

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

PhD TÉZIS

Szegedi Tudományegyetem, Környezettudományi Doktori Iskola

Készítette: Bihari Zoltán

Témavezető: Dr. Mécs Imre

Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közalapítvány

Biotechnológiai Intézet

Szeged, 2006

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.

1. 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).
2. 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.

Egyéb publikációk:

Kesserű P., Kiss I., Bihari Z., Polyák B. (2002), The effects of NaCl and some heavy metals on the denitrification activity of *Ochrobactrum anthropi*. J. Basic Microbiol. **42**, 268-276. Impakt faktor: 0.512

Kiss I., **Bihari Z.**, Kesserű P., Fehér B., Polyák B. (2002), Co-immobilization of symbiotic green algae and *Saccharomyces unispora*. Symbiosis **32**, 247-256 Impakt faktor: 0.795

Összes impakt faktor: 6.765

A Disszertációban felhasznált publikációk:

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. Impakt faktor: 0.602

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. Impakt faktor: 1.611

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. Impakt faktor: 1.382

Kesserű P., Kiss I., **Bihari Z.**, Polyák B. (2005), Nitrate-dependent salicylate degradation by *Pseudomonas butanovora* under anaerobic conditions. Bioresour. Technol. **96**, 779-784. Impakt faktor: 1.863

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. Impakt faktor: -

3. A rétegvízminták anionanalízise nem mutatott ki nitrát, vagy nitrit elektronakceptorokat, 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.
4. A kutak 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).
5. 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.
6. 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 % többletoldaj

kitermelése volt regisztrálható. A pozitív hatás minimum 3 hónapig tartott, átlagos értéke 6 hónap volt.

7. Az alkalmazott eljárás hatása jól látszott a termelvény és paraffinkiválások kezelése után megemelkedő összcsíraszámában is, a lejtuttatott törzsek visszaizolálhatóak voltak, koncentrációjuk 0.5-4.5 nagyságrendnyi emelkedése korrelált a pozitív üzemi tapasztalatokkal, csökkenésük az inhibíciós hatás lecsengésével járt.
8. 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.
9. 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, 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.

Az *A. haemolyticus* AR-46 *alkM* génjének transzkripcióját a hosszú láncú *n*-alkánok széles spektruma (C_{16} - C_{30}) indukálta.

22. 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 célkötőhelyét azonosította.
23. 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.
24. Eredményeink megalapozzák az *A. haemolyticus* AR-46 törzs széleskörű technológiai alkalmazásait, amelyek előkészítése jelenleg is folyik.

17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Ennek megfelelően sikerült is az enzimet kódoló kromoszómális *alkM* gént azonosítanunk, amelynek a Southern hibridizációs és DGGE analízis alapján a genomban nem található paralógja.
21. 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.

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.

10. 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 törzssel 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).
11. Mikroaerofil körülmények között az AR-46 egyedi szénforrásként az aromás komponenseket nem tudta hasznosítani, ugyanakkor képes volt a C₁₂-től C₃₅-ig terjedő normál alkánok lebontására. A tesztelt vegyületek közül a *n*-hexadékant találtuk optimális növekedési szubsztrátnak ($\mu_m = 0.253 \text{ h}^{-1}$, $Y'_{X/S} = 0.576 \text{ kg sejt (kg } n\text{-hexadékan)}^{-1}$, az optimális 37 °C-os hőmérsékleten).

12. 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.
13. Az *A. haemolyticus* AR-46 nagy alkánbontási sebessége különleges alkánfelvételi mechanizmussal járt együtt. A sejtek és az alkáncsepceskék között kialakuló szoros kapcsolatot fénymikroszkópiásan is megörökítettük, a kitapadás jelenségének a szolubilizációban és a szubsztrátfelvételben is kulcsszerepe volt. A TEM felvételek alapján az alkáncsepceskékre 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.
14. A hosszú csillók elsődleges hidrofób helyként való viselkedését alátámasztja az a megfigyelés is, hogy a szubsztrátcsepceskék 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).

15. A MATH teszttel jól mérhető sejtfelszíni 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 sejtípus között kialakuló specifikus dinamikus egyensúlyról van szó. A hosszú csillókkal rendelkező hidrofób sejtek az alkáncsepceskék 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.
16. 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*-hexadecánsav, valamint a *n*-hexadecil-*n*-hexadekanoát vax észter tartalék tápanyag.