokban fiziko-kémiai tulajdonságai alapján osztályozzák. A pentánban oldódó rész a főként alkánokból álló paraffin-frakció. A nyersolaj pentánban oldhatatlan részét általában szén-diszulfidban oldják vissza és szervesen szorbensen - pl. szilikagél - átvezetve kapják meg az aszfaltén frakciót, mely főként poliaromás szénhidrogénekből (PAH) áll. A töltetről a bonyolult oldalláncokat és sok funkció csoportot tartalmazó óriásmolekulákat pl. toluollal lehet leszorítani, így kaphatjuk meg az olaj maltén (gyanta) frakcióját. Az egyes frakciók egymáshoz viszonyított tömegaránya jól jellemzi az



olajokat, magas alkántartalmú, ún. paraffinos olajok találhatóak az algyői és a közel-keleti mezőkben, míg magas aszfaltén-maltén tartalmú, ún. nafténes olajokat bányásznak hazánkban Zalában, ill. külföldön pl. Texasban. Technológiai szempontból a csoportosítás az ásványolaj frakcionált lepárlása során keletkező termékek alapján történik. A legkönnyebb (Fp. 50-210 °C) a C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> alkánok keverékeként előálló motorbenzin párlat, majd a petróleum (180-270 °C, C<sub>11</sub>-C<sub>12</sub>), melynek különlegesen tisztított formája a kerozin. A gázolaj (250-360 °C, C<sub>13</sub>-C<sub>15</sub>) vagy Diesel-olaj leválasztása után kapott maradék a pakura, amelyet fűtőolajként eltüzelnek, vagy vákuumdesztillációjával kenőolajat, ill. krakkolásával Diesel-olajat állítanak elő.

A földgáz a földkéreg porózus rétegeiben ásványolajjal együtt, vagy nélküle előforduló, főként metánból álló gáz. Míg a metán mellett előforduló propánt, butánt és izobutánt cseppfolyósítva hozzák forgalomba (PB-gáz), addig a nagyobb, folyékony komponenseket tartalmazó elegyet a technológiai folyamat során leválasztják, külön csővezetéken szállítják és gyakran a motorbenzinekhez keverik. Ez az elegy az ún. gazolin, mely C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub> alkánok és aromás vegyületek keveréke. Ez utóbbiak közé tartozik a benzol, toluol, etilbenzol, xilol (BTEX) és a különböző szubsztituált monoaromások (jellemzően alkilbenzolok) is.

Ahogy az előbbi esetben is jól látszik, a szénhidrogének egyes technológiai-gyakorlati csoportjai leírhatóak az összetevők szerves kémiai, tudományos csoportosítása alapján is. Az alifás vegyületek közül a normál alkán homológ sor első tagjai jellemzően a földgázban (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) és a kőolaj különböző lepárlási frakcióiban (C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>), míg a hosszabb alkánok a paraffinfrakcióban (pakurában) fordulnak elő. Mindhárom elegy kis mennyiségben tartalmaz izo- és cikloalkánokat és olefineket is. A monoaromás vegyületek a gazolin, a poliaromás vegyületek pedig az aszfaltén fő komponensei. A különböző szénhidrogének mikrobiális lebontási útvonalait szintén ez utóbbi szerves kémiai csoportosítás alapján mutatjuk be.

## 2.2. A SZÉNHIDROGÉNEK MIKROBIÁLIS BIODEGRADÁCIÓJA

### 2.2.1 A poliaromás szénhidrogének lebontása

A PAH vegyületekről régóta közismert toxikus, mutagén és karcinogén hatásuk. Közülük 16, 2-5 gyűrűs vegyület szerepel az USA Környezetvédelmi Ügynökségének, az EPA-nak a legveszélyesebb szennyező anyagokat tartalmazó listáján. Ezen vegyületek az élő természetben rendkívül perzisztensek, köszönhetően vízben való alacsony oldhatóságuknak és szilárd részecskékhez történő erős adszorpciós képességüknek. Mégis számos baktérium képes egyedüli szén- és energiaforrásként történő felhasználásukra.

Aerob körülmények között a legegyszerűbb PAH modellvegyület, a naftalin, a naftalin dioxygenáz enzim hatására cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidronaftalinné oxidálódik, ami egy négylépcsős folyam során szaliciláttá alakul. A szalicilátból catechol, vagy gentizát képződik, amelyek orto, vagy meta helyzetű gyűrűhasítás után végül a citromsavciklus különböző intermediereivé alakulnak. A naftalinhoz hasonlóan a 3 gyűrűs fenantrén és antracén is szaliciláton, míg a 4 gyűrűs pirén orto-ftaláton, vagy cinnamáton keresztül bomlik le. A legszélesebb körben tanulmányozott PAH bontó törzs a *Pseudomonas putida* G7, amelynek naftalin katabolizmusáért felelős génjei 3 operonba rendezve a 83 kilobázisos (kb) NAH7 jelű plazmidon kódoltak. Ugyanakkor számos más Gram-negatív és Gram-pozitív törzs esetében a PAH bontás azonosított génjei kromoszómán kódoltak (Habe és Omori, 2003).

Anoxikus környezetben és nitrát jelenlétében többek között a *Pseudomonas stutzeri* NAP-3-1 és a *Vibrio pelagius* NAP-4 jelű törzsek tiszta tenyészetek is képesek voltak naftalinbontásra, bár a reakció pontos mechanizmusa ismeretlen (Rockne *et al.*, 2000). A PAH

katabolikus utak legfontosabb köztiterméke, a szalicilát szintén lebomlik anaerob körülmények között. A butánbontásra és denitrifikációra is képes (Kesserű *et al.*, 2002 és 2003) *Pseudomonas butanovora* szalicilát hidroxiláz enzimének segítségével katekolt állít elő, amely a katekol-2,3-dioxigenáz enzim hatására meta-helyzetű gyűrűhasítással 2-hidroximukonát szemialdehiddé alakul. Ez a sárga színű intermedier a  $\beta$ -ketoadipát útvonalon keresztül bomlik tovább, és a reakció végül a citromsavciklusba torkollik. Az anaerob biodegradáció során az átalakuló  $\text{NO}_3^-$  - N : szalicilát molarány az eredmények alapján megfelelt az előre elvárt sztöchiometrikus 1 : 1-nek (Kesserű *et al.*, 2005).

### **2.2.2 A monoaromás szénhidrogének biodegradációja**

A monoaromás szénhidrogének aerob lebontására számos, biokémiai és genetikai szinten is jól jellemzett reakcióút létezik. Ezek közül a legismertebb a *Pseudomonas* törzsekre jellemző, TOL plazmidon kódolt *xyl*-gének által meghatározott katabolizmus. A lebomlási út első részében a xilol-monooxigenáz (XylMA), a benzil-alkohol dehidrogenáz (XylB) és a benzaldehid dehidrogenáz (XylC) által katalizált reakciók eredményeként benzoát keletkezik, amely meta-helyzetű hasítását és további konverzióját a plazmidon kódolt *xylXYZLTEGFJQKIH* gének termékei végzik el (Burlage, 1989). Abban az esetben, ha a benzoát orto-helyzetben hasad és így a  $\beta$ -ketoadipát útvonalon keresztül alakul tovább, az ezen reakciókért felelős gének általában a kromoszómán helyezkednek el (Nakazawa és Yokota, 1973). A BTEX-bontásra képes különböző Gram-negatív genusok (*Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*) egyes törzsei is nagy katabolitikus diverzitást mutatnak, amelyet az elbontandó szubsztrát típusa is befolyásol, de általánosságban elmondható, hogy a lebontási folyamatok benzoáton, 3-, vagy 4-metilkatekolon, esetleg vanilláton keresztül

haladnak és mind az orto-, mind a meta-helyzetű gyűrűhasítás végbemehet, néha egymás mellett is.

A monoaromások anaerob környezetben történő lebontását a *Thaurea aromatica* és az *Azoarcus* fajokban részletesen vizsgálták. Toluol esetében egy speciális enzimreakcióban az aromás komponenshez fumársav kapcsolódik, amiből így benzil-szukcinát képződik, amelyhez egy transzferáz által koenzim A (CoA) kofaktor kötődik. Néhány további lépést követően benzoil-CoA keletkezik, amely egyben a többi BTEX vegyület köztiterméke is. A benzoil-CoA ezután acetil-koenzim A (Ac-CoA) egységekre bomlik, amely ebben a formában tud kapcsolódni a sejtek energiatermelő folyamataiba (Boll *et al.*, 2002).

### **2.2.3 Az alifás szénhidrogének lebontása**

#### 2.2.3.1 Az aliciklusos szénhidrogének biodegradációja

Bár a ciklikus alkánok a kőolaj és a gázolin viszonylag jelentős mennyiségben előforduló összetevői, alig néhány izolátum képes ezeknek a komponensek a lebontására (Ridgway *et al.*, 1990). Ilyen például a *Rhodococcus ruber* CD4, amely egy monooxygenáz enzim segítségével első lépésben aliciklusos alkoholt, majd ennek redukálásával a megfelelő ketont állítja elő. Ez az ún. Baeyer-Villiger monooxygenáz segítségével oxidálódik tovább egy  $\omega$ -hidroxizsírsavat képezve, amely már gyorsan tovább metabolizálódik (Schumacher és Fakoussa, 1999). A Baeyer-Villiger monooxygenázt kódoló gént megtalálták egy-egy ciklikus alkánt bontó *Brevibacterium* (Brzostowicz *et al.*, 2000) és *Acinetobacter* (Chen *et al.*, 1998) törzsben is.

### 2.2.3.2 Az olefinek (alkének) katabolizmusa

A telítetlen kettős kötést tartalmazó alifás vegyületek jóval ritkábbak, de reaktívabbak alkán párjuknál. Mikrobiális lebomlásukat a prosztetikus csoportként vasat nem hemformában tartalmazó oxigenázok (non-heme iron oxygenases) végzik. Ilyen enzimek a következő fejezetben ismertetett alkén monooxigenázok, szolubilis és membrán-kötött metán monooxigenázok, vagy a különböző membrán-kötött integrális alkán monooxigenázok, amelyek preferált szubsztrátja általában valamely *n*-alkán. Ez alól kivétel pl. a *Rhodococcus rhodochrous* B-276, amely csak alkének epoxidálására képes és alkán-oxidációra egyáltalán nem. A terminális olefinek nemcsak szubsztrátjai pl. a *Pseudomonas putida* GPo1 membrán-kötött integrális alkán monooxigenáz epoxidációs reakciójának (Katopodis *et al.*, 1984), hanem kiváló inducerei is lehetnek az alkán monooxigenáz transzkripciójának, mint azt az *Acinetobacter* sp. ADP1 esetében láthatjuk (Ratajczak *et al.*, 1998b).

### 2.2.3.3 Az izoalkánok biodegradációja

Az elágazó szénláncú alkánok fontos összetevői a különböző kőolajszármazékoknak, lebontásuk hasonló a *n*-alkánokéhoz. A következő fejezetekben részletesebben taglalt, enzimkatalizált oxidációs folyamatok eredményeképpen a megfelelő karbonsavvá alakulnak, amely aztán  $\beta$ -oxidációval tovább metabolizálódik és CoA kofaktorhoz kapcsolt formában lép be a Krebs-ciklusba. Egyes baktériumtörzsek képesek a nyersolajban is megtalálható, de teljesen elágazó szerkezete miatt a legtöbb mikroba számára már hozzáférhetetlen prisztán (2,6,10,14-tetrametil-pentadekán) (Kunihiro *et al.*, 2005), illetve szkvalén (2,6,10,15,19,23-hexametil-tetrakoza-2,6*E*,10*E*,14*E*,18*E*,22-hexaén) (Bogan *et al.*, 2003) hasznosítására is.

## 2.3 A NORMÁL ALKÁNOK MIKROBIÁLIS LEBONTÁSA

Ez a fejezet tulajdonképpen az előző 2.2.3.4 pontjaként értelmezendő, de mivel a *n*-alkánok a természetes eredetű szénhidrogének legfontosabb és legnagyobb mennyiségben jelen lévő komponensei, és a nyersolajjal szennyezett talajok és talajvizek megtisztítása laboratóriumi mérettől egészen a terepi beavatkozásig gyakorlatilag az alkánok biodegradációját jelenti, így lebontásuk általános sémáját és lehetőségeit ebben a külön fejezetben foglaltuk össze. A disszertáció gerincét is egy rendkívül hatékony új alkánbontó törzs, az *Acinetobacter haemolyticus* AR-46 jellemzése adja, ezért csak az *Acinetobacter* genusra jellemző alkán-biodegradáció még részletesebb bemutatása a következő (2.4) fejezet témája.

A *n*-alkánok aerob degradációs útvonala, a fent említett többi szénhidrogénhez hasonlóan egy oxidációs reakcióval indul. Az oxidáció láncon belüli helye alapvetően az oxidációt katalizáló enzim típusától függ. Ennek alapján 3 nagy csoport különíthető el.

### 2.3.1 Citokróm P450 (P-450) típusú enzimek

Ezek az enzimek a mikrobákban az emlősökéhez képest jóval szűkebb szubsztrátspecifitással rendelkeznek, legtöbbjükét élesztőkben találták meg. Számos ortológjuk közül csak néhányról sikerült bebizonyítani, hogy valóban alkánbontásért felelősek, pl. *Candida rugosa*-ban (Ohkuma *et al.*, 1998) és *Yarrowia lipolytica*-ban (Iida *et al.*, 2000). A terminális alkán-oxidációs aktivitáson túl egyes törzsekben, pl. a *Candida maltosa*-ban olyan különleges, aspecifikus enzim (P450 52A3) van jelen, amely a *n*-alkánokból aldehideket,

zsírsavakat,  $\alpha$ - $\omega$ -diolokat,  $\omega$ -hidroxizsírsavakat és  $\alpha$ - $\omega$ -dikarbonsavakat is képez (Scheller *et al.*, 1998). Ilyen, ún. diterminális (biterminális) oxidációra találunk példát baktériumok – pl. az *Acinetobacter* sp. OC4 (Fujii *et al.*, 2006) esetében is. A diterminális alkán-oxidáció jelensége a három másik ismert és fontos baktériumtörzsnél, a Gram-pozitív *Rhodococcus rhodochrous* ATCC 19067-nél (Cardini és Jurtschuk, 1968) és a Gram-negatív *Acinetobacter calcoaceticus* EB104-nél (Müller *et al.*, 1989), valamint az *Alcanivorax borkumensis* SK2-nél (Kubota *et al.*, 2005) nem tapasztalható, ezek a törzsek csak  $\omega$ -helyzetű oxidációra képesek.

### 2.3.2 Szubterminális oxidációs enzimek

Ebbe a típusba csak néhány mikroba tartozik, így ennek az átalakulásnak szinte csak elméleti jelentősége van. Az oxidációs folyamat során *Burkholderia cepacia*-ban és *Pseudomonas aeruginosa* Sol 20-ban *n*-tridekánból szekunder-alkohol (2-tridekanol), majd keton (2-tridekanon) keletkezik (Forney és Markovetz, 1970). Utóbbi egy Baeyer-Villiger monooxygenáz hatására undecil-acetáttá alakul, melyet egy észteráz 1-undekanollá és acetáttá hasít (Shum és Markovetz, 1974). Az undekanol azután tovább oxidálódik undekánsavvá, mely belép a  $\beta$ -oxidációs ciklusba.

### 2.3.3 Vasat nem hem-formában tartalmazó oxigenázok (non-heme iron oxygenases)

Ezen oxigenázok nagy csoportja két alcsoportra bontható: a rövid láncú szénhidrogéneket bontó és a membrán-kötött, integrális, a vasat nem hem-formában tartalmazó oxigenázok csoportjára. Ez utóbbival rendelkeznek az alkánbontó baktériumok nagy része, ezáltal a tudományos és gazdasági szempontból egyaránt legjelentősebb törzsek.

2.3.3.1 Rövid láncú szénhidrogéneket bontó, a vasat nem hem-formában tartalmazó oxigenázok (short-chain non-heme iron monooxygenases)

**A.** Ide tartoznak a metán-metanol átalakítást végző szolubilis metán monooxigenázok (sMMO), melyek két eklatáns példáját a *Methylococcus capsulatus*-ból, ill. a *Methylosinus trichosporium* OB3b-ből izolálták. Ezek egy hidroxilázból, egy ún. Protein B effektorból és egy reduktázból állnak. A hidroxiláz  $\alpha$ -alegysége egy nem-hem jellegű, bisz- $\mu$ -hidroxo-kötött binukleáris vas központot tartalmaz, ahol a metán és az oxigén interakciója során képződik a metanol (Lipscomb, 1994). Az enzimszisztéma extrém széles szubsztrátspecifitással rendelkezik, alkánok, alkének és aromás vegyületek oxidációjára is képes.

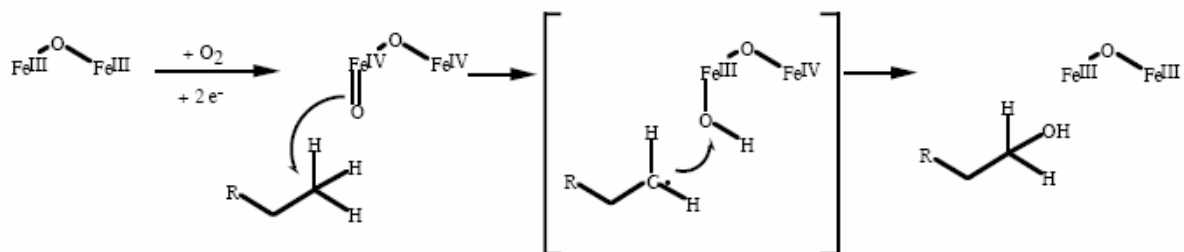
**B.** A membrán-kötött, ún. pMMO szemben az sMMO-val főként magas réz/biomassza arányánál expresszálódik a metanotrófokban. Három alegységből áll és két vas- és kb. 15 rézatomot tartalmaz mólonként. Viszonylag szűk specifitással bír, maximum 5 szénatomig oxidál alkánokat és alkéneket, de aromásokat egyáltalán nem.

**C.** Harmadik csoportjukba az alkén-monooxigenázok tartoznak. A *Xanthobacter* sp. Py2 (Small és Ensign, 1997) és a már említett *Rhodococcus rhodochrous* B-276 enzimei egyaránt kétkomponensű epoxigenázból, egy reduktázból és egy kapcsoló proteinből állnak, amelyek enantioszelektíven epoxidálják az alkéneket, de alkán hidroxilálásra nem képesek.



### 2.3.3.2 Membrán-kötött, integrális, a vasat nem hem-formában tartalmazó oxigenázok (non-heme iron integral membrane oxygenases)

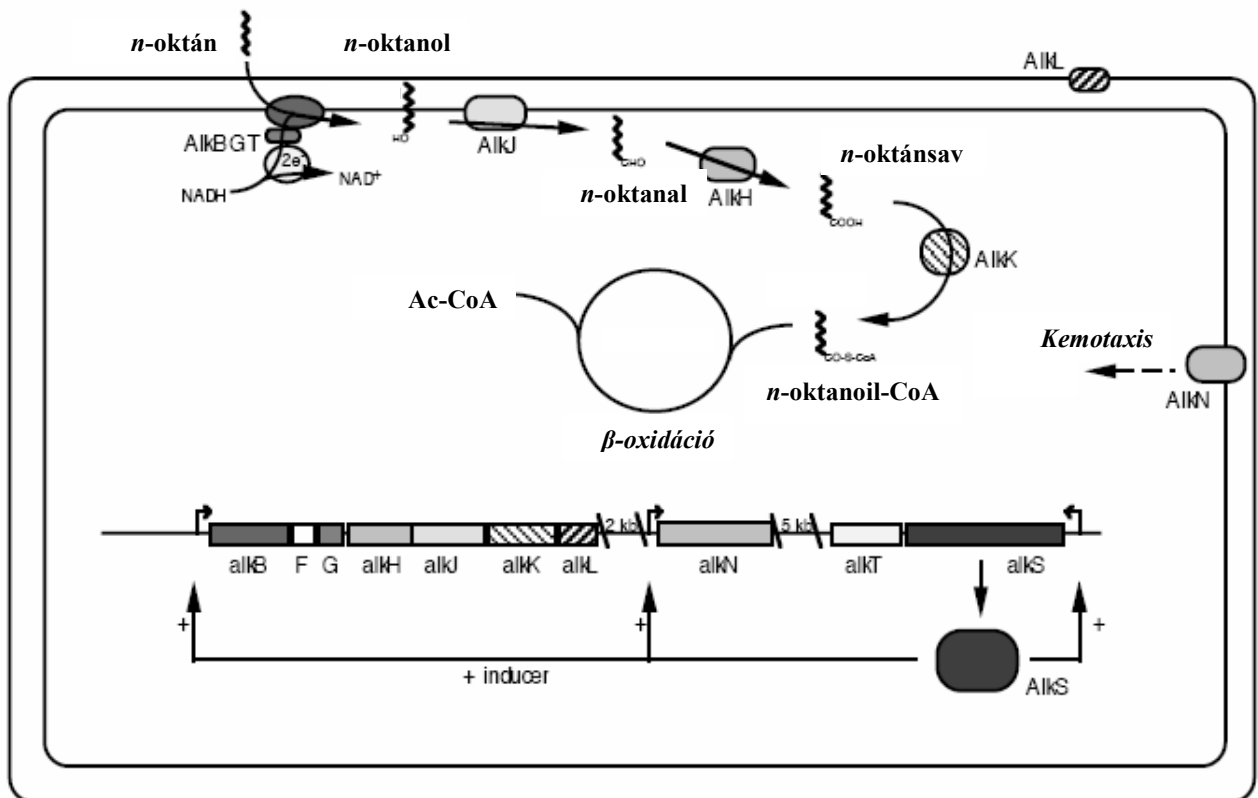
Ennek az enzimsaládnak a legrészletesebben vizsgált prototípusa a *Pseudomonas putida* (*oleovorans*) GPO1 alkán monooxygenáza (hidroxiláza). A fehérjének 6 transzmembrán régiója van, a katalitikus hely két vasiont tartalmaz, amelyek koordinációjában 3 szekvencia-motívumban található 8 konzervált hisztidin vesz részt: HX<sub>3-4</sub>H, HX<sub>2-3</sub>HH, HX<sub>2-3</sub>HH. Itt a reakció első lépéseként a légköri oxigénből a NADH két elektronjának segítségével egy Fe<sup>IV</sup>-oxo köztitermék képződik, amely az alkán terminális C-atomját támadja (Austin *et al.*, 2000). A C-OH kötés kialakulásakor az alkilgyök megbontja a Fe<sup>III</sup>-O kötést, amelynek másik elektronja a szomszédos vasra kerül át, így a katalizátor regenerálódik (**1. ábra**).



**1. ábra** Az alkán hidroxiláz katalitikus modellje (Smits, 2001)

Az enzim képes a *n*-pentántól *n*-dodekánig terjedő alkánok, különböző aliciklusos vegyületek hidroxilálására, a terminális alkoholok aldehiddé oxidálására (McKenna és Coon, 1970), valamint a terminális olefinek már említett epoxidációjára is. A törzs valamennyi, a *n*-alkántól egészen CoA-aktivált *n*-alkánsavig történő konverzióért felelős génje az OCT plazmidon található, két külön klaszterben (Chakrabarty *et al.*, 1973). Az első klaszter *alkBFGHJKL*

operonja tartalmazza a 3 komponensű alkán hidroxiláz enzimkomplex két elemét, az alkán hidroxilázt (*alkB*) és a rubredoxint (*alkG*). A többi gén kódolja a katabolikus út további enzimeit, az aldehid dehidrogenázt (*alkH*), az alkohol dehidrogenázt (*alkJ*), az acil-CoA-szintetázt (*alkK*) és egy membrán proteint (*alkL*) (van Beilen *et al.*, 1992). A másik klaszterben található az alkán hidroxiláz enzimkomplex harmadik elemét, a rubredoxin reduktázt (AlkT), illetve az *alkBFGHJKL* operon expresszióját reguláló fehérjét (AlkS) kódoló gén (2. ábra). Az *alkS* gén egy  $\sigma^S$  promóter kontrollja alatt áll, amely az exponenciális fázis alatt alacsony, míg a stacioner fázis alatt magasabb transzkripció szintet alakít ki. Emellett azonosítottak azonban egy másik, az *alkS* expressziót pozitívan kontrolláló promóter is (Canosa *et al.*, 2000).



2. ábra A *Pseudomonas putida* (*oleovorans*) GPO1 alkán degradációja (Smits, 2001)

Mint a fenti ábrán is jól látszik, az alkánok lebontása során képződő zsírsavakból a sejt  $\beta$ -oxidációval acetyl-coenzim A-t állít elő, amelynek oxidációjából energiát nyerhet, azonban a zsírsavak egy része közvetlenül a membránok felépítésére fordítódik. A megfigyelések szerint a páratlan szénatomszámú alkán szubsztrátokból kiindulva a keletkező páratlan szénatomszámú zsírsavak inkább foszfolipid-alkotórészekként lesznek jelen, míg a páros szénatomszámú alkánok nagyobb mennyiségű páros szénatomszámú zsírsavat eredményeznek (Doumenq *et al.*, 2001).

#### **2.3.4 A normál alkánok anaerob lebontása**

Az utóbbi pár évben derült fény ilyen folyamatok létezésére, jelen tudásunk szerint csak néhány delta-Proteobaktérium képes a hexántól eikozánig terjedő alkánok anoxikus mineralizációjára. A katabolikus folyamatok teljes egészében még nem ismertek, de a Hxd3 jelű törzsben egy karboxilációs reakció megy végbe, amit mutat, hogy még páros szénatomszámú alkánokból is páratlan szénatomszámú zsírsavakat képez. Egy másik szulfátredukáló törzs, az AK-01 esetében a lebomlás fumarát-addícióval indul (Callaghan *et al.*, 2006). Sikerült izolálni denitrifikáló körülmények között is néhány hexadekán-bontó törzset, illetve ezek konzorciumát (Ehrenreich *et al.*, 2000). Mikroaerofil denitrifikációval azonban a *Pseudomonas*-ok is hatékonyan bontanak alkánokat (Chayabutra és Ju, 2000).

#### **2.3.5 A n-alkánok biodegradációjában szerepet játszó egyéb faktorok**

Mint láthattuk, a n-alkánok oxidációjának színtere a plazmamembrán, vagy esetleg az intracelluláris tér, ezért a biodegradáció sebesség-meghatározó lépése gyakran nem is az

oxidációs folyamatok sebessége, hanem magának az alkánszubsztrátnak a penetrációs sebessége a sejt oxidázaihoz. Az alkánok vízoldhatósága az összes szénhidrogén közül a legkisebb mértékű, és a szénatomszámuk növekedésével csökken. A szobahőmérsékleten folyékony *n*-alkánok (C<sub>5</sub>-C<sub>16</sub>) minimális mértékben, de a szilárdak (>C<sub>16</sub>) már egyáltalán nem oldódnak. Mivel sűrűségük kisebb a víznél, vizes rendszerekben gyakorlatilag teljes mennyiségük a felszínen úszó film, vagy szilárd diszpergált formában van jelen. Ez különösen a folyékony alkánoknál, vagy pl. a nyersolajnál okoz gondot, mivel a szénhidrogén-film gátolja az oxigén diffúzióját a légből a vizes fázisba, ezáltal csökkentve az aerob katabolizmus hatékonyságát.

Az alkánok hozzáférhetőségének, szolubilizációjának növelése a mikrobák számára létfontosságú. Erre evolúciósan alapvetően két mechanizmus alakult ki. Az első esetében a baktériumok sejtfelszínének hidrofóbbá válása és a sejtek szubsztráthoz történő kitapadása segíti elő a hatékonyabb *n*-alkán felvételt. Ez főként az *Acinetobacter* genusra jellemző, a különböző folyamatok részletes ismertetését a 2.4 fejezet tartalmazza. A másik mechanizmus alkán-szolubilizáló anyagok szekrécióján alapul. Ilyen anyagok különféle biopolimerek, vezikulák, vagy felületaktív anyagok lehetnek. Az előbbi kettő szintén az *Acinetobacter*-ekben, míg az utóbbi a *Bacillus* (Christova *et al.*, 2004) és főleg a *Pseudomonas* fajokban gyakori. A legismertebb és leggyakrabban előforduló ilyen biotenzid a *Pseudomonas aeruginosa* törzsekre jellemző ramnolipid 1 és 2, amely szerkezetileg (L-ramnozil)<sub>1,2</sub>- $\beta$ -hidroxidekanoil- $\beta$ -hidroxidekanoát (Zhang és Miller, 1994 és 1995). Ezek az anyagok erősen csökkentik a vizes oldat felületi feszültségét (69-ről 19-30 mN/m-re), ezáltal növelik az alkán oldhatóságát és a szolubilizált szubsztrát felvételi sebességét a sejtfelszínen, bár maga a sejtfelszín az ilyen folyamatok során is hidrofil marad (Bouchez-Naitali *et al.*, 1999).

## 2.4 AZ *ACINETOBACTER* TÖRZSEK *N*-ALKÁN BIODEGRADÁCIÓJA

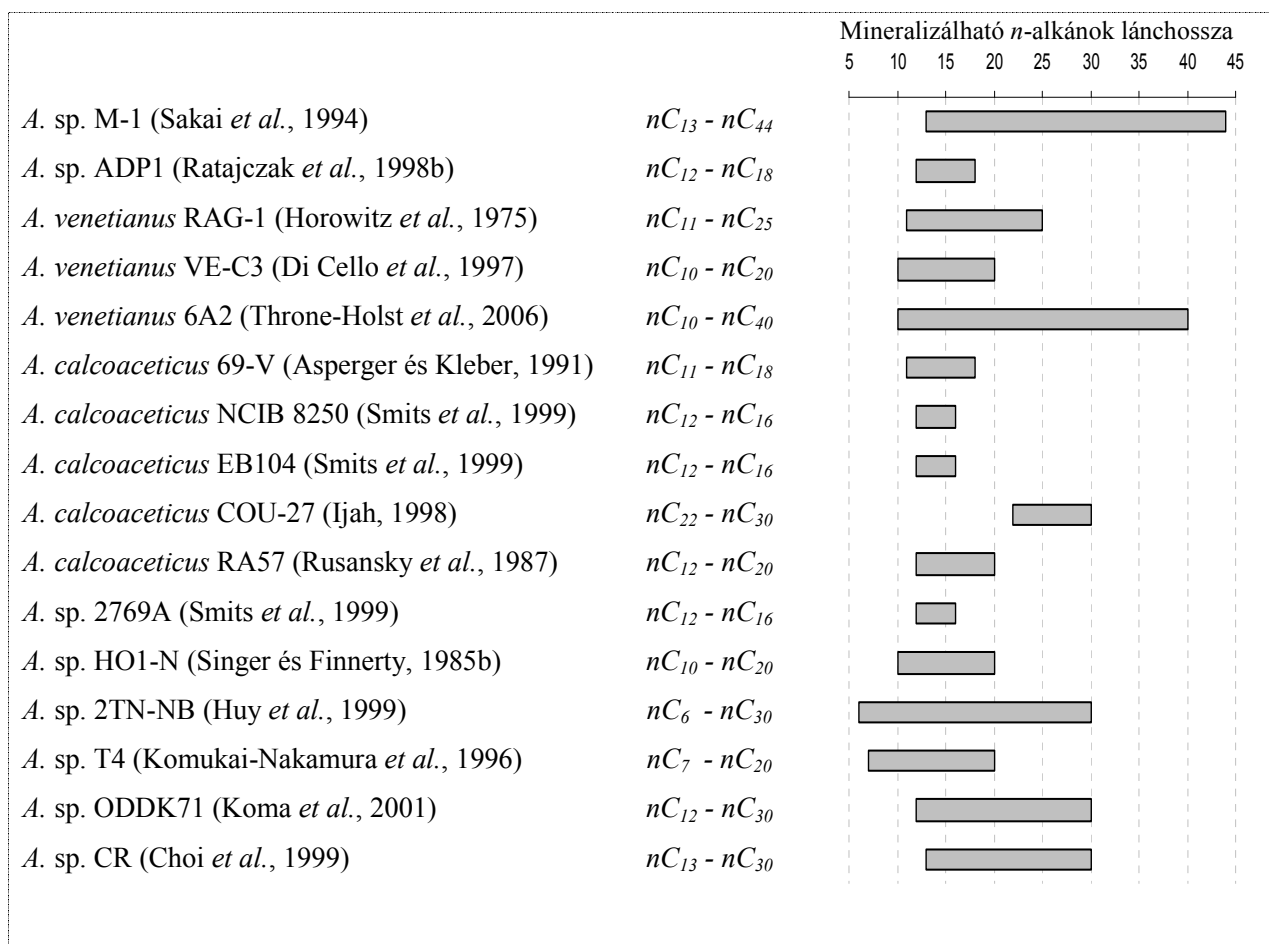
### 2.4.1 Általános jellemzők

Az *Acinetobacter* genus a *Gamma-Proteobaktériumok Pseudomonadales* rendjének *Moraxellaceae* családjába tartozik. Nyolc legismertebb faja az *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. lwoffii*, *A. radioresistens* és az *A. venetianus*. A nemzetségbe tartozó izolátumok 16S rDNS (Ibrahim *et al.*, 1997) és *gyrB* (DNS giráz  $\beta$ -alegység, Yamamoto *et al.*, 1999) génjeinek szekvencia-analízise alapján 21, ill. 18 genetikai csoportba oszthatóak, és klasszikus biokémiai analízissel is differenciálhatóak (Bergey, 1993; Vaneechoutte *et al.*, 1999). Az *Acinetobacter*-ek 0.9-1.6  $\mu\text{m}$  átmérőjű és 1.5-2.5  $\mu\text{m}$  hosszú, oxidáz-negatív és kataláz-pozitív Gram-negatív rövid pálcák, amelyek a növekedés stacioner fázisában inkább gömb alakúak. Bár aktív mozgásra képtelenek, - innen származik nevük is: a görög *akinetos* szó mozgásképtelent jelent – azonban bizonyos „rángatózó mozgásra” valószínűleg poláris csillóik révén képesek. Minden törzsük jól növekszik valamennyi komplex tápközegben 20 és 30 °C közötti hőmérsékleten, hőmérsékleti optimumuk általában 33-35 °C. Ásványi sókat és egyedüli szénforrásként etanolt, acetátot, laktátot, piruvátot, malátot vagy  $\alpha$ -ketoglutarátot tartalmazó tápközegben jól növeszthetőek, viszont legtöbbjük nem hasznosítja a glükózt. Denitrifikációra általában képtelenek, anaerob körülmények között nem tenyészthetőek. Nagy mennyiségben fordulnak elő talajban és vizekben, becslések szerint a teljes heterotróf aerob baktériumpopuláció legalább 0.001 %-t teszik ki (Bergey, 1993).

## 2.4.2 Az *Acinetobacter* törzsek által hasznosítható *n*-alkánok

Ebbe a genusba tartozó, alap- és alkalmazott kutatási szempontból egyaránt jelentős érdeklődésre számot tartó, különleges alkánbontó képességű törzsek izolálása és karakterizálása a 60-as évektől egészen napjainkig nagy erővel folyik. Az általuk metabolizálható legrövidebb *n*-alkán a  $C_6H_{14}$  (Huy *et al.*, 1999), míg a leghosszabb a  $C_{44}H_{90}$  (Sakai *et al.*, 1994). A tudományos vagy technológiai szempontból fontos, a szakirodalomban leírt *Acinetobacter* fajok által felhasználható normál szénhidrogének spektrumát mutatja be a

### 3. ábra.



3. ábra Az *Acinetobacter* spp. által mineralizálható *n*-alkánok

A nemzetségbe tartozó törzsek szubsztrátpreferenciája általában a  $nC_{10}$ - $nC_{20}$  tartományban mozog, de látható módon jelentős eltéréseket mutat. Ezt a szűk, közepes vagy hosszú láncú alkántartományt más genusok tagjai, főként a *Pseudomonas*-ok is képesek hatékonyan hasznosítani. Azonban ahogy a fenti ábra is mutatja, számos olyan *Acinetobacter* izolátumot (pl. *A. sp.* M-1, *A. venetianus* 6A2, *A. sp.* 2TN-NB) is találunk, amelyek nemcsak széles szubsztrátspecifitással bírnak, hanem a nagyon hosszú szénláncú szilárd *n*-alkánok biodegradációjára is képesek. Az ebbe a genusba tartozó törzsek különlegessége többek között éppen ebben áll, hiszen ezt a baktériumok közül kizárólag egyes *Acinetobacter*-ek tudják megvalósítani, megalapozva ezzel kiemelt biotechnológiai alkalmazhatóságukat.

### **2.4.3 A *n*-alkánbontás sebessége és kinetikai paraméterei**

Bár az *A. spp.* köztudottan hatékony szénhidrogén-bontásra képesek, és alkán-szolubilizációs mechanizmusaik hatékonysága folytán a szubsztrátfelvétel általában nem sebességmeghatározó - és így a lebomlásra alkalmazható a Monod-modell (Sinclair és Cantero, 1990) - a kinetikai paraméterek meghatározása bonyolult. Ennek fő oka az, hogy kétfázisú rendszerrel van dolgunk, a vizes oldat felszínén elhelyezkedő alkánfilmből (szilárd paraffinból, nyersolajból stb.) a fermentációra hatással nem lévő, reprezentatív minta nem nyerhető. Így hiába egyszerű a bakteriális biomassza tömegének (fehérjetartalmának, esetleg sejtszámának) nyomonkövetése a növekedési görbe pontjaiban, minden egyes ilyen pontban a maradó alkán-koncentráció méréséhez a teljes kísérleti rendszer extrakciójára van szükség legalább 3 párhuzamosban. Ez természetesen nagyszámú, azonos időpillanatban azonos sejtszámmal indított, azonos körülmények között inkubált rendszert jelent, amely nemcsak technikai nehézséget jelent, hanem viszonylag nagyobb szórást is eredményez.

Éppen ezért sajnós a törzsek biodegradációs képességének objektív összehasonlítását lehetővé tevő kinetikai adatok a szakirodalomból nem állnak rendelkezésre, viszont más módszerrel az *A. sp.* CR törzs ilyen paraméterei meghatározhatóak voltak. Szilárd *n*-heneikozánt ( $nC_{21}H_{44}$ ) az izolátum számára degradálhatatlan prisztánban (tápközeg 1%-a) oldottak fel és az így előállított, már mintavételezhető modellolaj biodegradációját vizsgálták aerob fermentorban 27 °C-on. A szubsztrátkoncentrációt, az aerációt és az adagolt Triton X-100 tenzid koncentrációját változtatva a maximális specifikus növekedési sebesség ( $\mu_m$ ) 0.60  $h^{-1}$ , míg a yield faktor (Y)  $2.7 \times 10^{15}$  sejt  $kg^{-1}$ -nek adódott (Choi *et al.*, 1999; Hori *et al.*, 2002).

Emellett azonban számos, technológiai szempontból fontos *A. spp.* nyersolaj biodegradációs sebességéről van adatunk, amelyek ugyan nem alkalmasak a törzsek abszolút értékelésre, de az alkalmazott körülmények közötti hatékonyságáról sokat elárulnak (**1. táblázat**).

**1. táblázat** *Acinetobacter* izolátumok nyersolaj-degradációs hatékonysága

Törzs neve	Nyersolaj koncentráció (%)	Degradáció mértéke (%)	Hőmérséklet (°C)	Inkubációs idő (nap)	Kiindulási és elért sejtszám (sejt/ml)
<i>A. venetianus</i> RAG-1 (Horowitz <i>et al.</i> , 1975)	0.06	52.8	32	3	$10^4 - 10^8$
<i>A. calcoaceticus</i> COU-27 (Ijah, 1998)	1	45.5	30	16	nincs adat
<i>A. sp.</i> 2TN-NB (Huy <i>et al.</i> , 1999)	5	63.4	37	1	nincs adat
<i>A. sp.</i> T4 (Komukai-Nakamura <i>et al.</i> , 1996)	0.4	41.0	20	10	$3 \times 10^6 - 7 \times 10^8$
<i>A. sp.</i> ODDK71 (Koma <i>et al.</i> , 2001)	1	80	25	3	nincs adat



A táblázatból egyértelműen a nagy biodegradációs sebességgel és széles szubsztrátspektrummal (v.ö. **3. ábra** adataival) rendelkező *A. sp.* 2TN-NB törzs látszik a leghatékonyabbnak, de sajnos további karakterizálását a szerzők nem végezték el. Szembetűnő viszont, hogy a bontás a többi törzssel ellentétben magasabb hőmérsékleten, 37 °C-on folyt.

Pontosan ennek a kérdésnek a tisztázása, vagyis az *Acinetobacter*-ek alkán degradációjának hőmérsékletfüggése szintén teljes mértékben hiányzik a szakirodalomból. Az izolátumokat rutinszerűen 30 °C-on inkubálják, de mint azt itt és később is láthatjuk, ez komoly hibákat hordozhat magában, hiszen a hőmérséklet-optimum nem feltétlenül 30 °C.

#### **2.4.4 Alkánfelvételi mechanizmusok az *Acinetobacter* genusban**

Mint ahogy erre az előző fejezetekben (2.4.3 ill. 2.3.4) már utaltunk, az *A. spp.* fajokban a hatékony alkán biodegradáció eléréséhez létfontosságú, alapvetően két típusba sorolható alkán szolubilizációs-felvételi mechanizmus fejlődött ki az evolúció során.

##### 2.4.4.1 Alkán-szolubilizáló anyagok szekréciója

*2.4.4.1A* Számos törzs szekretál olyan biopolimereket, amelyek a standard módszer (Rosenberg *et al.*, 1979) szerint emulzifikációs aktivitást mutatnak. Ezeknek tenzid hatása is van, tehát a vizes oldat felületi feszültségét 69-ről 41-49 mN/m-re csökkentik, de ezzel jóval elmaradnak a klasszikus *Bacillus* és *Pseudomonas* biotenzid-értékektől (l. 2.3.4) és inkább extracelluláris emulzifikáló anyagoknak tekinthetők. Az *A. sp.* 2TN-NB (Huy *et al.*, 1999), *A. junii* L1 (Menezes Bento *et al.*, 2005) és *A. sp.* HO1-N (Leahy *et al.*, 2003) törzsek felülúszóiból izolált anyagok pontos szerkezete bár nem ismert, úgy tűnik hasonló felépítésű

lipoheteropoliszaharid-fehérje komplexek, mint az *A. venetianus* RAG-1 által termelt emulzán. Ez egy D-galaktózaminból, L-galaktózamino-uronsavból, dideoxi-diaminohexózból ill. 2- és 3-hidroxi-dodekán-savból N-acil és O-észterkötésekkel összekapcsolódó, kb. 990 kDa molsúlyú, anionos, kapszuláris apoemulzánnak nevezett biopolimerből és hozzá nem kovalens módon kapcsolódó 10-20 %-nyi fehérjéből áll. A fehérjefrakció felelős az aktivitás feléért, egyik legfontosabb eleme egy extracelluláris észteráz, melynek funkciója a biopolimer deacetilálása (Bach *et al.*, 2003). A RAG-1 sejtek a szaporodásuk exponenciális fázisában emulzán-szerű polimereket halmoznak fel a sejt felszínén. A hozzájuk kapcsolódó fehérjék aktivitásának köszönhetően a molekulák közötti keresztkötések megszűnnek, és főleg a kevertetés mechanikai hatására a növekedés stationer fázisában a kialakult emulzán kijut az extracelluláris térbe. A sejt felszínen rögzült és a szabad emulzán kémiai és immunokémiai is identikus. Az emulzán felszabadulása fenotipikus változásokban is megnyilvánul, a tok vastagsága drasztikusan lecsökken (Pines *et al.*, 1983). Az emulzán komplex a sejtek száraztömegének 15-20 %-át is kiteheti, képes 100-1000-szer annyi alifás-aromás szubsztrát elegyének hatékony emulgeálására is, azonban a tiszta alifás, vagy aromás vegyületekére nem (Rubinovitz *et al.*, 1982).

A RAG-1 emulzánhoz hasonlóan etanol szénforráson növesztett *A. sp.* BD4 jelű törzs által termelt ún. BD4 emulzán is a kapszulából (tokból) jut az extracelluláris térbe, de ez utóbbi esetében ennek során a kapszuláris biopolimer mennyisége nem csökken le, hanem konstans marad. A poliszaharid rész zsírsavakat (O-acil csoportokat) nem tartalmazó, 4:1:1:1 molarányú ramnózból, glükózból, mannózból és glükuronsav heptaszaharid egységekből áll. Sem ez a poliszaharid- sem a fehérjefrakció nem aktív önmagában, azonban együttesen igen. A BD-4 jelű törzsből származó BD413 (*A. sp.* ADP1-nek felel meg) mini-kapszuláris mutáns glükóz tápoldaton nevelve csak a vad törzs exopoliszaharid mennyiségének 25 %-át képes

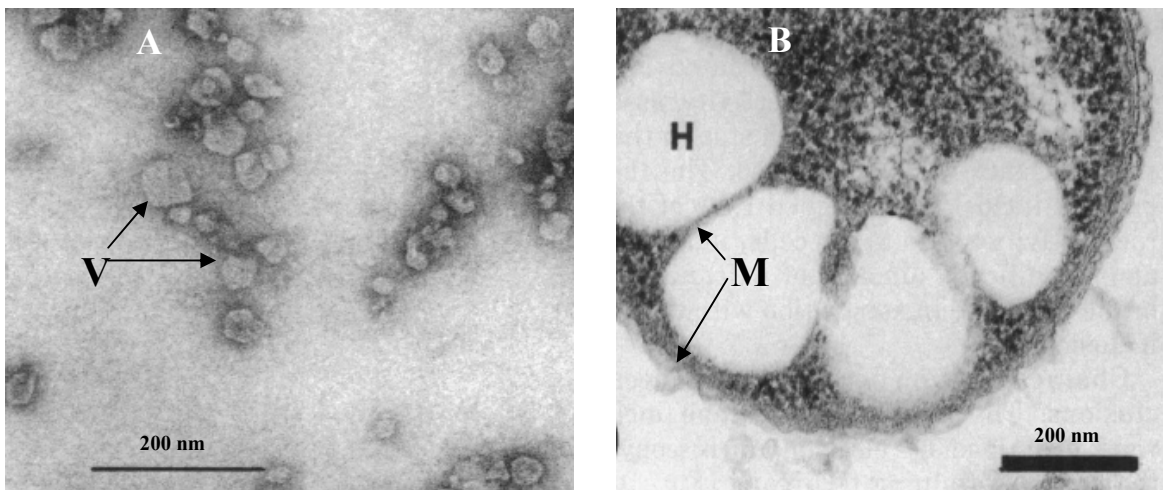
megtermelni, azonban ennek 50 %-át képes szekretálni, míg a vad törzs csak 10 %-ot. Az ADP1 törzs ilyen körülmények között egyszerre termel poliszaharidot és fehérjét, ezáltal aktív bioemulzifikáló anyagot, míg a vad törzs csak poliszaharidot, így felülűszójának nincs aktivitása (Kaplan *et al.*, 1987).

Az *A. radioresistens* KA53 esetében az alazán nevű poliszaharid-fehérje komplex választódik ki. A poliszaharid komponens az N-acetil-glükózaminon, N-acetil-galaktózaminon és diamino-diszaharidon kívül, itt kovalensen kötött alanin egységeket is tartalmaz. A proteinfrakció kulcsfontosságú a szerkezetben és a funkcióban. Az apoalazán inaktív, míg egyedülálló módon 3 kapcsolódó fehérjének is van emulzifikáló hatása. Ezek közül a legnagyobb, 11 %-kal még az intakt alazánnál is magasabb aktivitása egy 45 kDa-os proteinnek van, mely az *Acinetobacter* genusban általánosan előforduló membránfehérje az OmpA (Toren *et al.*, 2001 és 2002).

**2.4.4.1B** A polimereken kívül a másik fontos szekretált bioemulzifikáló anyagcsoportot a membránnal borított vezikulumok jelentik. Hexadekánon nevelt *A. sp.* HO1-N sejtek felülűszói a mérések alapján 110-szer annyi hexadekánt tartalmaznak, mint a kontroll tápoldat. A felülűszó ultracentrifugálással való szeparációját követően a megoszlási mérések alapján a 20-50 nm átmérőjű vezikulumokat (**4A ábra**) tartalmazó, kiülepedő frakció köti a szubsztrát nagy részét, és több mint tízszer annyi szubsztrátot képes szolubilizálni, mint a ki nem ülepedő rész. A vezikulumok polipeptid-összetétele hasonló a külső membránéhoz, de annál jóval foszfolipid- gazdagabb, ahol főként a foszfátidil-etanolamin mennyisége kiugró. A vezikulumok egyben lipopoliszaharid-gazdagok is, a magas 2-keto-3-deoxioktánsav (KDO) mennyiség jellemző rájuk (Kappeli és Finnerty, 1979). Ilyen vezikulumokat izoláltak még az

*A. sp.* 69-V (Borneleit *et al.*, 1988) és az *A. venetianus* RAG-1 jelű törzsekből is (Leahy *et al.*, 2003).

Utóbbi szerző cikkében rámutat a bioemulzifikáló anyagok és a vezikulumok szekréciója közti összefüggésre is. Láthattuk, hogy a bioemulzifikáló anyagok termelése alkán hiányában (etanol szénforráson) is teljes, ásványi anyagokat feleslegben tartalmazó tápoldatban ezek szerepe főként a sejtek hidrofób alkán szubsztrátról való deszorbeálásában és az alkán-felvétel elősegítésében rejlik. Ilyen körülmények között a vezikulumok által szolubilizált, membránba burkolt szénhidrogének az intracelluláris térbe bejutva zárványok formájában halmozódnak fel (**4B ábra**). Kedvezőtlen, ásványi anyag-limitált tápközegben, a sejt hasznos anyagainak megóvása érdekében mind a vezikulumok, mind az emulzifikáló anyagok termelése lecsökken, ugyanakkor ez utóbbi specifikus emulzifikációs aktivitása jelentősen megnő akár az *A. sp.* HO1-N, akár az *A. venetianus* RAG-1 esetében.

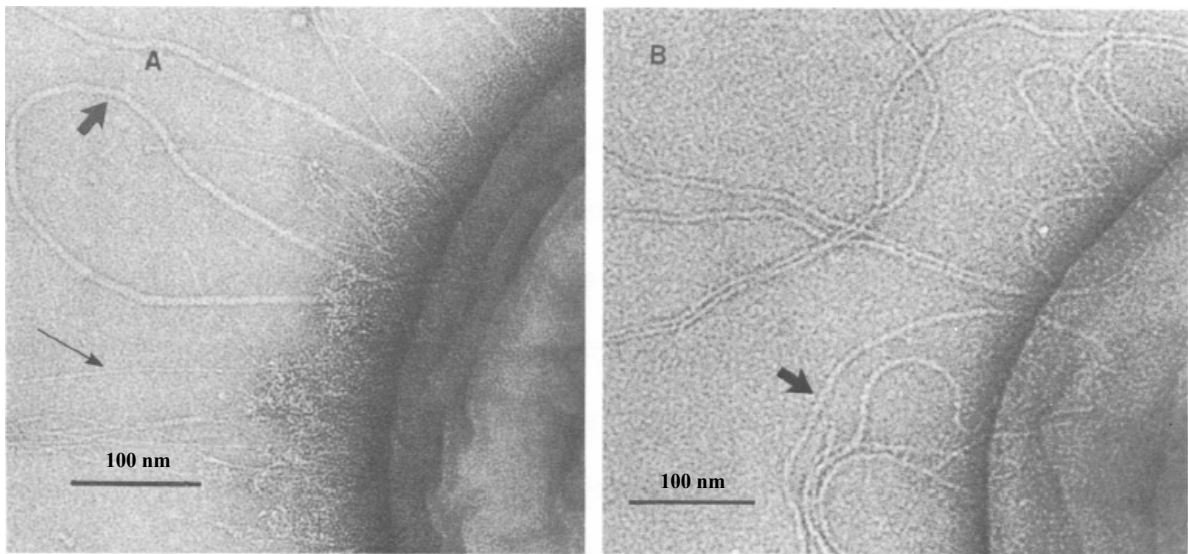


**4. ábra** Az *A. sp.* HO1-N sejtek extracelluláris, membránnal borított vezikulumainak (A) és zárványainak (B) elektronmikroszkópos képe. V: vezikulumok, H: hexadekán-zárvány, M: külső ill. vezikula membrán. Forrás: Kappeli és Finnerty, 1979 ill. Scott és Finnerty, 1976.

#### 2.4.4.2 Specifikus kitapadás

A másik nagy alkán szolubilizációs mechanizmus-típus a baktériumsejtek alkáncseppek felszínén történő specifikus kitapadásán alapszik. Ilyen módszer önmagában is elég lehet a megfelelő szubsztrátfelvételi sebesség eléréséhez, azonban gyakran mindkét nagy csoport elemei egy törzsben párhuzamosan figyelhetők meg. Ez utóbbira eklatáns példa az előzőekben is említett és részletesen tanulmányozott *A. venetianus* RAG-1. A törzs egy MR-481 jelű spontán mutánsa ugyan megfelelő módon szekretálja az emulzánt, ugyanakkor képtelen kitapadni különböző szénhidrogének felszínére. Nem rázatott kultúrában az MR-481 nem képes *n*-hexadékan szubsztráton növekedni, jelezve ezzel a kitapadási képesség alapvető fontosságát a RAG-1 izolátumban (Rosenberg és Rosenberg, 1981). A transzmissziós elektronmikroszkópiás (TEM) felvételek tanúsága szerint a vad RAG-1 törzs sejtfelszínén 3.5 nm átmérőjű vékony és 6.5 nm átmérőjű vastag csillók egyaránt megfigyelhetők, míg az MR-481 esetében csak vastag csillókat találunk (5. ábra). További vékony csilló-deficiens, kitapadásra képtelen mutánsok és ez utóbbira revertánsok analízise alapján úgy tűnt, hogy a *n*-alkánon való kitapadási jelenségért kizárólag a vékony csillók a felelősek (Rosenberg *et al.*, 1982).

Azonban ez korántsem ennyire egyértelmű. Erre bizonyítékul az MR-481 törzsből további fág-mutagenézissel előállított T481A és T481 $\phi$ 3 törzsek szolgáltak. Ezekben a vékony csillók szintén nem láthatóak, viszont az MR-481-gyel szemben emulzán-deficiens. A mutáns T481A és T481 $\phi$ 3 törzsek a vad RAG-1 törzsszel azonos módon növekednek *n*-hexadékan szubsztráton és sejtfelszínük hidrofób, míg a hidrofil MR-481 sejtek alkánbontási képessége jóval kisebb.



**5. ábra** Az *A. venetianus* RAG-1 (A) és MR-481 (B) sejtek felszínéről készült TEM felvételek. A vékony nyilak a vékony csillókat, a vastag nyilak a vastag csillókat jelölik. Forrás: Rosenberg *et al.*, 1982.

Tehát léteznek olyan másodlagos sejt felszíni hidrofób helyek is, amelyeken keresztül a sejtek kitapadhatnak az alkánszubsztráthoz, de ezeket a helyeket az emulzán elfedi, ennek hiánya pedig a sejt felszín hidrofóbbá válásában nyilvánul meg. A mérések alapján az ap3 és nφ fág-rezisztens T481φ3 kettős mutáns felszíne hidrofilebbnek mutatkozott a csak ap3-ra rezisztens T481A felszínénél, így a fág nφ receptor valószínűsíthetően egy ilyen másodlagos hidrofób hely (Pines és Gutnick, 1984).

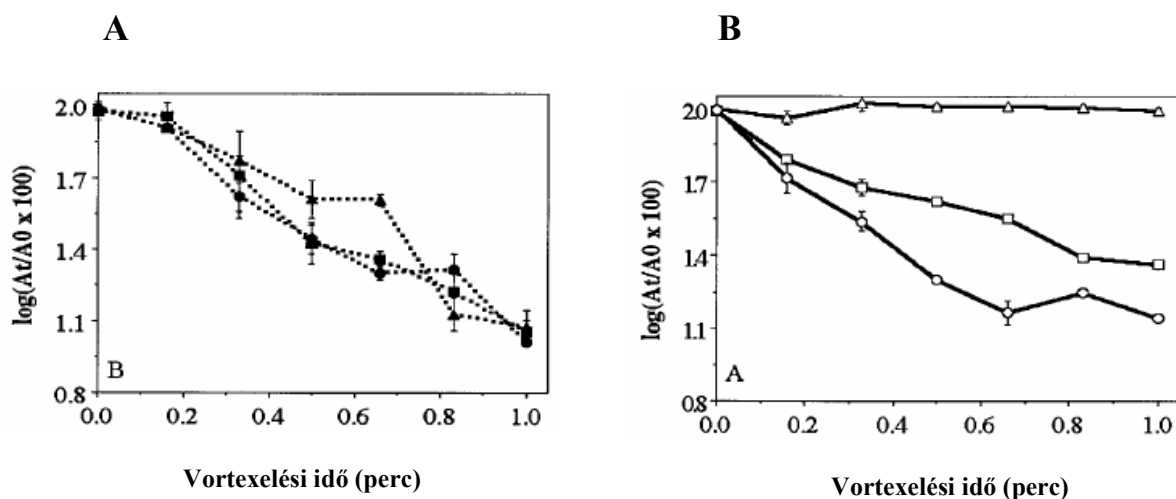
Mint láthatjuk, az *A. venetianus* RAG-1 kitapadási mechanizmusát jelentősen befolyásolja a sejt felszíni emulzán jelenléte. A vad törzsben ez megvan, de a vékony csillókhöz köthető elsődleges hidrofób helyeken keresztül a kitapadás, és ezáltal a hatékony *n*-alkán szolubilizáció létrejön. A stacioner fázisban az emulzán extracelluláris transzportja a másodlagos helyeket is elérhető teszi. Ha az elsődleges helyek nem funkcionálnak, a másodlagos helyek is teljes mértékű kitapadást alakíthatnak ki, ha az emulzán nem fedi őket.

Ha az MR-481 felszínéről az intenzív rázatás mechanikai hatása eltávolítja az emulzánt, mégiscsak képes növekedni alkán szénforráson, bár emiatt hosszabb lag fázis szükséges. Úgy tűnik a kapszuláris poliszaharid mennyisége és a kitapadási képesség fordítottan arányos. Etanol szénforráson nevelt vad törzseknél jóval nagyobb hexadékan felületére történő kitapadás tapasztalható mind a mini-kapszuláris mutánsok, mind a toktól enzimatikusan megfosztott vad törzsek esetében, nemcsak az *A. venetianus* RAG-1, de az *A. sp.* BD4 törzs esetében is (Rosenberg *et al.*, 1983).

Az *A. venetianus* RAG-1 fent vázolt, és egy *A. venetianus* VE-C3 jelű újabb alkánbontó izolátum *n*-alkán felvételi mechanizmusának fluoreszcens molekuláris próbák segítségével kivitelezett konfokális mikroszkópiás, *in situ* elektrokémiai és sejtfelszíni hidrofobicitás-mérésen alapuló tanulmányozása az előbbi törzs esetében a várt, az utóbbi esetében pedig új eredményekkel szolgált (Baldi *et al.*, 1999). A RAG-1 törzsben a Diesel-olaj ( $nC_{12}$ - $nC_{28}$ ) cseppek szolubilizációja valóban a sejtek adhéziójával indul, amelyet a termelődő emulzán felületi feszültség-csökkentő hatása segít elő. A vezikuláris szolubilizációt az alkáncseppek szétesése kíséri, amelyről az emulzán hatására a sejtek deszorbeálódnak. A VE-C3 izolátumban a mechanizmus szintén a sejtek kolonizációjával kezdődik. Ezután a kitapadt sejtek poliszaharid mátrixot termelnek és választanak ki, amely szinte összeragasztja az olajcseppecskéket és a sejteket. Specifikus lektin-blottal sikerült egy 22 kDa méretű, az olaj hatására indukálódó glikoproteint kimutatni, amely a sejtburkok emulzifikációs aktivitásáért felelős (Baldi *et al.*, 2003). Ennek hatására az alkáncseppecskék beintegrálódnak a kapszuláris mátrixba, egyre hidrofóbbá téve azt. A sejtfelszín karakterének változását az analitikai mérések eredményei is alátámasztják.

Míg a kiindulási időpillanatban a RAG-1 felszíne hidrofób (elektroforetikus mobilitás:  $-0.38 \times 10^{-8} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ , zéta potenciál: -4.9 mV), addig a VE-C3 felszíne hidrofílnak adódott

(elektroforetikus mobilitás:  $-0.81 \times 10^{-8} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ , zéta potenciál:  $-10.5 \text{ mV}$ ). A Diesel-olaj hatására történő hidrofobicitás változások az ún. MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbon) teszttel követhetővé válnak (6. ábra). A teszt lényege, hogy a növekedési kinetika több pontján mintákat veszünk a rendszerekből, a sejteket mossuk, majd *n*-hexadekánt adunk hozzájuk és 0-1 percig vortexeljük őket. A vizes fázis 600 nm-en mért abszorbanciájából ( $A_t$ ) és a vortexelés előtti sejtszuszpenzió abszorbanciájából ( $A_0$ ) számítható a  $\log(A_t / A_0 \times 100)$  érték, amely megmutatja a sejtek alkánhoz való kitapadási képességének mértékét.



**6. ábra** Az *A. venetianus* RAG-1 (A) és VE-C3 (B) sejtek hidrofobicitása MATH teszttel mérve 2 g/l Diesel-olajat tartalmazó minimál tápoldatban. A növesztési kinetika inkubációs idejét háromszög (0 óra), négyzet (12 óra) és kör (36 óra) jelöli a vortexelés idejének függvényében.

A kapott  $\log(A_t / A_0 \times 100)$  értékek alapján egyértelmű, hogy a várakozásoknak megfelelően (a mértékadó 1 perces vortexelési idők alapján) a RAG-1 sejtfelszíne állandóan hidrofób, míg a VE-C3-é csak az olajjal történő inkubáció során válik azzá. Végül mindkét törzs sejteinek kb. 85 - 90%-a képes a kitapadásra és ezáltal a szubsztrát biodegradációjára.



## 2.4.5 Az *Acinetobacter* törzsek *n*-alkán katabolizmusa

Az alkánszubsztrát felvételét követő katabolikus oxidáció lépései és módjai alig néhány *Acinetobacter* izolátum esetében ismertek részleteiben, mindenesetre a 2.3 fejezetben leírt három alapvető oxidációs típusból kettő létezését sikerült bizonyítani a genus tagjaiban. A szubterminális oxidáció nem fordul elő, azonban igazoltak egy új, csak a genusra jellemző mechanizmust is.

### 2.4.5.1 A citokróm P450-függő oxidáció

A prokarióta citokróm P450 molekulák citoplazmatikus vas-tiolát proteinek, közülük a CYP153A családba tartozóak képesek alkánok oxidációjára. A CYP ferredoxinnal és ferredoxin reduktázzal háromkomponensű rendszert alkot. Az *A. sp.* OC4 törzs ilyen enzimeit kódoló génjeit (*aciABC*) PCR reakcióval amplifikálták, vektorba klónozták és *E. coli* BL21-ben expresszáltatták (Fujii *et al.*, 2006). Mivel az aktív citokróm P450-ek kimutathatóak szén-monoxid hatására 450 nm-en megjelenő abszorbanciacsúcsuk alapján (Müller *et al.*, 1989), a konstrukció sikeres kifejeződése a CO-differenciál spektrum alapján bizonyítható volt. A rendszer egyaránt képes volt  $nC_5$ - $nC_{13}$  alkánok és  $1-nC_6$ - $nC_{12}$ -alkanolok oxidációjára  $\alpha,\omega$ -diolokká is. A maximális határfokot oktán ill. 1-oktanol szubsztrát mellett kapták. Az *AciABC* enzimekkel 99, 99 és 97% homológiát mutató enzimek génjeit sikerült izolálni és klónozni *A. calcoaceticus* EB104-ből is, de ez a CYP az OC4-éhez képes jóval kevésbé bizonyult stabilnak (Maier *et al.*, 2001). Az EB104 törzsnek viszont az a különleges tulajdonsága, hogy a CYP-en kívül a terminális alkán-oxidációra képes másik enzim, az alkán hidroxiláz (AlkM) is megtalálható benne.

#### 2.4.5.2 Membrán-kötött, integrális, a vasat nem hem-formában tartalmazó oxigenázok

Mint a 2.3.3.2 fejezetben láttuk, ennek az enzimes családnak a típuspéldája a *Pseudomonas putida* GPo1 alkán monooxygenáza/hidroxiláza (AlkB), de hasonló enzimek előfordulnak az *Acinetobacter*-ekben is, ahol AlkM-nek nevezik őket. A membrán-kötött, integrális, a vasat nem hem-formában tartalmazó alkán monooxygenázokban található konzervált HEL(G/S)HK és HSDHH motívumok alapján tervezett degenerált primerekkel (TS2S és deg1RE) végzett PCR reakciókkal számos *Acinetobacter alkM* gént amplifikáltak és határozták meg a szekvenciáját (Smits *et al.*, 1999). Így kapták meg az *A. calcoaceticus* EB104 mellett az *A. calcoaceticus* 69-V, *A. calcoaceticus* NCIB 8250 és az *A. sp.* 2769A 550 bp hosszú parciális *alkM*-szekvenciáját is. Sajnos a szakirodalomban vagy csak az *alkM* gén kimutatása (a fenti 4 és az *A. venetianus* VE-C3 törzsből), esetleg gázkromatográfiás-tömegspektrometriás (GC-MS) analízissel a lebomlási intermedier azonosítása (1-hexadekanol az *A. sp.* ODDK71 törzsben; Koma *et al.*, 2001), vagy az alkán oxidázok enzimreakciójának mérése (*A. sp.* HO1-N törzsre; Finnerty, 1990) szerepel. Ezekkel a módszerekkel a biodegradáció katabolikus útjai egyértelműen nem határozhatóak meg, részletes funkcionális analízis pedig csak három törzsnél történt (l. 2.4.6 fejezet).

#### 2.4.5.3 A Finnerty-lebontási út

Ez a dioxigenáz enzimek által katalizált lebontási út csak erre a genusra jellemző, sémája:



Az első lépést, a *n*-alkánból *n*-alkil-hidroperoxiddá történő konverziót dioxigenáz enzimek végzik, amelyből 3 félét (A,B,C) is sikerült *A. sp.* M-1-ben kimutatni (Maeng *et al.*, 1996a,b).

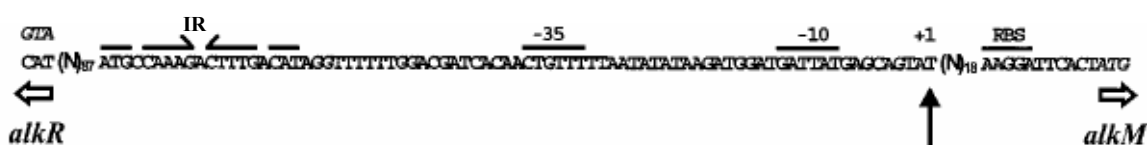
Valamennyi citoplazmatikus, aktivitásához NAD(P)H-t nem, csak oxigént igénylő protein (Sakai *et al.*, 1996). Az „A” egy 72 kDa-os alegységekből álló homotetramer, mely nem tartalmaz prosztetikus csoportot, de Fe(III)-ionok aktiválják. Kiválóan oxidál szilárd alkánokat, preferált szubsztrátja a  $nC_{24}$ . A „B” enzim elveszíti aktivitását a tisztítás során, de főleg a rövidebb ( $nC_{12}$ – $nC_{16}$ ) alkánokra hat, csakúgy mint a „C”. Ez utóbbi két, 64 kDa-os alegységből álló Cu(II)-függő flavoprotein. Mindhárom katalízis *n*-alkil-hidroperoxid akkumulációval jár, amely aztán a megfelelő aldehiddé alakul. Ennek a terméknek a bomlásáért egy NAD(P)H-függő, indukálódó aldehyd-reduktáz a felelős. A törzs teljes alkán-katabolikus aktivitását tovább bonyolítja az alkán hidroxiláz jelenléte, amelynek a tulajdonságait a következő fejezetben ismertetjük.

#### **2.4.6 Az *Acinetobacter* spp. alkán hidroxiláz-iniciált katabolizmusában szerepet játszó gének funkcionális analízise**

2.4.6.1 Az *A. sp.* ADP1 membrán-kötött, integrális, a vasat nem hem-formában tartalmazó alkán monooxygenáza volt az első, aminek kódoló, *alkM* génjét a genus tagjaiból izolálták. Ez a terminális hidroxiláz reakciómechanizmusában ugyan megegyezik a *Pseudomonas putida* GPo1 AlkB-jével, de mindössze 41 %-os homológiát vele, kromoszómálisan és nem plazmidon kódolt, preferált alkán szubsztrátjával *in vivo* enzimaktivitása nem mérhető. Teljesen más regulációs mechanizmussal is rendelkezik és tulajdonképpen az enzim-szupercsaládon belül egy másik, új családba tartozik (Ratajczak *et al.*, 1998a).

A *n*-alkán lebontáshoz az ADP1-ben legalább 5 gén esszenciális. Ezek, szemben a GPo1-gyel, nem klaszterekben plazmidon, hanem a kromoszóma 3 távoli lókuszában helyezkednek el. Az elsőben található a konstans szinten kifejeződő *xcpR*, amely az általános szekréciós út egyik

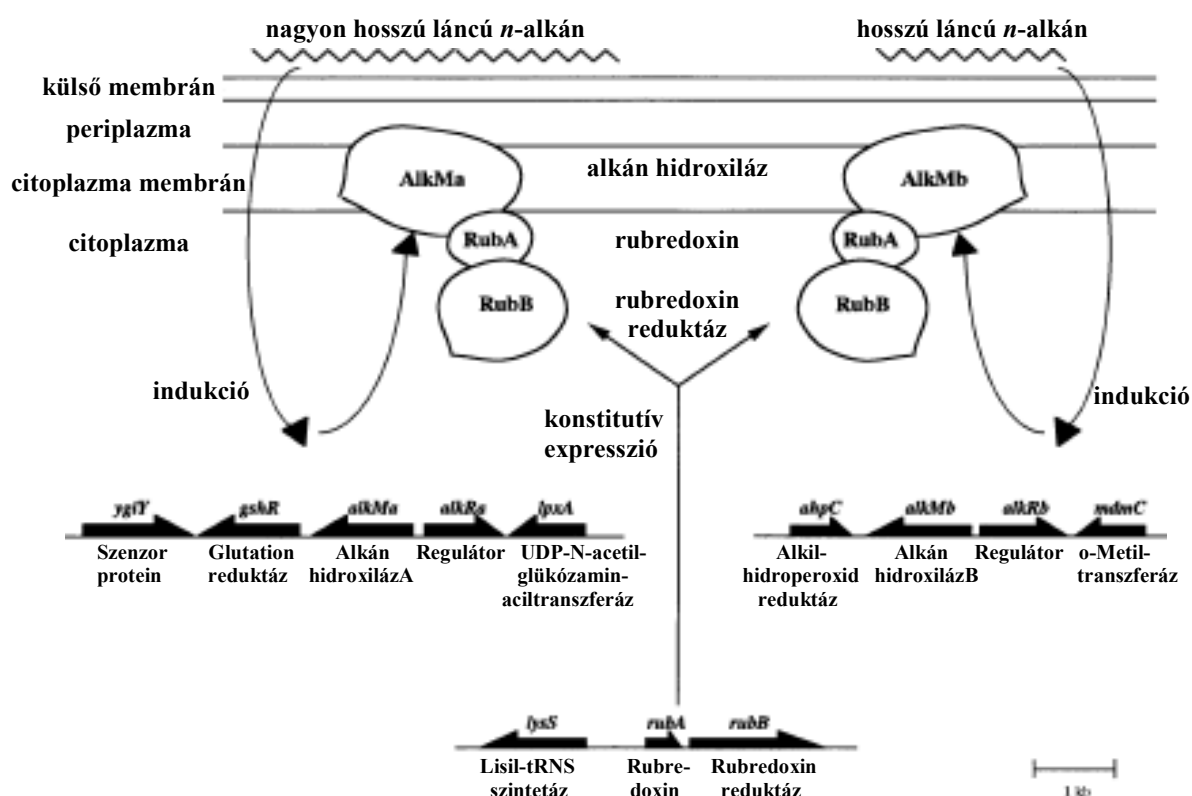
komponense (Parche *et al.*, 1997). A másodikban található két gén kódolja a szintén konstitutív rubredoxint (RubA) és a rubredoxin reduktázt (RubB) (Geissdorfer *et al.*, 1999). A GPo1 szintén ezekkel alkot katalitikus komplexet, azonban ott a két kódoló gén, az *alkG* és az *alkT* külön klaszterban van, és érdekes módon az AlkG (172 aminosav [as]) mérete jóval nagyobb a RubA-nál (54 as). A harmadik lókuszban található a két talán legfontosabb gén, az *alkM* és az *alkR*. Az *alkM::lacZ* fúziós protein  $\beta$ -galaktozidáz-aktivitásai alapján alkánok hatására az *alkM* erős indukciót mutat érdekes módon a törzs által nem mineralizálható  $nC_7$ – $nC_{11}$  és a felhasználható  $nC_{12}$ – $nC_{18}$  alkánokra, valamint alkénekre is, ugyanakkor viszont az alkanol és alkanal intermedierekre nem. Az expresszióhoz szükség van az alacsony transzkripciót mutató, AraC-XylS-szerű aktivátor/regulátor fehérjére, az AlkR-re, amely az *alkM*-mel szomszédos, ellentétes orientációjú *alkR* gén terméke. A két gén közötti szakaszon megtalálható az *alkM* transzkripciósi iniciációs helye, a promóter elemek, sőt egy inverted repeat is, mely az AlkR kötőhelyeül szolgálhat (7. ábra) (Ratajczak *et al.*, 1998b).



**7. ábra** Az *A. sp.* ADP1 *alkM* és *alkR* intergenikus szakasza az alábbi, meghatározott elemekkel: RBS – riboszómakötő-hely, +1: transzkripciósi iniciációs hely, -10 és -35: promóter szekvenciaelemek, IR: AlkR kötőhelyként szolgáló inverted repeat. Forrás: (Ratajczak *et al.*, 1998b)

2.4.6.2 Az *A. sp.* M-1 törzsből a lebontás első lépését kódoló *alkM* génből a Southern hibridizációs kísérlet tanúsága szerint két különböző van jelen. Mivel az M-1 törzsből a helyspecifikus rekombináció hiányában knock-out mutánsokat a szerzők nem tudtak előállítani (Tani *et al.*, 2001) a klónozott *alkMa* és *alkMb* géneket tartalmazó vektorokat

transzformáltak az ADP1 *alkM*Δ mutáns törzsébe. A Northern blot eredmények alapján az *alkMa* gén a szilárd, nagyon hosszú láncú (>*n*C<sub>22</sub>), míg az *alkMb* a hosszú láncú (*n*C<sub>16</sub>-*n*C<sub>22</sub>) alkánok hatására indukálódik. A *rubAB* expressziója szintén konstitutív és alacsony mértékű. Az *alkM* génektől downstream elhelyezkedő glutation reduktáz és alkil-hidroperoxid reduktáz gének az oxidáció során keletkező gyökök ártalmatlanításában játszanak szerepet.



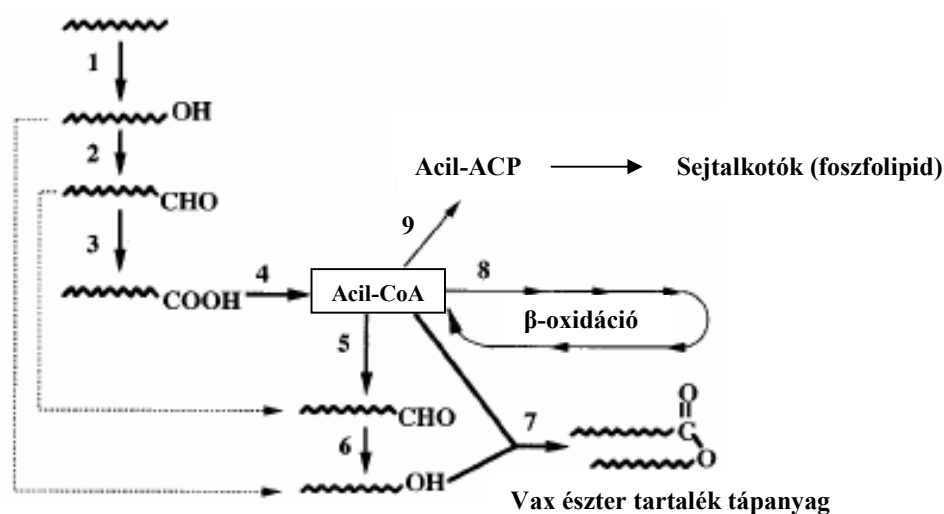
**8. ábra** Az *A. sp. M-1* alkán hidroxiláz rendszere a szerepet játszó génekkel. Forrás: (Tani *et al.*, 2001)

2.4.6.3 Az *A. venetianus* 6A2 jelű törzsben szintén két *alkM* paralógot találunk. Bár expressziós kísérleteket a szerzők nem végeztek, a genomi knock-out mutánsok által hasznosítható *n*-alkán spektrumok alapján az *alkMa* főként a *n*C<sub>16</sub>-*n*C<sub>18</sub>, míg az *alkMb* a *n*C<sub>10</sub>-*n*C<sub>14</sub> alkánok lebontásáért a felelős. A tény, hogy a dupla mutánsok képesek voltak növekedni

a  $nC_{20}$ -nál hosszabb alkánokon, valamilyen más típusú oxidációs mechanizmus jelenlétét is feltételezi a 6A2 jelű törzsben (Throne-Holst *et al.*, 2006). Ez nem ritka jelenség az *A. spp.* között, mint azt láthattuk az *A. sp.* EB104, vagy az *A. sp.* M-1 példáján is.

Valamennyi törzs esetében a monoterminális oxidációs reakció során képződő primer alkanol valamilyen alkohol dehidrogenáz hatására alakul tovább (9. ábra). Számos törzsben ezek NAD(P)-függő, alkán-indukálható, membrán-kötött (Asperger *et al.*, 1991) enzimek, míg az *A. sp.* HO1-N törzsben konstitutívan kifejeződő, két NADP-függő és egy NAD-függő alkohol dehidrogenáz is citoplazmatikus aktivitást mutat. Az így képződő aldehid a HO1-N-ben háromféle enzim szubsztrátja. A NAD-függő aldehid dehidrogenáz csak az összaktivitás 2 %-áért felelős, a vezikulákhoz kötődő NADP-függő enzim erősen indukálódik alkánon való növesztés során, míg a szintén indukálódó, membrán-kötött, nukleotid-független protein felelős az aktivitás 80 %-áért (Fox *et al.*, 1992). Az *A. sp.* M-1-ben a kromoszómális *ald1* gén által kódolt 55.5 kDa-os aldehid dehidrogenáz szolubilis, *E. coli*-ban is kifejezethető és a hosszú láncú aldehideket preferálja (tetradekanal). A reakciók eredményeként keletkező zsírsavak az acil-CoA szintetáz hatására a központi jelentőségű intermedierré, az acil-CoA-vá alakulnak, amelynek a sorsa a sejt energetikai viszonyaitól függően különböző lehet.

Egy része acil carrier proteinhez kapcsolódva a sejtalkotókhoz kerül és főként a foszfolipidek felépítésében vesz részt. Amennyiben a külső körülmények kedvezőtlenek, az acil-CoA nagy része  $\beta$ -oxidációval lebomlik, a sejt a képződő Ac-CoA eloxidálásával ATP-hez jut. Amennyiben elegendő szénforrás áll a mikroba rendelkezésére, a katabolikus út a tartalék tápanyag képzésének irányába tolódik el. Az *Acinetobacter*-ekben ez gyakori jelenség, ásványi anyag-limitáció esetén a képződő vax észterek a sejtek szárazanyag-tartalmának 17 %-át teszik ki pl. az M-1 törzsben (Ishige *et al.*, 2002).



**9. ábra** Az *A. spp.* monoterminális alkán oxidációs katabolizmus útjai. Enzimek: 1. alkán hidroxiláz komplex, 2. NAD(P)-függő alkohol dehidrogenáz, 3. NAD(P)-függő aldehyd dehidrogenáz, 4. acil-CoA szintetáz, 5. acil-CoA reduktáz, 6. aldehyd reduktáz, 7. acil-CoA:alkohol transzaciláz, 8. acil-CoA dehidrogenáz 9. acil-CoA:ACP(acil carrier protein)-transzaciláz Forrás: (Ishige *et al.*, 2000 és 2002)

A képződéséhez szükséges acil-CoA reduktáz *acr1* génjét azonosították az ADP1 (Reiser és Somerville, 1997), illetve *acrM* génjét az M-1 törzsben (Ishige *et al.*, 2002). Ez utóbbi törzsben kimutatták, hogy az aldehyd konverzióját alkohollá egy *alrA* gén által kódolt, NADP-függő, alkán-indukált, 160 kDa-os fehérje végzi (Tani *et al.*, 2000). Mint az a **9. ábrán** is jól látható, az alkán oxidációs és az acil-CoA redukciós katabolikus út intermedierei megegyeznek, az átalakításukat átfedő aktivitású enzimek is végezhetik. Végeredményben a megfelelő acil-CoA és alkanol reakciójából létrejön a vax észter, amely zárványként raktározódik a sejtekben. Ez utóbbi átalakítást az *A. sp* ADP1-ben egy széles specifitású szintetáz végzi, mely szubsztrátként primer alkohol helyett diacil-glicerint is elfogad, és ezáltal triacil-glicerint, azaz természetes lipidet képez (Uthoff *et al.*, 2005). Az enzim kifejeztethető *E. coli*-ban is, így a reakció ipari-biotechnológiai alkalmazása megoldható és felhasználható (Kalscheuer *et al.*, 2006).

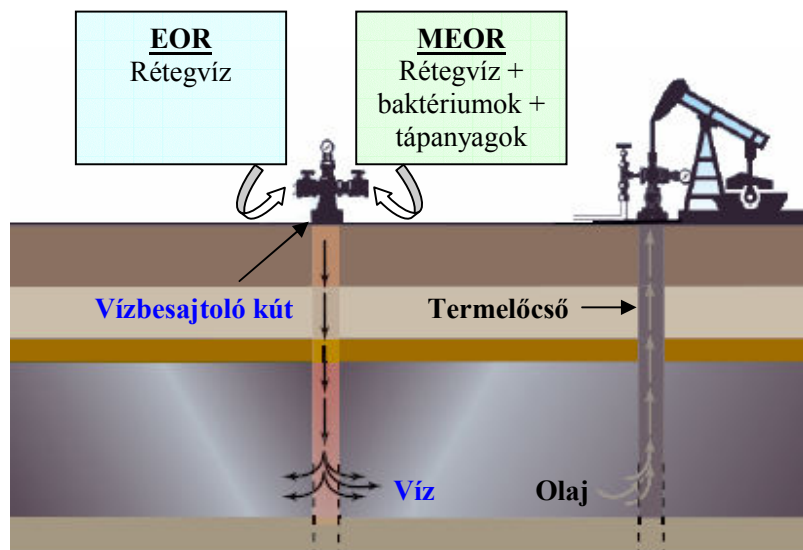
## 2.5 MIKROORGANIZMUSOK OLAJIPARI ALKALMAZÁSAI

### 2.5.1 Az olajipari biotechnológiai kutatások jövője

Külföldön a nagy olajipari konszernek a különböző olajtermelési technológiáik hatékonyságának növeléséhez az utóbbi években egyre nagyobb mértékben vonják be a modern biotechnológia eszköztárát. Ezek a kísérleti leírások, know-how-k természetesen a legszigorúbb üzleti titkok, a publicitás elkerülése érdekében a módszert általában még csak nem is szabadalmaztatják, az olajipari szakfolyóiratokban vagy konferenciákon is csak a laboratóriumi, vagy üzemi kísérletek hatásfokát, gazdaságossági számításait közlik részletesen.

Magyarországon az olajtermelés jelentősége a mezők kimerülésével fokozatosan csökken. A több évtizedes bányászat során az olajrezervoár oldott gáztartalmának, a legmobilisabb földgáznak és könnyűpárlatoknak a nagy részét már felszínre hozták, így a közet lecsökkent rétegyomása már önmagában nem elegendő a megmaradt viszkózusabb olaj felszínre hozására. Ezért hazánkban ma már kizárólag EOR (Enhanced Oil Recovery) módszereket használnak, leggyakrabban az ún. elárasztást (**10. ábra**). Ennek során a nyersolaj, az ún. termelvény rétegvíz tartalmának leválasztása után azt a vízbesajtoló kutakon keresztül visszanyomják a rétegbe, ami maga előtt hajtja, kiszorítja az olajat a rezervoárból. A besajtoló rétegvízhez tápanyagokat és mikrobákat adva, a bakteriális anyagcsere tovább növeli a termelés hatásfokát. Ez, az ún. MEOR (Microbially Enhanced Oil Recovery) eljárás (**10. ábra**) külföldön is, és a szegedi Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közalapítvány Biotechnológiai Intézet Bioremediációs Osztályában is az egyik legintenzívebben kutatott terület.





10. ábra Az EOR és MEOR kőolajtermelés sémája.

### 2.5.2 Az olajipari biotechnológia mai állása hazánkban

Osztályunknak a MOL Rt.-vel közös, 3 elfogadott nemzetközi szabadalma van mikroorganizmusok olajipari alkalmazásáról. Az elsőben leírt technológia alkalmazásával, baktériumos kezelés hatására a nyersolaj/víz emulziók megbonthatóak, a tartályokban tárolt olaj könnyebben szeparálható a vizes fázistól. Ez az effektus a vezetékben szállított termelvény esetében is bekövetkezik, a magas viszkozitású emulzióknak olaj- és vízfázisra való szétválása csökkenti a termelvény össz-viszkozitását, ami megkönnyíti a szállítást (Hlatki *et al.*, 2003a).

A hazai olajipar számára még komolyabb gond, hogy a kitermelés során a kőzetrétegekből felfelé áramló nyersolajból a csökkenő hőmérséklet és nyomás hatására a paraffin-aszfalten-maltén nehézkomponensek kiválnak a termelőcső falára, ami a termelés csökkenéséhez vezet. Ekkor a kutakat le kell zárni, a „blokkokat” mechanikusan el kell távolítani, ami jelentős termelésekieséssel és bérköltséggel jár. A paraffin degradációjának és a

kiválás lerakódásának gátlási lehetőségét szelektált baktériumkonzorciumokkal laboratóriumi kísérletekben igazolták (Lazar *et al.*, 1999). Ilyen baktériumok izolálását és alkalmazását az ún. Huff'n'Puff kútkezelési eljárásunk során mi is szabadalmaztattunk (Hlatki *et al.*, 2003b). Az ásványi anyagokat, biopolimereket és szelektált baktériumkonzorciumokat tartalmazó szuszpenzió kutakba történő lesajtolását követően a termelőcsövek falán kialakuló aktív biofilm gátolja a kiválás lerakódását, és szénforrásként hasznosítja a nehézkomponenseket, így a kút újraindítása után a mechanikus paraffinmentesítést jóval ritkábban, vagy egyes esetekben egyáltalán nem kell többé alkalmazni.

### **2.5.3 Bioremediációs kutatások Intézetünkben**

A mikróbák nemcsak a termelésben, hanem az olajipari eredetű szennyezések bioremediációjában is felhasználhatóak. A szénhidrogénnel szennyezett talajnak, mint négyzetrácsnak a pontjaiba, felváltva tápanyagokkal ellátott szelektált baktériumkonzorciumot és robbanótöltetet juttatva, a robbantást követően a baktériumok nem csupán nem pusztulnak el, de effektívebben jutnak el a homogenizált olajszubsztráthoz. Szabadalommal védett eljárásunkkal így a bioremediációs hatások jelentősen emelhetők (Hlatki *et al.*, 2002).

Mikróbákat alkalmazunk olyan bioaktív töltetek, ún. biobarrierék kifejlesztése során is, amelyek segítségével a komplex és mélyebb víztartókban elhelyezkedő szennyezettségi csóvák *in situ* kezelésére is mód nyílik (GVOP-3.1.1.-2004-05-0133/3.0 elnyert pályázat). A technológia során a baktériumokat és adalékanyagokat tartalmazó barrieréket a talajvíz áramlási irányával merőlegesen alakítjuk ki, így a mikrobiális tevékenység következtében a lassan mozgó szennyezőanyagok a tölteten való áthaladás során degradálódnak, ezáltal a

barrier mögötti védett talajszelvény nem kontaminálódik és végeredményben az egész csóva költséghatékonyan ártalmatlanítható.

## 2.6 CÉLKITŰZÉS

A Huff'n'Puff paraffinmentesítési technológia kialakítása során a Bioremediációs Osztályon belül rám bízott feladatok az alábbiakban foglalhatóak össze.

- A kőolajtermelő kutakban uralkodó környezeti tényezők analitikai meghatározása.
- A feltárt körülmények között a paraffinos kiválások leghatékonyabb degradációjára képes törzsek szelekciójának metodikai megalapozása.
- A bakteriális kezelések során a rendszerben bekövetkező változások nyomonkövetése és laboratóriumi modellezése.
- A technológia eredményeinek értékelése, a végbemenő mikrobiális anyagcserefolyamatok és üzemi jelenségek magyarázata.

Ezek után, a kútkezelések adatainak fényében célul tűztük ki olyan baktériumtörzsek izolálását, amelyek segítségével a kútkezelési technológia továbbfejleszthető, valamint amelyek a fejlesztés alatt álló, fent említett többi olajipari eljárásunkban sikerrel alkalmazhatóak. Mivel a bioremediációs eljárások általában alacsonyabb (10-20 °C), míg a termelésnövelési eljárások magasabb (>30 °C) hőmérsékleten folynak, screenvizsgálatainkban széles hőmérsékletoptimumú, hatékony törzseket kerestünk. Ezek után, a szempontrendszer alapján leghatékonyabbnak talált AR-46 jelű izolátum olajbontó képességének meghatározását és részletes fiziológiai karakterizálását tűztük ki célul.

## 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 3.1 TAXONÓMIAI KARAKTERIZÁLÁS

#### 3.1.1 Biokémiai meghatározás

Az olajipari technológiáink céljaira szelektált és alkalmazott baktériumtörzsek azonosítását az izolátumok nagy száma miatt először biokémiai módszerekkel végeztük el. Erre a klasszikus API tesztek szolgálták a gyártó (bioMerieux Inc.) instrukcióinak megfelelően. Amennyiben lehetséges és szükséges volt, a törzseket Bergey szerint (1993) különböző fajokba is soroltuk.

Mivel az újonnan izolált AR-46 jelű törzs az előzetes eredmények alapján az *Acinetobacter* genusba tartozó  $\beta$ -hemolizáló volt, az ilyen fajok hatféle determinatív sajátosságán (növekedés laktáton, malonáton, 4-hidroxi-benzoáton, 41 °C-on, savtermelési képesség glükózon, ill.  $\beta$ -xilozidáz aktivitás) alapuló biokémiai elkülönítést (Vaneechoutte *et al.*, 1999) is elvégeztük. Hogy a lehető legpontosabb taxonómiai azonosításon túl, alapvető metabolizmus-adatokat kapjunk, az izolátum cukor-, és szerves sav-bontási képességének analízisét még részletesebben is megvalósítottuk. DSM 457 tápoldatban, (l. 3.2 fejezet) 10 mM-os koncentrációban, összesen 20 féle szubsztrátot (arabinóz, fukóz, glükóz, laktóz, maltóz, mannitol, melibióz, mio-inozitol, ramnóz, ribóz, szaharóz; acetát, citrát, kaproát, malát, propionát; ill. alanin, hisztidin, szerin és etanol) oldottunk fel. Az oldatok sterilre szűrését követően vizsgáltuk az  $5 \times 10^6$  sejt/ml koncentrációban bejuttatott AR-46 sejtek növekedési képességét az alkalmazott szénforrásokon 30 °C-on 48 óra alatt.

### 3.1.2 16S rDNS analízis

Az AR-46 jelű törzs identifikálását a biokémiai analízissel párhuzamosan a 16S RNS-t kódoló génjének (16S rDNS) szekvencia-meghatározásával is elvégeztük. A PCR reakció templátjaként 30 µl 1 M glicin-betain pufferben felvett egyedi kolónia szuszpenziójának 1 µl-e szolgált. Az amplifikáció 20 µl-es térfogatban Di Cello (1997) szerint, 150 ng bakteriális EubB (27F) és EubA (1522R) primer segítségével 10 mM Tris-HCl; 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>-tartalmú pufferben, külön-külön 250 µM dNTP és 1 U *Taq* jelenlétében történt. A program az alábbi volt: 95 °C 1.5 perc, majd 35x(95 °C 0.5 perc, Ta °C 0.5 perc, 72 °C 4 perc) (Ta= 60 °C az első 5, 55 °C a következő 5, 50 °C az utolsó 25 ciklusban), végül pedig 72 °C 10 perc és 60 °C 10 perc.

A kapott PCR terméket az EubA és EubB, valamint a belső EubC (519F) primer (l. 5. táblázat; Suzuki és Giovannoni, 1996) felhasználásával megszekvenáltattuk. Az egyes átfedő szekvenciák összeillesztése után az AR-46 jelű törzs 1413 bp hosszú 16S rDNS génjének parciális szekvenciáját az EMBL/GenBank/EBI adatbázisokban az AY586400 kódszám alatt tettük közzé.

Az identifikálást követően az izolátumot a magyar Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében az NCAIM B02172 szám alatt helyeztük el.

## 3.2 A BAKTÉRIUMTÖRZSEK NÖVESZTÉSI KÖRÜLMÉNYEI

### 3.2.1 Az üzemi technológiák során használt törzsek növesztése

Mivel a kútkezelések során az alkalmazott törzsek kolonizációját vártuk a termelőcsövek paraffinkiválással fedett felszínén, az izolálásukat, karakterizálásukat és a kezelések utáni visszaizolásukat olajfilmmel fedett minimum táptalajon végeztük. Ez utóbbi a DSM 457 jelű tápközeg volt, amelynek összetétele az alábbi:

2. táblázat A DSM 457 tápközeg összetétele	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.52 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> vagy NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.50 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0.20 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0.05 g
SL-4 oldat	10.00 ml
Agar (amennyiben szükséges)	15.00 g
Desztillált víz	1000.00 ml
	pH=6.9
Az SL-4 oldat összetétele:	
EDTA	0.50 g
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0.20 g
SL-6 mikroelemoldat	100.00 ml
Desztillált víz	900.00 ml
Az SL-6 mikroelemoldat összetétele:	
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0.10 g
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0.03 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.30 g
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0.20 g
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0.01 g
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0.02 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0.03 g
Desztillált víz	1000.00 ml

A DSM 457 táptalajok (20 ml) megszilárdulása után kardoskúti főgyűjtő tartályolaját, ill. a kezelendő kút olaját, vagy annak tisztított frakcióit (paraffint, aszfaltént, gyantát vagy kiválás-

mintát) tartalmazó 10 %-os hexános (vagy utóbbi két szubsztrát esetében toluolos) oldatából 1-1ml-t juttattunk egyenletesen az agarlemezek felszínére, majd steril fülke alatt az oldószer elpárolgását követően megkaptuk az egyedüli szénforrásként a kívánt komponenseket tartalmazó, ill. ezzel a filmmel fedett lemezt. A szelektív táplemezeken kívül DSM 1 jelű gazdag tápközeget (**3. táblázat**) is használtunk az általános mikrobiológiai laborműveletek (szélesztés, sejtszámlálás plateléssel, gátlási zónák meghatározása stb.) során.

<b>3. táblázat</b> A DSM 1 tápközeg összetétele	
Pepton	5.00 g
Hús extraktum	3.00 g
Agar (amennyiben szükséges)	15.00 g
Desztillált víz	1000.00 ml

### 3.2.2 Az AR-46 jelű törzs növesztése

Az AR-46 jelű törzs izolálása során szintén DSM 457 tápközeget használtunk oldat formában. A screenvizsgálatokban ennek félkémcsövekbe kimért 5 ml-ét 1 g/l DW5052 jelű tisztított százhalombattai paraffinnal ( $nC_{20}$ – $nC_{38}$ ), a biokémiai vizsgálatok során pedig 10 mM-os végkoncentrációban a megfelelő szubsztráttal (l. 3.1.1) egészítettük ki. A törzs meghatározását követően azonban áttértünk a specifikusabb, ásványi sókat feleslegben, vagy limitáló mennyiségben tartalmazó HNPS (Leahy *et al.*, 2003) illetve LNPS (Snellman *et al.*, 2002) (High / Low Nitrogen, Phosphorous, Sulfur) tápoldatok alkalmazására (**4. táblázat**).

Az AR-46 törzset rutinszerűen 1g/l *n*-hexadekánt tartalmazó 50 ml HNPS tápoldatban 100 ml-es Erlenmeyer lombikokban neveltük 37 °C-on nem rázatott körülmények között. A felhasználható szénhidrogén-spektrum meghatározása során a szénforrások 1 g/l koncentrációban különböző normál alkánok ( $nC_6$ ,  $nC_{10}$ ,  $nC_{11}$ ,  $nC_{12}$ ,  $nC_{16}$ ,  $nC_{20}$ ,  $nC_{30}$ ,  $nC_{40}$ ),

**4. táblázat** A HNPS és LNPS tápközegek összetétele

	HNPS	LNPS
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	16.50 g	3.30 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11.00 g	2.20 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.00 g	1.00 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	5.00 g	1.00 g
NaCl	5.00 g	5.00 g
MgSO <sub>4</sub>	0.29 g	0.29 g
CaCl <sub>2</sub>	0.05 g	0.05 g
FeSO <sub>4</sub>	0.001 g	0.001 g
Agar (amennyiben szükséges)	15.00 g	15.00 g
Desztillált víz	1000.00 ml	1000.00 ml
	pH=7.0	pH=7.0

DW5052 jelű paraffin, Demjén 7-es nyersolaj, vagy aromás szénhidrogének (toluol, xilol izomerek, naftalin, benz[a]antracén) voltak. Az inokuláláshoz az AR-46 sejteket DSM 1 tápoldaton neveltük 24 óráig, majd a tenyészet 0.5 ml-ét lecentrifugáltuk (16 000g, 5 perc), HNPS-ben reszuszpendáltuk és az összecsíraszámot Bürker-kamra segítségével meghatároztuk. Ebből a szuszpenzióból pipettával annyit juttattunk a friss HNPS tápoldatba, hogy annak kiindulási sejtszáma  $5 \times 10^6$  sejt/ml (a fermentációs paraméterek megállapításánál  $2 \times 10^6$  sejt/ml) legyen. Az álló lombikokat 37 °C-on, vagy a hőmérséklet-függési kinetika felvételénél 25-40 °C-on a megfelelő időintervallumig (48 óráig, vagy 0-70 óráig) inkubáltuk. Teljesen hasonlóan jártunk el a rokon *Acinetobacter* törzsek (*A. venetianus* 6A2, *A. calcoaceticus* NCIB 8250, *A. calcoaceticus* 69-V, *A. calcoaceticus* EB104, *A. sp.* ADP1, *A. sp.* 2769A és az AR-46) *n*-hexadekánbontó képességének hőmérsékletfüggési kinetikájának összeállításakor is, csak a törzseket ekkor a DSM 1 tápoldatban nem 37, hanem 30 °C-on neveltük elő 24 óráig.

A mikróbák szaporodását a kultúrák 600 nm-en mért optikai denzitásának, a sejtek száraztömegének és a Bürker-kamrával mikroszkópiásan mért összecsíraszámának a változásán keresztül követtük nyomon. A degradáció kinetikai paramétereit a Monod-modell (Sinclair és Cantero, 1990) alapján számítottuk.



### 3.3 ALKALMAZOTT ANALITIKAI ELJÁRÁSOK

#### 3.3.1 Analitika a bakteriális kútkezelési technológia hatásainak értékelésére

##### 3.3.1.1 Gázkromatográfiás mérések

A különböző olajtermelő kutakból paraffinkiválás- és termelvény-mintákat gyűjtöttünk a baktériumos kezelés előtt, közben és után is, majd ezek *n*-alkán tartalmának mennyiségi és minőségi analízisét a magyar szabvány szerint (MSZ 21470-94: 2000) elvégeztük. A minták 1-1 grammját először 5 ml acetonnal, majd kétszer 10 ml, 10 mg/l 1-klór-oktadekán extrakciós standardot is tartalmazó hexánnal extraháltuk ultrahangos fürdő segítségével, majd az elegyített extraktumokhoz annyi 1,4-diklór-benzol belső standardot adtunk törzsoldatából, hogy azt 10 mg/l-es végkoncentrációban tartalmazza. Az így előkészített minta 1 µl-ét FID detektorral ellátott, HT-5 kapilláris kolonnával (25 m x 0.32 mm x 0.1 µm, SGE) szerelt, Chemstation szoftverrel vezérelt HP-5890 Series II gázkromatográf (GC) analizáltuk. Az analízis körülményei az alábbiak voltak: injektor és detektor hőmérséklet: 420 °C, kolonna hőmérséklet: 45 °C 2 percig, majd 15 °C/perccel emelkedve 400 °C-ig, majd ezt a hőmérsékletet 3 percig tartva splitless módban.

### 3.3.1.2 Termelvényminták viszkozitásának mérése

A minták reológiai vizsgálata Brookfield DV-II+ (Brookfield Engineering Inc., USA) rotációs viszkoziméterrel, az adatok gyűjtése és analízise pedig Wingather32 szoftverrel történt a gyártó utasításai szerint. A mérések 25-37 °C- on, LV típusú SC4-18 jelű orsóval, 1-100 rpm közötti fordulatszám tartományban zajlottak. A kísérleti adatok értékelése, a plasztikus viszkozitás és a nyírási feszültség adatok meghatározása a Bingham modell szerint történt.

### 3.3.1.3 Termelvényminták bakteriális emulzióbontásának mérése

A kezelés előtti termelvényminták 30 ml-eihez 1-1 ml, DSM 1 tápoldaton nevelt, különböző baktériumkonzorcium szuszpenziót (a technológia során használt 8 fermentációs csoport és keverékük) adtunk és 37 °C-on 100 rpm-mel 168 óráig rázattuk őket 50 ml-es Greiner csövekben. A kiváló víz mennyiségét volumetriásan mértük.

### 3.3.1.4 Vízminták oldott oxigén-tartalmának mérése

A Dorozsma-55 jelzésű kút kúttalpjáról (mélység: 2800 m, nyomás: 110 bar, hőmérséklet: 125 °C) nyomásálló, zárható bombával vett termelvényminta vizes fázisának oldott oxigén-tartalmát a felnyitás után azonnal WTW inoLAB OxyLevel 3 típusú oxigénelektóddal határoztuk meg 25 °C-on.

A mélységi rétegvízminta mellett a felszínre hozott algyői és mezősasi termelvényminták vizes fázisának analízisét is elvégeztük.

### 3.3.1.5 Vízminták anion-összetételének mérése

Az előző pontban szereplő vízminták anion-tartalmát minőségileg és mennyiségileg Chromeleon 6.40 szoftverrel vezérelt Dionex HPLC rendszerünk segítségével határoztuk meg a rendszert 0-10 g/l klorid, nitrit, nitrát, szulfát, foszfát ionokkal 5 pontban kalibrálva az alábbiak szerint:

Pumpa:	Dionex P680
Eluens:	1.7 mM NaHCO <sub>3</sub> - 1.8 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Áramlási sebesség:	2 ml/perc
Oszlop:	Sarasep AN-300 (150 mm x 5.5 mm x 7µm), 25 °C
Detektor:	Sykam S3111 konduktivitás detektor szupresszorral
Mintatérfogat:	20 µl, Gina50 automata mintaadagolóval injektálva.

### 3.3.2 Analitika az AR-46 jelű törzs alkán-degradációs folyamatának nyomonkövetésére

#### 3.3.2.1 Degradációsebesség és intermedier-analízis gázkromatográfiás mérésekkel

Az AR-46 jelű törzs szubsztrátfelvételi kinetikáját az adott mintavételi időpontban az inkubált rendszerekben maradt *n*-hexadekán koncentrációjának meghatározásán keresztül szintén gázkromatográfiásan végeztük. A lombikok tartalmát 100 mg/l 1-klór-oktadekán belső standardot is tartalmazó kloroform/methanol 3/1 oldószerkeleggyel extraháltuk (Koma *et al.*, 2001). A szerves fázis 2 µl-ét a fenti összeállítású műszerrel, de az alábbi körülmények között

analizáltuk: injektor és detektor hőmérséklet: 280 °C, kolonna hőmérséklet: 100 °C 1 percig, majd 15 °C/perccel emelkedve 250 °C-ig split módban (1:20 arány mellett).

Az AR-46 *n*-hexadekan biodegradációs útjának meghatározásához a törzset 1 g/l szubsztráttal kiegészített 500 ml HNPS és LNPS tápoldaton növesztettük. A sejteket a növekedés midlog (OD<sub>600</sub>: 0.7-0.8) és korai stracioner fázisában (OD<sub>600</sub>: 1.2-1.4) centrifugálással ülepítettük, majd fiziológias sóoldatban kétszer mostuk. Az 50 mM Tris-HCl pH 7.2 pufferben reszuszpendált sejteket háromszor 1.5 percig jégen 25 W-on szonikáltuk (Vibracell, Sonics & Materials, USA). Az így nyert sejtextraktumot vagy közvetlenül a különböző enzimaktivitási mérésekhez használtuk, vagy kloroform/metanol 4/1 oldószerkeleggyel tovább extraháltuk, hogy a lebontási intermediereket kimutathassuk. A koncentrált szerves fázis 2 µl-eit közvetlenül, metanolízis nélkül, DB-5 kapilláris kolonnával (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, SGE) szerelt Finnigan ThermoQuest Trace GC/Automass tömegspektrométer (GC-MS) segítségével analizáltuk. Az elválasztás körülményei az alábbiak voltak: injektor és detektor hőmérséklet: 350 °C, kolonna hőmérséklet: 45 °C 1 percig, majd 15 °C/perccel emelkedve 330 °C-ig és 15 percig ezen a hőmérsékleten tartva splitless módban.

### 3.3.2.2 A növekedési kinetika és a sejtek hidrofobicitásának spektrofotometriás mérése

Az OD méréseket és a MATH tesztet Unicam Helios  $\alpha$  spektrofotométer segítségével 600 nm-es hullámhosszon végeztük. A MATH teszt (Baldi *et al.*, 1999) során az AR-46 többféle szubsztráton mért növekedési kinetikájának 3-5 jellemző pontján 1.5 ml mintákat vettünk a rendszerekből. A sejteket lecentrifugáltuk (16 000g, 5 perc) és kétszer desztillált vízzel mostuk, majd 7.2-es pH-jú PBS-ben (fiziológias sóoldat 0.05 M foszfát pufferrel)

reszuszpendáltuk őket úgy, hogy a sejtek OD-ja 0.4-0.6 közé essen. A szuszpenzió 2 ml-éhez 100 µl *n*-hexadekánt adtunk és 0-1 percig vortexeltük őket. Az alsó vizes fázis abszorbanciájából ( $A_t$ ) és a vortexelés előtti sejtsuszpenzió abszorbanciájából ( $A_0$ ) számítható volt a  $\log(A_t / A_0 \times 100)$  érték, amely megmutatta a sejtek alkánhoz való kitapadási képességének mértékét.

3.3.2.3 A *n*-hexadekánon növesztett AR-46 törzs felülúszóinak analízise a termelő extracelluláris emulzifikáló anyagok kimutatására

Az AR-46 *n*-hexadekánon mért növekedési görbéjének különböző pontjaiból vett sejtmentes felülúszókkal a MATH teszten kívül még számos egyéb vizsgálatot is végeztünk. A hagyományos, cseppszámláláson alapuló Traube módszerrel követtük a felületi feszültség változását (Vold és Vold, 1983).

A gázkromatográfiás *n*-hexadekán megoszlási analízis során a felülúszó 5 ml-éhez 100 µl alkánt adtunk, a félkémcsöveket 1 órán keresztül 200 rpm-mel szobahőmérsékleten rázattuk, majd 4 °C-ra helyeztük őket. A megszilárdult alkán alatt elhelyezkedő vizes oldat, valamint a kontrollként használt steril tápoldat *n*-hexadekán koncentrációját a fenti GC módszerrel határoztuk meg, hogy eldönthessük, változott-e a vizes fázis szénhidrogén-koncentrációja az emulzifikációra képes extracelluláris membránnal borított vezikulumok termelése következtében (Käppeli és Finnerty, 1979).

Többek között mértük a minták emulzifikációs aktivitását is, úgy hogy 0.5 ml mintát, 1 ml 20 mM Tris-10 mM MgSO<sub>4</sub> puffert és 20 µl *n*-hexadekán/2-metilnaftalin elegyet vagy esetleg Demjén-7-es kútból származó nyersolajat az előbbieket szerint rázattunk, majd meghatároztuk a 620 nm-en mért abszorbancia értékét a kontrollhoz képest (Rosenberg *et al.*, 1979). A módszer

alapja az, hogy az esetlegesen termelődő emulzifikáló anyag a szubsztráttal kölcsönhatva növeli az oldat fényszórását.

Végül a klasszikus fenol-kénsav reagenssel megmértük a felülúszó totál szénhidrát- (Dubois *et al.*, 1951), míg a Bradford-reagenssel a fehérje-tartalmát is (Bradford, 1976), hogy az esetlegesen szekretált biopolimerek megjelenését az oldatban igazolhassuk.

#### 3.3.2.4 Az AR-46 sejtekben jelen lévő alkán oxidázok enzimaktivitásának mérése

A fentiek (3.3.2.1) szerint előállított nyers AR-46 sejtextaktumok felhasználásával enzimaktivitás-méréseket végeztünk. Első lépésben a még intakt sejteket és a sejtörmeléket lecentrifugáltuk (16 000g, 10 perc). A sejteltávolítás paramétereinek optimalizálására és a fehérjeextraktum alkalmasságának ellenőrzésére pozitív kontrollként a protocatechuate-2,3-dioxigenáz enzimének aktivitásmérése (Doten *et al.*, 1987) szolgált.

Az alkán dioxigenáz aktivitás mérése az eredeti recept (Sakai *et al.*, 1996) módosításával történt. Mivel a Plysurf A210G detergenst a kereskedelmi forgalomból nem tudtuk beszerezni, a *n*-hexadekán szubsztrátot más módon tettük vízoldhatóvá, hogy a reakcióelegyben a kívánt szubsztrátkoncentrációt (>1  $\mu\text{mol/ml}$ ) biztosíthassuk. A megfelelő szolubilizációt anionos Triton X-100 detergens (az oldat melegítésével és ultrahangos kezeléssel), *Pseudomonas aeruginosa* B110 jelű törzsünk által termelt ramnolipid biotenzid vagy E/1 jelű törzsünk által szekretált emulzifikáló anyag segítségével értük el. A szolubilizált szubsztrátot tartalmazó 0.9 ml 50 mM Tris-HCl pH 7.5 pufferhez 0.1 ml fehérjeextraktumot, illetve egy másik párhuzamosban ezeken felül 5-5  $\mu\text{l}$  50 mM NAD, NADH, NADP, NADPH, FAD és FADH koenzimeket, valamint 25  $\mu\text{l}$  10 $\mu\text{M}$  FeSO<sub>4</sub>-t adtunk. A reakcióelegyeket tartalmazó 2 ml-es üvegcskéket 5-60 percig 200 rpm-mel rázatva 30 °C-on inkubáltuk, majd a *n*-hexadekán

koncentrációját a fentiek szerinti (3.3.2.1), oldószeres extrakciót követő GC analízissel határoztuk meg.

Az extraktumok citokróom P450 tartalmának meghatározását Müller szerint (1989) végeztük. A polisztirol küvettékbe bemért enzimentartalmú oldatok 1ml-ein hangyasav-kénsav reakcióval előállított szén-monoxidot buborékoltattunk át 0.5 ill. 5 percig. Mivel a bakteriális P450 jelenlétében a CO hatására 450 nm-en abszorpciós maximumot mutató sárga színű termék keletkezik, egy 400 és 500 nm-es hullámhossz közötti scan méréssel felvettük az extraktum CO-differenciál spektrumát a CO-kezelt Tris-pufferrel, ill. hőinaktivált (90 °C, 20 perc) kontrollal szemben.

A kútkezelések előtt, közben és után steril mintavevő edényekben gyűjtöttük a paraffin- és termelvénymintákat, amelyek mikrobiológiai analízisét 24 órán belül el is végeztük. A reológiai és gázkromatográfiás mérések a mintavételt követően egy héten belül megtörténtek. Az analitikai eljárásokkal követett valamennyi módszert legalább három párhuzamosban végeztünk, az általános laborvegyszerek a Reanaltól, míg a finomvegyszerek a Sigma-Aldrichtól, vagy a Flukától származtak.

### 3.4 FOTOGRÁFIÁS ÉS MIKROSKÓPIÁS DOKUMENTÁCIÓ

A bakteriálisan kezelt olajkutak paraffinkiválásainak, a technológia során használt törzsek, valamint az újonnan izolált AR-46 jelű baktérium tenyészetek felvételei Panasonic NV-MX300-as digitális kamerával születtek.

A fénymikroszkópos felvételek valamennyi törzsről Storm Video Version 2. (Canopus Co.) szoftverrel vezérelt és kiértékelte, Zeiss Axioskop 20 jelű mikroszkópra szerelt Sony DXC-930P típusú CCD kamerával készültek.

A *n*-hexadékanon midlog fázisig növesztett AR-46 izolátum sejtjeinek transzmissziós elektronmikroszkópiás (TEM) képeinek elkészítéséhez Tecnai-12 (FEI) elektronmikroszkópra szerelt CCD kamerát (MegaView III, Soft Imaging System) használtunk.

A szubsztráthoz nem kitapadó, szabad sejteket a kultúrákból úgy izoláltuk, hogy a pipetta csúcsát óvatosan a kitapadt sejteket tartalmazó felszíni alkán-réteg alá merítettük és a sejteket a vizes fázis közepéből nyertük. Ezután a kultúrát lecentrifugáltuk (16 000g, 10 perc) és az így szeparált kétféle sejtípus közül a felszínen úszó alkáncseppekre kitapadt AR-46 sejteket kipipettáztuk. A DSM 1 tápoldatban nevelt kontroll sejteket szintén a kultúra közepéből, pipetta segítségével izoláltuk.

Valamennyi sejtípust tartalmazó mintából egy-egy cseppet paraffinhártyát tartalmazó réz gridekre szárítottunk, majd 0.5 % uranyl-acetáttal festettük őket (Rosenberg *et al.*, 1982) és TEM felvételeket elkészítettünk róluk.



## 3.5 MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREK

### 3.5.1 DNS manipuláció

#### 3.5.1.1 Általános technikák

Az AR-46 jelű törzsből genomi DNS-t a standard CTAB-módszer (Wilson, 1994) segítségével izoláltunk. Plazmidot alkalikus lízissel, forralásos módszerrel (Engebrecht *et al.*, 1991), illetve a sejtek 10 %-os SDS-sel történő agaróz gél-zsebben való direkt feltárásával is megpróbáltunk kimutatni. A termékeket kontroll genomi DNS-t, emésztetlen és *XhoI*-emésztett lambda fág DNS markert is tartalmazó 0.3 %-os agaróz gélen, 4 °C-on szeparáltuk, majd 1xTAE pufferben (0.04 M Tris-acetát, 0.001 M EDTA, [pH 8.5]) oldott 0.5 µg/ml etídium-bromiddal tettük láthatóvá.

Egyéb esetekben a különböző DNS mintákat 0.5 µg/ml etídium-bromidot tartalmazó, 50 ml térfogatú 1-1.5 %-os horizontális agaróz gélen futtattuk 1xTAE pufferben 10 V/cm-es feszültség mellett szobahőmérsékleten. Az elektroforézist követően, amennyiben szükséges volt, a fragmenteket QIAGEN gél extrakciós kittel tisztítottuk. A munkánkhoz szükséges puffereket, DNS markereket, enzimeket, PCR reagenseket a Fermentastól vagy a Promegától szereztük be és használtuk instrukcióik szerint. Az oligonukleotidok szintéziséhez, valamint a DNS szekvenciák meghatározásához az MTA SZBK kapacitását vettük igénybe.

Az analitikai polimeráz láncreakciók (PCR) 20, a preparatívok 50 µl-es térfogatban zajlottak, a kivitelezéshez PTC 200 Thermal Cycler-t használtunk (MJ Research). A PCR termékek tisztítása QIAquick PCR Purification kittel történt.

### 3.5.1.2 Az AR-46 jelű törzs *alkM* génjének amplifikálása

Összesen tíz különböző *Pseudomonas* és *Acinetobacter* törzs konzervált *alkB* és *alkM* szekvenciárészlete alapján degenerált primereket terveztünk (AlkDegFw és AlkDegRev; 1. 5. táblázat).

**5. táblázat** A munkánk során használt primerek szekvenciája.

Primer	Sequence (5'→3')
EubA(1522R):	AAGGAGGTGATCCANCCRCA
EubB(27F):	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
EubC(519F):	CAGCMGCCGCGGTAATWC
AlkDegFw:	TTCCNRYGATHGATACRATTATTGG
AlkDegRev:	CGHGTCGGATWVGC GTGATGATC
AlkInv1Fw:	GGTTGGGGCATGAGTGCTGCATTTC
AlkInv1Rev:	GATCGCCCCCATTGAAACACCAAGC
AlkInv2Fw:	GCTCATCATGTTCCAAGCACTG
AlkInv2Rev:	CATCGTCGTATCCATGTCTTCG
AlkInv3Fw:	CGATTGCCTCTGACGCTCAG
AlkInv3Rev:	CAGCGCCTGAATGGCTGC
AlkInv4Rev:	GCAGTTCTTAGCCCCTGAATCG
AlkInv5Rev:	CAAGCTGGTCACCCGCAACAAC
TS2S ( <i>SacI</i> ):	AAYAGAGCTCAYGARYTRGGTCAYAAG
Deg1RE ( <i>EcoRI</i> ):	GTGGAATTCGCR TGRTGRTCIGARTG
AlkMUp ( <i>EcoRI</i> ):	ATACGAATTCATGGATACGACGATG
AlkMDw ( <i>PstI</i> ):	TAGTCTGCAGTTTCCGTAGACGT

Kódok: N=A+C+G+T; R=A+G; Y=C+T; H=A+C+T, W=A+T; V=A+C+G; M=A+C; I=Inozitol).

Az aláhúzott nukleotidok a primer neve után zárójelben feltüntetett enzim restrikciós helyei.

Ennek a két primernek a segítségével touchdown PCR reakciót állítottunk össze. Az 50 µl-es reakció Promega puffert, 1.25 mM MgCl<sub>2</sub>-t, 250 µM dNTP-t, 2 U *Taq*-ot, 0.2 U *Pfu*-t, 0.5 µM primerpárt és 100 ng AR-46 genomi templát DNS-t tartalmazott. A PCR program az alábbi volt: 11 x (0.5 perc 95 °C, 0.5 perc 68-i °C [i=1-11], 1 perc 72 °C), majd 20 x (0.5 perc 95 °C, 0.5 perc 55 °C, 1 perc 72 °C). A reakció egy *alkM* fragmentet eredményezett, amelyet a két primerrel közvetlenül megszekvenáltattunk.

### 3.5.1.3 A teljes *alkM* gén és a vele szomszédos gének amplifikálása inverz PCR-ral

A fragment szekvenciájának ismeretében belső inverz primereket (AlkInv1Fw és AlkInv1Rev, l. **5. táblázat**) terveztünk. Az AR-46 *EcoRI*-emésztett kromoszómális DNS-ét T4 DNS ligázzal magára ligáltuk és templátként használtuk a következő inverz PCR reakcióban. A fenti touchdown PCR protokolt használtuk azzal az eltéréssel, hogy az elongációs periódust 6 percre növeltük. A reakció során amplifikálódott fragmentet izoláltuk, tisztítottuk, majd az AlkInv1Fw és AlkInv1Rev primerekkel két irányból megszekvenáltattuk. Az újonnan nyert szekvenciák alapján azokra újabb inverz primereket terveztünk (l. **5. táblázat**) és ezt a folyamatot addig ismételtük, míg a kétirányú szekvenálás össze nem ért, azaz átfedő szekvenciát nem kaptunk. Így végül a teljes *EcoRI*-végű genomi DNS darab szekvenciája összeilleszthető volt, amit a GenBank/EMBL/EBI adatbázisban AY586401 kódszám alatt közzé is tettünk.

### 3.5.2 A kapott szekvenciák szoftveres analízise

A szekvenciák open reading frame-jeinek (ORF) meghatározását és vizuális megjelenítését a Clone95 szoftvercsomag SECentral nevű programjával végeztük. A gének aminosav-szekvenciára történő lefordításához az Interneten ingyenesen elérhető BCM Search Launcher, míg a fehérjék elsődleges azonosításához az NCBI protein-protein Blast szoftverét használtuk. A rokon törzsekkel való szekvencia-összehasonlításokra az EBI ClustalW programját, ezek filogenetikai törzsfa szintű megjelenítésére pedig ennek a TreeView 1.6 jelű szoftverét alkalmaztuk.

Bakteriális  $\sigma^{70}$  promóter keresésre és felismerésre a szintén ingyenesen hozzáférhető SoftBerry BPROM, míg protein topológia- és transzmembrán hélix-predikcióra a MTA HMMTOP programját használtuk.

### 3.5.3 *alkM*-paralógok keresése az AR-46 genomjában

#### 3.5.3.1 A PCR termék denaturáló gradiens gél elektroforetikus analízise

Az alkán hidroxilázokban konzervált HEL(G/S)HK és HSDHH motívumokra tervezett degenerált TS2S és Deg1RE primerpárral (l. **5. táblázat**; Smits *et al.*, 1999) számos Gram-negatív és Gram-pozitív törzsből sikerült *alkM-alkB* homológokat amplifikálni, a Gram-pozitívokból gyakran egy törzsből akár négyet-ötöt is (van Beilen *et al.*, 2002). Ezekkel a primerekkel PCR reakcióban amplifikáltunk fragmenteket AR-46 genomi DNS templátról. A komponensek összetétele megegyezett a fentivel (3.5.1.2), de a program a következő volt: 4 perc 95 °C, 25 x (0.75 perc 95 °C, 1 perc 40 °C, 1 perc 72 °C), 5 perc 72 °C, majd 4 °C. Ezután a 20 µl-es reakció 1 µl-ét templátként használva, egy ugyanilyen második reakcióban történt a nukleinsav-termék végleges amplifikációja (Smits *et al.*, 1999).

A terméket 1 x TAE pufferben elkészített 8 %-os poliakrilamid denaturáló gradiens gél elektroforézissel (DGGE) szeparáltuk, ahol a denaturáció mértéke 0-tól 100 %-ig (formamid 0-40 ml, urea 0-42 g / 100 ml) változott (Muyzer *et al.*, 1993). A nukleinsav-baneket 0.5 µg/ml etídium-bromiddal tettük láthatóvá, markerként 1 kb-os GeneRuler-t használtunk.

### 3.5.3.2 Southern hibridizáció

Különböző restriktív enzimekkel (*Xho*I, *Hind*III és *Eco*RI) emésztett 2 µg AR-46 genomi DNS-t 1%-os agaróz gélen szeparáltunk, a depurináció, a denaturáció és a neutralizáció után 10xSSC pufferrel (0.15 M nátrium-citrát – 1.5 M NaCl) a klasszikus kapilláris transzfer technikával Amersham Hybond N filterre blottoltuk és hőkezeléssel rögzítettük (80 °C, 2 óra) a gyártó utasításait követve. A próba elkészítéséhez a 3.5.1.2 pontban leírt, PCR-amplifikált *alkM* fragmentet (50ng) és a Gene Images Random Prime Labelling kittet (Amersham Life Science) használtuk. Ennek során a fragmenthez random nonamer primereket adtunk, ahonnan kiindulva a Klenow polimeráz az amplifikáció során a dTTP nukleotidok helyére fluoreszcen-11-dUTP-t épített be. A hibridizációt magas (2xSSC-0.1% SDS, 66 °C) és alacsony stringenciájú (0.5xSSC-0.1% SDS, 37 °C) körülmények között is elvégeztük, és a jeleket Gene Images CDP-Star Detection modul (Amersham Life Science) segítségével a gyártó instrukciói alapján detektáltuk.

## 3.5.4 Az *alkM* gén funkcionális analízise

### 3.5.4.1 Northern blot analízis

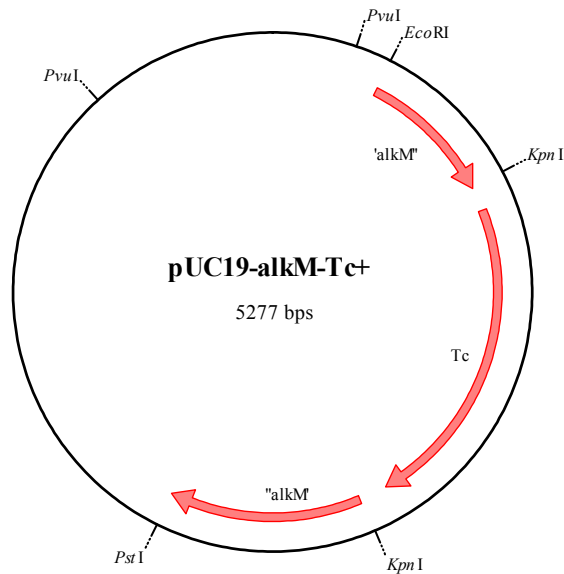
A kísérlet során az alkalmazott különböző szénforrások hatását vizsgáltuk az *alkM* gén expressziójára. A kontroll gazdag tápoldaton (DSM 1), valamint *n*-dodekán, *n*-hexadekán, *n*-eikozán és *n*-triakontán egyedüli szénforrásokon növesztett AR-46 midlog fázisú sejtjeiből a Trizol reagens segítségével a gyártó (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) utasításait követve totál RNS-t izoláltunk. Ezek 20 µg-jait 1% formaldehidet és 0.01% etídium

bromidot tartalmazó 1%-os denaturáló agaróz gélen futtattuk és az előző pontban leírtak szerint, de 20xSSC-ben Hybond N filterre blottoltuk és rögzítettük. A transzfer hatékonyságát, a felvitt RNS minőségét és a riboszómális RNS mennyiségét UV fény alatt ellenőriztük és dokumentáltuk. Ugyanabból, a Southern hidridizációnál is használt *alkM* fragmentből kiindulva annak 5'-végét a T4 polinukleotid kináz és [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP segítségével az Amersham standard protokolja alapján radioaktívan jelöltük. A 12 óráig a speciális kazettában történő Northern hidridizáció során ezt a jelölt próbát használtuk fel, és a kapott jeleket a Molecular Dynamics 860 STORM PhosphorImager készülék segítségével detektáltuk. A riboszómális RNS és a radioaktívan jelölt *alkM* RNS jelek intenzitásait ImageQuant 5.0 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, California, USA) szoftver segítségével kvantitáltuk.

#### 3.5.4.2 Kísérlet az AR-46 jelű törzs *alkM* knock-out mutánsának előállítására

A teljes *alkM* gén szekvenciájának ismeretében, a gén 5' és 3' végére egy-egy *EcoRI* ill. *PstI* restrikciós helyet is tartalmazó AlkMUp és AlkMDw primerpárt terveztünk (l. 5. táblázat), amelyek segítségével a 3.5.1.2 pontban leírtak szerint genomi DNS-ről az *alkM* gént felamplifikáltuk. A terméket a tisztítást követően *EcoRI* és *PstI* restrikciós enzimekkel hasítottuk és ugyanígy vágott pUC19 vektor multiklónozó helyére ligáltuk. A konstrukciót *E. coli* XL1-Blue elektrokompetens sejtekbe elektroporáltuk és az ampicillin, X-Gal és IPTG-tartalmú lemezen felnőtt transzformások közül 10 fehér telepet izoláltunk (Maniatis *et. al.*, 1982). Miután restrikciós mintázata alapján valamennyit megfelelőnek találtuk, az egyik kiválasztott klónt *KpnI* enzimmel hasítottuk, melynek egyedüli hasítóhelye az *alkM* gén közepén volt. Az így linearizált vektorhoz p34S-Tc vektorból (Dennis és Zylstra, 1998)

szintén *KpnI* enzimmel kivágott tetraciklin (Tc) kazettát ligáltunk, és *E. coli* DH5 $\alpha$ -ba transzformáltuk. Az elkészített konstrukció szerkezete a **11. ábrán** látható.



**11. ábra** Az AR-46 *alkM* génjét és vele megegyező orientációban beleépített Tc kazettát tartalmazó, az AR-46 törzs homológ rekombináltatására használt pUC19-alapú vektor.

DSM 1 gazdag tápoldaton növesztett AR-46 törzsből elektrokompetens sejteket készítettünk, majd a standard módszer szerint 7% DMSO-ban (Maniatis *et al.*, 1982), 10% glicerinben (Sekizaki *et al.*, 1998), vagy 300 mM szaharózban (Choi *et al.*, 2006) reszuspendált sejteket a szerzők által leírt módon elektroporálással (Elektro Cell Manipulator 600, BTX, 0.75-2.5 kV) transzformáltuk. Ennek során a plazmid konstrukciót (pUC19-*alkM*-Tc+/-), vagy annak kettős *PstI*-*PvuI*-emésztett tisztított (*alkM*-Tc+/-), linearizált fragmentjét használtuk a megfelelő koncentrációban.

Emellett megpróbáltuk az *A. sp.* ADP1-ben tapasztalt természetes transzformációs képesség kialakítását (Nielsen *et al.*, 1997) és annak homológ rekombinációra való felhasználását AR-46-ban is.

A transzformánsok növesztését 6 µg/ml tetraciklint tartalmazó DSM 1 lemezekon végeztük 30, ill. 37 °C-on.



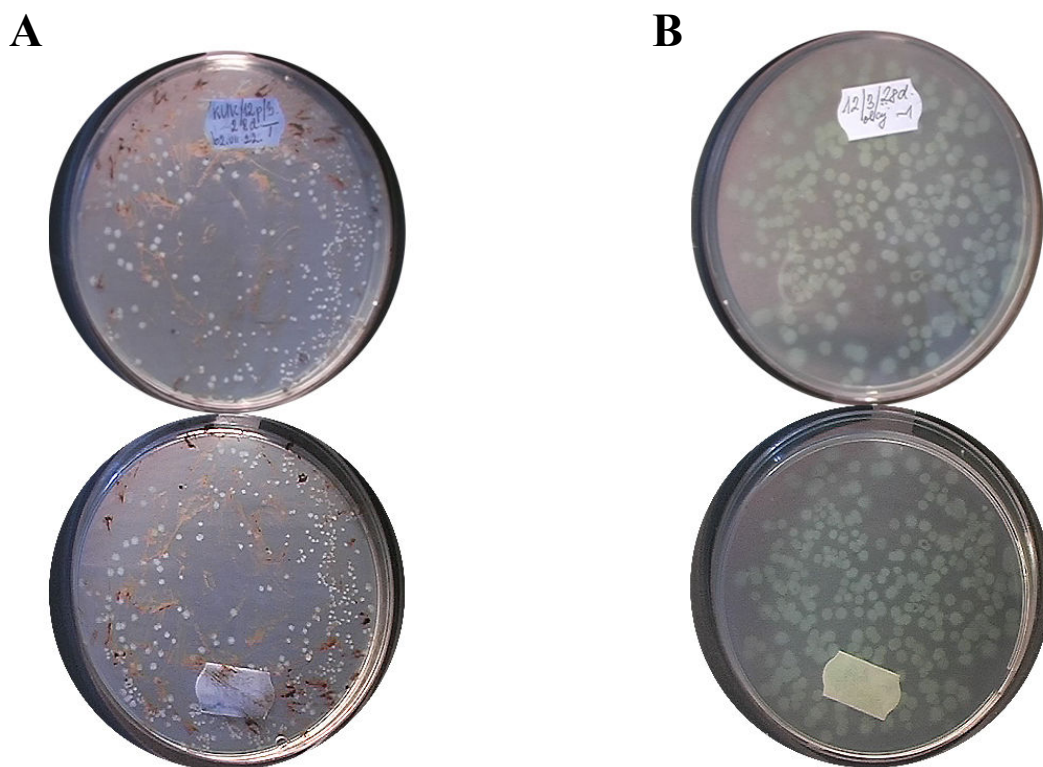
## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1 A KÚTKEZELÉSI TECHNOLÓGIA EREDMÉNYEI

#### 4.1.1 Az üzemi kísérletek megalapozása, előzmények

A Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közalapítvány Bioremediációs Csoportja a MOL NyRt.-vel létrejött szerződések értelmében az elmúlt öt évben kőolaj-termelő kutak paraffinmentesítésére dolgozott ki eljárást. A kezelt kutakban a mikrobiális beavatkozást megelőzően jelentős technológiai problémát okozott a termelőcsövek belső felszínére kiváló paraffinos-aszfalténes-malténes kiválás, a kiválasztott kutak döntő többségénél a termelést naponta néhány órára le kellett állítani, hogy a kiválás mechanikus eltávolítását el lehessen végezni. Számos kút esetében erre olyan gyakran kellett volna sort keríteni, hogy a nyersolaj kitermelése már nem volt gazdaságos, ezért ezek a kutak a kezeléskor már bizonyos ideje nem is működtek, le voltak zárva.

Első lépésként tehát olyan baktériumok izolálására volt szükség, amelyek képesek üzemi körülmények között, egyedüli szénforrásként a kiválások anyagának felhasználására. Csoportunkban ezernél is több ilyen baktériumtörzs izolálására és alapvető karakterizálására került sor. Mivel a legtöbb esetben az olajkutak termelvényének vizes fázisa  $10^1$ - $10^4$  sejt/ml koncentrációban tartalmazott ilyen baktériumokat, a technológia során alkalmazott mikrobákat egyrészt innen, másrészt pedig olajkomponensekkel szennyezett talajokból és talajvizekből izoláltuk és fermentorban szaporítottuk. Néhány ilyen olajkomponenseket bontó baktériumtenyészet fotóját mutatjuk be a **12. ábrán**.



**12. ábra** A Kiskunhalas 50-es kút paraffinkiválásán (A) ill. termelvényének tízszeres hígításán (B), mint egyedüli szénforráson és DSM 457 minimál táptalajon aerob körülmények között 37 °C-on növekvő baktériumkolóniák fotója.

A megfelelő baktériumok kiválasztásának fontos szempontja volt a kutakban uralkodó környezeti tényezők hatása. Mivel a kiválások a legtöbb esetben a csőfalon néhány száz méteres mélységben rakódnak le, az ott mérhető hőmérsékletnek megfelelően csak 37-60 °C-on növekvő kiválás-bontó törzsek alkalmazása jöhetett szóba.

A másik fontos szempont a vízfázis oxigén-ellátottságának kérdése volt. Szakirodalmi adatok alapján ismert volt, hogy mélységi olajrezervoárookban akár 2000 m-es mélységben, 100 °C feletti réteghőmérsékleten is megtalálhatóak strict aerob baktériumok a jelenlévő 0.6-0.7 ppm oxigén hatására (Kato *et al.*, 2001). Ehhez azonban friss, oxigéndús víznek kell a rétegbe beáramlania. Mint azt a Bevezetésben is említettük, a magyar olajmezőket már hosszú

évek óta vízbesajtolásos ún. elárasztással termeltetik, kb. 30%-kal fokozva ezzel a kitermelés hatásfokát. Ennek hatását tapasztaltuk a Dorozsma-55 jelzésű kút 2800 méter mély kúttalpjáról vett minta analízise során is, amelynek vizes fázisában 2 ppm oxigén jelenlétét mutattuk ki. Tehát aerob baktériumok is alkalmazhatóak a kezelés során, de csak akkor, ha a vízáramlás és oxigénutánpótlás folyamatos. Ilyen baktériumok megtalálhatóak voltak a felszíni termelvény- és rétegvízmintákban is, amelyek a várakozásnak megfelelően az oldhatósági limitnek megfelelő 6.5-7 ppm oldott oxigént tartalmaztak. Mivel azonban a kezelési technológia során a kút hosszabb idejű lezárása elkerülhetetlen, a törzsscreen során főként a fakultatív anaerob baktériumok kiválasztása és alkalmazása mellett döntöttünk.

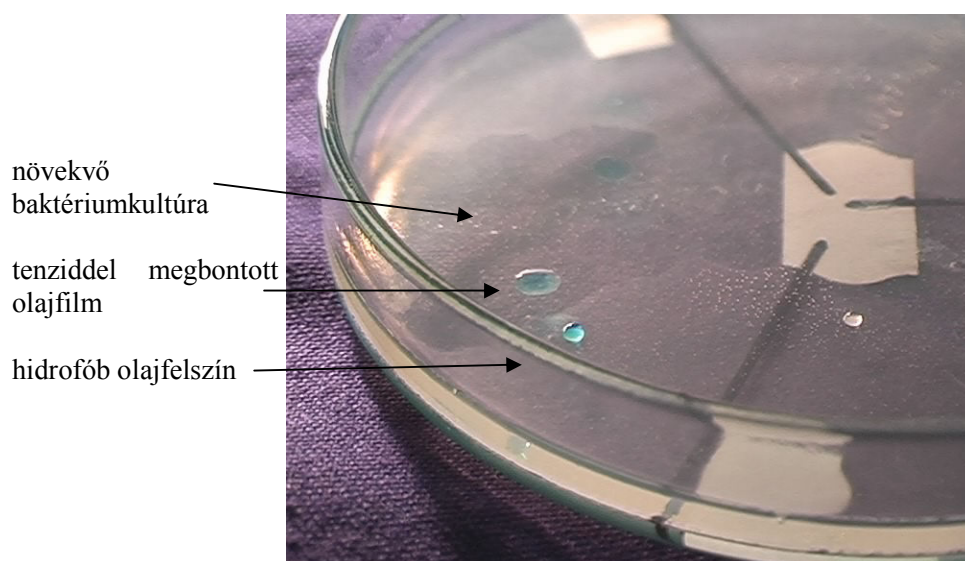
Azonban ez szorosan összefügg a harmadik fontos paraméterrel, az ásványi anyag ellátottsággal is. Néhány kút termelvényének vizes fázisának, illetve az algyői rétegvíz-főgyűjtő anion-összetételét mutatja be a következő táblázat:

**6. táblázat** Néhány technológiai vízminta anion-összetétele.

Kút neve	[Cl <sup>-</sup> ] (g/l)	[PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ] (g/l)	[SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ] (g/l)
Mezősas-11	9.9500	0	0.1800
Algyő-247	4.6100	0.0600	0.0300
Algyő-502	0.6680	0	0.0080
Algyő-679	0.0310	0	0.0009
Algyői főgyűjtő (rétegvíz)	0.7890	0	0.0051
Dorozsma-55 (mélységi)	2.6509	0	0.0430

Látható, hogy a baktériumok számára létfontosságú szerves foszfor és kénforrások limitálóak voltak, míg nitrát vagy nitrit egyáltalán nem fordult elő a mintákban. Emiatt a bakteriális tevékenység elősegítéséhez a kezelése során kálium-foszfát és kálium-szulfát, valamint az aerobok és fakultatív anaerobok számára is egyaránt megfelelő nitrogénforrás, az ammónium-nitrát adalékanyag használata mellett döntöttünk.

A fentiek alapján a kútkezelésekhez 35 db., a *Bacillus licheniformis*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis* és a *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. cepacia*, *P. pseudomallei* fajokba tartozó fakultatív anaerob törzset választottunk ki, amelyek között paraffin-, aszfaltén- és malténbontó, ill. tenzidtermelő (13. ábra), egymásra inhibíciós hatással nem lévő izolátumok voltak.



**13. ábra** Kardoskúti olajjal fedett DSM 457 minimál táptalajon 37 °C-on növekvő *Bacillus licheniformis* izolátum tenzidtermelő képességének bemutatása. A termelt extracelluláris tenzid hatását a kékre festett víz 1-1 cseppjének alakjával (szétterülő: hidrofil, gömb: hidrofób felszín) szemléltetjük.

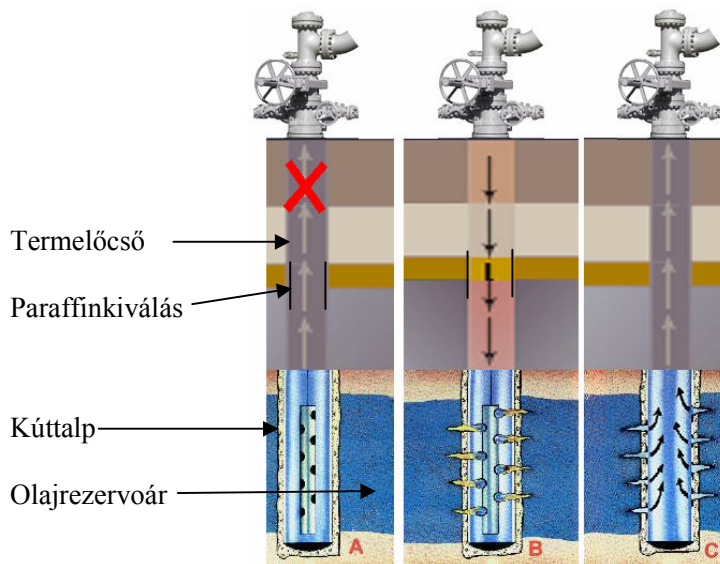
#### 4.1.2 A paraffinmentesítési technológia vázlata

A kiválasztott törzseket 8 csoportban fermentorban szaporítottuk, majd a konzorciumokat a szállítás előtt elegyítettük, ásványi adalékanyagokkal, fehérje és poliszaharid biopolimerekkel és szintetikus tenziddel egészítettük ki. Az így elkészített ún. csőműkálati folyadékban a fehérje szerepe a kezdeti *in situ* szaporodás beindítása (szerves C, N-forrás) a xantán poliszaharidé pedig ezen túl a sűrűség 1.15 g/ml-re történő beállítása.

Kísérleteink szerint ugyanis ilyen érték és összetétel mellett a szuszpenzió a termelőcső fala mentén lassan süllyed a kúttalpig, ezáltal kialakulhat a biofilm a kiválással fedett csőfelszínen, a xantán pedig még tovább fokozza a kolonizáció határfokát. Egy kezelés során 1 m<sup>3</sup> ilyen folyadék besajtolására kerül sor, amelynek összcsíraszám kb. 10<sup>14</sup> sejt.

Az üzemi beavatkozás előtt a kút lezárásra kerül, majd a csőmunkálati folyadék besajtolását követően általában 7-10 napig zárva is marad, majd 1-2 napra újra megnyitják. Ezt a ciklust még kétszer kell megismételni. A kidolgozott ún. Huff'n'Puff paraffinmentesítési eljárás technológiai sémája a **14. ábrán** látható.

Minden egyes ciklus végén, majd a végleges megnyitás után 1 hónappal, majd fél évvel később a kutakból termelvény, ill. paraffinkiválás-mintát (amennyiben volt) gyűjtöttünk, amelyeket mikrobiológiai és analitikai vizsgálatok alá vetettünk.



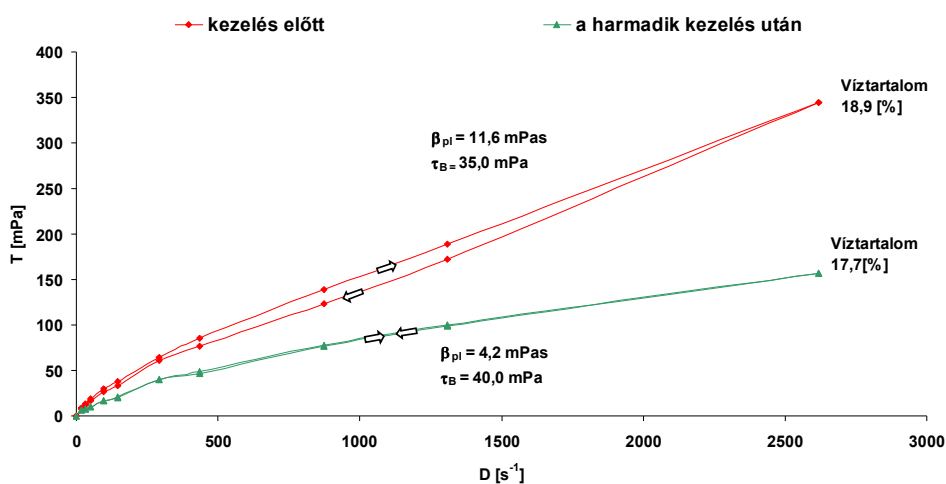
**14. ábra** A Huff'n'Puff kútkezelési eljárás lépései: (A) A kút lezárása (B) A csőmunkálati folyadék besajtolása, 7-10 nap inkubáció (C) A kút megnyitása 1 napig, majd a ciklus kétszeri megismétlése.

### 4.1.3 A technológia eredményeinek értékelése

Az elmúlt öt évben a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közalapítvány Biotechnológiai Intézetének Bioremediációs Csoportja a MOL NyRt. részére 65 kőolaj-termelő kút biotechnológiai paraffinmentesítését végezte el. A kezelt kutak kialakítása (horizontális ill. vertikális), mélysége, talphőmérséklete, a termelt olaj mennyisége, víztartalma, gáztartalma, származási helye (különböző mezők, földtani rétegek) igen nagy heterogenitást mutatott. Ennek ellenére a bakteriális kezelés a kutak két harmadában egyértelműen sikeres volt, a paraffinkiválás ezekben a kutakban megszűnt, vagy mennyisége jelentősen lecsökkent. Általában a két főt igénylő napi nehéz és veszélyes mechanikus csőtisztítást csak 10-14 naponta kellett elvégezni, és a kis mennyiségű lerakódás miatt 1 ember munkája is elég volt. A kezelés kedvező hatása minimum 3 hónapig tartott, az átlagérték 6 hónap volt, és ami emellett még nagyon fontos, ebben az intervallumban a kitermelhető olaj mennyisége is 30-100 %-kal megnőtt. Ennek egyik oka az lehetett, hogy a kezelés hatására a korábban emulzió jellegű termelvények emulzióstabilitása a felszíni technológiával (Hlatki *et al.*, 2003a) megegyező módon a termelőcsőben is megbomlott, ezáltal a viszkozitása lecsökkent, a termelés jellemzően kétfázisúvá (olaj-víz) vált. A harmadik bakteriális kezelési ciklust követően a termelvény és a paraffinkiválás mililiterenkénti összecsíraszama 0.5-4.5 nagyságrenddel megnőtt (ill. az előtte steril kutakban megjelent), és az alkalmazott baktériumok minden esetben a kezelés után még minimum 1 hónappal is visszaizolálhatóak voltak a termelvényből.

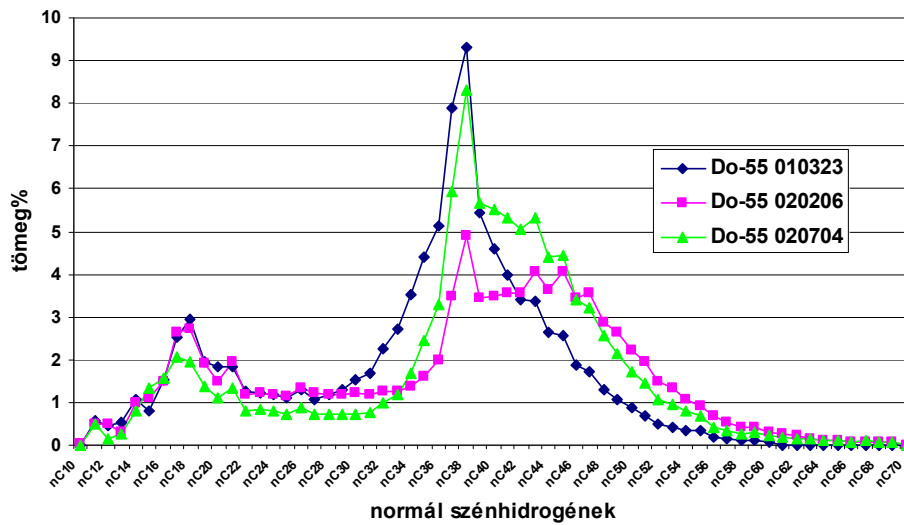
A termelési tapasztalatok magyarázatát és az eredmények értékelését néhány kezelt kút példáján mutatjuk be. A legsikeresebb a Dorozsma-55 jelzésű kút volt, amelynek már a leállítását fontolgatták a MOL szakemberei az intenzív paraffinlerakódás miatt. A napi tisztítás igen nehéz, a mechanikus kés beszakadásának a veszélye igen nagy volt, a berendezés

kimentése sok időbe és több millió forintba került volna. A bakteriális kezelési ciklusok után már 5 éve egyáltalán nincs szükség mechanikus beavatkozásra, a kút kezelőszemélyzet nélkül, 50%-os plussz olajkihozattal termeltethető, a termelvényből átlagban  $10^3$  sejt/ml koncentrációban visszaizolálhatóak az általunk lejtett baktériumok. A kezelés hatására a Dorozsma-55 termelvényének viszkozitása lecsökkent, a mérhető reológiai változásokat a **15. ábrán** mutatjuk be. A termelvény a kezelés előtt nagy viszkozitású tixotróp emulzió volt, ami a kezelés hatására híg folyó, szerkezetét elvesztő szinte newtoni folyadékká alakult.



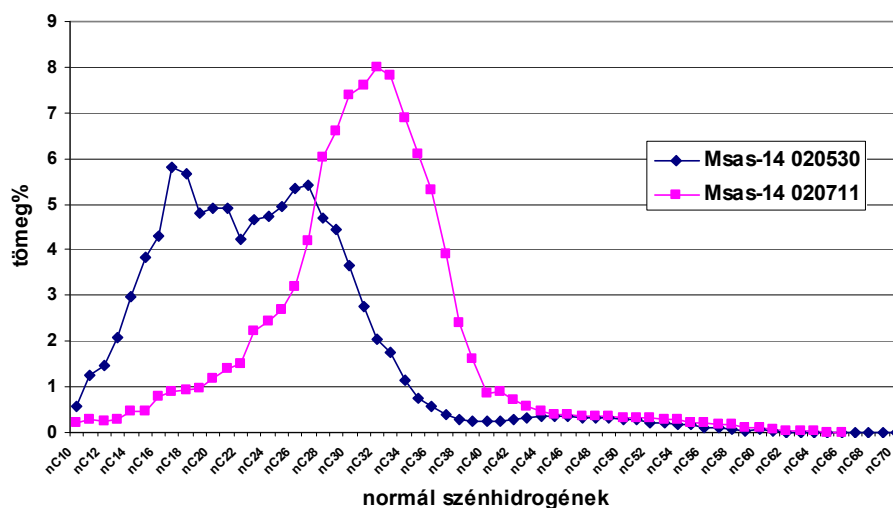
**15. ábra** A Dorozsma-55 jelzésű kút termelvényének reológiai változása a bakteriális kezelés hatására rotációs viszkoziméterrel mérve. Az Y tengelyen a nyírófeszültség, az X tengelyen a nyírási sebességgradiens szerepel,  $\beta_{pl}$  a számított plasztikus viszkozitás, a  $\tau_B$  pedig a mozgási ellenállás értéke.

Kiválásminta a 3. ciklus után már csak nyomnyi mennyiségben volt vehető, ennek  $n$ -alkán összetétele a **16. ábrán** látható változásokat mutatta. Az ábrán jól látszik, hogy a kiválás mennyiségének csökkenésével annak összetétele is változott, a  $nC_{40}$ -nél nagyobb komponensek relatív mennyisége megnőtt, míg a rövidebb láncúaké lecsökkent. Ezzel szemben a technológiai beavatkozás eredményeképpen a termelvény alkán-összetétele sem itt, sem a többi kút esetében nem mutatott szignifikáns változásokat (nem bemutatott adatok).



**16. ábra** A Dorozsma-55 jelzésű kút paraffinkiválásának *n*-alkán összetétel-változása a bakteriális kezelés hatására GC-vel mérve. Kezelés előtt: 2001.03.23, 3. ciklus végén: 2002.02.06, 5 hónappal a kezelés után: 2002.07.04.

Egy másik, a mezőszasi mező 14 jelzésű kútból már sikerült megfelelő mennyiségű kiválásmintát venni, így az alkán-összetétel változása nemcsak analitikailag (17. ábra),



**17. ábra** A Mezőszas-14 jelzésű kút paraffinkiválásának *n*-alkán összetétel-változása a bakteriális kezelés hatására GC-vel mérve. Kezelés előtt: 2002.05.30, 3. ciklus végén: 2002.07.11.



de makroszkópiusan is jól követhető volt (**18. ábra**).

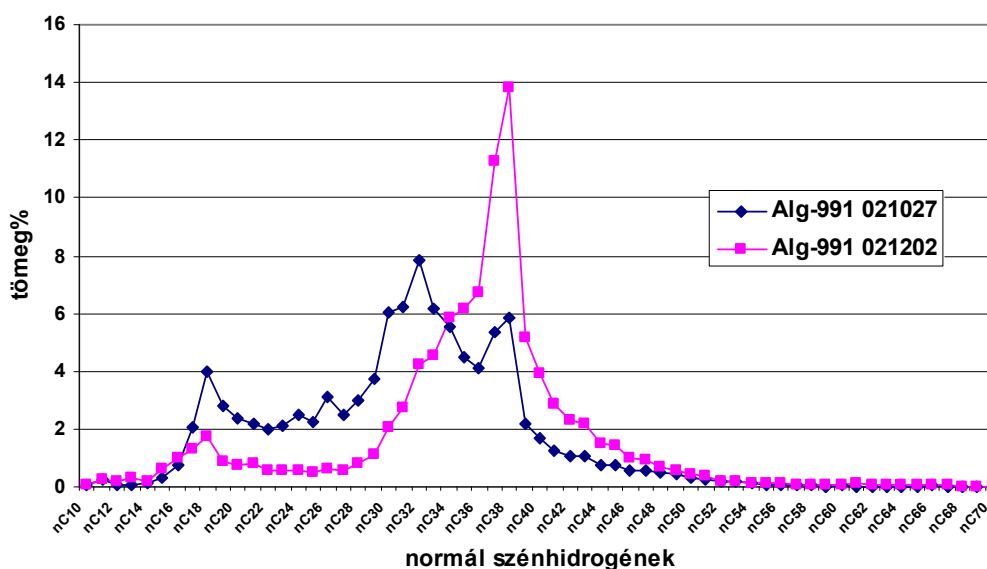


**18. ábra** A Mezősas-14 jelzésű kút paraffinkiválás konzisztenciájának változása a bakteriális kezelés hatására. Kezelés előtt: 2002.05.30, 2. ciklus termeltetés előtt: 2002.06.26., 2. ciklus végén: 2002.06.26. 3. ciklus termeltetés előtt: 2002.07.10., 3. ciklus végén: 2002.07.11.

Az utóbbi ábrák alapján szembevetendő, hogy bár a paraffinkiválás kiindulási összetétele a dorozsmai és a mezősasi kutakban meglehetősen eltérő volt, a kezelés hatására lejátszódó jelenségek hasonlóak voltak. A nagyon hosszú láncú, szobahőmérsékleten szilárd paraffinok relatív mennyisége a mintákban megnőtt, ezek az alkánok „feldúsultak” a kiválásokban, ennek hatására a sötét színű, ragacsos, kenhető paraffinkiválások a technológiai lépések során világos, rigid, lemezes szerkezetűvé váltak, ami lehetővé tette, hogy a folyadékáram elsodorja azt. A konzisztencia változásának egyértelmű magyarázata az összetételben, ennek változása pedig a bakteriális tevékenységben keresendő. Ez utóbbi érdekessége, hogy míg a kezelést megelőzően a termelvény vízfázisában  $4 \times 10^6$ , az olajfázisban  $10^4$ , a kiválásban pedig  $3 \times 10^4$

sejt/ml koncentrációban olajbontásra nem képes, endemikus törzsek voltak jelen, addig az alkalmazott technológia során az általunk lejtuttatott baktériumok kiszorították az endemikus flórát és a vízben  $6 \times 10^3$ , az olajban  $3 \times 10^3$ , a kiválásban pedig  $7 \times 10^5$  sejt/ml koncentrációt értek el az utolsó ciklus végére.

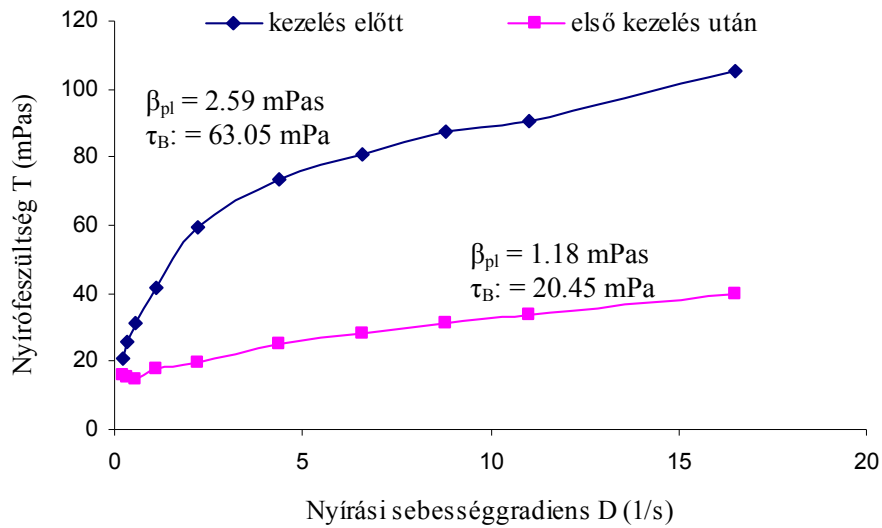
A fentiekhez hasonló folyamatok játszódtak le az algyői mező legsikeresebben paraffinmentesített kútjaiban is, köztük az Algyő-991 jelzésűben is, amelynek alkánösszetétele ismét az eddigiektől eltérő, de az algyői mezőre általában jellemző volt (19. ábra).



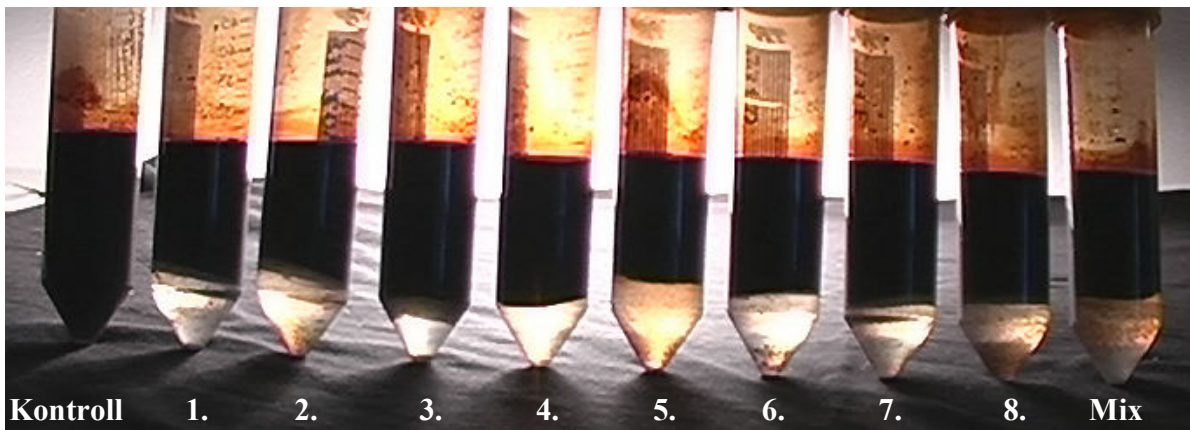
**19. ábra** Az Algyő-991 jelzésű kút paraffinkiválásának *n*-alkán összetétel-változása a bakteriális kezelés hatására GC-vel mérve. Kezelés előtt: 2002.10.27, 3. ciklus végén: 2002.12.02.

Itt is az alkán-spektrum már ismert, a nagyobb lánchosszú tartomány megmaradásának irányába történő eltolódását tapasztaltuk, ami azonban makroszkópiusan a magas aszfalten-tartalom miatt (fényes fekete kiválás, nem bemutatott ábra) nem volt szembeötlő. A kezelés előtt steril kút termelvényéből  $10^4$ , kiválásából pedig  $2.6 \times 10^4$  sejt/ml koncentrációban izoláltuk vissza a baktériumainkat a harmadik kezelés után.

A termelvény viszkozitása már a legelső kezelés hatására erősen csökkent (20. ábra), aminek magyarázatát a baktériumkonzorciumok termelvényre gyakorolt emulzióbontó hatása adta (21. ábra).



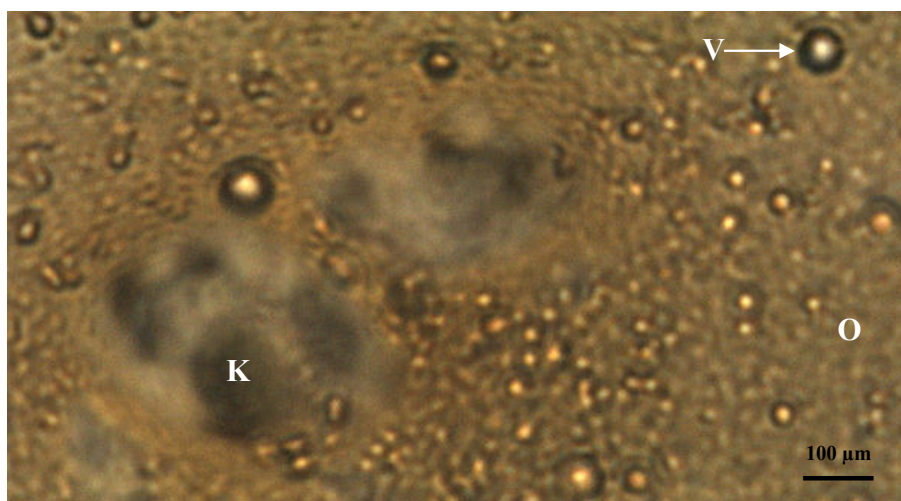
**20. ábra** Az Algyő-991 jelű kút termelvényének reológiai változása a bakteriális kezelés hatására rotációs viszkoziméterrel mérve.



**21. ábra** Bakteriális emulzióbontás. Az Algyő-991 jelzésű kút 30 ml kezeletlen termelvényének és 1-1 ml, DSM 1 tápoldatban felnevelt baktériumkonzorcium-csoport sejtjeinek (8 csoport és a mix) keveréke laboratóriumi körülmények között 100 rpm-mel 168 óráig 37 °C-on rázatva.

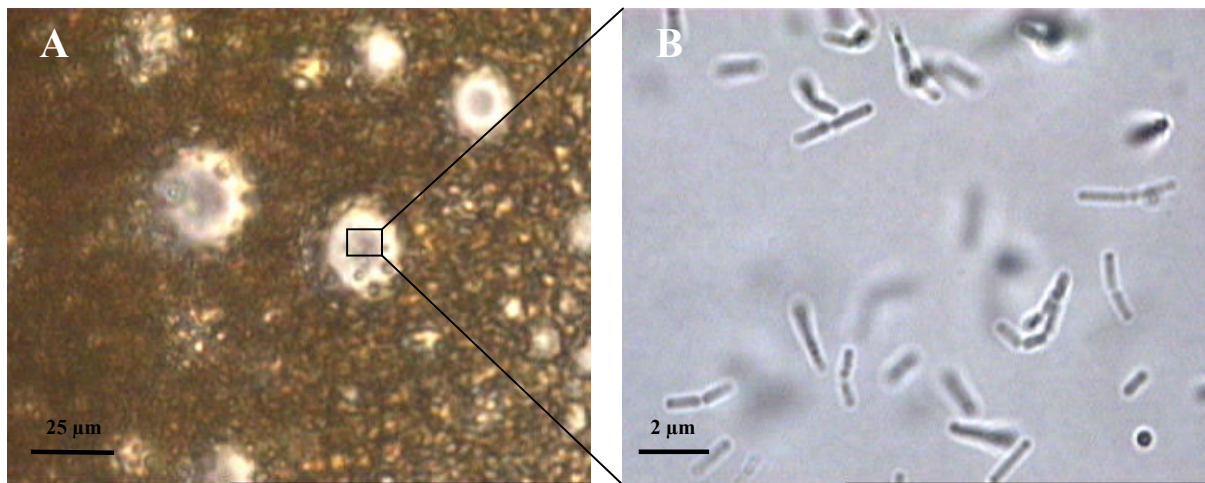
Az utóbbi ábrán jól látható, hogy a sejtmentes kontrollban az emulziós termelvény nem bomlott meg, azonban egyes baktériumkonzorciumok (pl. 2., 5.) illetve a 8 csoport keverékének (Mix) hatására a termelvény víztartalmának (31.5%) gyakorlatilag 100%-a elvált az olajfázistól. Ennek a jelenségnek leheztünk tanúi a kútkezelés során is, a szétváló termelvény-emulzió kétfázisú áramlást eredményezett, a viszkozitás, már az első kezelés után drasztikus csökkenést mutatott.

A kezeletlen termelvény mikroszkópos felvételén (22. ábra) jól láthatóak az olajfázisban emulgeált vízcseppek és a paraffin-aszfaltén-maltén-tartalmú kiválások.

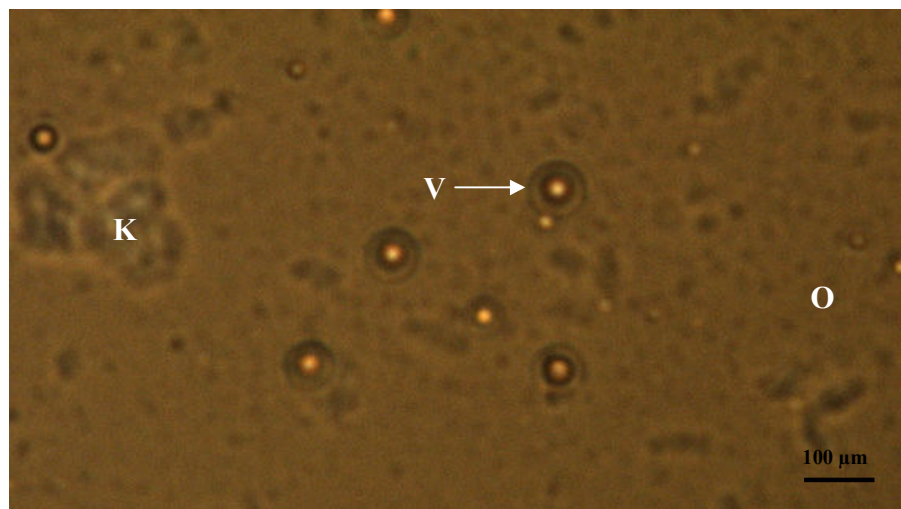


**22. ábra** Az Algyő-991 jelzésű kút kezeletlen termelvényének mikroszkópos képe. O: olajfázis, V: emulgeált vízcsepp, K: szilárd kiválás

A baktériumok az emulgeált vízcseppek belsejében szaporodnak, és aktív mozgásukkal egyesítik őket (23A-B ábra). Végül különálló fázisként kiválik a víz, az olajban csak néhány emulgeált csepp marad, a kiválások nagy része pedig a bakteriális metabolizmus eredményeképpen eltűnik (24. ábra).



**23. ábra** Az Algyó-991 jelzésű kút bakteriálisan kezelt termelvényének v/o emulziójának mikroszkópos képe (A) a belsejükből aktívan mozgó, szaporodó mikrobákkal (B).



**24. ábra** Az Algyó-991 jelzésű kút kezelt termelvény olajfázisának mikroszkópos képe. O: olajfázis, V: emulgeált vízcsepp, K: szilárd kiválás

A paraffinmentesítési technológia alkalmazásával kezelt kutak termelvényeinek viszkozitáscsökkenése általános jelenségnek bizonyult, amit a laboratóriumi batch elrendezésű emulzióbontási tesztek is megerősítettek. Igaz volt ez a kutak azon kb. egy harmadára is, ahol

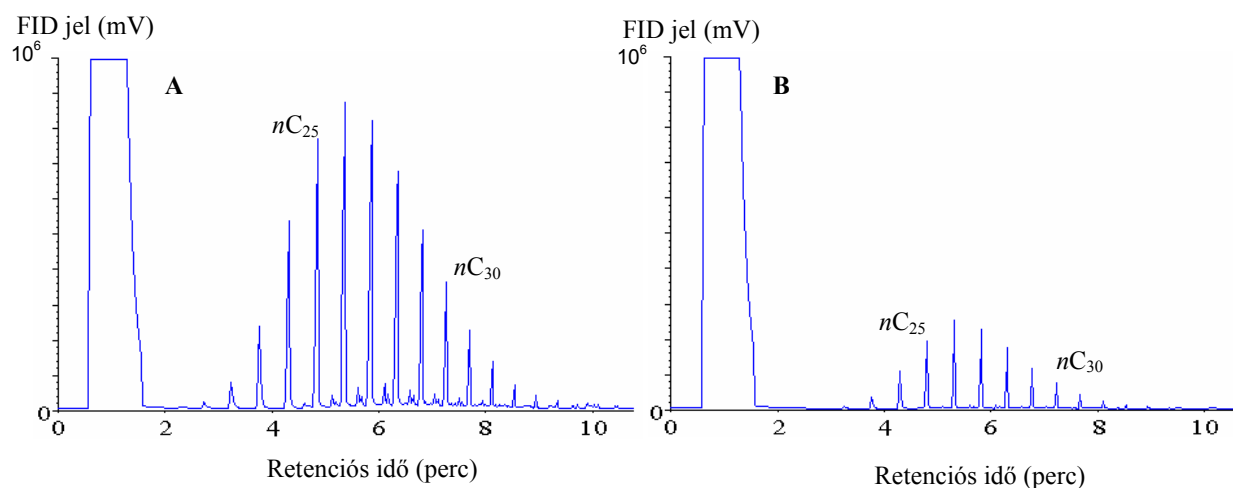
a csőfalon lerakódó kiválások alkán-összetételében gázkromatográfiásan nem volt mérhető változás. A paraffinkiválás bakteriális inhibíciós hatásának időbeli csökkenésével jól korrelált a termelvényekből és kiválásokból visszaizolálható baktériumok koncentrációjának csökkenése (nem bemutatott adatok), ami minden bizonnyal a lejuttatott tápanyagok és ásványi anyagok elfogyásával magyarázható. Azokban a kutakban, ahol 6 hónapnál hosszabb gátlást sikerült elérni, a külsőleg bejuttatott nitrát elektronakceptor fogyasztásával a fakultatív anaerob helyett az aerob biodegradációs folyamatok kerülhettek előtérbe. Az alkalmazott *Pseudomonas* és *Bacillus* törzsekről köztudott, hogy a rövidebb alkánláncok ( $nC_6$ -tól  $nC_{20}$ -ig) metabolizálására képesek és az igen hosszú alkánokéra egyáltalán nem, ami a lejuttatott törzsek számára biodegradálhatatlan komponensek feldúsulásával jár együtt, mint azt a GC mérések eredményeképpen láthattuk.

Ezért a paraffinmentesítési technológiánk továbbfejlesztésére olyan baktériumok izolálását tűztük ki célul, amelyek képesek a nagyon hosszú láncú alkánok ( $>nC_{20}$ ) aerob lebontására a kiválások hőmérsékletén ( $>30\text{ °C}$ ) is. Ilyen baktériumok alkalmazása talaj- és talajvíz-bioremediációs eljárásokban is nagy fontossággal bírhat, hiszen ezek a mineralizálendő szubsztrátkomponensek pl. a nyersolaj-szennyezésekben is igen nagy mennyiségben fordulnak elő.

## 4.2 AZ AR-46 JELŰ TÖRZS IZOLÁLÁSA ÉS IDENTIFIKÁLÁSA

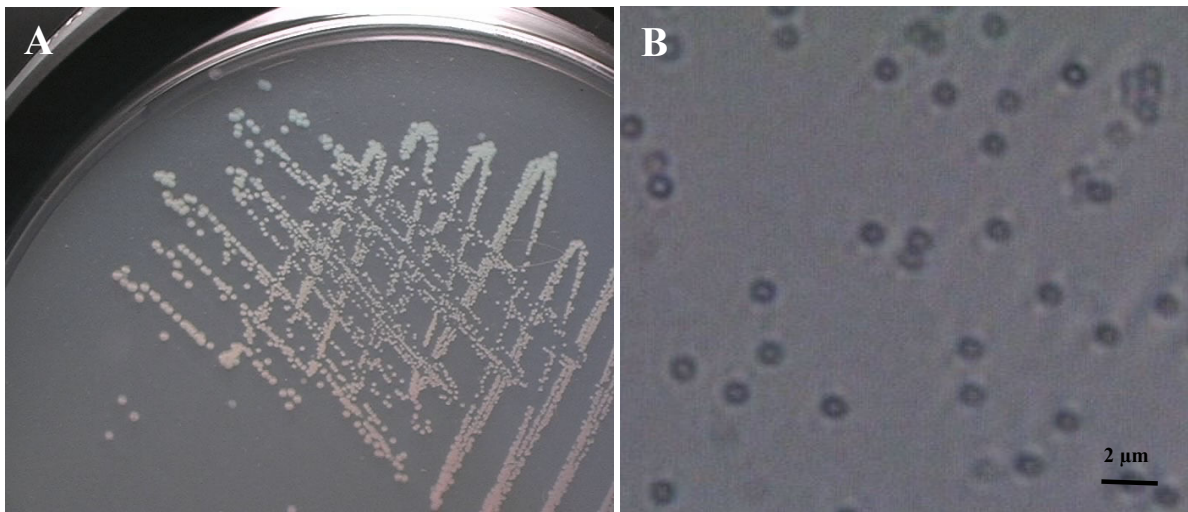
### 4.2.1 Izolálás screenvizsgálatokkal

Az algyői mező kezeletlen kútjaiból származó rétegvíz-minták baktériumflóráját egyedüli szénforrásként 1 g/l DW5052 jelű tisztított százhalmattai paraffint ( $nC_{20}$ - $nC_{38}$ ) tartalmazó minimál tápoldaton dúsítottuk. Többszöri átoltást követően a legmagasabb optikai denzitást mutató tenyészetet gazdag tápoldatra szélesztettük. Az AR-46 jellel ellátott domináns izolátum tiszta tenyészetben is képes volt a paraffin biodegradációjára (**25A,B** ábra).



**25. ábra** Az AR-46 jelű törzs paraffinbontó aktivitásának mérése GC-vel. Az 1 g/l paraffinnal kiegészített sejtmentes kontrollt (A) és az AR-46 sejteket  $5 \times 10^6$  sejt/ml kiindulási koncentrációban is tartalmazó (B) nem rázatott tenyészeteket 168 óráig  $37^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk az analízis előtt.

A törzs DSM 1 táptalajon narancsféher színű, fényes, koncentrikus kolóniákat alkotott, míg mikroszkópiusan a sejtek rövid pálcák voltak, amelyek a növekedés exponenciális fázisában coccoid formát mutattak (**26A,B** ábra).

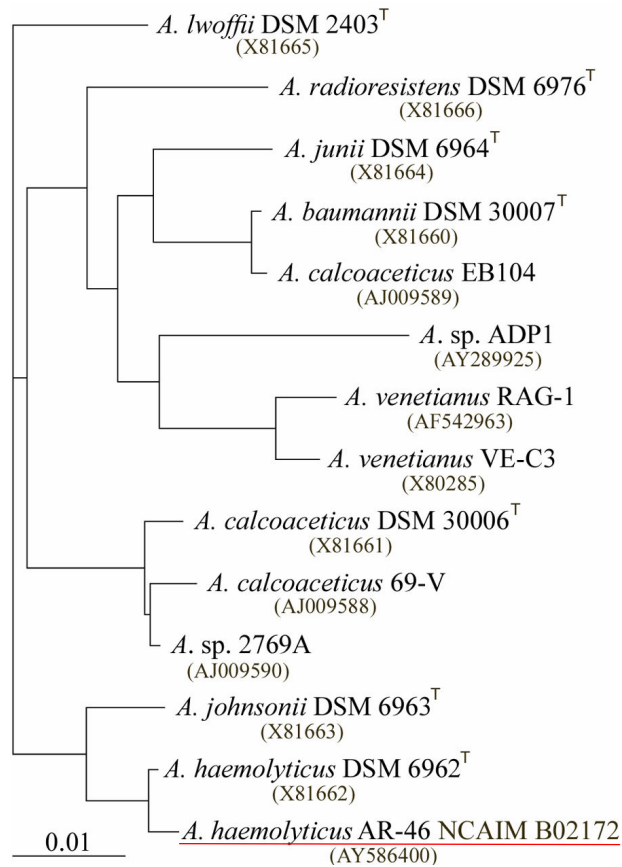


**26. ábra** Az AR-46 jelű törzs kolóniáinak fotója (A) és az exponenciális növekedési fázisban levő sejtek fénymikroszkópos képe (B).

#### 4.2.2 16S rDNS alapú identifikálás

Az AR-46 jelű törzs 16S rDNS génjét kolónia PCR-ral amplifikáltuk, és az EubA, EubB és EubC primerekkel közvetlenül megszekvenáltattuk. A kapott 1413 bp hosszú 16S rDNS fragment szekvenciája (GenBank: AY586400) a legnagyobb homológiát az ammónia-oxidáló *Acinetobacter* sp. YY-5 (99.86%-os egyezés, AY639376) és az *A. haemolyticus* DMS 6962<sup>T</sup> típus törzs (99.51%-os egyezés, X81662) szekvenciájával mutatta. Az adatbázisokból elérhető *Acinetobacter* 16S rDNS szekvenciák összehasonlítása azt mutatta, hogy az AR-46 jelű törzs evolúciósan távol helyezkedik el az ismert szénhidrogén-bontó fajoktól, és inkább az *A. haemolyticus* DMS 6962<sup>T</sup> klinikai típus törzssel mutat közeli rokonságot (27. ábra).





**27. ábra** Az AR-46 jelű izolátum 16S rDNS szekvenciáján alapuló taxonómiai elhelyezkedése a filogenetikai törzsfán. A zárójeles GenBank kódszámokkal jelölt, összehasonlított szekvenciák egyrészt a típus törzsekből (DSM katalógus számmal és <sup>T</sup> szimbólummal), másrészt a releváns olajbontó izolátumokból származnak. A skála 100 nukleotidokénti 1 nukleotid eltérést reprezentál.

#### 4.2.3 A törzs biokémiai identifikálása

Annak a bizonyítására, hogy az AR-46 jelű Gram-negatív izolátum tényleg az *A. haemolyticus* fajba tartozik, további biokémiai azonosítást végeztünk el. A törzs valóban béta-hemolizáló volt, ezért az ilyen törzsekre alkalmazható determinatív fenotipikus tulajdonságok (7. táblázat) alapján is elvégeztük a besorolást.

**7. táblázat** A béta-hemolizáló *Acinetobacter* fajok determinatív fenotipikus tulajdonságai.

Species	Növekedés laktáton	Növekedés malonáton	Növekedés <i>p</i> -hidroxi- benzoáton	Savtermelés glükózból (OF teszt)	Növekedés 41 °C-on	β-xilozidáz termelés
ATCC 17905 <sup>a</sup>	+	D <sup>b</sup>	+	D <sup>b</sup>	-	D <sup>b</sup>
ATCC 17979 <sup>a</sup>	-	-	-	+	-	+
<i>A. venetianus</i> RAG-1 <sup>a</sup>	-	+	-	-	-	-
<i>A. haemolyticus</i> RUH 55 <sup>a</sup>	-	-	+	+	+	D <sup>b</sup>
<i>A. haemolyticus</i> AR-46	-	-	+	+	+	+

<sup>a</sup> Vizsgált különböző biokémiai karakterű hemolizáló törzsvonalak Vaneechoutte (1999) szerint kategorizálva.

<sup>b</sup> Különböző reakciók a különböző taxonokban (D-different).

A táblázatból egyértelműen kitűnik, hogy az *A. haemolyticus* fajokhoz hasonlóan az AR-46 is növekszik *p*-hidroxi-benzoáton, DSM 1 tápoldatban 41 °C-on, glükózból savat termel, rendelkezik β-xilozidáz enzimmel is és nem nő laktáton és malonáton. A többi hemolizáló törzsvonal tagjai legalább két fenotipikus tulajdonságban eltérnek az *A. haemolyticus* fajoktól.

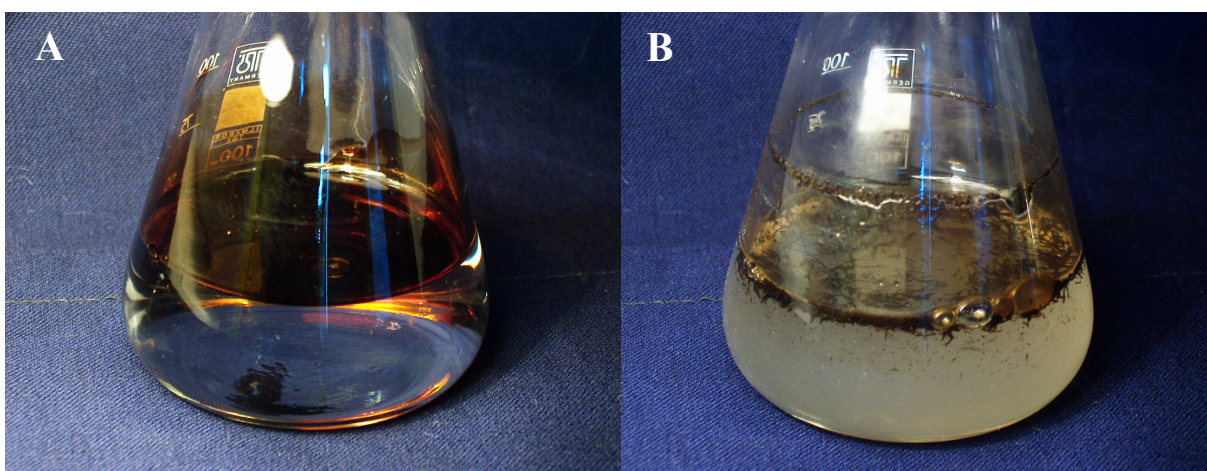
A determinatív tulajdonságok mellett a törzs képes volt egyedüli szénforrásként szaharózt, acetátot, citrátot, kaproátot, malátot, propionátot, alanint, hisztidint és etanolt felhasználni, míg növekedést nem tapasztaltunk arabinóz, fukóz, laktóz, maltóz, mannitol, melibióz, mio-inozitol, ramnóz, ribóz, és szerin szénforrásokon.

A 16S rDNS-alapú és a biokémiai identifikálás eredményeképpen az AR-46 jelű izolátumot egyértelműen az *A. haemolyticus* fajba tartozónak találtuk, és a magyar Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében az NCAIM B02172 szám alatt helyeztük el. A törzs széleskörű vizsgálatának a dolgozat további részében ismertetett eredményeit cikk formában publikáltuk (Bihari *et al.*, 2007).

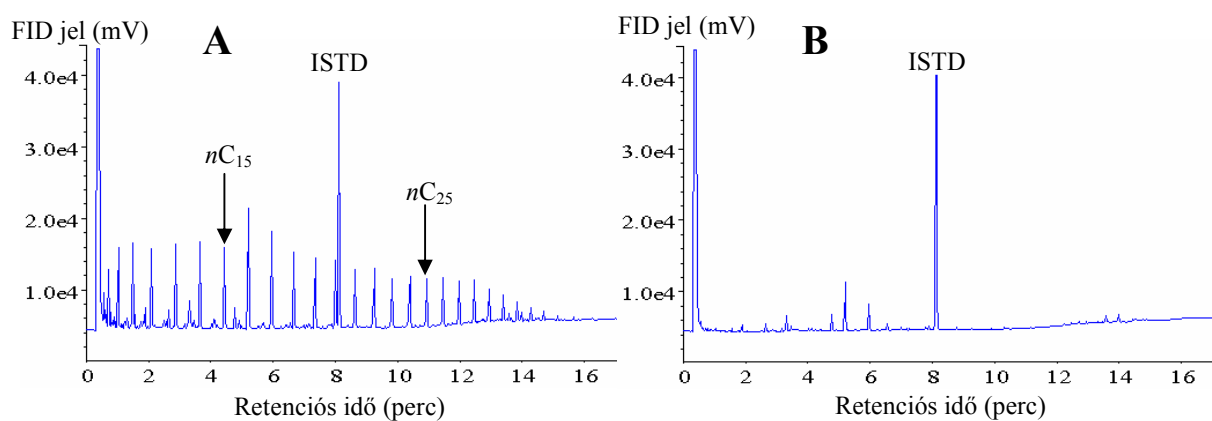
## 4.3 AZ AR-46 JELŰ TÖRZS ALKÁNBONTÁSI MECHANIZMUSA

### 4.3.1 A szénhidrogénbontó képesség vizsgálata

Az AR-46 jelű törzs folyékony nyersolaj szénforráson a szilárd paraffinnál gyorsabb növekedésre (28A,B ábra) és hatékonyabb szubsztrát biodegradációra volt képes (29A,B ábra).



28. ábra Az AR-46 jelű izolátum növekedése 0.1% Demjén-7 jelű olajjal kiegészített 50 ml HNPS tápoldaton 72 óra alatt 37 °C-on (B) a sejtmentes kontrollhoz képest (A) .



29. ábra Az előző ábrán bemutatott AR-46 tenyészetének GC kromatogramjai. ISTD: belső standard.

A paraffin és nyersolaj mineralizáció analitikai eredményeinek kiértékelése alapján az izolátum a C<sub>10</sub>–C<sub>35</sub> lánchosszú normál alkánok valamint izealkánok biodegradációjára képes (l. **25.** és **29. ábra**), azonban a poliaromás szénhidrogének lebontására nem. Ez utóbbi vegyületek, mint fekete „szálacsák” jól látszanak a **28B ábrán**, illetve kisebb móltömegű, illékonyabb komponenseinek GC csúcsai megfigyelhetők a **29B ábrán** is.

Szénforrásként egyedi szénhidrogén-komponenseket alkalmazva az AR-46 jelű törzs valóban nem hasznosította a tesztelt hidrofób aromás vegyületeket, a toluolt, xilolt, naftalint vagy a benz[a]antracént. A sejtek növekedését az elért sejtszám függvényében egyedi *n*-alkán szubsztrátokon a **8. táblázatban** mutatjuk be.

**8. táblázat** Az *A. haemolyticus* AR-46 szubsztrátspecifitása különböző *n*-alkánokon.

Szénforrás <sup>a</sup>	<i>n</i> -C <sub>6</sub>	<i>n</i> -C <sub>10</sub>	<i>n</i> -C <sub>11</sub>	<i>n</i> -C <sub>12</sub>	<i>n</i> -C <sub>16</sub>	<i>n</i> -C <sub>20</sub>	<i>n</i> -C <sub>30</sub>	<i>n</i> -C <sub>40</sub>
Összcisíraszám (%) <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	1.1 ± 0.9	100 ± 0.9	52.3 ± 0.7	3.1 ± 0.1	0 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> A sejtek 1g/l, különböző *n*-alkánnal kiegészített HNPS tápoldatban, nem rázatott körülmények között 48 óráig növekedtek 37 °C-on. A kiindulási sejtszám 5x10<sup>6</sup> sejt/ml volt.

<sup>b</sup> A közölt értékek az adott szubsztráton mért összcsíraszámok, a *n*-C<sub>16</sub> szénforráson elért maximális sejtszám (kb. 7.7x10<sup>8</sup> sejt/ml - 100%) százalékában kifejezve.

<sup>c</sup> Az 5x10<sup>6</sup> sejt/ml-nél kisebb összcsíraszámokat 0%-nak tekintettük (növekedést nem tapasztaltunk).

Az adatok megerősítették azt a megfigyelést, hogy a folyékony alkánok a preferált szubsztrátok a szilárdakkal szemben, a legintenzívebb növekedést *n*-hexadékanon találtuk. Érdekes jelenség viszont az, hogy míg a nyersolajban a többi alkánkomponenssel együtt jelen lévő *n*-dekánt és *n*-undekánt a törzs felhasználta, addig egyedi szénforrásként nem mineralizálódtak, a *n*-dodekán volt a legkisebb lánchosszú szubsztrát, amely mellett sejtszaporodás volt kimutatható.

A preferált *n*-hexadekán szubsztrát jelenlétében meghatároztuk az alkánbontás hőmérsékletoptimumát is, amely 37 °C-nak adódott (**9. táblázat**).

**9. táblázat** Az *A. haemolyticus* AR-46 *n*-hexadekán bontásának hőmérsékletfüggése.

Hőmérséklet (°C) <sup>a</sup>	25	28	31	34	37	40
Összcsíraszám (%) <sup>b</sup>	31.6 ± 2.5	35.1 ± 1.1	69.4 ± 2.3	78.9 ± 1.8	100.0 ± 0.9	14.1 ± 1.9

<sup>a</sup> A sejtek 1g/l *n*-hexadekánnal kiegészített HNPS tápoldatban, nem rázatott körülmények között 48 óráig növekedtek. A kiindulási sejtszám 5x10<sup>6</sup> sejt/ml volt.

<sup>b</sup> A közölt értékek az adott hőmérsékleten mért összcsíraszámok, a 37 °C-on elért maximális sejtszám (kb. 7.7x10<sup>8</sup> sejt/ml - 100%) százalékában kifejezve.

Mivel az ismert *n*-alkánbontó *A. spp.*-t rutinszerűen 30 °C-on nevelik, és alkánbontó képességük hőmérsékletfüggéséről egyáltalán nincs adat a szakirodalomban, ezt néhány rendelkezésünkre bocsátott törzs esetében a fenti módszerekkel elvégeztük (**10. táblázat**).

**10. táblázat** Releváns *Acinetobacter* törzsek *n*-hexadekán biodegradációjának hőmérsékletfüggése.

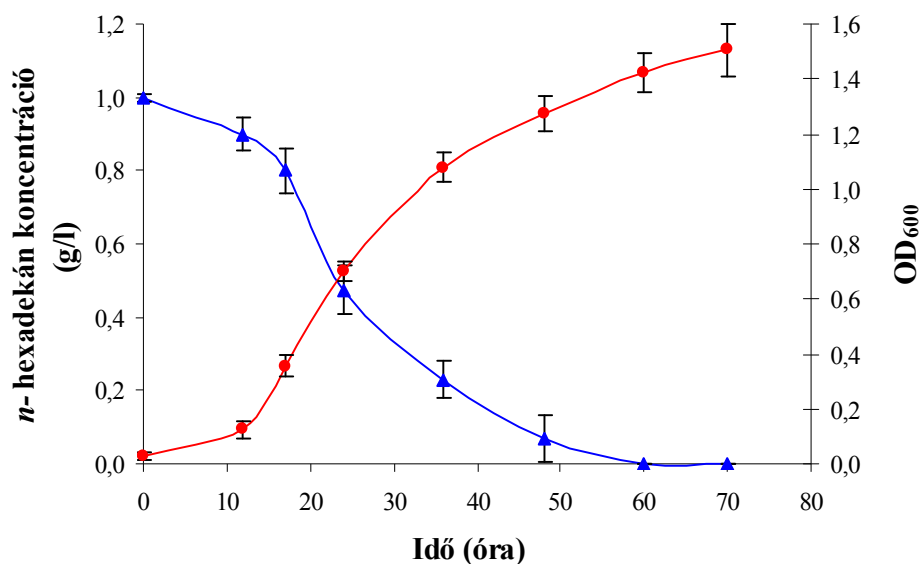
Hőmérséklet (°C) <sup>a</sup>	30	37
	Összcsíraszám (%) <sup>b</sup>	Összcsíraszám (%) <sup>b</sup>
<i>A. sp.</i> ADP-1	22.2 ± 1.6	7.8 ± 0.1
<i>A. sp.</i> 2769A	9.6 ± 0.5	3.4 ± 0.4
<i>A. calcoaceticus</i> NCIB 8250	10.9 ± 0.1	4.8 ± 0.1
<i>A. calcoaceticus</i> 69-V	26.7 ± 0.1	17.1 ± 0.5
<i>A. calcoaceticus</i> EB104	9.7 ± 0.9	19.9 ± 0.6
<i>A. haemolyticus</i> AR-46	55.4 ± 1.6	82.1 ± 0.1
<i>A. venetianus</i> 6A2	87.0 ± 2.4	100 ± 2.6

<sup>a</sup> A sejtek 1g/l *n*-hexadekánnal kiegészített HNPS tápoldatban, nem rázatott körülmények között 48 óráig növekedtek. A kiindulási sejtszám 5x10<sup>6</sup> sejt/ml volt.

<sup>b</sup> A közölt értékek az adott hőmérsékleten mért összcsíraszámok, az *A. venetianus* 6A2 által 37 °C-on elért maximális sejtszám (kb. 9.4x10<sup>8</sup> sejt/ml - 100%) százalékában kifejezve.

Az eredmények tanúsága szerint a 30 °C-kal szemben a 37 °C-on történő alkánbontás preferenciája nem csak az AR-46-ra jellemző egyedi jelenség az *Acinetobacter*-ek között, az *A. venetianus* 6A2 és az *A. calcoaceticus* EB104 is jobban növekszik a magasabb hőmérsékleten. Azonban míg az AR-46 és a 6A2 nagyon intenzív növekedést mutat a 48 órás inkubációs idő alatt, addig az EB104 az előző két törzsnél kapott sejtszámoknak csupán  $24.3 \pm 0.7$ , illetve  $19.9 \pm 0.6\%$ -át éri el. Az alacsonyabb, 30 °C-os hőmérséklet kedvezőbb volt az *A. sp.* ADP-1, *A. sp.* 2769A, *A. calcoaceticus* NCIB 8250 és az *A. calcoaceticus* 69-V számára, még a 37 °C-on növesztett AR-46-éhoz viszonyított relatív sejtszámaik is  $27.0 \pm 1.9$ ,  $11.7 \pm 0.6$ ,  $13.3 \pm 0.1$  és  $32.8 \pm 0.1\%$  voltak. Sőt mi több, még ezen törzsek értékeinek legmagasabbika is kevesebb, mint fele volt a 30 °C-on növesztett AR-46 sejtszámának.

Az optimális szénforráson és hőmérsékleten tenyésztett *A. haemolyticus* AR-46 jelű törzsünk szubsztrátfelvételi és növekedési kinetikája az alábbi lefutást mutatta (30. ábra):



**30. ábra** Az AR-46 jelű törzs szubsztrátfelvételi (▲) és növekedési (●)kinetikája 1g/l *n*-hexadekán szubsztráttal kiegészített HNPS tápoldatban 37 °C-on, nem rázatott körülmények között GC-vel ill. fotometriásan követve. Kiindulási sejtszám:  $2 \times 10^6$  sejt/ml.

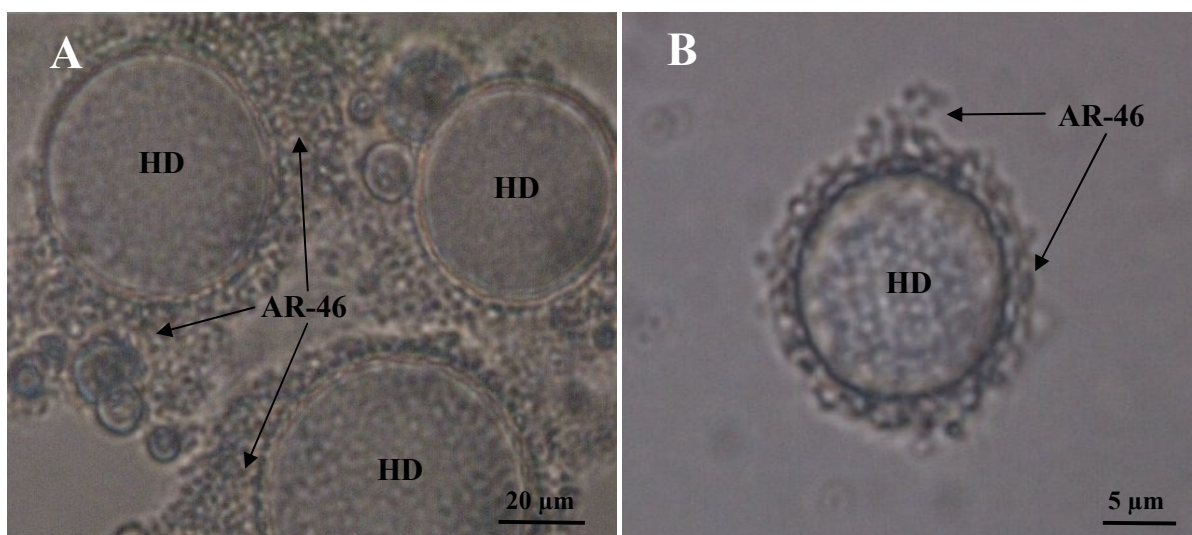
A baktériumok álló tenyészeteti 50 ml HNPS tápoldatban a kiindulási  $2 \times 10^6$ -ról kb. 60 óra alatt nőttek fel  $9 \times 10^8$  sejt/ml-es sejtszámra ( $OD_{600}=1.5$ ) és bontották el teljesen az 1 g/l *n*-hexadékan szubsztrátot. A tapasztalatok szerint a rázatás még gyorsabb biodegradációs sebességet eredményezett az izolátum alkánlebontása során, azonban a kinetikát mégis álló tenyészetekkel végeztük el. Ennek egyik oka az volt, hogy a rázatás (kevertetés) során a sejtek kitapadtak az alkáncseppecskékre, ezek az asszociátumok pedig az Erlenmeyer lombik falára, és a tápoldattal való érintkezése nem minden esetben valósulhatott meg, ami elfogadhatatlanul nagy szórást eredményezett a tenyészetek *n*-hexadékan-koncentrációjának GC-s meghatározásakor. A másik fő ok pedig az ipari alkalmazáshoz kapcsolódik. Mint már említettük, a Dorozsma-55 jelzésű kút mélységi mintájának oldott oxigéntartalma 2 ppm-nek adódott, és ez az érték belül esett azon a tartományon, amit a kinetika során a tápoldatokban mértünk (2-4 ppm). A törzs bioremediációs vagy kútkezelési alkalmazása során a mátrix oldott oxigén-tartalma sem lesz ennél magasabb, az így meghatározott kinetikai paraméterek a mikroaerofil technológiai viszonyokhoz jobban igazodnak, mint a maximális biodegradációs sebesség mesterséges értéke.

A kinetika során mért (idő- $t$ , biomassza száraztömeg- $X_V$ , szubsztrátkoncentráció- $S$ ) és ezekből számított adatok (biomassza növekedési sebesség- $R_X=dX/dt$ , szubsztrát fogyási sebesség- $R_S=dS/dt$ , növekedési sebesség- $\mu= R_X/X_V$ ) felhasználásával a Monod-egyenletek Lineweaver-Burke átrendezéseit ( $1/\mu=K_S/\mu_{max} \cdot 1/S + 1/\mu_{max}$  ill.  $R_S/X_V=1/Y'_{X/S} \cdot R_X/X_V + m_s$ ) grafikusán ábráztuk, és a pontjainkra illesztett egyenesek ( $R^2=0.9761$  ill.  $0.9748$ ) függvényeiből megkaptuk a két legfontosabb biodegradációs kinetikai paramétert. Az adott körülmények között a sejtek maximális specifikus növekedési sebessége ezek alapján ( $\mu_{max}$ )  $0.253 \text{ h}^{-1}$ -nek, míg a yield faktor ( $Y'_{X/S}$ )  $0.576 \text{ kg sejt (kg } n\text{-hexadékan)}^{-1}$ -nek adódott.

#### 4.3.2 Az *A. haemolyticus* AR-46 *n*-alkán felvételi mechanizmusa

A törzs nagy biodegradációs sebessége szükségszerűen hatékony szubsztrátfelvételi mechanizmussal párosul. Méréseink alapján a *n*-hexadekánon növesztett tenyészetek felülúszóiban a növekedés egyik fázisában sem csökken a felületi feszültség, az oldat emulzifikációs aktivitást nem mutat, és szignifikáns mennyiségben nem tartalmaz fehérjét és szénhidrátot. A GC-s megoszlási analízis elvégzése során a levett felülúszó-minták egyike sem volt képes a feleslegben adott alkán szolubilizációját a vízben való oldhatóságának határa fölé vinni, azaz kijelenthetjük, hogy az AR-46 sejtek nem termelnek biotenzideket, bioemulzifikáló anyagokat és extracelluláris membránvezikulákat sem szekretálnak. Következésképp a szubsztrátfelvétel a sejteknek az alkánhoz való direkt kitapadásán keresztül valósulhat meg.

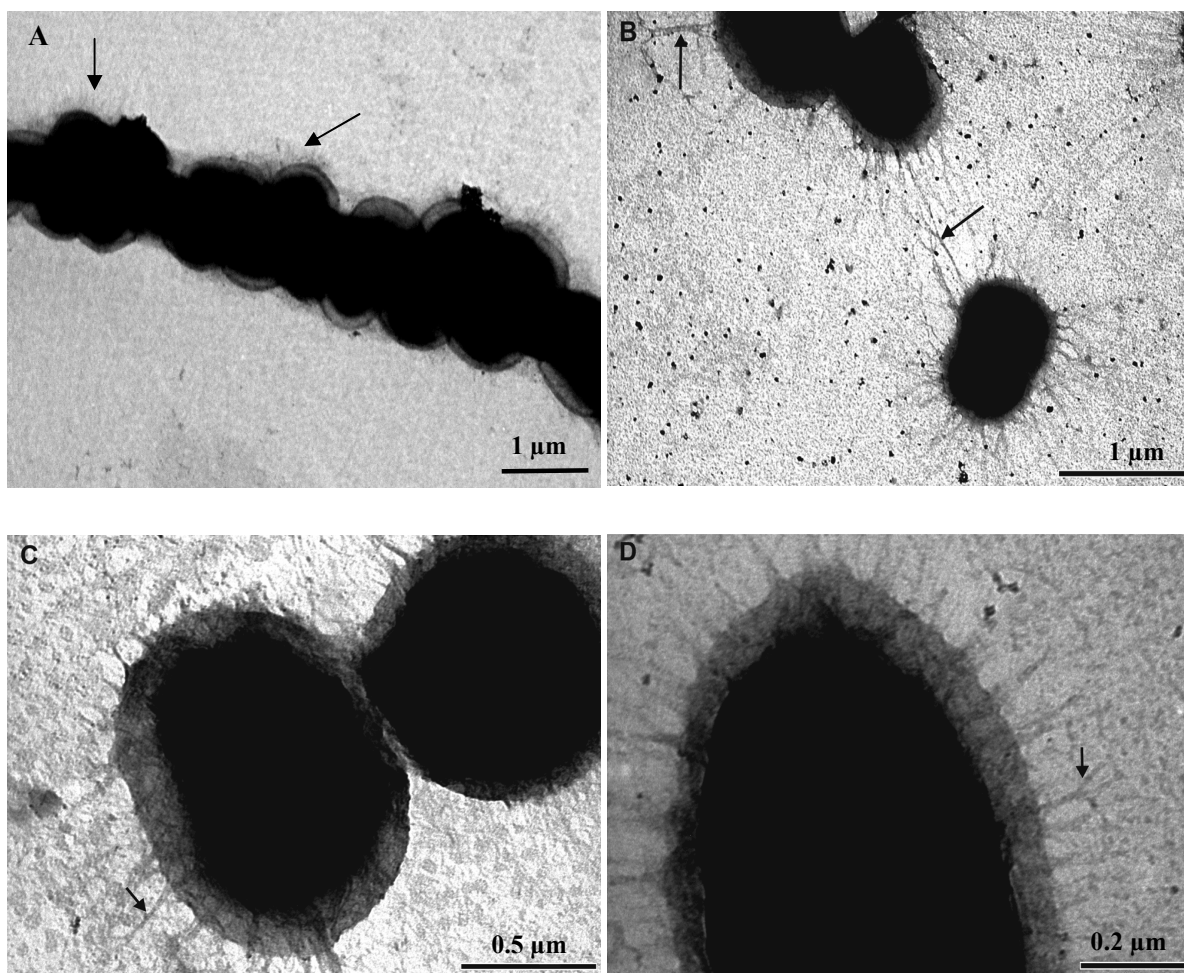
Ez a jelenség már az álló tenyészetek korai exponenciális szakaszában is jól látható, a sejtek körbeveszik a nagy *n*-hexadekáncseppeket (**31A ábra**), amelyek a midlog fázisra apró, sejt-kortexszel borított, és ilyen módon láthatóvá váló cseppecskékre esnek szét (**31B ábra**).



**31. ábra** Az AR-46 jelű törzs sejteinek kitapadása *n*-hexadekán (HD) cseppek (A) és egy cseppecske (B) felszínére fénymikroszkópos felvételen.



Ez a kölcsönhatás annyira erős, hogy a baktériumok még intenzív centrifugálás (16 000g, 10 perc) hatására sem válnak el az alkáncseppekről, és a tápoldat felszínén úszó szubsztráthoz asszociálódva figyelhetőek meg. A TEM felvételek alapján elmondható, hogy a *n*-hexadekánra kitapadt sejteknek vékony csillói nincsenek, csak vastag (11-14 nm) és hosszú (700-1400 nm) csillók figyelhetőek meg náluk (32A,B ábra). A nem kitapadt, szabad sejteknek (32C ábra), valamint a DSM 1 gazdag tápoldaton nevelt sejteknek (32D ábra) szintén csak vastag, 11-14 nm átmérőjű csillóik vannak, de ezek szignifikánsan rövidebbek (370-440 nm).



**32. ábra** Az AR-46 jelű törzs *n*-hexadekánra kitapadt sejt-asszociátumainak (A) és egyedi sejtjeinek (B), valamint az alkánra nem kitapadt, szabad sejtjeinek (C), illetve kontroll DSM 1 tápoldaton felnevelt sejtjeinek (D) TEM képe.

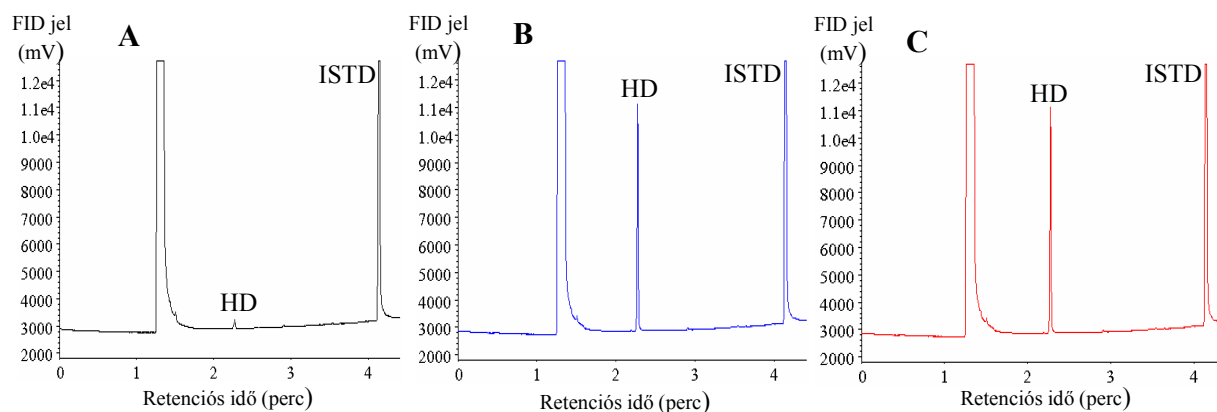
Ezek a morfológiai különbségek jó korrelációt mutattak a MATH tesztek során mért sejtfelszíni hidrofobicitás értékekkel. Tekintve, hogy a teszt során a sejteknek éppen a *n*-hexadékanra való kitapadási képességét vizsgáljuk, az AR-46 törzs *n*-hexadékan bontása közben a szubsztrát felszínére kitapadt, és oda erősen kötődő sejtek hidrofobicitását 100%-nak tekinthetjük. Ezzel szemben a nem kitapadt, szabad sejtek az alkánon történő növesztés minden tesztelt fázisában hidrofil sajátosságokat mutattak. A mért  $\log(A_t/A_0 \times 100)$  értékek a növekedési görbe minden mért pontjában még egy perces vortexelési idő mellett is 1.95-nél nagyobbak mutatkoztak (v.ö. **6. ábra**). Ez azt jelenti, hogy a szabad sejtek kevesebb, mint 10%-a volt képes kötődni a *n*-hexadékanhoz. Ezzel megegyező konstans hidrofilitást tapasztaltunk az AR-46 DSM 1 tápoldaton, illetve egyedüli glükóz vagy 4-hidroxi-benzoát szénforráson nevelt sejtjeinél is.

### **4.3.3 Az *A. haemolyticus* AR-46 *n*-hexadékan katabolizmusa**

#### 4.3.3.1 Oxigenázok enzimaktivitásának vizsgálata

A katabolikus út lépéseinek meghatározásához a hatékony alkánfelvételt követő oxidációs reakciókat katalizáló enzimek kimutatását ill. aktivitásuk mérését az ultrahanggal feltárt sejtek fehérjeextraktumaiból többféle módszerrel is elvégeztük. Mivel a *n*-hexadékan vízben igen rosszul oldódik, első lépésben vízzel oldható, homogén, egyfázisú szubsztrátot kellett előállítani, hogy a fogyást megfelelően tudjuk detektálni GC-vel. Ezt Triton X-100 szintetikus detergens, *Pseudomonas aeruginosa* B110 jelű törzsünk ramnolipid biotenzidének, illetve E/1 jelű törzsünk szekretált emulzifikáló anyagának felhasználásával végeztük el (**33A,B ábra**).

Az ily módon előállított szubsztrát és az AR-46 *n*-hexadékanon midlog ill. korai stacioner fázisig növesztett sejtjeiből származó fehérjeextraktumok enzimreakciói során a Finnerty-lebomlási útra jellemző alkán dioxigenázok aktivitása nem volt mérhető. A szubsztrátfogyást a hozzáadott vas(II) ionok és koenzimek sem segítették elő (**33C ábra**).

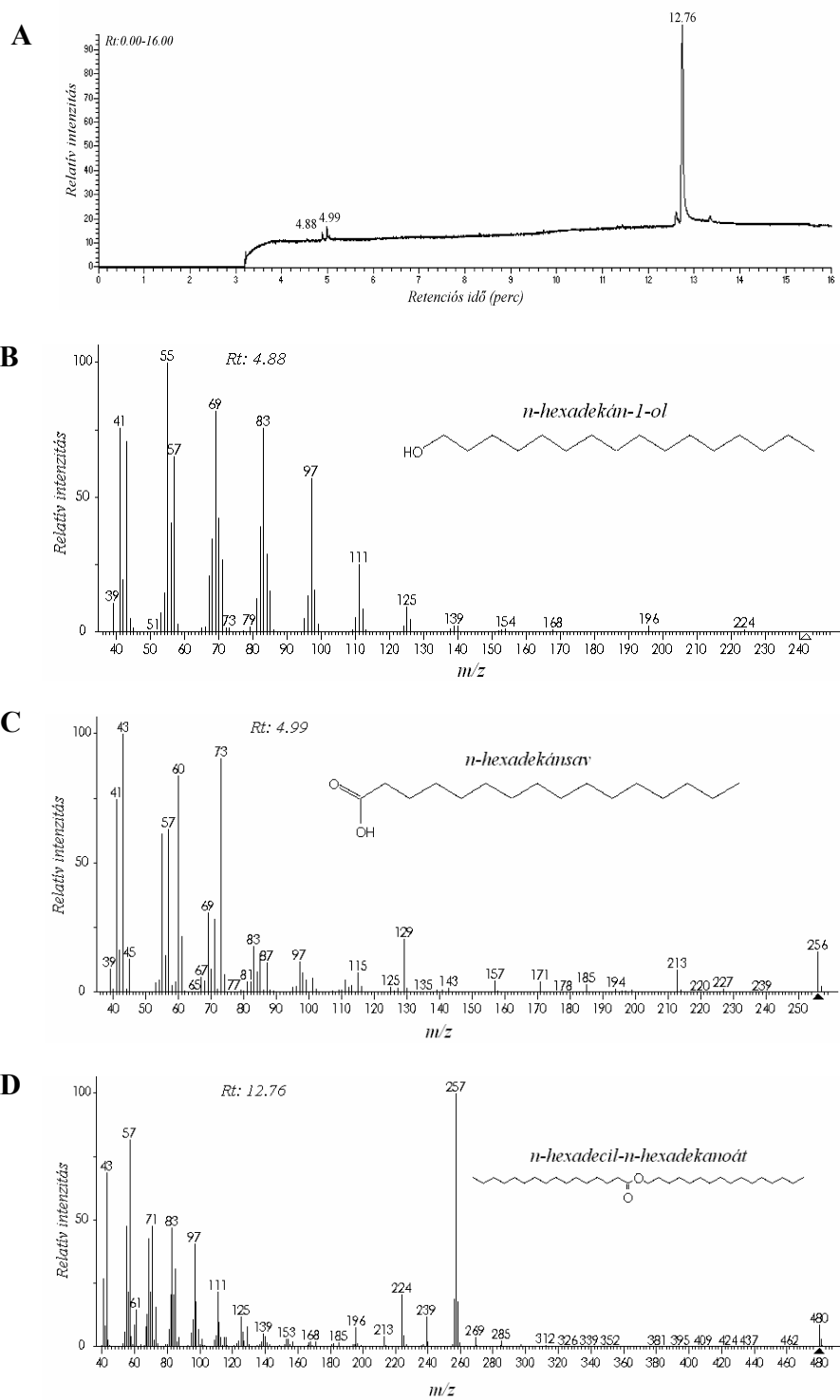


**33. ábra** Az AR-46 jelű törzs alkán oxigenáz enzimeinek GC-s aktivitásmérése. A nyers fehérjeextraktumot, vas(II)-ionokat és koenzimeket tartalmazó reakcióelegy *n*-hexadékan koncentrációja 0 (**B**) és 60 perces (**C**) inkubáció után az E/1 jelű törzs emulzifikáló anyagának jelenlétében (7.5  $\mu\text{mol/ml}$ ) (**B-C**), illetve anélkül (0.4  $\mu\text{mol/ml}$ ) (**A**).

A fehérjeextraktumok CO-differenciál spektrumában sem jelentek meg a citokróm P450-re vagy akár a P420-ra jellemző csúcsok (450 és 420 nm).

#### 4.3.3.2 Lebontási intermedierek kimutatása

Az alkán dioxigenáz és citokróm P450 enzimek aktivitásának hiánya azt jelzi, hogy az oxidációs folyamatokat membránkötött, integrális alkán hidroxilázok végzik, melyek aktivitása az *Acinetobacter*-ekben így nem mérhető. Az ilyen, ún. monoterminális oxidáció legfontosabb intermediereit GC-MS segítségével valóban sikerült azonosítani (**34. ábra**).



**34. ábra** Az 1 g/l *n*-hexadekánt tartalmazó HNPS tápoldaton korai stacioner fázisig növesztett AR-46 sejtek extrahált intermediereinek GC-MS totál ion kromatogramja (A), valamint az 1-hexadekanolként, palmitinsavként ill. vax észterként azonosított csúcsok tömegspektruma (B-D).

HNPS vagy LNPS tápoldaton és *n*-hexadékanon növesztett, logaritmusos vagy stacioner fázisban lévő AR-46 sejtekből egyaránt 1-hexadékanol (*n*-hexadékan-1-ol) és palmitinsav (*n*-hexadékansav) volt kimutatható. Ásványi anyaggal feleslegben ellátott (HNPS) és azt limitáló (LNPS) tápoldatban szaporodó korai stacioner fázisban lévő sejtekben egyaránt *n*-hexadecil-*n*-hexadékanóat vax észter tartalék tápanyag akkumulációját detektáltuk. Szemben az AR-46-tal, a tartalék tápanyag felépítése az *Acinetobacter* sejtekben az eddigi adatok alapján csak ásványi anyag-limitált tápoldatban következik be.

Annak bizonyítására, hogy a monoterminális oxidáció első, legfontosabb lépését valóban *alkM* gén által kódolt, prosztetikus csoportként nem vasat tartalmazó membránkötött integrális alkán hidroxiláz végzi az *A. haemolyticus* AR-46 jelű törzsben, a gén PCR-alapú azonosítását végeztük el elsőként.

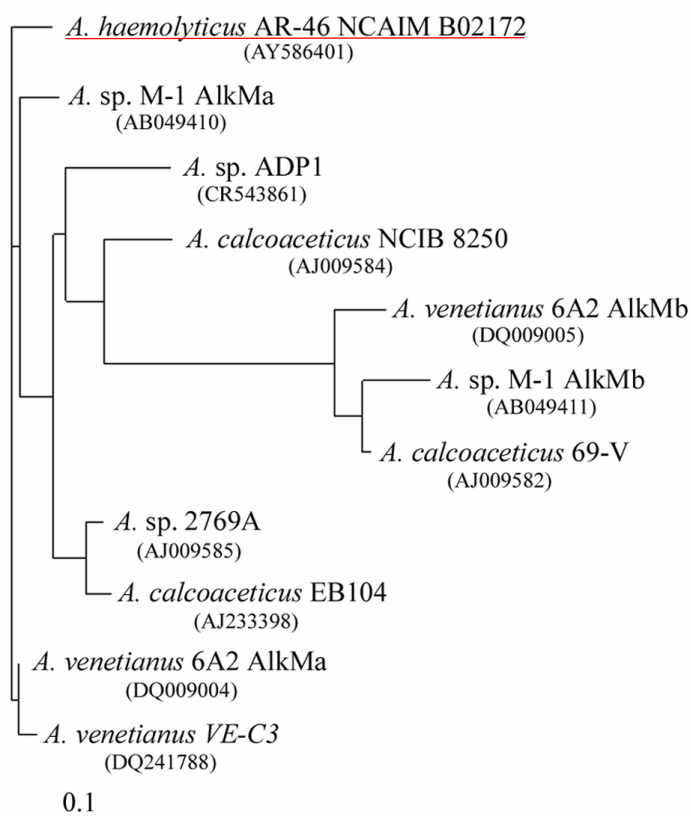
## 4.4 AZ AR-46 JELŰ TÖRZS ALKÁNBONTÓ KÉPESSÉGÉNEK GENETIKAI HÁTTERE

### 4.4.1 Az *alkM* gén azonosítása

A különböző ismert AlkB és AlkM fehérjék szekvenciájának vizsgálata evolúciósan konzervált régiók meglétét mutatta. Az ezekre tervezett degenerált primereket (AlkDegFw és AlkDegRev, l. 5. táblázat) PCR reakcióhoz használtuk. Bár az *alkB* gének a *Pseudomonas* fajokban plazmidon kódoltak, az AR-46 további vizsgálatához genomi DNS-t használtunk, mivel nem sikerült plazmid jelenlétét igazolni az izolátumban (nem bemutatott adatok). Az említett primerek és genomi DNS templát alkalmazásával PCR reakcióban egy 720 bp-os fragmentet amplifikáltunk. A termék szekvenciájának meghatározása során, az valóban egy *alkM* gén fragmentjének bizonyult. Ez a szekvencia kiindulópontként szolgált egy olyan inverz PCR reakcióhoz, amelynek során a teljes *alkM* és a vele szomszédos gének szekvenciáját is megkaptuk. A belső AlkInv1Fw és AlkInv1Rev (l. 5. táblázat) primerpár és *EcoRI*-emésztett majd magára ligált AR-46 genomi DNS templát segítségével az inverz PCR reakció egy 5136 bp-os fragmentet eredményezett. A különböző inverz oligonukleotid primerek (l. 5. táblázat) felhasználásával a fragment teljes hosszát átszekvenáltuk. A szekvenciadatok ismeretében a teljes, 5445 bp hosszú, *EcoRI*-végű DNS szakasz összeállíthatóvá vált, amely 5 teljes és 2 parciális ORF-et tartalmazott.

Az AR-46 jelű törzs ORF6-ja egy *alkM* gén. A kódolt fehérje aminosav- és hidrofobicitás-analízise (HMMTOP szoftverrel) a membránkötött, integrális alkán hidroxilázok tipikus 8-hisztidin motívumának (**HELSH**, **HPYGHH**, **HSDHH**) és 5

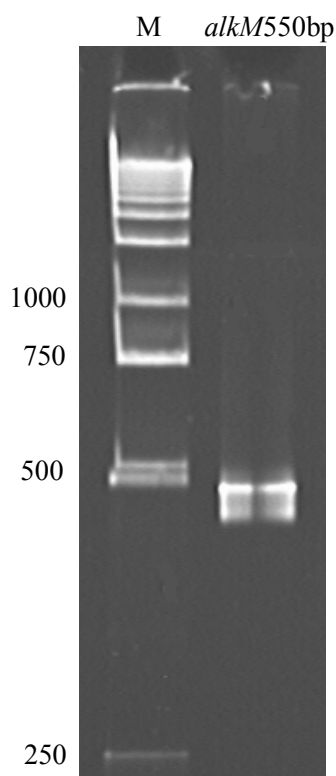
transzmembrán hélixnek (nem bemutatott adat) a meglétét mutatta. A 412 aminosav hosszúságú AR-46 AlkM protein szekvenciája a legnagyobb hasonlóságot az *A. venetianus* 6A2 *alkMa* génje által kódolt parciális alkán hidroxiláz A szekvenciával (96%), az *A. venetianus* VE-C3 parciális AlkM szekvenciával (94%), illetve az *A. sp.* M-1 teljes AlkMA szekvenciájával (93% identikus) mutatta. Az *Acinetobacter* spp. AlkM fehérjei alapján felállított filogenetikai fát a **35. ábrán** mutatjuk be.



**35. ábra** Az AR-46 jelű izolátum AlkM szekvenciáján alapuló filogenetikai elhelyezkedése az *Acinetobacter* genusban. Az összehasonlított szekvenciák GenBank kódszáma zárójelben látható. A skála 100 aminosavankénti 10 eltérést reprezentál.

#### 4.4.2 Az *alkM* gén paralógjainak keresése az AR-46 jelű törzsben

Az általunk tervezett degenerált primerek mellett az AR-46 *alkM* génjét a szintén degenerált TS2S és deg1RE primerekkel is felamplifikáltuk PCR reakcióban. Ezek Gram-pozitív és Gram-negatív törzsek *alkB* és *alkM* homológjainak univerzális amplifikációját teszik lehetővé, és az AR-46 esetében is eredményeztek egy 550 bp-os fragmentet. Mindkét fragment (720 és 550 bp) direkt szekvenciameghatározása során tiszta, egynemű DNS szekvenciákat nyertünk. Az AR-46 izolátum genomjában esetleg jelen lévő és PCR-ral amplifikált *alkM* paralógok elválasztásához, az 550 bp-os fragment denaturáló gradiens gélelektroforetikus analízisét végeztük el. (36. ábra).

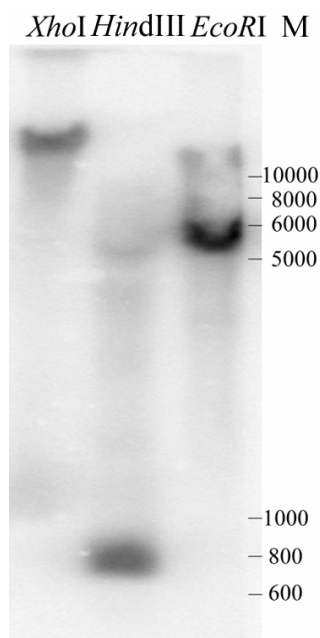


**36. ábra** A TS2S és deg1RE primerekkel amplifikált 550 bp-os AR-46 *alkM* fragment DGGE analízise. M: GeneRuler 1kb DNS marker (bp).



A néhány bp-nyi nukleotid-eltérés azonosítására is alkalmas DGGE módszerrel csak egyetlen *alkM* fragment kettős szálú és annak denaturált egyes szálú formája volt valószínűsíthető, azonban több *alkM* gén jelenlétének egyértelmű kizárására Southern hidridizációs vizsgálatot is végeztünk.

A degenerált primerpárjainkkal amplifikált 720 bp-os *alkM* génfragmentet fluoreszceinnel jelöltük, és ezzel a próbával hibridizáltuk a különböző restrikciós enzimekkel hasított genomi DNS-t alacsony és magas stringenciájú körülmények között is (37. ábra).

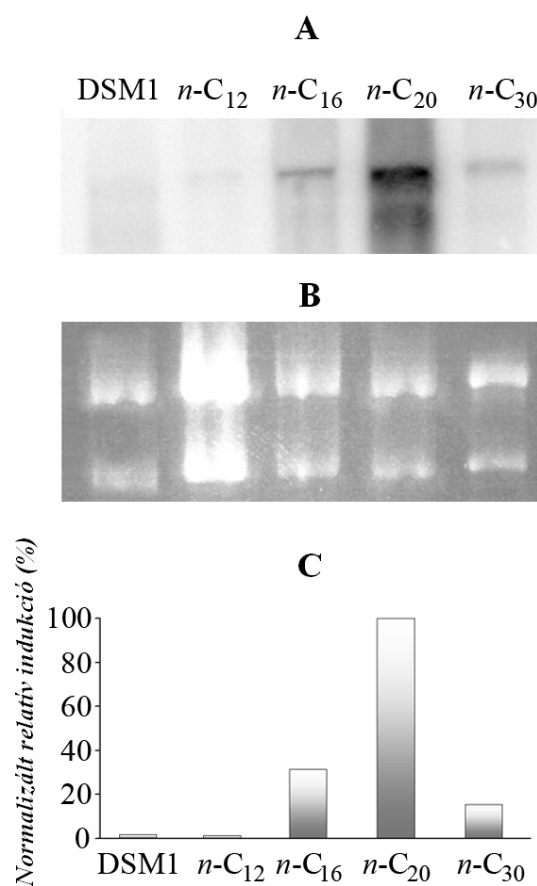


**37. ábra** *XhoI*, *HindIII* és *EcoRI*-emésztett AR-46 genomi DNS Southern blot analízise fluoreszcein-jelölt 720 bp-os *alkM* próbával alacsony stringencia mellett. M: Smart Ladder DNS marker (bp).

Mint azt az ábrán láthatjuk, a jelölt próba csak egy-egy restrikciósan hasított genomi DNS bandhez hibridizált még alacsony stringenciájú körülmények között is (37 °C). A *HindIII* és *EcoRI*-emésztett bandek méretei tökéletesen megfeleltek a később megismert szekvencia alapján elvárható értékeknek (*HindIII*: 685, 695 és 748 bp, *EcoRI*: 5445 bp, amelyben *XhoI* hely nem található)

#### 4.4.3 Az *alkM* gén funkcionális analízise

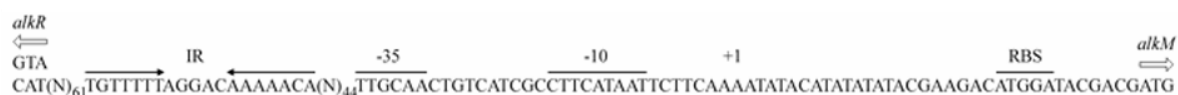
Az *alkM* gén alkánlebontásban játszott szerepének igazolására, a gén különböző szubsztrátok hatására történő kifejeződésének mérésére, Northern hibridizációs analízist végeztünk (38. ábra).



**38. ábra** A Radioaktívan jelölt 720 bp-os *alkM* próbával végzett Northern blot analízis különböző szénforrásokon növesztett AR-46 sejtekből extrahált RNS-en. B A riboszómális RNS kontrollok gélképe. C A 16 S RNS mennyiségével normalizált *alkM* RNS mennyisége a *n*-C<sub>20</sub> esetében kapott érték százalékában.

Mint látható, a próba erősen hibridizált a *n*-hexadekánon, *n*-eikozánon és *n*-triakontánon növesztett sejtekből származó RNS-sel, míg nem kaptunk szignifikáns jelet *n*-dodekán és DSM 1 gazdag tápközeg esetében. A legerősebb indukciót a *n*-C<sub>20</sub> szénforráson nevelt sejtekben mértünk, ennek értéke közel háromszor akkora volt, mint amit az optimális *n*-C<sub>16</sub> szubsztrát hatására tapasztaltunk.

A különböző lánchosszúságú *n*-alkánok az *alkM* gént egy feltételezett promóteren keresztül indukálják, amelynek az elemeit a BPROM szoftver és szekvencia homológiák alapján az *alkM* és a szomszédos *alkR* (ORF5) gének között elhelyezkedő régiójában azonosítani is tudtunk (39. ábra).



**39. ábra** Az AR-46 jelű törzs *alkM* expressziójáért felelős intergenikus szakasz sémája. A feltételezett start kodonokat üres, az AlkR-kötő inverted repeatet teli fekete nyilakkal jelöltük, a többi jelölés a -35 és -10 promóter elemeknek, a transzkripció iniciációs helynek (+1) és a riboszómakötő-helynek (RBS) felel meg.

A feltételezett riboszómakötő-hely, a transzkripció iniciációs hely, a -10 és -35 boxok az *alkM* gén ATG start kodonjától 7, 34, 42 és 62 bp-ra, upstream irányban helyezkednek el. Az *alkM*-mel ellentétes orientációban fekvő *alkR* gén terméke egy 310 aminosavas AraC-XylS-szerű transzkripció regulátor (aktivátor) protein, amelynek feltételezett cél-kötőhelye a -35 elemtől 5' irányban 44 bp-ra található inverted repeat szekvencia.

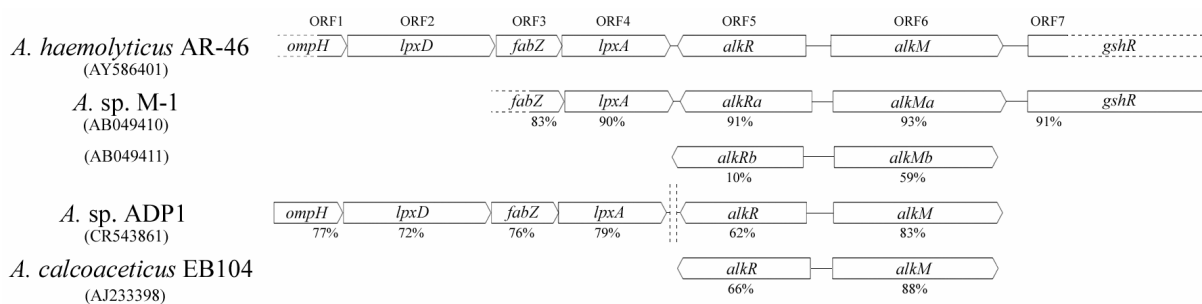
Terveink között szerepelt az AR-46 *alkM* knock-out mutánsának előállítása is. A transzpozonos és a homológ rekombináción alapuló mutagenézis alkalmazásának gátat szabott az a tény, hogy az izolátum rezisztensnek mutatkozott nemcsak kanamicinre, de ampicillinre,

sztreptomycinre, gentamicinre, trimetoprimre és részben klóramfenikolra (50 µg/ml-ig) is, de a tetraciklinre nem. PCR reakcióban amplifikált és pUC19 vektorba klónozott teljes *alkM* gén közepébe sikerült egy tetraciklin kazettát inszertálnunk (l. **11. ábra**). A konstrukciót és annak linearizált formáját többféle módon készített elektrokompetens sejtbe többféle módon is elektroporáltuk, és vártuk, hogy homológ rekombinációval tetraciklin-rezisztens, *alkM* knock-out mutánsokat kapjunk. A szelektív lemezen azonban a törzs alacsony transzformációs, vagy inkább homológ rekombinációs hatékonyságából kifolyólag egyik esetben sem kaptunk transzformánsokat.

#### **4.4.4 Az *alkM* génnel szomszédos, az alkánbontásban valószínűleg szerepet játszó gének azonosítása**

Az inverz PCR termék szekvenciájának megismerésével az *alkM*-mel szomszédos gének is azonosíthatóvá váltak. Downstream irányban egy részleges glutation reduktáz gént (*gshR*, ORF7) találtunk a kromoszómán, amely valószínűleg a *n*-alkán oxidáció során keletkező reaktív oxigéngyökök ártalmatlanításáért felelős proteint kódol (Tani *et al.*, 2001). Az *alkR* géntől 5' irányban korai lipid A bioszintézis géneket azonosítottunk klaszterezett formában. Ilyen volt az UDP-N-acetilglükózamin aciltranszferáz (*lpxA*, ORF4), a 3R-hidroximirisztoil-acil carrier protein dehidratáz (*fabZ*, ORF3), az UDP-3-O-3-hidroxilauroil glükózamin N-aciltranszferáz (*lpxD*, ORF2), illetve végül egy parciális feltételezett külső membrán protein (*ompH*, ORF1) génje.

Ezeknek a géneknek az elrendeződése és szekvenciáik szisztematikus összehasonlítása a különböző *Acinetobacter* fajokban a **40. ábrán** látható.



**40. ábra** Az eddig az *A. spp.*-ben azonosított hasonló gének genetikai elrendeződése. Az egyes törzsek génjeinek GenBank azonosítószámát zárójelben tüntettük fel. A géneket reprezentáló üres nyilak alatt az AR-46 jelű törzs megfelelő génjeire vonatkoztatott szekvenciahasonlóság értéke látható. A vízszintes szaggatott vonalak a meg nem szekvenált gnrészleteket, míg a függőleges szaggatott vonalak a két gén között lévő nagyobb szekvenciátávolságot jelzik.

Az ábrából jól kitűnik, hogy az *A. haemolyticus* AR-46 mind a gének elrendeződésében, mind azok szekvenciájában nagy hasonlóságot mutat az *A. sp. M-1*-gyel. A *n*-alkán biodegradációs gének mindkét törzsnél szorosan a korai lipid A bioszintézis gének mellett találhatóak. Azonban az M-1 törzsből meglévő *alkRb-alkMb* paralógok génjei a genomon távolabb lokalizálódnak és a tőlük upstream irányba elhelyezkedő gének nem hozhatóak összefüggésbe a membránok kialakításával. Az *lpxD-fabZ-lpxA* gének az ADP1-ben is egy klaszterbe rendeződnek, azonban közel 25 kbp távolságra vannak az *alkR-alkM* génektől. Ez utóbbi gének környezetében az ADP1-ben és az EB104-ben is peptidil-prolil *cisz-transz* izomeráz és acil CoA dehidrogenáz található, sőt az ADP1 teljes genomszekvenciájának ismeretében azt is tudjuk, hogy a törzsnél egyáltalán nincs glutation reduktáza.

Vizsgálataink során a katabolizmus szempontjából legfontosabb első lebomlási kulcslépések genetikai hátterét vizsgáltuk részletesebben, az erősen átfedő és összetett regulációval rendelkező reakciókért (l. Irodalmi áttekintés) felelős gének analízisét a jövőben kívánjuk elvégezni.

## 5. DISZKUSSZIÓ

A kőolajtermelés során fellépő és a kutak termelőcsövében ill. kúttalp körüli zónájában lerakódó paraffinkiválás a magyar olajipar egyik legjelentősebb és legköltségigényesebb problémája. A hagyományos fizikokémiai módszerekkel (mechanikai eltávolítás, aromás oldószerrel történő kezelés) a kiválás eltávolítható, de kockázatos, drága és mindig csak időleges. Éppen ezért az utóbbi években felmerült a bakteriális biotechnológia alkalmazásának lehetősége is. Tekintve, hogy a világ nagy kőolajtermelő cégei általában nem túl nagy mélységből termelnek és a hatalmas olajkincs lehetővé teszi a paraffinkiválós kutak egyszerű leállítását, az ilyen kútkezelések általában a szegényebb, kimerülő mezőkkel rendelkező országok számára okoznak igazán jelentős gondot. Így a világon alkalmazott ilyen technológiák száma nem csak kevés, de az összehasonlításra alkalmas konkrét üzemi technológiai adatok, leírások és értékelések nem is publikusak, ipari titokként kezelik őket. Azonban ismert, hogy laboratóriumi körülmények között egyes izolált és kiválasztott aerob és fakultatív anaerob mikróbák konzorciumai a megfelelő ásványi tápanyagok jelenlétében gátolták és részben bontották a kiválást (Lazar *et al.*, 1999). A Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közalapítvány Biotechnológiai Intézetének Bioremediációs Osztálya 2001 óta a MOL 65 kőolajtermelő kútjának paraffinmentesítését végezte el az általunk kifejlesztett és nemzetközi szabadalmi oltalommal védett mikrobiális Huff'n'Puff technológia alkalmazásával (Hlatki *et al.*, 2003b). A módszer lényege az előzetesen szelektált baktériumok konzorciumait, valamint poliszaharidokat, fehérjéket és anorganikus tápanyagokat tartalmazó csőmunkálati folyadékot a besajtolása az előzőleg lezárt kutakba, majd 7-10 nap után a termelés újraindítása három ilyen teljes lezárási-besajtolási-termeltetési ciklusban.

Elővizsgálataink során a Dorozsma-55 jelzésű kút mélységi termelvénymintájának oldott oxigén-tartalma 2 ppm-nek adódott, ami az aerob lebontási folyamatok jelenlétét valószínűsíti. Azonban a kezelést és a megfelelő inkubációt csak a kutak hosszabb idejű lezárásával lehetett végrehajtani, ami inkább anaerob környezetet eredményez. Ezért a módszer kialakítása során az olaj különböző nehézfракcióinak (paraffin, aszfaltén, maltén) leghatékonyabb lebontására, illetve tenzidtermelésre képes fakultatív anaerob *Pseudomonas* és *Bacillus* izolátumokat választottunk ki és alkalmaztuk ezek konzorciumait. A rétegvízminták anionanalízise nem mutatott ki nitrát, vagy nitrit elektronakceptorokat (a szulfát nem használható a keletkező kén-hidrogén korrozív hatása miatt) ezért a csőmunkálati folyadékot nitráttal egészítettük ki. Mivel a szerves N, P és S forrásokat limitáló mennyiségűnek, vagy teljesen hiányzóknak találtuk, a szükséges ásványi anyagokat szintén kívülről pótoltuk.

Elképzelésünk szerint a kút lezárása során az oldott oxigén tenziója lecsökken, ami a denitrifikációs folyamatoknak kedvez. Az általunk is alkalmazott *Pseudomonas aeruginosa*-ról tudjuk, hogy ilyen körülmények között is képes pl. a *n*-hexadékan degradációjára (Chayabutra és Ju, 2000), míg a *Pseudomonas butanovora*-ról mi írtuk le, hogy nemcsak denitrifikációra képes (Kesserű *et al.*, 2002, 2003), de ilyen körülmények között aromás szubsztrátokat is kometabolizál (Kesserű *et al.*, 2005). A folyamatos termelés során egy idő után az elektronakceptor is elfogy, és a beáramló víz visszaállítja a termelőcsőben a mikroaerofil körülményeket. Ezért úgy véljük, hogy a hosszútávon is hatásos paraffingátlás egyik előfeltétele a termelvény vízfázisának megfelelő oldott oxigéntartalma. Ezt láthattuk a Dorozsma-55 példájánál is, ahol a magas tenzió eddig 5 éves, a mai napig is tartó kiválás-inhibíciós hatást eredményezett. Természetesen az oxigéntartalom a kút és a réteg paramétereitől függ, kívülről nem, vagy csak nagyon nehezen változtatható. Adataink alapján a demjéni mezőben kezelt alacsony talphőmérsékletű (30-50 °C) kutak paraffinlerakódás

gátlási hatékonysága 100% volt, ami egyrészt az oxigén magasabb oldhatóságával, másrészt az alacsonyabb kiválási hőmérséklettel is magyarázható. Összességében a törzseinkkel beoltott kutak kétharmadánál a beavatkozás tudományos és anyagi szempontból is egyértelműen sikeres volt, a paraffinkiválás megszűnt, vagy mennyisége drasztikusan lecsökkent és ezzel párhuzamosan a kutak jelentős részénél 30-100 % többletolaj kitermelése volt regisztrálható. A pozitív hatás minimum 3 hónapig tartott, átlagos értéke 6 hónap volt.

Az alkalmazott baktériumok hatása jól látszott a kezelések után a termelvény- és paraffinkiválás-minták megemelkedő összcsíraszámában is, a lejuttatott törzsek visszaizolálhatóak voltak, koncentrációjuk 0.5-4.5 nagyságrendnyi emelkedése korrelált a pozitív üzemi tapasztalatokkal, csökkenésük az inhibíciós hatás lecsengésével járt. A baktériumkonzorciumok képesek voltak laboratóriumi batch (l. **21. ábra**), illetve felszíni tartályolajakkal végzett üzemi kísérletekben (Hlatki *et al.*, 2003a) is az emulziós termelvény megbontására. Ez a tulajdonságuk a kutak üzemi paramétereiben is visszaköszönt, a korábban egységes emulziós termelvény egyfázisú áramlása helyett a termékáram részlegesen kétfázisúvá vált, a víz kiválása csökkentette a termelvény viszkozitását (l. pl. **20. ábra**), ami magyarázhatja az olajtöbbletet. Ezzel párhuzamosan a kiválások alkán-összetétel változása is megfigyelhető volt. A legsikeresebb kezelések hatására a csökkenő mennyiségű kiválásokban feldúsultak a hosszabb láncú ( $>nC_{30}$ ) *n*-alkánok (l. **16, 17, 19. ábra**), ami egyértelműen azzal magyarázható, hogy a szakirodalmi adatoknak megfelelően ezek biodegradálására a *Pseudomonas* és *Bacillus* izolátumok már nem voltak képesek, relatív mennyiségük a mintákban így emelkedhetett meg.

Olyan mikrobák izolálását tűztük ki tehát célul, amelyek az olaj ilyen magasabb lánchosszú paraffinkomponenseit is képesek lebontani. Egy ilyen törzs a kútkezelési technológia fejlesztésén túl szükséges volt a nyersolajjal szennyezett talajok (Hlatki *et al.*,



2002) és talajvizek (GVOP-3.1.1 pályázat) remediálásával, illetve egy új, ún. MEOR technológia kidolgozásával kapcsolatos feladatainkhoz is.

Az AR-46 jelű törzset egy algyői rétegvízmintából szilárd paraffin szénforráson történő dúsítást követően izoláltuk. Mind a 16S rDNS analízise, mind a biokémiai karakterizációja a legmagasabb szintű hasonlóságot az *A. haemolyticus* típus törzsszel mutatta, viszont evolúciósan távol helyezkedett el az ismert alkánbontó *A. spp.*-től (l. **27. ábra**). Az ebbe a fajba tartozó, a környezetből izolált első, *n*-alkán bontásra képes törzs részletes leírását mi adtuk közre (Bihari *et al.*, 2007). Aerob (mikroaerofil) körülmények között az AR-46 egyedi szénforrásként az aromás komponenseket nem tudta hasznosítani, ugyanakkor képes volt a C<sub>12</sub>-től C<sub>35</sub>-ig terjedő normál alkánok lebontására. A tesztelt vegyületek közül a *n*-hexadekánt találtuk optimális növekedési szubsztrátnak ( $\mu_m = 0.253 \text{ h}^{-1}$ ,  $Y'_{X/S} = 0.576 \text{ kg sejt (kg } n\text{-hexadekán)}^{-1}$ ), az optimális 37 °C-os hőmérsékleten. A *n*-alkán degradáció hőmérsékletfüggésének az AR-46 és a többi *Acinetobacter* faj közötti szisztematikus összehasonlítását is elvégezve azt találtuk, hogy bár az *Acinetobacter* törzseket rutinszerűen 30 °C-on növesztik, az *A. calcoaceticus* EB104 és az *A. venetianus* 6A2 számára inkább a 37 °C-os inkubáció az optimális, vagyis az AR-46 magasabb hőmérsékleti optimuma egyáltalán nem egyedi, amit már előrevetített az irodalmi áttekintésben is szereplő *A. sp.* 2TN-NB (Huy *et al.*, 1999) degradációs vizsgálata is. A kísérleti adatok tanúsága szerint kiemelkedő hosszú láncú *n*-alkán biodegradációs képessége alapján az AR-46 és a 6A2 használható leginkább különböző biotechnológiai alkalmazásokban akár 30, akár 37 °C-on.

Az *A. haemolyticus* AR-46 nagy alkánbontási sebessége kifinomult és különleges alkánfelvételi mechanizmussal járt együtt. A sejtek és az alkáncseppcsek között kialakuló szoros kapcsolatot fénymikroszkópiásan is megörökítettük (l. **31A,B ábra**), a kitapadás jelenségének a szolubilizációban és a szubsztrátfelvételben is kulcsszerepe volt. Ezek során az

AR-46 sejtek egyedi jellegzetességeket mutattak, sem az *A. venetianus* RAG-1 törzsnél megfigyelt, elsődleges hidrofób helyekként azonosított vékony (kb. 3.5 nm átmérőjű), sem az ún. „rángatózó mozgásért” felelős vastag csillókat (kb. 5 nm átmérőjű) nem tudtuk azonosítani, találtunk viszont szokatlanul vastag csillókat (11-14 nm átmérőjű). Az alkáncseppcsekék felszínére kitapadt sejteknek ezen képletei szignifikánsan (2-3-szor) hosszabbak voltak, mint a nem kitapadó szabad és a nem alkánon növesztett kontroll sejteké (32. ábra). Ez azt sugallja, hogy ezek a struktúrák kulcsszerepet játszanak a *n*-hexadékan cseppek felszínére történő kitapadásban és annak szolubilizációjában. A jelenség a sejtek fiziológiai tulajdonságaiban is megnyilvánul. A hosszú csillók elsődleges hidrofób helyként való viselkedését alátámasztja az a megfigyelés is, hogy a szubsztrátcseppcsekék és a hidrofób sejtek felszíne közötti kapcsolat olyan erős, hogy szeparációjuk még intenzív centrifugálással sem oldható meg. Azonban a gazdag tápoldatban növekvő sejtekhez hasonlóan az alkán szubsztráton nevelt, a vizes fázisban jelen lévő nem kitapadó sejtek felszíne konstans hidrofilicitást mutat. A tenyésztés során a szabad sejteknek mindig kevesebb, mint 10%-a képes a kitapadásra, míg a megfelelő érték az *A. venetianus* RAG-1 és VE-C3 törzsekben 90% (Baldi *et al.*, 1999). A MATH teszttel jól mérhető sejt felszíni hidrofilicitás értéke általában különböző stresszek (hő-, só- vagy pH-sokk, oxigén-, ásványi anyag- vagy szénforrás-limitáció) hatására emelkedik (Kovács *et al.*, 2002), de jelen esetben inkább a két AR-46 sejt típus között kialakuló specifikus dinamikus egyensúlyról van szó. A hosszú csillókkal rendelkező hidrofób sejtek az alkáncseppcsekék szolubilizációját és felvételét követően hidrofillé válnak és az ásványi anyagokban dús tápoldat vizes fázisa felé igyekeznek, ahol a szubsztrátkötésre már nincsen szükségük, így a csillók hosszának csökkenése tapasztalható. Ezt az új teóriát megerősíti az a tény is, hogy a HNPS tápoldatból nem, de a szabad sejtekből GC-MS-sel kimutathatóak a monoterminális oxidáció interemedierei, a *n*-hexadékan-1-ol és a

*n*-hexadékansav, valamint a *n*-hexadecil-*n*-hexadekanoát vax észter tartalék tápanyag (34. ábra). Ez utóbbi vegyület HNPS tápoldaton való növesztés közbeni akkumulációja egyedülálló jelenség a genusban, hiszen eddig csak az ásványi anyag-limitált körülmények között volt kimutatható a felhalmozódása.

A hosszú és vastag csillók, mint elsődleges hidrofób helyek mellett az AR-46 *alkR-alkM* génjei melletti klaszterben lokalizált *lpxD-fabZ-lpxA* gének termékei is kulcsfontosságúak lehetnek az alkán szolubilizációban. Az expressziójuk hatására keletkező lipid A és a hozzá kapcsolódó lipopoliszaharidok zsírsavakkal összekapcsolódó aminocukrokból állnak, amelyek valamennyi szubsztráthozzáférést elősegítő sejtkomponens, pl. az extracelluláris emulzán, a membránnal borított vezikulumok (Leahy *et al.*, 2003), vagy a sejtfelszíni emulzán-szerű polimerek (Pines *et al.*, 1983) fő alkotóelemei. Az AR-46 izolátum fent említett génjei mellett elhelyezkedő *ompH*-nak szintén lehet szerepe a szolubilizációban, mert az *Acinetobacter* genusban általánosan előforduló membránfehérjéről, mint pl. az *A. radioresistens* OmpA-járól igen jelentős szolubilizációs képességet írtak le (Toren *et al.*, 2001 és 2002).

Az AR-46 sejtek által felvett *n*-hexadékan szubsztrát oxidációját katalizáló enzimeket részletesen vizsgáltuk, de a sejtekből nem tudtunk sem alkán dioxigenáz sem citokróm P450 aktivitást kimutatni. Ez, valamint a GC-MS analízis eredménye a monoterminális alkán monooxigenáz/hidroxiláz enzim jelenlétét valószínűsítette törzsünkben. Ennek megfelelően sikerült is az enzimet kódoló kromoszómális *alkM* gént azonosítanunk, amelynek a Southern hibridizációs és DGGE analízis alapján a genomban nem található paralógja. A többi *A. spp.* *alkM* génjeinek és az AR-46 egyetlen *alkM* génjének az indukciójában és regulációjában a Northern hibridizációs eredmények összehasonlítása során jelentős eltéréseket tapasztaltunk. Az *A. sp.* M-1 törzsben az *alkMa* paralóg expressziója csak C<sub>26</sub>-C<sub>30</sub> *n*-alkánok, míg az *alkMb*-

jé csak C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub> *n*-alkánok hatására indukálódott (Tani *et al.*, 2001), míg ezzel szemben az *A. haemolyticus* AR-46 *alkM* génjének transzkripcióját a teljes hosszú láncú *n*-alkánok széles spektruma (C<sub>16</sub>-C<sub>30</sub>) indukálta. Az általunk igen hatékony *n*-alkánbontónak talált *A. venetianus* 6A2 esetében is a két *alkM* gén kettős regulációja tapasztalható. Bár Northern hidridizációs analízist a szerzők nem végeztek, az elkészített *alkM* knock-out mutánsok számára metabolizálható *n*-alkánok vizsgálata azt mutatta, hogy a 6A2 *alkMa* génje a C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub>, míg az *alkMb* a C<sub>10</sub>-C<sub>14</sub> *n*-alkánok lebontásáért felelős (Throne-Holst *et al.*, 2006). Az eredmények tükrében kijelenthető, hogy az alkán indukciós profil alapvetően a regulációs mechanizmustól és nem az AlkM proteinek szekvenciájától függ, hiszen az AR-46 AlkM-je 96% ban identikus a 6A2 és 93%-ban az M-1 AlkMa-jával, de mégis gyökeresen eltérő *n*-alkán poolok kapcsolják be az *alkM* gének transzkripcióját. Az a tény, hogy az AR-46 egyetlen alkán hidroxiláz génje a *n*-alkánok széles spektrumának a hatására képes indukálódni, evolúciósan előnyös lehet a 6A2-vel és az M-1-gyel szemben, főként valós környezeti körülmények között, ahol a szennyezés szénhidrogén-összetétele általában meglehetősen diverz.

Azonban csak egy, jól indukálódó *alkM* gén megléte sem jelent automatikusan magas biodegradációs aktivitást. Az *A. sp.* ADP1 *alkM* génje C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> *n*-alkánok (a hosszabbakat nem vizsgálták - Ratajczak *et al.*, 1998b) hatására erőteljes transzkripciót mutat, és az AlkM fehérje szekvenciája is hasonló az AR-46 AlkM-éhez (83% azonosság). Sőt mi több, az *in silico* analízis mindkét törzsben az *alkM* upstream régiójában hasonló promóter elemeket és az AraC-XylS-szerű AlkR transzkripció regulátor fehérje inverted repeat cél-kötőhelyét azonosította (v.ö. 7. és 39. ábrát). Ezek alapján az ADP1-hez hasonlóan minden bizonnyal az AR-46-ban is esszenciális az AlkR fehérje az *alkM* gén alkánok hatására indukálódó transzkripciójában. Azonban ezen hasonlóságok ellenére az AlkR szekvenciák (62% azonosság), a felvételi mechanizmusok, az ezt követő oxidációs folyamatok, vagy más egyéb

jellemzők közötti különbségek a két törzs biodegradációs sebességében nagy eltéréseket okozhatnak, hiszen *n*-hexadekánon az AR-46 jelű izolátum az ADP1-nél lényegesen hatékonyabb mineralizációra képes (10. táblázat), és ezáltal kiváló alanya lehet fontos biotechnológiai alkalmazásoknak.

Azonban az AR-46 különleges *n*-alkán metabolizmusának megértéséhez, a lebontási út későbbi elemeinek azonosításához további vizsgálatokra van szükség. A *n*-dodekán hatására pl. az *alkM* gén nem indukálódik, és mivel alkán dioxigenáz és citokróm P450 aktivitás a sejtekből nem volt kimutatható, ennek a szubsztrátnak a lebontása valószínűleg valamilyen eddig ismeretlen lebontási útvonalon zajlik. Bár egyedi szénforrásként a törzs nem képes a  $nC_{10}$ - $nC_{11}$  hasznosítására, ám nyersolajon történő növesztés során ezek a komponensek is degradálódnak. Ezért valószínűleg szintén ez az új katabolikus út, vagy a többi *n*-alkán indukciós hatására termelődő AlkM ezen szubsztrátokra is gyakorolt aktivitása a felelős. Sajnos a helyspecifikus rekombináció alacsony frekvenciája erősen gátolja a mélyebb genetikai analízist, az *A. sp.* M-1 törzshöz hasonlóan az *A. haemolyticus* AR-46-ban sem lehetett homológ rekombinációval knock-out mutánsokat előállítani. A jövőben keressük a válaszokat arra az érdekes kérdésre, hogy az *alkM* gén miért indukálódik erősebben a *n*-eikozán, és nem az optimális szubsztrátnak talált *n*-hexadekán hatására. Meg kívánjuk vizsgálni a tartalék tápanyag szintéziséért felelős géneket és enzimeket is, hiszen az ásványi anyag felesleget tartalmazó HNPS tápoldatban történő vax észter akkumuláció az izolátumunk egyedi jellegzetességének tűnik az *Acinetobacter* genusban.

## 6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani

témavezetőmnek, Dr. Mécs Imrének, hogy hasznos tanácsaival irányította kutatásaimat és elősegítette szakmai fejlődésemet;

Dr. Kálmán Miklósnak, a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közalapítvány Biotechnológiai Intézetének igazgatójának, hogy a munkához szükséges feltételeket biztosította;

munkatársaimnak, Dr. Balázs Jánosnak, aki az olajipari technológiák kialakításában és az értékelés módszertanában irányította munkámat;

Dr. Apjok Józsefnek, aki mindig készségesen segített a szerves kémiai problémák megoldásában;

Dr. Ágoston Évának a törzsek biokémiai identifikálásában nyújtott segítségért;

Lengyel Gyulának a fénymikroszkópiás és fényképfelvételek elkészítéséért;

Dr. Kiss Istvánnak és Dr. Kesserű Péternek, akik a kutatások irányításában és a tudományos munka kontrollálásában jelentős szerepet vállaltak;

Szvetnik Attilának, aki a molekuláris biológiai munka során felmerülő kérdéseket mindig segített megválaszolni;

Balázs Margitnak és Bartos Péternek, akik a laboratóriumi munka elvégzésében rendkívül hasznos segítséget nyújtottak;

Göblös Szabolcsnak, aki az ábraanyag elkészítésében rengeteget segített;

Tóth Máriának, Bordás Diánának, Zsurka Ferencnének, Bánfalvi Szabolcsnének és Szilágyi Lajosnének, akiknek a mindennapi segítségére és értékes munkájára mindig számíthattam, valamint a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közalapítvány Biotechnológiai Intézet összes dolgozójának.

Köszönetet szeretnék mondani szerzőtársaimnak,

Dr. Pettkó-Szandtner Aladárnak, akivel a molekuláris biológiai kísérleteket és

Dr. Csanádi Gyulának, akivel a GC-MS analíziseket végeztük.

Továbbá,

Dr. Tamás Gábornak és Dr. Varga Csabának, akik lehetővé tették a TEM felvételek elkészítését;

Dr. Hlatki Miklósnak és Dr. Puskás Sándornak, akik a MOL NyRt. részéről az olajipari technológiák kialakításában és a felmerülő kérdések megválaszolásában segédkeztek;

Prof. J. B. van Beilennek, Prof. P. A. Williamsnek, Dr. M. Throne-Holstnak és Prof. S. B. Zotchevnek, akik munkámhoz a kért *Acinetobacter* törzseket rendelkezésemre bocsátották.

## 7. IRODALOMJEGYZÉK

Asperger O., Kleber H.-P. (1991), Metabolism of alkanes by *Acinetobacter* In: Towner K. J., Bergogne-Berezin E., Fewson C. A. (eds), The biology of *Acinetobacter*. Plenum Press, New York, N.Y., 323-350.

Austin R. N., Chang H.-K., Zylstra G. J., Groves J. T. (2000), The non-heme diiron alkane monooxygenase of *Pseudomonas oleovorans* (ALkB) hydroxylates via a substrate radical intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 11747-11748.

Bach H., Berdichevsky Y., Gutnick D. (2003), An exocellular protein from the oil-degrading microbe *Acinetobacter venetianus* RAG-1 enhances the emulsifying activity of the polymeric bioemulsifier emulsan. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2608-2615.

Baldi F., Ivosevic N., Minacci A., Pepi M., Fani R., Svetlicic V., Zutic V. (1999), Adhesion of *Acinetobacter venetianus* to diesel fuel droplets studied with *in situ* electrochemical and molecular probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2041-2048.

Baldi F., Pepi M., Capone A., della Giovampaola C., Milanese C., Fani R., Focarelli R. (2003), Envelope glycosylation determined by lectins in microscopy sections of *Acinetobacter venetianus* induced by diesel fuel. *Res. Microbiol.* **154**, 417-424.

BCM Search Launcher honlap: <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html>

Bergey D. H. (1993), Gram-negative aerob rods and cocci. In: Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A. (Eds) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams & Wilkins, Section 4.



- Bihari Z.**, Pettkó-Szandtner A., Csanádi Gy., Balázs M., Bartos P., Kesserű P., Kiss I., Mécs I., (2007), Isolation and characterization of a novel *n*-alkane-degrading strain, *Acinetobacter haemolyticus* AR-46. Z. Naturforsch. C – elfogadott cikk.
- Bogan B. W., Sullivan W. R., Kayser K. J., Derr K. D., Aldrich H. C., Paterek J. R. (2003), *Alkanindiges illinoisensis* gen. nov., sp. nov., an obligately hydrocarbonoclastic, aerobic squalane-degrading bacterium isolated from oilfield soils. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **53**, 1389-95.
- Boll M., Fuchs G., Heider J. (2002), Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. Curr. Opin. Chem. Biol. **6**, 604-611.
- Borneleit P., Hermsdorf T., Claus R., Walther P., Kleber H. P. (1988), Effect of hexadecane-induced vesiculation on the outer membrane of *Acinetobacter calcoaceticus*. J. Gen. Microbiol. **134**, 1983-1992.
- Bouchez-Naitali M., Rakatozafy H., Marchal R., Leveau J. Y., Vandecasteele J. P. (1999), Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. J. Appl. Microbiol. **86**, 421-428.
- Bradford M. M. (1976), A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**, 248-254.
- Brzostowicz P. C., Gibson K. L., Thomas S. M., Blasko M. S., Rouviere P. E. (2000), Simultaneous identification of two cyclohexanone oxidation genes from an environmental *Brevibacterium* isolate using mRNA differential display. J. Bacteriol. **182**, 4241-4248.
- Burlage R. S., Hooper S. W., Saylor G. S. (1989), The TOL (pWW0) catabolic plasmid. Appl. Environ. Microbiol. **55**, 1323–1328.

- Callaghan A. V., Gieg L. M., Kropp K. G., Suflita J. M., Young L. Y. (2006) Comparison of mechanisms of alkane metabolism under sulfate-reducing conditions among two bacterial isolates and a bacterial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 4274-4282.
- Canosa I., Sanchez-Romero J. M., Yuste L., Rojo F. (200), A positive feedback mechanism controls expression of AlkS, the transcriptional regulator of the *Pseudomonas oleovorans* alkane degradation pathway. *Mol. Microbiol.* **35**, 791-799.
- Cardini G, Jurtshuk P. (1968) Cytochrome P-450 involvement in the oxidation of n-octane by cell-free extracts of *Corynebacterium* sp. strain 7E1C. *J. Biol. Chem.* **243**, 6070-6072.
- Chakrabarty A. M., Chou G., Gunsalus I. C. (1973), Genetic Regulation of Octane Dissimilation Plasmid in *Pseudomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **70**, 1137–1140.
- Chayabutra C., Ju L.K. (2000), Degradation of *n*-hexadecane and its metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under microaerobic and anaerobic denitrifying conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 493-498.
- Chen Y. C., Peoples O. P., Walsh C. T. (1998), *Acinetobacter* cyclohexanone monooxygenase: gene cloning and sequence determination. *J. Bacteriol.* **170**, 781-789.
- Choi D. H., Hori K., Tanji Y., Unno H. (1999), Microbial degradation kinetics of solid alkane dissolved in nondegradable oil phase. *Biochem. Eng. J.* **3**, 71-78
- Choi K. H., Kumar A., Schweizer H. P. (2006), A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J. Microbiol. Methods.* **64**, 391-397.
- Christova N., Tuleva B., Nikolova-Damyanova B. (2003), Enhanced hydrocarbon biodegradation by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. *Z. Naturforsch.* **59c**, 205-208.

- Dennis J. J., Zylstra G. J. (1998), Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2710-2715.
- Di Cello F., Pepi M., Baldi F., Fani R. (1997), Molecular characterization of an *n*-alkane-degrading bacterial community and identification of a new species, *Acinetobacter venetianus*. *Res. Microbiol.* **148**, 237-249.
- Doten R. C., Ngai K.-L., Mitchell D. J., Ornston L. N. (1987), Cloning and genetic organization of the *pca* gene cluster from *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Bacteriol.* **169**, 3168-3174
- Doumenq P., Aries E., Asia L., Acquaviva M., Artaud J., Gilewicz M., Mille G., Bertrand J. C. (2001), Influence of *n*-alkanes and petroleum on fatty acid composition of a hydrocarbonoclastic bacterium: *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* strain 617. *Chemosphere.* **44**, 519-528.
- Dubois M., Gilles K., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. (1951), A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* **168**, 167.
- EBI ClustalW honlap: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>
- Ehrenreich P., Behrends A., Harder J., Widdel F. (2000) Anaerobic oxidation of alkanes by newly isolated denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **173**, 58-64. Erratum: *Arch. Microbiol.* **173**, 232.
- Engbrecht J. A., Brent R., Kaderbhai M. A. (1991), Minipreps of plasmid DNA. In: Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (eds)

- Current Protocols in Molecular Biology (1994), John Wiley & Sons, Inc., New York 1.6.1 and 1.6.4.
- Finnerty W. R. (1990), Assay methods for long-chain alkane oxidation in *Acinetobacter*. Methods. Enzymol. **188**, 10-14.
- Fujii T., Narikawa T., Sumisa F., Arisawa A., Takeda K., Kato J. (2006), Production of alpha, omega-alkanediols using *Escherichia coli* expressing a cytochrome P450 from *Acinetobacter* sp. OC4. Biosci. Biotechnol. Biochem. **70**, 1379-1385.
- Forney F. W., Markovetz A. J. (1970), Subterminal oxidation of aliphatic hydrocarbons. J. Bacteriol. **102**, 281-282.
- Fox M. G., Dickinson F. M., Ratledge C. (1992), Long-chain alcohol and aldehyde dehydrogenase activities in *Acinetobacter calcoaceticus* strain HO1-N. J. Gen. Microbiol. **138**, 1963-1972.
- Geissdorfer W., Kok R. G., Ratajczak A., Hellingwerf K. J., Hillen W. (1999), The genes *rubA* and *rubB* for alkane degradation in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 are in an operon with *estB*, encoding an esterase, and *oxyR*. J. Bacteriol. **181**, 4292-4298.
- Goldman S., Shabtai Y., Rubinovitz C., Rosenberg E., Gutnick D. L. (1982), Emulsan in *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1: distribution of cell-free and cell-associated cross-reacting material. Appl. Environ. Microbiol. **44**, 165-170.
- Habe H., Omori T. (2003) Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. Biosci Biotechnol Biochem. **67**, 225-243.
- Hlatki M., Kálmán M., Puskás S., Mécs I., Balázs J., Lengyel Gy., Virág Zs., Kovács Gy., Horváth F., Samu F. (2002), Eljárás talaj minőségének javítására bioexplozióval, továbbá mikroorganizmusok előállítására erre a célra. PCT/HU02/00103 Nemzetközi Szabadalom

- Hlatki M., Puskás S., Mécs I., Balázs J., Lengyel Gy., (2003a), Eljárás a kőolajtermelő kutakban és a felszíni termelő berendezésekben keletkező víz/kőolaj és/vagy kőolaj/víz emulziók petrol-biokémiai módszerekkel történő kezelésére. PCT/HU03/00078 Nemzetközi Szabadalom
- Hlatki M., Mécs I., Puskás S., Balázs J., Kálmán M., Lengyel Gy. (2003b), Eljárás aszfalténgyanta-paraffin kiválások és lerakódások megelőzésére, csökkentésére és eltávolítására kőolajtermelő kutakban, azok kifolyó-kútvezetékeiben és olajszállító vezetékekben biokolloid szuszpenzió felhasználásával. PCT/HU03/00079 Nemzetközi Szabadalom
- Hori K., Matsuzaki Y., Tanji Y., Unno H (2002), Effect of dispersing oil phase on the biodegradability of a solid alkane dissolved in non-biodegradable oil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 574-579.
- Horowitz A., Gutnick D., Rosenberg E. (1975), Sequential growth of bacteria on crude oil. *Appl. Microbiol.* **30**, 10-19.
- Huy N. Q., Jin S., Amada K., Haruki M., Huu N. B., Hang D. T., Ha D. T., Imanaka T., Morikawa M., Kanaya S. (1999), Characterization of petroleum-degrading bacteria from oil-contaminated sites in Vietnam. *J. Biosci. Bioeng.* **88**, 100-102.
- Ibrahim A., Gerner-Smidt P., Liesack W. (1997), Phylogenetic relationship of the twenty-one DNA groups of the genus *Acinetobacter* as revealed by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 837-841.
- Iida T., Sumita T., Ohta A., Takagi M. (2000), The cytochrome P450ALK multigene family of an n-alkane-assimilating yeast, *Yarrowia lipolytica*: cloning and characterization of genes coding for new CYP52 family members. *Yeast* **16**, 1077-1087.

- Ijah U. J. J. (1998), Studies on relative capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil. *Waste Manag.* **18**, 293-299.
- Ishige T., Tani A., Sakai Y., Kato N. (2000), Long-chain aldehyde dehydrogenase that participates in n-alkane utilization and wax ester synthesis in *Acinetobacter* sp. strain M-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3481-3486.
- Ishige T., Tani A., Takabe K., Kawasaki K., Sakai Y., Kato N. (2002), Wax ester production from n-alkanes by *Acinetobacter* sp. strain M-1: ultrastructure of cellular inclusions and role of acyl coenzyme A reductase. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1192-1195.
- Kalscheuer R., Stoveken T., Luftmann H., Malkus U., Reichelt R., Steinbuchel A. (2006), Neutral lipid biosynthesis in engineered *Escherichia coli*: jojoba oil-like wax esters and fatty acid butyl esters. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 1373-1379.
- Kaplan N., Zosim Z., Rosenberg E. (1987), Reconstitution of emulsifying activity of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 emulsan by using pure polysaccharide and protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 440-446.
- Käppeli O., Finnerty W. R. (1979), Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. *J. Bacteriol.* **140**, 707-712.
- Kato T., Haruki M., Imanaka T., Morikawa M., Kanaya S. (2001), Isolation and characterization of long-chain-alkane degrading *Bacillus thermoleovorans* from deep subterranean petroleum reservoirs. *J. Biosci. Bioeng.* **91**, 64-70.
- Katopodis A. G., Wimalasena K., Lee J., May S. W. (1984), Mechanistic studies on non-heme iron monooxygenase catalysis: epoxidation, aldehyde formation and demethylation by the  $\omega$ -hydroxylation system of *Pseudomonas oleovorans*. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 7928-7935.

- Kesserű P., Kiss I., **Bihari Z.**, Polyák B. (2002), Investigation of the denitrification activity of immobilized *Pseudomonas butanovora* cells in the presence of different organic substrates. *Water Res.* **36**, 1565-1571.
- Kesserű P., Kiss I., **Bihari Z.**, Polyák B. (2003), Biological denitrification in a continuous-flow pilot bioreactor containing immobilized *Pseudomonas butanovora* cells. *Bioresour. Technol.* **87**, 75-80.
- Kesserű P., Kiss I., **Bihari Z.**, Polyák B. (2005), Nitrate-dependent salicylate degradation by *Pseudomonas butanovora* under anaerobic conditions. *Bioresour. Technol.* **96**, 779-784.
- Koma D., Hasumi F., Yamamoto E., Ohta T., Chung S. Y., Kubo M. (2001), Biodegradation of long-chain *n*-paraffins from waste oil of car engine by *Acinetobacter* sp. *J. Biosci. Bioeng.* **91**, 94-96.
- Komukai-Nakamura S., Sugiura K., Yamauchi-Inomata Y., Toki H., Venkateswaran K., Yamamoto S., Tanaka H., Harayama S. (1996), Construction of bacterial consortia that degrade Arabian light crude oil. *J. Ferm. Bioeng.* **82**, 570-574.
- Kovács T., **Bihari Z.**, Hargitai A., Mécs I., Kovács K. L. (2002), Stress related changes of cell surface hydrophilicity in *Bacillus subtilis*. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **49**, 21-35.
- Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium honlapja (2005):  
<http://www.kvvm.hu/szakmai/karmentes/jelentes2004/index.htm> és  
<http://www.kvvm.hu/szakmai/karmentes/annotaciok/csop5/10.htm>
- Kubota M., Nodate M., Yasumoto-Hirose M., Uchiyama T., Kagami O., Shizuri Y., Misawa N. (2005), Isolation and functional analysis of cytochrome P450 CYP153A genes from various environments. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 2421-2430

- Kunihiro N, Haruki M, Takano K, Morikawa M, Kanaya S. (2005), Isolation and characterization of *Rhodococcus* sp. strains TMP2 and T12 that degrade 2,6,10,14-tetramethylpentadecane (pristane) at moderately low temperatures. *J. Biotechnol.* **26**;115(2):129-136.
- Lazar I, Voicu A, Nicolescu C, Mucenica D, Dobrota S, Petrisor I.G., Stefanescu M., Sandulescu L. (1999), The use of naturally occurring selectively isolated bacteria for inhibiting paraffin deposition. *J. Petrol. Sci. Eng.* **22**: 161-169.
- Leahy J. G., Khalid Z. M., Quintero E. J., Jones-Meehan J. M., Heidelberg J. F., Batchelor P. J., Colwell R. R. (2003), The concentrations of hexadecane and inorganic nutrients modulate the production of extracellular membrane-bound vesicles, soluble protein, and bioemulsifier by *Acinetobacter venetianus* RAG-1 and *Acinetobacter* sp. strain HO1-N. *Can. J. Microbiol.* **49**, 569-575.
- Lipscomb J. D. (1994), Biochemistry of the soluble methane monooxygenase. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 371-399.
- Maeng J. H., Sakai Y., Tani Y., Kato N. (1996a), Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of *n*-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp. M-1. *J. Bacteriol.* **178**, 3695-3700.
- Maeng J. H., Sakai Y., Ishige T., Tani Y., Kato N. (1996b), Diversity of dioxygenases that catalyzes the first step of oxidation of long-chain *n*-alkanes in *Acinetobacter* sp. M-1. *FEMS Microbiol. Lett.* **141**, 177-182.
- Magyar Ásványolaj Szövetség honlapja (2006): <http://www.petroleum.hu>
- Mancinelli R. L. (1995), The regulation of methane oxidation in soil. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 581-605



- Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. (1982) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, NY.
- McKenna E. J., Coon M. J. (1970), Enzymatic omega-oxidation. IV. Purification and properties of the omega-hydroxylase of *Pseudomonas oleovorans*. J. Biol. Chem. **245**, 3882-3889.
- Menezes Bento F., de Oliveira Camargo F. A., Okeke B. C., Frankenberger W. T. Jr. (2005), Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. Microbiol. Res. **160**, 249-255.
- MTA HMMTOP honlap: [www.enzim.hu/hmmtop](http://www.enzim.hu/hmmtop)
- Muyzer G., de Waal E. C., Uitterlinden A. G. (1993), Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Envir. Microbiol. **59**, 695-700.
- Müller R., Asperger O., Kleber H. P. (1989), Purification of cytochrome P-450 from *n*-hexadecane-grown *Acinetobacter calcoaceticus*. Biomed. Biochim. Acta. **48**, 243-54.
- Nakazawa T., Yokota T. (1973), Benzoate metabolism in *Pseudomonas putida(arvilla)* mt-2: demonstration of two benzoate pathways. J. Bacteriol. **115**, 262-267.
- NCBI protein-protein Blast honlap: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>
- Nielsen K. M., van Weerelt M. D., Berg T. N., Bones A. M., Hagler A. N., van Elsas J. D. (1997), Natural transformation and availability of transforming DNA to *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. Appl. Environ. Microbiol. **63**, 1945-1952.
- Ohkuma M., Zimmer T., Iida T., Schunck W. H., Ohta A., Takagi M. (1998), Isozyme function of *n*-alkane-inducible cytochromes P450 in *Candida maltosa* revealed by sequential gene disruption. J. Biol. Chem. **273**, 3948-3953.

- Parche S., Geissdorfer W., Hillen W. (1997), Identification and characterization of *xcpR* encoding a subunit of the general secretory pathway necessary for dodecane degradation in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1. J. Bacteriol. **179**, 4631-4634.
- Pines O., Bayer E. A., Gutnick D. L. (1983), Localization of emulsion-like polymers associated with the cell surface of *Acinetobacter calcoaceticus*. J. Bacteriol. **154**, 893-905.
- Pines O., Gutnick D. (1984), Alternate hydrophobic sites on the cell surface of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. FEMS Microbiol. Lett. **22**, 307-311.
- Radwan S. S., Sorkhoh N. A., Fardoun F., Al-Hasan R. H. (1995), Soil management enhancing hydrocarbon biodegradation in the polluted Kuwaiti desert. Appl. Microbiol. Biotechnol. **44**, 265-270.
- Rainey F. A., Lang E., Stackebrandt E. (1994), The phylogenetic structure of the genus *Acinetobacter*. FEMS Microbiol. Lett. **124**, 349-353.
- Ratajczak A., Geissdörfer W., Hillen W. (1998a), Alkane hydroxylase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1 is encoded by *alkM* and belongs to a new family of bacterial integral-membrane hydrocarbon hydroxylases. Appl. Environ. Microbiol. **64**, 1175-1179.
- Ratajczak A., Geissdörfer W., Hillen W. (1998b), Expression of alkane hydroxylase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1 is induced by a broad range of *n*-alkanes and requires the transcriptional activator AlkR. J. Bacteriol. **180**, 5822-5827.
- Reiser S., Somerville C. (1997), Isolation of mutants of *Acinetobacter calcoaceticus* deficient in wax ester synthesis and complementation of one mutation with a gene encoding a fatty acyl coenzyme A reductase. J. Bacteriol. **179**, 2969-2975.
- Ridgway H. F., Safarik J., Phipps D., Carl P., Clark D. (1990), Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. Appl. Environ. Microbiol. **56**, 3565-3575.

- Rockne K. J., Chee-Sanford J. C., Sanford R. A., Hedlund B. P., Staley J. T., Strand S. E. (2000), Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1595-1601.
- Rosenberg E., Zuckerberg A., Rubinovitz C., Gutnick D. L. (1979), Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 402-408.
- Rosenberg M., Rosenberg E. (1981), Role of adherence in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. *J. Bacteriol.* **148**, 51-57.
- Rosenberg M., Bayer E. A., Delarea J., Rosenberg E. (1982), Role of thin fimbriae in adherence and growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 929-937.
- Rosenberg E., Kaplan N., Pines O., Rosenberg M., Gutnick D. (1983), Capsular polysaccharides interfere with adherence of *Acinetobacter calcoaceticus* to hydrocarbon. *FEMS Microbiol. Lett.* **17**, 157-160.
- Rubinovitz C., Gutnick D. L., Rosenberg E. (1982), Emulsan production by *Acinetobacter calcoaceticus* in the presence of chloramphenicol. *J. Bacteriol.* **152**, 126-132.
- Rusansky S., Avigad R., Michaeli S., Gutnick D. L. (1987), Involvement of a plasmid in growth on and dispersion of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* RA57. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1918-1923.
- Sakai Y., Maeng J. H., Tani Y., Kato N. (1994), Use of long chain *n*-alkanes (C<sub>13</sub>-C<sub>44</sub>) by an isolate, *Acinetobacter* sp. M-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 2128-2130.
- Sakai Y., Maeng J. H., Kubota S., Tani A., Tani Y., Kato N. (1996), A non-conventional dissimilation pathway for long chain *n*-alkanes in *Acinetobacter* sp. M-1 that starts with a dioxygenase reaction. *J. Ferm. Bioeng.* **81**, 286-291.

- Scheller U., Zimmer T., Becher D., Schauer F., Schunck W. H. (1998), Oxygenation cascade in conversion of *n*-alkanes to alpha, omega-dioic acids catalyzed by cytochrome P450 52A3. *J. Biol. Chem.* **273**, 32528-32534.
- Schumacher J. D., Fakoussa R. M., (1999), Degradation of alicyclic molecules by *Rhodococcus ruber* CD4. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 85-90.
- Scott C. C., Finnerty W. R. (1976), Characterization of intracytoplasmic hydrocarbon inclusions from the hydrocarbon-oxidizing *Acinetobacter* species HO1-N. *J. Bacteriol.* **127**, 481-489.
- Sekizaki T., Tanoue T., Osaki M., Shimoji Y., Tsubaki S., Takai S. (1998), Improved electroporation of *Rhodococcus equi*. *J. Vet. Med. Sci.* **60**, 277-279.
- Shum A. C., Markovetz A. J. (1974), Purification and properties of undecyl acetate esterase from *Pseudomonas cepacia* grown on 2-tridecanone. *J. Bacteriol.* **118**, 880-889.
- Sinclair C. G., Cantero D. (1990), Fermentation modelling. In: Fermentation a practical approach. McNeil B., Harvey L. M. (eds), IRL PRESS at Oxford University Press, New York, pp. 65-112.
- Small F. J., Ensign S. A. (1997), Alkene monooxygenase from *Xanthobacter* strain Py2. Purification and characterization of a four-component system central to the bacterial metabolism of aliphatic alkenes. *J. Biol. Chem.* **272**, 24913-24920.
- Smits T. H., Rothlisberger M., Witholt B., van Beilen J. B. (1999), Molecular screening for alkane hydroxylase genes in Gram-negative and Gram-positive strains. *Environ. Microbiol.* **1**, 307-317.
- Smits T. H. (2001), Cloning and functional analysis of bacterial genes involved in alkane oxidation. Diss. ETH No. 14234, Doktori disszertáció.

Snellman E. A., Sullivan E. R., Colwell R. R. (2002), Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. *Eur. J. Biochem.* **269**, 5771-5779.

SoftBerry BPROM honlap:

(<http://softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>)

Sullivan E. R., Snellman E. A., Baryshnikova L., Colwell R. R. (1999), Multiple mechanisms to facilitate hydrocarbon uptake in *Acinetobacter* sp. RAG-1. *Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.* 99st, 1999. Abstr. Q-107. p. 554.

Suzuki M. T., Giovannoni S. J. (1996), Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 625-630.

Tani A., Sakai Y., Ishige T., Kato N. (2000), Thermostable NADP(+)-dependent medium-chain alcohol dehydrogenase from *Acinetobacter* sp. strain M-1: purification and characterization and gene expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5231-5235.

Tani A., Ishige T., Sakai Y., Kato N. (2001), Gene structures and regulation of the alkane hydroxylase complex in *Acinetobacter* sp. strain M-1. *J. Bacteriol.* **183**, 1819-1823.

Throne-Holst M., Markussen S., Winnberg A., Ellingsen T. E., Kotlar H. K., Zotchev S. B. (2006), Utilization of *n*-alkanes by a newly isolated strain of *Acinetobacter venetianus*: the role of two AlkB-type alkane hydroxylases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 353-60.

Toren A., Navon-Venezia S., Ron E. Z., Rosenberg E. (2001), Emulsifying activities of purified alasin proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1102-1106.

Toren A., Orr E., Paitan Y., Ron E. Z., Rosenberg E. (2002), The active component of the bioemulsifier alasin from *Acinetobacter radioresistens* KA53 is an OmpA-like protein. *J. Bacteriol.* **184**, 165-170.

- Uthoff S., Stoveken T., Weber N., Vosmann K., Klein E., Kalscheuer R., Steinbuchel A. (2005), Thio wax ester biosynthesis utilizing the unspecific bifunctional wax ester synthase/acyl coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase of *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 790-796.
- van Beilen J. B., Eggink G., Enequist H., Bos R., Witholt B. (1992), DNA sequence determination and functional characterization of the OCT-plasmid-encoded *alkJKL* genes of *Pseudomonas oleovorans*. *Mol Microbiol.* **6**, 3121-3136.
- van Beilen J. B., Smits T. H., Whyte L. G., Schorcht S., Rothlisberger M., Plaggemeier T., Engesser K. H., Witholt B. (2002), Alkane hydroxylase homologues in Gram-positive strains. *Environ. Microbiol.* **11**, 676-682.
- Vaneechoutte M., Tjernberg I., Baldi F., Pepi M., Fani R., Sullivan E. R., van der Toorn J., Dijkshoorn L. (1999), Oil-degrading *Acinetobacter* strain RAG-1 and strains described as *Acinetobacter venetianus* sp. nov. belong to the same genomic species. *Res. Microbiol.* **150**, 69-73.
- Vold R. D., Vold M. (1983), *Colloid and Interface Chemistry*, Addison-Wesley, London
- Ward O., Singh A., Van Hamme J. (2003), Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 260-270.
- Wilson K. (1994), Minipreps of bacterial genomic DNA. In: Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (eds) *Current Protocols in Molecular Biology* (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York 2.4.2.
- Yamamoto S., Bouvet P. J., Harayama S. (1999), Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 87-95.

Zhang Y., Miller R. M. (1994), Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. Appl. Environ. Microbiol. **60**, 2101-2106.

Zhang Y., Miller R. M. (1995), Effect of Rhamnolipid (Biosurfactant) Structure on Solubilization and Biodegradation of n-Alkanes. Appl. Environ. Microbiol. **61**, 2247-2251.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

A kőolaj kitermelése során paraffinos-aszfalténes kiválás képződik a termelőcsőben és a kúttalp körüli zónában. Az olajcégeknak szembesülnie kell ezzel a mindennapos problémával, amely a termelés leállítását és állandó beavatkozást igényel. A paraffinkiválás a gazdaságosan kitermelhető szint alá csökkentheti a termelést, amely a kutak idő előtti bezárásához vezet, míg az olajkészlet legnagyobb része a mezőben kiaknázatlanul marad.

A Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közalapítvány Bioremediációs Osztályának munkatársai a MOL NyRt. szakértőivel közösen egy nemzetközi szabadalommal védett mikrobiális kiválás-gátlási technológiát dolgoztak ki (Hlatki et al., 2003b).

Elővizsgálataink során a Dorozsma-55 jelzésű kút mélységi termelvénymintájának oldott oxigén-tartalma 2 ppm-nek adódott, ami az aerob lebontási folyamatok jelenlétét valószínűsíti. Azonban a kezelést és a megfelelő inkubációt csak a kutak hosszabb idejű lezárásával lehetett végrehajtani, ami inkább anaerob környezetet eredményez. Ezért a módszer kialakítása során az olaj különböző nehézfrakcióinak (paraffin, aszfaltén, maltén) leghatékonyabb lebontására, illetve tenzidtermelésre képes fakultatív anaerob *Pseudomonas* és *Bacillus* izolátumokat választottunk ki és alkalmaztuk ezek konzorciumait. A rétegvízminták anionanalízise nem mutatott ki nitrát, vagy nitrit elektronakceptorokat, ezért a csőműkálati folyadékot nitráttal egészítettük ki. Mivel a szerves N, P és S forrásokat limitáló mennyiségűnek, vagy teljesen hiányzóknak találtuk, a szükséges ásványi anyagokat szintén kívülről pótoltuk.

A kút lezárása során az oldott oxigén tenziója lecsökken, ami a denitrifikációs folyamatoknak kedvez. Az általunk is alkalmazott *Pseudomonas aeruginosa*-ról tudjuk, hogy



ilyen körülmények között is képes pl. a *n*-hexadékan degradációjára (Chayabutra és Ju, 2000), míg a *Pseudomonas butanovora*-ról mi írtuk le, hogy nemcsak denitrifikációra képes (Kesserű *et al.*, 2002, 2003), de ilyen körülmények között aromás szubsztrátokat is kometabolizál (Kesserű *et al.*, 2005). A folyamatos termelés során egy idő után az elektronakceptor is elfogy, és a beáramló víz visszaállítja a termelőcsőben a mikroaerofil körülményeket. Ezt láthattuk a Dorozsma-55 példájánál is, ahol a magas tenzió eddig 5 éves, a mai napig is tartó kiválás-inhibíciós hatást eredményezett. Összességében a törzseinkkel beoltott kutak kétharmadánál a beavatkozás tudományos és anyagi szempontból is egyértelműen sikeres volt, a paraffinkiválás megszűnt, vagy mennyisége drasztikusan lecsökkent és ezzel párhuzamosan 30-100 % többletolaj kitermelése volt regisztrálható. A pozitív hatás minimum 3 hónapig tartott, átlagos értéke 6 hónap volt.

Az alkalmazott eljárás hatása jól látszott a termelvény és paraffinkiválások kezelése után megemelkedő összcsíraszámában is, a lejuttatott törzsek visszaizolálhatóak voltak, koncentrációjuk 0.5-4.5 nagyságrendnyi emelkedése korrelált a pozitív üzemi tapasztalatokkal, csökkenésük az inhibíciós hatás lecsengésével járt. A baktériumkonzorciumok képesek voltak laboratóriumi batch, illetve felszíni tartályolajakkal végzett üzemi kísérletekben (Hlatki *et al.*, 2003a) is az emulziós termelvény megbontására. Ez a tulajdonságuk a kutak üzemi paramétereiben is visszaköszönt, a korábban egységes nyersolaj termelése kétfázisúvá vált, a víz kiválása csökkentette a termelvény viszkozitását, ami magyarázhatja az olajtöbbletet. Ezzel párhuzamosan a kiválások alkán-összetétel változása is megfigyelhető volt. A legsikeresebb kezelésekre hatására a csökkenő mennyiségű kiválásokban feldúsultak a hosszabb láncú ( $>nC_{30}$ ) *n*-alkánok, ami egyértelműen azzal magyarázható, hogy a szakirodalmi adatoknak megfelelően ezek biodegradálására a *Pseudomonas* és *Bacillus* izolátumok már nem voltak képesek, relatív mennyiségük a mintákban így emelkedhetett meg.

Olyan mikrobák izolálását tűztük ki tehát célul, amelyek az olaj ilyen magasabb lánchosszú paraffinkomponenseit is képesek lebontani. Egy ilyen törzs a kútkezelési technológia fejlesztésén túl szükséges volt a nyersolajjal szennyezett talajok (Hlatki *et al.*, 2002) és talajvizek (GVOP-3.1.1 pályázat) remediálásával, illetve egy új, ún. MEOR technológia kidolgozásával kapcsolatos feladatainkhoz is.

Az AR-46 jelű törzset egy algyői rétegvízmintából szilárd paraffin szénforráson történő dúsítást követően izoláltuk. Mind a 16S rDNS analízise, mind a biokémiai karakterizációja a legmagasabb szintű hasonlóságot az *A. haemolyticus* típustörzssel mutatta, viszont evolúciósan távol helyezkedett el az ismert alkánbontó *A. spp.*-tól. Az AR-46 az ebbe a fajba tartozó, a környezetből izolált első, *n*-alkán bontásra képes törzs, melyet részletesen jellemeztünk (Bihari *et al.*, 2007). Mikroaerofil körülmények között az AR-46 egyedi szénforrásként az aromás komponenseket nem tudta hasznosítani, ugyanakkor képes volt a C<sub>12</sub>-től C<sub>35</sub>-ig terjedő normál alkánok lebontására. A tesztelt vegyületek közül a *n*-hexadekánt találtuk optimális növekedési szubsztrátnak ( $\mu_m = 0.253 \text{ h}^{-1}$ ,  $Y'_{X/S} = 0.576 \text{ kg sejt (kg } n\text{-hexadekán)}^{-1}$ ), az optimális 37 °C-os hőmérsékleten. A *n*-alkán degradáció hőmérsékletfüggésének az AR-46 és a többi *Acinetobacter* faj közötti szisztematikus összehasonlítását is elvégezve azt találtuk, hogy bár az *Acinetobacter* törzseket rutinszerűen 30 °C-on növesztik, az *A. calcoaceticus* EB104 és az *A. venetianus* 6A2 számára inkább a 37 °C-os inkubáció az optimális, vagyis az AR-46 magasabb hőmérsékleti optimuma egyáltalán nem egyedi. A kísérleti adatok tanúsága szerint kiemelkedő hosszú láncú *n*-alkán biodegradációs képessége alapján az AR-46 és a 6A2 használható leginkább különböző biotechnológiai alkalmazásokban akár 30, akár 37 °C-on.

Az *A. haemolyticus* AR-46 nagy alkánbontási sebessége különleges alkánfelvételi mechanizmussal járt együtt. A sejtek és az alkáncseppecskék között kialakuló szoros

kapcsolatot fénymikroszkópiásan is megörökítettük, a kitapadás jelenségének a szolubilizációban és a szubsztrátfelvételben is kulcsszerepe volt. A TEM felvételek alapján az alkáncseppceszkékre kitapadt sejtek felszínén lévő 11-14 nm átmérőjű vastag csillók szignifikánsan (2-3-szor) hosszabbak voltak, mint a nem kitapadó szabad és a nem alkánon növesztett kontroll sejteké. A hosszú csillók elsődleges hidrofób helyként való viselkedését alátámasztja az a megfigyelés is, hogy a szubsztrátcseppceszkék és a hidrofób sejtek felszíne közötti kapcsolat olyan erős, hogy szeparációjuk még intenzív centrifugálással sem oldható meg. Azonban a gazdag tápoldatban növekvő sejtekhez hasonlóan az alkán szubsztráton nevelt, a vizes fázisban jelen lévő nem kitapadó sejtek felszíne konstans hidrofilitást mutat. A tenyésztés során a szabad sejteknek mindig kevesebb, mint 10%-a képes a kitapadásra, míg a megfelelő érték az *A. venetianus* RAG-1 és VE-C3 törzsekben 90% (Baldi *et al.*, 1999). A MATH teszttel jól mérhető sejt felszíni hidrofilitás értéke általában különböző stresszek (hő-, só- vagy pH-sokk, oxigén-, ásványi anyag- vagy szénforrás-limitáció) hatására emelkedik (Kovács *et al.*, 2002), de jelen esetben inkább a két AR-46 sejt típus között kialakuló specifikus dinamikus egyensúlyról van szó. A hosszú csillókkal rendelkező hidrofób sejtek az alkáncseppceszkék szolubilizációját és felvételét követően hidrofillé válnak és az ásványi anyagokban dús tápoldat vizes fázisa felé igyekeznek, ahol a szubsztrátkötésre már nincsen szükségük, így a csillók hosszának csökkenése tapasztalható. Ezt az új teóriát megerősíti az a tény is, hogy a HNPS tápoldatból nem, de a szabad sejtekből GC-MS-sel kimutathatóak a monoterminális oxidáció interemedierei, a *n*-hexadecán-1-ol és a *n*-hexadekánsav, valamint a *n*-hexadecil-*n*-hexadekanoát vax észter tartalék tápanyag. Ez utóbbi vegyület HNPS tápoldaton való növesztés közbeni akkumulációja egyedülálló jelenség a genusban, hiszen eddig csak az ásványi anyag-limitált körülmények között volt kimutatható a felhalmozódása.

A hosszú és vastag csillók, mint elsődleges hidrofób helyek mellett az AR-46 *alkR-alkM* génjei melletti klaszterben lokalizált *ompH-lpxD-fabZ-lpxA* gének termékei a membránok kialakításáért felelősek és kulcsfontosságúak lehetnek az alkán szolubilizációban.

Az AR-46 sejtek által felvett *n*-hexadekán szubsztrát oxidációját katalizáló enzimeket részletesen vizsgáltuk, de a sejtekből nem tudtunk sem alkán dioxigenáz sem citokróm P450 aktivitást kimutatni. Ez, valamint a GC-MS analízis eredménye a monoterminális alkán monooxigenáz/hidroxiláz enzim jelenlétét valószínűsítette törzsünkben. Ennek megfelelően sikerült is az enzimet kódoló kromoszómális *alkM* gént azonosítanunk, amelynek a Southern hibridizációs és DGGE analízis alapján a genomban nem található paralógja.

A többi *A. sp.* *alkM* génjeinek és az AR-46 egyetlen *alkM* génjének az indukciójában és regulációjában a Northern hibridizációs eredmények összehasonlítása során jelentős eltéréseket tapasztaltunk. Az *A. haemolyticus* AR-46 *alkM* génjének transzkripcióját a hosszú láncú *n*-alkánok széles spektruma (C<sub>16</sub>-C<sub>30</sub>) indukálta. Az *A. sp.* ADP1-hez hasonlóan az *in silico* analízis az AR-46 *alkM* upstream régiójában is hasonló promóter elemeket és az AraC-XylS-szerű AlkR transzkripció regulátor fehérje inverted repeat cél-kötőhelyét azonosította.

A helyspecifikus rekombináció alacsony frekvenciája erősen gátolta a mélyebb genetikai analízist, az *A. sp.* M-1 törzshöz hasonlóan az *A. haemolyticus* AR-46-ban sem lehetett homológ rekombinációval knock-out mutánsokat előállítani.

## 9. SUMMARY

In the course of the production of crude oil, paraffinic-asphaltenic deposition occurs on the inner surface of the tubing and in the near-wellbore zone. Oil companies have to face this costly problem, which can necessitate constant intervention to eliminate mechanical blocks, otherwise paraffin precipitation restricts production to uneconomical levels, causing premature abandonment of well and leaving the main part of the oil resource in the reservoir unrecovered.

The Department of Bioremediation, Bay Zoltán Foundation for Applied Research, Institute for Biotechnology and the MOL Hungarian Oil and Gas Plc. have been developed and patented a microbial deposition-inhibiting technology (Hlatki et al., 2003b).

Our preliminary analysis on production stream of Dorozsma-55 wellbore zone detected 2 ppm of dissolved oxygen, thus the presence of aerobic degradation processes were presumed. However, suitable microbial treatment could only be performed under closed-well-state only, which resulted in anaerobic conditions. Consequently, during the development of the technology, the consortia of facultatively anaerobic *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates with the degrading ability of different heavy oil fractions (paraffin, asphaltene, maltene) or with biosurfactant producing ability were chosen and applied. As nitrate or nitrite electronacceptors were not detected in formation water samples, technology fluid was supplemented with nitrate. Inorganic N, P and S sources were found to be either in limiting concentration or they were not present at all, so these nutrients were externally amended.

During the closed intervals, the oxygene tension decreased in the wells, which had positive effect on the denitrification processes. The *Pseudomonas aeruginosa* strains were

known to be able to decompose *n*-hexadecane (Chayabutra és Ju, 2000) under these conditions; and we had proved previously that *Pseudomonas butanovara* not only has denitrification ability (Kesserű *et al.*, 2002, 2003), but it cometabolizes aromatic substrates as well (Kesserű *et al.*, 2005).

During oil production, the added electronacceptor disappears, and the waterflow regenerates the microaerophilic condition in the tubing. This phenomenon was observed in the case of well Dorozsma-55. The bacterial treatment took place five years ago and since then the elevated oxygene tension has evoked the paraffin deposition inhibition effect.

Taken together, the technology was succesfull both scientifically and economically in the two-third of the microbially injected wells. Mechanical tube clearing was either not needed at all, or the intervention intervals were elongated drastically. In line with it, the oil production increased by 30-100%. The durability of the microbial treatment was at least 3 months, and the average value was 6 months. The effect of the applied method was evident on the increasing total cell numbers in oil and deposit samples recorded after the treatment; and the injected strains could be reisolated. The increase of cell concentration by 0.5-4.5 order of magnitude correlated well with the positive technological observations, the decrease in total cell number coexisted with the falling of the inhibition effect.

Consortia were able to brake oil/water emulsions both in laboratory batch experiments and in industrial treatments of surface tank oil (Hlatki *et al.*, 2003a). Similar effect occured during oil production, the previously uniform production stream was separated to oil and water phases. It yielded to a decrease in viscosity, which could lead to the appearance of extra oil production.

In line with the phenomena mentioned above, changes in the alkane-composition of depositions were also measured. Due to the most successful treatments, the quantity of

deposits decreased, and the longer *n*-alkanes ( $>nC_{30}$ ) concentrated in it. According to literature data, this phenomenon is an unambiguous consequence of the biodegradation limit of *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates. These strains were unable to mineralize the long-chain alkanes, so the relative amounts of these compounds could increase in this way.

The isolation of microbes with long chain paraffin-degrading ability was aimed. The effective strain was necessary not only for upgrading the oil well treatment technology, but for bioremediation processes of oil contaminated soil (Hlatki *et al.*, 2002) and water phases (GVOP-3.1.1 grant), and also for developing of a new MEOR technology.

Strain AR-46 was sampled from the production water of an oil reservoir in Hungary and was isolated after enrichment on solid paraffin carbon source. Both 16S rDNA analysis and biochemical characterization indicated the highest degree of similarity between AR-46 and the *A. haemolyticus* type strain. We performed the first detailed description (Bihari *et al.*, 2007) of this novel *n*-alkane-degrading isolate belonging in this species from the environment. Under microaerophilic conditions, AR-46 was able to assimilate *n*-alkanes with carbon chain lengths of from  $C_{12}$  to  $C_{35}$ . Among the tested compounds, *n*-hexadecane was found to be the best substrate for growth and biodegradation ( $\mu_m = 0.253 \text{ h}^{-1}$ ,  $Y'_{x/s} = 0.576 \text{ kg of cells (kg of } n\text{-hexadecane)}^{-1}$ ) at the optimal temperature of 37 °C. A systematic comparison of AR-46 with related *Acinetobacter* spp. concerning the temperature dependence of *n*-alkane degradation was performed. Although *Acinetobacter* species are routinely maintained at 30 °C, the present results suggest a cultivation temperature of 37 °C for *A. calcoaceticus* EB104 and *A. venetianus* 6A2. The experimental data reported here indicate that this latter strain and our isolate appear to be well suited for relevant biotechnological applications in consequence of their excellent long-chain *n*-alkane-degrading ability at both temperatures.

The high rate of *n*-alkane biodegradation correlates with an improved substrate uptake mechanism. Intimate interaction between the cell and *n*-alkane droplet surfaces was observed microscopically, and this adherence is involved in the solubilization and uptake process. Based on the TEM data, the thick fimbriae (11-14 nm in diameter) of the *n*-hexadecane-adhered cells are significantly (2-3 times) longer than the fimbriae of the non-adhered and control cells. The phenomenon that these long structures serve as primary hydrophobic sites is also manifested in their physiological properties. The interactions between the *n*-alkane droplets and the adhered hydrophobic cells are so strong that cells can not be separated from the substrate even by intensive centrifugation. However, the detached *n*-alkane-grown AR-46 cells in the bulk phase, similarly to cells grown in rich media, are predominantly unable to adhere to *n*-hexadecane because of their constant surface hydrophilicity. Fewer than 10% of these free AR-46 cells can attach to *n*-alkane, whereas the analogous values for *A. venetianus* RAG-1 and VE-C3 are approximately 90% (Baldi *et al.*, 1999). Cell surface hydrophilicity values - measured by MATH tests - are generally increased (Kovács *et al.*, 2002) by different stress effects (heat, salt or pH shocks, oxygene-, nutrient and carbon source-limitation), but in the case of AR-46, it is rather the result of the special dynamic balance between the two cell types. After alkane droplet solubilization and uptake, the hydrophobic cells possessing long and thick fimbriae become hydrophilic and migrate to the nutrient-rich bulk phase. The alkane adherence is not further necessary, thus the reduction of the length of the fimbriae can be observed. This theory was strengthened by the fact that the intermediates *n*-hexadecan-1-ol, *n*-hexadecan-1-oic acid and the wax ester *n*-hexadecyl-*n*-hexadecanoate could be measured from free cells, but not from the HNPS media. The accumulation of this latter substance is a unique phenomenon in the genus, as wax ester has only been detected under nutrient-limiting conditions until now.



Besides long and thick fimbriae as primary hydrophobic sites, the products of clustered *ompH-lpxD-fabZ-lpxA* genes are responsible for membrane formation. Therefore, these genes located adjacently to the *alkR-alkM* gene may also play a crucial role in *n*-alkane solubilization.

The enzymes which catalyse the oxidation of *n*-hexadecane substrate taken up by AR-46 cells were examined in detail, but neither alkane dioxygenase nor cytochrome P450 activities were detected in cells. These results of enzyme assays and the GC-MS analysis afforded evidence of the involvement of the monoterminial oxidation pathway in AR-46. In support of this, the chromosomal *alkM* gene was identified. The gene has no paralogue in the genom as revealed by Southern hybridization and DGGE analysis. Comparison of the results of Northern hybridization experiments on *A. spp.* demonstrated significant differences in alkane hydroxylase gene induction and regulation. The transcription of *alkM* in *A. haemolyticus* AR-46 is evoked by the broad range of long-chain *n*-alkanes (C<sub>16</sub>-C<sub>30</sub>).

Similarly to *A. sp.* ADP1, in the upstream regions of *alkM* gene, *in silico* analysis revealed the same types of putative promoter elements and inverted repeat sequences serving binding targets for the AraC-XylS-like AlkR transcription regulator in AR-46 too.

Unfortunately, deeper genetic analyses are hampered by the very low efficiency of site-specific recombination. Similarly as for *A. haemolyticus* AR-46, deriving gene disruptants failed for strain M-1 too.