

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék



37. ORSZÁGOS
TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI
KONFERENCIA 2025



37. OTDK Biológia Szekció helyi TDK forduló
TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

**Egy használt kenőolajjal szennyezett talaj *ex situ* biostimulációs
kármentesítésének fokozása a *Micrococcus luteus* extracelluláris
szervesanyagának ismételt adagolásával**

Készítette:

Hoffmann Klaudia, II. éves, molekuláris biológia MSc szakos hallgató

Témavezető:

Dr. Bodor Attila, tudományos munkatárs

Szeged

2024

TARTALOMJEGYZÉK

1. Irodalmi áttekintés.....	3
1.1. Problémafelvetés	3
1.2. Kőolajfeldolgozás és kenőolajok	3
1.3. Olajszennyezés a talajban	5
1.4. Az olajszennyezett közegek kármentesítése	7
1.4.1. Hagyományos kármentesítési eljárások	7
1.4.2. Bioremediáció	7
1.4.3. Szénhidrogének mikrobiális lebontása.....	8
1.5. A kármentesítés monitorozása	9
1.6. Biomonitorozás	9
1.7. Mikrobiális közösségek jellemzése	10
1.8. Bioremediáció korlátai és a VBNC állapot.....	11
1.9. Kilépés a VBNC állapotból	12
1.10. Rpf fehérjék és környezeti alkalmazásuk.....	13
1.11. A kutatásunk előzményei.....	14
2. Célkitűzések	15
3. Anyagok és módszerek.....	16
3.1. Felhasznált vegyszerek	16
3.2. Felhasznált talajminta	16
3.3. Talajvizsgálati módszerek	17
3.4. A <i>M. luteus</i> EOM előállítása	17
3.5. Megnövelt léptékű <i>ex situ</i> talajmikrokozmosz kísérletek összeállítása	18
3.6. A talaj szénhidrogén-tartalmának meghatározása.....	19
3.7. Mikrobiális respirációs vizsgálatok	20
3.8. Telepképző sejtszámok meghatározása	21
3.9. A talaj enzimatis aktivitásának meghatározása	22
3.10. Talaj fitotoxikológiai tesztek	23
3.11. Statisztikai analízis	23
4. Eredmények és értékelésük	24
4.1. A használt kenőolajjal szennyezett talaj jellemzői.....	24
4.2. Az EOM hatása a szénhidrogének biodegradációjára	24
4.3. A mikrobiális aktivitás és sejtszámok változása a bioremediáció során	28
4.4. A különböző kezelések hatása a talajok fitotoxicitására	32
5. Összefoglalás.....	34
Irodalomjegyzék.....	35
Tételes szerzői hozzájárulás	39
Köszönetnyilvánítás	40

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Problémafelvetés

A kőolajipari termékek fokozott használata a káros légköri és klimatikus hatásokon túl nagy mennyiségű hulladékolaj képződésével is jár. Európában az egyik legszámottevőbb folyékony veszélyes hulladékat a kenőolajok hulladékai jelentik. A használt kenőolajban (HKO) felhalmozódhatnak mérgező égéstermékek, nehézfémek, illetve policiklikus aromás (*polycyclic aromatic hydrocarbon*, PAH) és poliklórozott szénhidrogének (*polychlorinated biphenyl*, PCB), amelyek nem megfelelően kezelve elszennyezhetik a levegőt, a (felszíni és felszín alatti) vizeket vagy a talajt (Pinheiro és mtsai 2017). A talajba jutott olajkomponensek módosíthatják annak alapvető tulajdonságait, így a talaj természetes élőhelyi funkciói és (esetleges) későbbi hasznosítási lehetőségei meglehetősen leszűkülnek (Bodor és mtsai 2020a, 2021).

A természetben előforduló mikroorganizmusok egy része képes alkalmazkodni a hidrofób, szerves szennyezőanyagok jelenlétéhez és szén-, illetve energiaforrásként hasznosítani az olajban található szénhidrogéneket. Ezen tulajdonságaik hatékony eszközzé teszik őket az olajszennyezett közegek biológiai kármentesítése során (Bodor és mtsai 2020a, 2021). A mikrobiális aktivitást azonban számos biotikus (kompetíció, predáció stb.) és abiotikus tényező (hőmérséklet, pH, oxigénellátottság, nedvességtartalom, tápanyagok hozzáférhetősége, szennyezőanyagok jelenléte stb.) is befolyásolhatja, és amennyiben a körülmények kedvezőtlennek bizonyulnak, számos mikroorganizmus hajlamos belépni egy élő, de nem szaporodóképes (*viable but non-culturable*, VBNC) állapotba (Bodor és mtsai 2020b), amelyben az aktivitásuk minimálisra csökken, vagy akár teljesen megszűnik. Éppen ezért a biológiai kármentesítések sikere alapjaiban múlhat azon, hogy a megfelelő stimulánsok adagolásával mennyire sikerül fenntartani a mikroorganizmusok aktivitását és újraaktivizálni a szunnyadó VBNC sejteket (Paniagua-Michel és Fathepure 2018, Bodor és mtsai 2020b, Shi és mtsai 2024).

1.2. Kőolajfeldolgozás és kenőolajok

A kőolaj sötét színű, folyékony halmazállapotú, viszkózus anyag, amely az évmilliók alatt felhalmozódott, nagy nyomáson és magas hőmérsékleti viszonyok között átalakult, fehérjékben, szénhidrátokban, ligninben és lipidekben gazdag biomasszából képződött. Leginkább a felszín alatt, üledékes kőzetek pórusaiban fordul elő (Hannus és mtsai 2007). A kőolaj nagy mennyiségű szenet (85-89%) és hidrogént (10-14%) tartalmaz, de változó

mértékben előfordulhat benne még oxigén, nitrogén, kén és különböző nehézfémek is. Szénhidrogén-tartalma alapvetően négy frakcióba sorolható: (a) alkánok (nyílt vagy elágazó láncúak, telítettek vagy telítetlenek), (b) aromások [ide tartoznak a BTEX (benzol, toluol, etilbenzol, xilol)- és poliaromás vegyületek], (c) gyanták (olajban oldódó, poláris, amorf szilárdanyagok), (d) aszfaltének (olajban diszpergált komplex vegyületek) (Varjani 2017, Varjani és Upasani 2017).

A kőolajat a kitermelést követően különböző fizikai és kémiai módszerek segítségével dolgozzák fel. A finomítás során a nyersolajat először atmoszférikus desztillációval különböző forráspontú frakciókra választják: benzin, petróleum, gázolaj, kerozin és pakura. Ez utóbbit jelentősen alacsonyabb nyomáson (2-4 kPa), vákuumdesztillációval dolgozzák fel, aminek a terméke a gázolaj, illetve a melléktermékként gudron és különböző kenőolaj előfrakciók (alapolajok) keletkeznek. A különféle tisztító eljárások (pl. a hosszú szénláncú paraffinok hűtési kristályosítással történő kivonása, az instabil vegyületeket oldószeres raffinálása, kéntelenítés) után – a kenőolajgyártás utolsó lépésként – különböző adalékanyagokat (szintetikus polimereket) adagolnak ezekhez az alapolajokhoz (Hannus és mtsai 2007).

A kenőolajok (KO) olyan olajipari termékek, amelyek védőréteget képeznek az egymással érintkező, mozgó gépalkatrészek felszínén, így csökkentik a súrlódást, és védenek a korróziótól. Összetételüket tekintve a KO-ok kb. 80-90%-ban alapolajokból állnak, a maradék 10-20%-ban pedig különböző kémiai adalékanyagokat és egyéb komponenseket tartalmaznak. A gyártásukhoz felhasznált adalékanyagok (pl. antioxidánsok, detergensok, rozsdagátlók, súrlódásmódosítók, viszkozitásmódosítók stb.) minőségét és mennyiségét az határozza meg, hogy a későbbiekben milyen területen alkalmazzák majd az adott KO-at (Botas és mtsai 2017, Minami 2017, Nowak és mtsai 2019). Habár a KO-oknak többnyire a belsőégésű motoroknál, kompresszoroknál, sebességváltóknál, turbináknál és hidraulikus rendszereknél veszik hasznát, számos további felhasználási területük létezik, így minden egyes funkcióra egyedi összetételű kenőolajat kell létrehozni. Jelenleg 5000 és 10000 közé tehető a különböző típusú, kereskedelmi forgalomban megvásárolható KO-ok száma. 2015-ben 35,6 millió tonna KO fogyott világszerte, és ennek közel felét az ázsiai és csendes-óceáni régiók fogyasztása tette ki (Mang és Gosalia 2017, Bodor és mtsai 2020a). A KO-ok lehetnek járműolajok, ipari olajok, zsírok, fémmegmunkáló folyadékok és technológiai olajok. Ezek közül a járműolajok (56%) és az ipari olajok (26%) teszik ki az összes KO jelentős hányadát.

A motor üzemeltetésekor a KO-ok számos fizikai és kémiai változáson mehetnek keresztül, amelyek során felhalmozódnak bennük a különböző károsanyagok, mint például az égéstermékek, nehézfémek vagy a PCB- és PAH-vegyületek (Mang és Gosalia 2017, Pinheiro

és mtsai 2017). Ezek mennyisége és aránya azonban számos egyéb tényező (pl. alapanyagok összetétele és feldolgozása, adalékanyagok típusa, üzemidő) függvénye lehet (Pinheiro és mtsai 2021).

A KO-ok egy része a légkörbe párologva vagy az üzemidő alatt elégve is szennyezhet, ám a legnagyobb mennyiségben a használatnál és a nem megfelelő tárolás során kerülnek a környezetbe. Európában az évente hulladékként keletkező 5 millió tonna HKO 40-50%-a közvetlenül veszélyezteti a környezetet (Luther 2017). A becslések szerint egy liter HKO képes akár egymillió liter vizet is elszennyezni vagy egy 3784 m² alapterületű termőföldet alkalmatlanná tenni a növénytermesztésre. Ez szemléletesen példázza, hogy a HKO-k miért tartoznak napjaink legjelentősebb szennyezőanyagai közé (Ossai és mtsai 2024).

1.3. Olajszennyezés a talajban

Míg a talajok olajszennyezése főként a finomítók, szerelőműhelyekből, töltőállomásokból, lerakókból, üzemi területekről vagy szállításból származó kiömlésekből és szivárgásokból eredeztethető, addig a HKO-ok többnyire a járműalkatrészekből és -motorokból, illetve a felelőtlen emberi tevékenység során, a csatornába és a talajra kiborítva kerülhet a környezetbe (Abdulsalam és mtsai 2011).

A kőolajat és származékait a környezetbe jutva és ott a közeg felszínén szétterjedve azonnal olyan hatások érik (pl. párolgás, diszperzió, emulgeálás, bomlás, foto-oxidáció, biodegradáció), amelyek következtében módosulhat az összetételük. Az olaj tetemes mennyisége azonban a kapilláris és gravitációs erők hatására a talaj mélyebb rétegeibe is be tud szivárogni. Ilyenkor az olaj hozzátapadhat a talajszemcsékhez és kitölti a talajpórusokat, ez pedig akadályozza a víz, az oxigén és a tápanyagok transzportját (Paria 2008, Varjani 2017, Pinheiro és mtsai 2021). Mivel a talaj áteresztőképességét alapvetően már a talajszerkezet is befolyásolja, így az hatással van a szennyezőanyagok mobilitására is. Az agyagos talajok áteresztőképessége kicsi, ezért ott a víz, oxigén, tápanyagok és a szénhidrogének transzportja korlátozott, míg a homoktalajok esetében ez pont fordítva van (Maletic és mtsai 2013, Nowak és mtsai 2019). Mindemellett a talajkomponensek (pl. hidrofób talajszemcsék vagy a talaj szervesanyagai) megköthetik az olajos vegyületeket, amelyeknek ilyenkor csökken a mobilitása. Az így „előregedő” szennyezések toxicitása ugyan mérséklődhet az alacsony hozzáférhetőség miatt, de ezzel együtt a mikrobiális degradáció határfoka is romlik, és a talaj termőképességére is hatással van (Paria 2008, Jiang és mtsai 2016, Koshlaf és Ball 2017).

Azok a területek, ahol sűrű a gépjárműforgalom, és gyakran végeznek karbantartási műveleteket, sokkal inkább ki vannak téve a HKO-szennyezés kockázatának. Egy ilyen jellegű környezeti kár esetén, a talajba kerülő olaj megváltoztatja a közeg fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságait. A HKO-ban lévő szennyezőanyagok – mint a szénhidrogének és nehézfémek – például negatívan hatnak a talajbióta diverzitására és közösség-összetételére, hiszen ezek a komponensek citotoxikusak és károsítják a sejtmembránt (Jung és mtsai 2016, Bodor és mtsai 2020a). A szennyezőanyagok képesek az eredeti helyszíntől továbbterjedni (pl. a vízmozgások segítségével), ez pedig a távolabbi területek talajflóráját és -faunáját is veszélyezteti. A talaj áteresztőképességének csökkenése, valamint a magok és gyökerek felszínén kialakuló olajbevonat rontja a csírázást és a már kihajtott növények fejlődését. A szénhidrogének hatására kialakuló oxidatív stressz pedig a fotoszintézis hatékonyságát csökkenti, így a növények sokkal kevésbé képesek ellenállni a betegségeknek, amely tápanyaghiányhoz, majd nekrozishoz vezethet (Graj és mtsai 2013, Ossai és mtsai 2020). A petrogén vegyületek különösen perzisztensek, így hosszan fenn tudnak maradni talajban, és felhalmozódhatnak a növényi szövetekben. Ez jelentősen kihat a tápláléklánc további tagjaira: genetikai mutációkat vagy akár halált is okozhat az állatokban és az emberekben. De a friss és használt KO-ban előforduló, karcinogén vegyületekkel szennyezett növények elfogyasztásán túl a levegőben lévő illékony anyagok belélegzése vagy akár bőrrel történő érintkezés is további egészségügyi problémákat (vérszegénység, súlycsökkenés, májkárosodás, gasztrointesztinális betegségek, gyenge immunrendszer stb.) válthat ki az emberi szervezetben (Koshlaf és Ball 2017).

Mivel a mikroorganizmusok alapvető szerepet játszanak a kőolajképződés korai szakaszában – és később befolyásolják az összetételét is –, ráadásul kis koncentrációban széles körben előfordulnak nem kőolaj-eredetű szénhidrogének (pl. zsírok, olajok vagy viaszok) is a környezetben, így a mikrobák óhatatlanul kölcsönhatásba kerülnek ezekkel az anyagokkal. Valószínűleg ennek köszönhető, hogy – bár többnyire alacsony gyakorisággal, de – természetesen előfordulnak olyan mikroorganizmusok, amelyek képesek lebontani a kőolaj és a petrokémiai termékek szénhidrogén-komponenseit (Ławniczak és mtsai 2020). A biodegradáció szempontjából a hidrofób, szerves szennyezők négyféle frakcióját lehet elkülöníteni: (a) könnyen hozzáférhető, (b) lebonthatók és eltávolíthatók, (c) bontásnak ellenálló, (d) nem hozzáférhető. Ezeknek az egymáshoz viszonyított arányát azonban a talaj szerkezete és szervesanyag-tartalma, az oxidatív és katalitikus állapotok (talajenzimek), a mikrobiális összetétel, valamint az adott szennyezőanyag kémiai szerkezete is befolyásolja (Biswas és mtsai 2018). Ez utóbbi különösen nehézkessé teheti a kőolaj-eredetű

szénhidrogének biodegradációjának folyamatát. A leghatékonyabban például a nyílt láncú *n*-alkánokat tudják lebontani a mikroorganizmusok, majd ezt követően az elágazó láncúakat, aromásokat és cikloalkánokat. Legnehezebben a nagy molekulatömegű és a több aromás gyűrűt tartalmazó szénhidrogéneket (pl. PAH-ok) tudják lebontani. Ha ezek a poliaromás vegyületek nagy koncentrációban vannak jelen a talajban, az drasztikusan csökkenti a biodiverzitást, amely tovább komplikálja a mikrobiális lebontási folyamatokat (Das és Chadran 2011, Jung és mtsai 2015).

1.4. Az olajszennyezett közegek kármentesítése

A kenőolajok és más kőolaj-eredetű környezeti szennyezők ártalmatlanítása elengedhetetlen, mivel azok a talajban élő mikroközösségekre, növényekre, állatokra és az emberre nézve egyaránt veszélyesek. Az adott szennyezéstől függően a kármentesítést el lehet végezni fizikai, kémiai vagy biológiai úton is, amely történhet helyben (*in situ*), illetve a szennyezett közeg kitermelését követően (*ex situ*). Ez utóbbi aztán történhet a helyszínen (*on-site*) vagy a közeg elszállítása után egy, a feladatra megfelelően kialakított, lehatárolt területen/telepen (*off-site*). A gyakorlat azt mutatja, hogy a biológiai módszerek jelentős potenciállal bírnak, viszont időigényesebbek, mint a hagyományos remediációs eljárások (Ossai és mtsai 2020).

1.4.1. Hagyományos kármentesítési eljárások

A hagyományos kármentesítési technikák közé sorolunk minden olyan módszert, amikor a szennyezett közeget valamilyen fizikai (pl. izoláció, gőzlepárlás, elektromágneses kezelés, égetés, vitrifikáció, pirolízis stb.) vagy kémiai (pl. oldószeres extrakció, kémiai oxidáció, immobilizáció stb.) kezelésnek vetik alá. Ezek jellemzően egyszerű és gyors eljárások, azonban gyakran igen költségesek, ráadásul előfordulhat, hogy az így kezelt talaj szerkezete irreverzibilisen romlik, vagy megnő a toxicitása (Lim és mtsai 2016, Ossai és mtsai 2020).

1.4.2. Bioremediáció

A bioremediáció során biológiai rendszerek alkalmazásával ártalmatlanítják a környezetszennyező anyagokat, vagy csökkentik azok mennyiségét. A hagyományos módszerekkel szemben a bioremediáció jóval költséghatékonyabb, és ideális esetben nem okoz további talajromlást, így környezetkímélőbb is (Lim és mtsai 2016).

Mivel a bioremediáció során jellemzően élő szervezeteket használnak fel, így bizonyos abiotikus (pl. hőmérséklet, tápanyagok, oxigéntartalom, nedvességtartalom, pH) és biotikus (pl. predáció, kompetíció, mutualizmus) tényezőknek megfelelőnek kell lenniük az optimális működéshez. Ha ez külső beavatkozás nélkül is teljesül, akkor végbemehet a passzív bioremediáció, az ún. természetes csillapodás. Ezek hiányában olyan módszerek alkalmazása válik szükségessé, amelyekkel a szennyezőanyag biodegradációjának körülményei javíthatók. A biostimuláció során az eredetileg korlátozott mennyiségben rendelkezésre álló tápanyagok (pl. nitrogén, foszfor, kálium stb.), alternatív elektronakceptorok vagy felületaktív anyagok adagolásával serkenthető a szennyezett közegben élő (endogén) mikroorganizmusok aktivitása és szaporodása, vagy javítható a szennyezőanyag hozzáférhetősége és biodegradációja. A kármentesítés hatékonysága növelhető bioaugmentációval is. Ekkor laboratóriumban felszaporított, specifikus lebontó aktivitással rendelkező mikroorganizmusokat juttatnak ki oltóanyagként a szennyezett közegbe (Lim és mtsai 2016, Roy és mtsai 2018, Sales de Silva és mtsai 2020).

1.4.3. Szénhidrogének mikrobiális lebontása

Az olajszennyezett közegek biológiai kármentesítése a szénhidrogének aerob (oxigénben gazdag környezetben) vagy anaerob (oxigénmentes környezetben) biodegradációján alapul. Mára több mint 12 Archea és 320 Eubacteria nemzetségről (pl. *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Flavocabter*, *Marinobacter*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Nocardia* stb.) bizonyították be, hogy egyes tagjaik képesek a szénhidrogéneket szén- és energiaforrásként hasznosítani. De emellett ismerünk olajszármazékokat bontó gombafajokat (pl. az *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Penicillium*, *Syncephalastrum*, *Fusarium*, *Amorphoteca*, *Talaromyces* stb. nemzetségek képviselői között) is (Koshlaf és Ball 2017, Prince és mtsai 2019).

A legegyszerűbb szerkezetű szénhidrogének, az *n*-alkánok mikrobiális degradációja aerob módon, a terminális útvonalon keresztül játszódik le a legkönnyebben. Az első, alkán-monooxygenáz által katalizált lépésben a szénhidrogénlánc oxidálódik, és primer alkohol képződik. Ezt egy alkohol-dehidrogenáz aldehiddé alakítja át, majd ebből aldehyd-dehidrogenáz által zsírsav keletkezik. Az alkánok oxidációjának végső lépéseként létrejött zsírsavak ezután belépnek a β -oxidáció energiatermelő folyamatába, vagy beépülnek a sejtmembránba (Das és Chandran 2011, Maletic és mtsai 2013, Laczi és mtsai 2015). Az aromás vegyületek toxikusabb hatásúak, ezért fokozottabb veszélyt jelentenek a természetes életközösségekre. Nagyobb

stabilitásuk miatt azonban a lebontásuk is nehezebb, ebben a komplex a folyamatban pedig sokféle útvonalon, számos enzim vehet részt (Abdel-Shafy és mtsai 2018).

1.5. A kármentesítés monitorozása

A „földtani közeg és felszín alatti víz szennyezéssel szembeni védelméhez szükséges határértékekről” szóló 6/2009. (IV. 14.) KvVM-EüM-FVM együttes rendelet (Hatályos Jogszabályok Gyűjteménye) alapján Magyarországon az ásványolajok és szénhidrogének a „minden esetben veszélyes anyagok” közé tartoznak, a szennyezettségi határértékük pedig a rendelet 1. melléklete szerint az összes alifás szénhidrogénre (C₅-C₄₀) nézve 100 mg/kg; a BTEX-vegyületekre 0,2-0,5 mg/kg, a fenolokra 0,5-1 mg/kg; PAH-vegyületekre 0,5-1 mg/kg; illetve halogénezett szénhidrogéneknek 1 mg/kg. Az olajszennyezett talaj szennyezettségének mértékét leggyakrabban az összes kőolaj-eredetű szénhidrogének (*total petroleum hydrocarbon*, TPH) mennyiségével szokás megadni. Önmagában azonban sem a TPH-tartalom, sem az egyes szennyezőkomponensek koncentrációja nem képes jellemezni a környezeti veszély mértékét. Előfordulhat ugyanis, hogy mialatt a könnyebben lebontható szénhidrogének mennyisége csökken a közegben, azzal párhuzamosan megnő a nehezebben lebontható, toxikusabb vegyületek relatív aránya. Hasonlóan ronthatják a talaj állapotát a mikrobiális lebontási folyamatok közti- és melléktermékei is, hiszen megeshet, hogy ezek az eredeti szennyezőanyagnál is mérgezőbb hatásúak (Montagnolli és mtsai 2015, Adeniji és mtsai 2017, Bodor és mtsai 2021).

A kármentesítés sikeréhez tehát elengedhetetlen nem csak a biodegradáció folyamatának, hanem a szennyezett környezet változásainak széleskörű monitorozása is. A talaj kémiai és biológiai paraméterei (pl. a szennyezőanyag-koncentráció, hozzáférhető tápanyag-tartalom, mikrobiális közösség és ökotoxicitás változásai) alapján teljesebb képet kaphatunk a szennyezett közeg állapotáról, és így megelőzhető az adott ökoszisztéma funkcióinak további károsodása. A talaj egészségét és termőképességét gyakran biológiai indikátorok – például a mikrobiális biomassza mennyisége, talajenzim-aktivitás, növényi csírázás és növekedés, földigiliszták szaporodása stb. – segítségével jellemzik (Khan és mtsai 2018, Bodor és mtsai 2021, 2024).

1.6. Biomonitorozás

A talajlakó mikroorganizmusok (és növényi gyökerek) által termelt talajenzimek olyan fehérjék, amelyek fontos biokémiai funkciókkal bírnak a különböző anyag- és

energiaátalakítási folyamatokban (Wolińska és Stepniewska 2012, Zuccarini és mtsai 2023). A legtöbb talajenzim besorolható az oxidoreduktázok, ligázok, liázok, hidrolázok és izomerázok közé (Wolińska és Stepniewska 2012), és a talaj szerves kolloidjaival és agyagásványaival komplexet képezve stabilizálódnak a talajmátrixban (Bodor és mtsai 2024). Ez alól kivétel az oxidoreduktázok csoportjába tartozó dehidrogenáz (DH), amely csak intracellulárisan fordul elő az élő mikrobákban. A DH a talaj szervesanyagának biológiai oxidációját katalizálva segíti elő a hidrogénnek (proton és elektron) a szerves szubsztrátról szervesetlen akceptorra szállítását, így részt vesz a C-körforgalomban. Az egyik legfontosabb talajenzim, hiszen információt nyújthat a közeg teljes mikrobiális aktivitásáról (Wolińska és Stepniewska 2012). A kataláz (*catalase*, CAT) szintén az oxidoreduktázok közé tartozik, és a hidrogén-peroxidot alakítja át vízzé és oxigénné. A dehidrogenázhoz hasonlóan a CAT is rendkívül érzékeny a nehézfémek jelenlétére: erős szennyezettségnél csökken mindkettő aktivitása, amely így a monitorozás során alkalmassá teszi őket a szennyezett talaj állapotának jellemzésére (Achuba és Peretiem-Clarke 2008). A szukráz (*sucrase*, SUC, vagy más néven: invertáz) a mikroorganizmusok szénhidrát-felhasználásáról adhat képet, mivel a szukrózt glükózzá és fruktózzá hidrolizálja. A csökkent SUC aktivitás a mikrobiális közösség diverzitásának csökkenésére is utalhat (Feng és mtsai 2022). Számos enzim képes hidrolizálni a fluoreszcein-diacetátot (FDA) – ilyenek például a proteázok, lipázok, észterázok –, éppen ezért az FDA-hidroláz aktivitás alapján szintén becsülhető a talaj teljes mikrobiális aktivitása (Adam és Duncan 2001).

A fentiek remekül illusztrálják a talajenzimek fontosságát a talaj egészségének fenntartásában, így az aktivitásuk nyomon követése nélkülözhetetlen egy kármentesítési eljárás során (Das és Varma 2011). Mindemellett azonban érdemes további ökotoxikológiai tesztek is elvégezni, hogy teljesebb képet kaphassunk a talaj állapotáról a kármentesítés alatt és után is. Erre alkalmasak lehetnek például a fitotoxicitást jellemző paraméterek vizsgálatai, mint a megfelelően érzékeny növényi indikátorfajok (pl. mustár, repce, lucerna) felhasználásával kivitelezett csírázási tesztek és morfológiai (pl. hajtás, gyökerek hossza) vizsgálatok (Graj és mtsai 2013, Jiang és mtsai 2016).

1.7. Mikrobiális közösségek jellemzése

Aktivitásuk révén a mikroorganizmusok sokféle talajfunkció ellátásában (pl. a talaj szerkezetének, termékenységének és stressztűrésének meghatározása) nélkülözhetetlenek (Bodor és mtsai 2024). A szennyezőanyagok jelenléte azonban a mikrobiális diverzitás – és így

az aktivitás – befolyásolásával jelentősen kihat ezekre a funkciókra. A mikrobiális közösségek jellemzésére és változásainak nyomon követésére a hagyományos, szaporításon alapuló vagy kis áteresztőképességű, molekuláris technikák mellett már rendelkezésre állnak olyan újgenerációs szekvenálási eljárások (*next-generation sequencing*, NGS) is, amelyek segítségével nagy mennyiségű információ nyerhető ki a környezeti mintákból izolált genetikai állományból. A 16S rRNS gén amplikon szekvenálásával a bakteriális közösségek diverzitása, az összes DNS shot-gun szekvenálásával a közösségösszetétel és potenciális funkciók (metagenomika), az összes RNS szekvenálásával pedig a ténylegesen kifejeződő funkciók (metatranszkriptomika) is jellemezhetők (Cordier és mtsai 2020, Laczi és mtsai 2020, Pacwa-Płociniczak és mtsai 2020).

1.8. Bioremediáció korlátai és a VBNC állapot

Habár a bioremediáció egy környezetkímélő és költséghatékony módszer a szennyezett közegek kármentesítésére, a sikerét mégis számos biotikus és abiotikus tényező befolyásolhatja (talajtípus, pH, hőmérséklet, oxigén- és elektronakceptorok jelenléte, hozzáférhető tápanyagok stb.). Hatékonyan csak akkor alkalmazható, ha mindezek optimálisak a lebontó mikroorganizmusok aktivitásának fenntartásához. Talajban a szénhidrogének biodegradációjának általában kedvez a megfelelő talajnedvesség (Abatenh és mtsai 2017) és oxigénellátottság, a közel semleges pH (kb. 6,5-8,5), 30-40 °C közötti hőmérséklet (Mishra és mtsai 2021), vagy a C:N:P=100:10:(1-5) arány (Zawierucha és Malina 2011). Száraz talajban kevésbé aktívak a mikroorganizmusok, a víztartalom emelkedésével viszont romlik a talaj szellőzése (és oxigénellátottsága). Hidegben a mikrobák aktivitása szintén csökken, magasabb hőmérsékleten azonban növekszik a szénhidrogének oldhatósága, amely egyszerre befolyásolhatja azok hozzáférhetőségét és toxicitását, illetve a talaj pH-ját. A hozzáférhető tápanyagok kicsi és nagy koncentrációja egyaránt gátolhatja a szennyezőanyagok biodegradációját, és ugyanilyen hatással lehet a folyamatra a szennyeződés „öregedése” is (Abatenh és mtsai 2017, Koshlaf és Ball 2017).

A fentiekből látszik, hogy a lebontó mikroorganizmusok számára optimális környezetet jóval egyszerűbb kontrollált, laboratóriumi körülmények között biztosítani, mint terepen. Szennyezett közegben, szuboptimális környezetben és különféle (olykor szélsőséges) környezeti stresszhatásoknak kitéve (pl. tápanyaghiány, UV- vagy fehér fény, pH-, sótartalom- és hőmérsékletváltozások stb.) nem csak a bioaugmentált baktériumtörzsek teljesíthetnek az elvárások alatt, pusztulhatnak ki, esetleg lépnek be egy extrém alacsony vagy zéró aktivitású,

VBNC állapotba, de gyakran még az endogén fajok is (Megharaj és mtsai 2011, Kuppusany és mtsai 2016, Bodor és mtsai 2020b). Az ilyen sejtek élnek, de nem képesek szaporodni, így telepeket sem képeznek a laboratóriumi táptalajokon. A VBNC állapot a mikroorganizmusok olyan adaptív, túlélési stratégiája, amely során a respirációjuk, metabolikus aktivitásuk, tápanyagtranszportjuk és makromolekuláris szintézisük drasztikusan lecsökken (miközben az ATP mennyisége nő), ezzel egyidejűleg pedig különféle morfológiai változásokat (pl. méret, alak, sejtfal és sejtmembrán összetétele stb.) szenvednek el. Mindez ellenállóbbá teszi őket bizonyos fizikai és kémiai hatásokkal szemben (Ramamurthy és mtsai 2014, Dong és mtsai 2020). A VBNC állapotot eredetileg patogén baktériumoknál írták le, így a vizsgálatára eleinte főleg az orvostudomány és az élelmiszeripar fókuszált. Mára azonban valószínű, hogy a legtöbb baktérium – beleértve szennyezőanyag-lebontó fajokat – (és néhány egysejtű gomba) természetesen is előfordul ebben a „szunnyadó” állapotban. Ráadásul bebizonyosodott, hogy a szennyezőanyagok (pl. szénhidrogének és nehézfémek) jelenléte is kiválthatja a jelenséget, így a biodegradációra képes sejtek VBNC állapotba lépése jelentősen visszavetheti a bioremediáció sikerét (Bodor és mtsai 2020b). Éppen ezért a folyamat megakadályozása és/vagy visszafordítása a biológiai kármentesítések egyik aktuális kihívásává vált.

1.9. Kilépés a VBNC állapotból

A VBNC állapotú sejtek újraéledését először 1984-ben, a *Salmonella enteritidis* esetében figyelték meg. Azóta számos más baktériumfajról is bebizonyosodott, hogy egy fajonként eltérő hosszúságú időintervallumban képesek visszanyerni a szaporodóképességüket – ezen túl azonban a folyamat nem visszafordítható, és a sejt lassan elpusztul (Bodor és mtsai 2020b, Dong és mtsai 2020). A VBNC sejtek újraéledésének feltételei rendkívül változatosak lehetnek. Bizonyos esetekben már a stresszfaktor megszüntetésével is újra szaporodóképes állapotba kerülnek: ilyenkor a környezet befolyásolása révén – például a tápanyag-koncentráció, illetve a hőmérséklet növelésével vagy csökkentésével, esetleg különböző kémiai ágensekkel (nátrium-piruvát, aminosavak, Tween 80) – újraaktiválhatók a VBNC baktériumok (Zhao és mtsai 2017). A legtöbb esetben azonban nem csak a környezeti tényezőkön múlik az újraéledés folyamata, hanem komplexebb módon, különféle stimulánsok – például autoindukálószer, katalázok, sziderofórok és újraéledést elősegítő faktorok (*Resuscitation promoting factor*, Rpf) segítségével idézhető elő a sejtek VBNC állapotból való kilépése (Bodor és mtsai 2020b).

1.10. Rpf fehérjék és környezeti alkalmazásuk

Az első Rpf fehérjét a laktáttartalmú minimál tápoldatban (*lactate minimal medium*, LMM) szaporított *Micrococcus luteus* sejtmentes felülszójában, vagyis extracelluláris szervesanyagában (*extracellular organic matter*, EOM) sikerült kimutatni. Az Rpf egy bakteriális növekedési faktor, amely már rendkívül kis koncentrációban is (a lag fázis rövidítésével) hatékonyan serkenti különböző fajok szaporodását, illetve elősegíti kilépésüket a VBNC állapotból (Bodor és mtsai 2020b). Rpf fehérjék vagy hozzájuk hasonlóan muralitikus (sejtfalbontó) aktivitással rendelkező Rpf analógok mára több Gram-pozitív és Gram-negatív baktérium esetében is ismertek (Li és mtsai 2024). A *M. luteus* segítségével előállított EOM-ban az Rpf a domináns fehérjekomponens, ám emellett tartalmaz olyan poliszacharidokat is (pl. sejtfal-fragmentumokat), amelyek jelzőmolekulaként szintén jelentőséggel bírhatnak a sejtek újraéledési folyamataiban (Bodor és mtsai 2020b). Habár az Rpf pontos hatásmechanizmusa továbbra sem ismert, valószínű, hogy a muralitikus aktivitása révén okozott sejtfalmódosulással, illetve az így kiváltott méretnövekedéssel és sejtosztódással függhet össze (Wang és mtsai 2021).

Hatékonyáguknak köszönhetően az Rpf fehérjéket –közülük is leginkább a *M. luteus*-ból származót – egyre elterjedtebben alkalmazzák a bakteriális szaporodás és újraéledés elősegítésén keresztül a mikrobiális diverzitás növelésére és a nehezen szaporítható fajok izolálására (Li és mtsai 2024). A szennyezőanyag-lebontó környezeti mikroorganizmusok effajta, Rpf-kapcsolt stimulációja új perspektívát nyit a környezetvédelem, azon belül is a biológiai kármentesítések területén. A bioremediáció során az Rpf hasznosítható natív formában tisztítva vagy a teljes EOM-mel együtt, esetleg rekombináns fehérjeként tisztított formában vagy nyers kivonatban (Bodor és mtsai 2020b, Xie és mtsai 2021). A lehetséges alkalmazási területek is meglehetősen sokrétűek az újfajta lebontó baktériumok izolálásától kezdve a szennyvizek tápanyagmentesítésén keresztül a szennyezőanyagok biodegradációjának fokozásáig (Su és mtsai 2013, Bodor és mtsai 2020b). Rpf (vagy Rpf-tartalmú EOM) segítségével sikerült izolálni például a PCB-bontó képességgel rendelkező *Rhodococcus biphenylivorans* TG9^T (Su és mtsai 2015a), *Castellaniella* sp. SPC4 (Su és mtsai 2019a), *Sreptococcus* sp. SPC0 (Lin és mtsai 2022) és *Bacillus* sp. LS1 (Han és mtsai 2023) törzseket. De Rpf-adagolással gyorsabbá és eredményesebbé vált az RB19 nevű antrakinon festék (Cai és mtsai 2020, 2021, Zhang és mtsai 2023) vagy a fenol (Su és mtsai 2019b, Yu és mtsai 2020) eltávolítása a szennyvízkezelés során (akár magas sótartalom mellett is), valamint hatékonyan

fokozható volt a PCB-vegyületek (Su és mtsai 2021) vagy a HKO-ok biodegradációja (Bodor és mtsai 2021) a szennyezett talajokban.

1.11. A kutatásunk előzményei

A kutatócsoportunk több alkalommal modellezte már egy helyi, HKO-szennyezett vasúti terület biológiai kármentesítési lehetőségeit. A talajmikrokozmosz rendszerek összeállításával végzett bioremediációs kísérleteikben arra jutottak, hogy mind a biostimuláció, mind az exogén eredetű, olajbontó *Rhodococcus* törzsek felhasználásával végzett bioaugmentáció alkalmas kezelés lehet a terület HKO-szennyezettségének csökkentésére (Bodor és mtsai 2020a). A 2021-ben publikált munkájukban (Bodor és mtsai 2021) 60 napon keresztül, megnövelt léptékű talajmikrokozmoszokban vizsgálták az Rpf-tartalmú EOM-adagolással kiegészített biostimuláció és bioaugmentáció hatását a HKO-biodegradációra. Habár az EOM-kezelés mindkét eljárás hatékonyságát egyaránt fokozta a megfelelő kontroll talajokhoz képest, ez rövidtávon leginkább a bennszülött mikrobióta olyan Rpf-reszponzív, szénhidrogénbontó tagjainak elszaporodásának lehetett köszönhető, mint például a *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Stenotrophomonas* és *Gordonia* nemzetségek képviselői (a bioaugmentált *Rhodococcus* törzsek biodegradációs hatékonyságára az EOM adagolása mindössze hosszabb időtávon volt gyenge pozitív hatással). Az EOM hatása a bioremediáció korai szakaszában, a HKO-biodegradáció első lépcsőjében volt a legkifejezettebb. Ebben a kb. 20-30 napban csökkent a leggyorsabban és a legnagyobb mértékben a TPH-tartalom az EOM-kezelt talajokban. Ezt követően a lebontási ráta jelentősen visszaesett a kontroll kezelések esetében megfigyelt szintre. Az EOM tehát rövidtávon hatékony stimuláns adalékanyagnak bizonyult, azonban az eredmények alapján felmerülhet a kérdés, hogy az EOM-hatás lecsengésekor megismételt adagolással fenntartható-e a stimuláló hatása, fokozható-e vele tovább a HKO-biodegradáció?

2. CÉLKITŰZÉSEK

Használatuk után a KO-ok és a bennük felhalmozódott nehézfémek, PCB-k és PAH-ok a talajban perzisztens szennyezést okoznak, zavarva ezzel a talaj természetes élőhelyi funkcióit vagy rontva annak hasznosíthatóságát. Hosszú ideje tartó és/vagy nagymértékű szennyezésnek kitéve még a szénhidrogének biodegradációjára képes mikroorganizmusok is beléphetnek az alacsony vagy zéró aktivitású VBNC állapotba, amely megnehezíti a biológiai kármentesítési folyamatokat. Akár a bioremediáció sikere is múlhat azon, hogy a megfelelő biostimulánsok adagolásával mennyire fenntartható a mikroorganizmusok aktivitása, vagy újraéleszthetők-e a VBNC sejtek.

A kutatómunkánk során a korábban HKO-szennyezett talajban hatékony biostimulánsnak bizonyult, Rpf-tartalmú EOM további hasznosítási lehetőségeit vizsgáltuk az azonos mintavételi helyszínről származó HKO-szennyezett talajokon. A célunk ezen talajok *ex situ* biostimulációs kármentesítésének fokozása volt megismételt EOM-kezelést alkalmazva. A megfelelő kontroll mikrokozmosz rendszerek összeállítása mellett az EOM-et a kísérlet összeállításakor (0. nap) és a HKO-biodegradáció kezdeti szakaszának végén (20. nap) is a talajhoz adagoltuk. A kísérlettel az alábbi két kérdésre kerestük a választ:

- (a) A rövidtávú EOM-hatás lecsengésekor megismételt adagolással fenntartható-e az EOM stimuláló hatása?
- (b) Tovább fokozható-e így a HKO-biodegradáció?

A kérdések megválaszolásához nyomon követtük a 60 napos inkubáció során a szénhidrogén-tartalom, mikrobiális respiráció, telepképző sejtszámok és talajenzimek aktivitásának alakulását, továbbá meghatároztuk a kezeléseket követően a talaj fitotoxicitásában bekövetkező változásokat is.

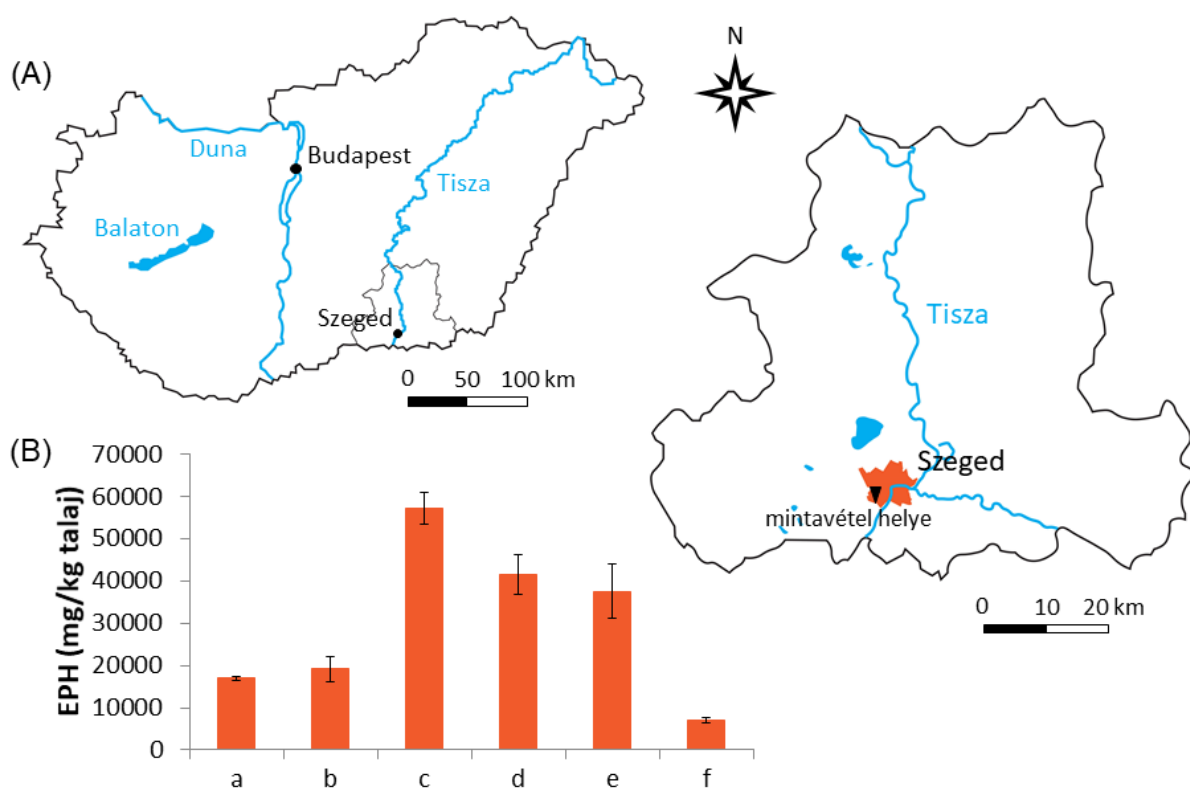
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Felhasznált vegyszerek

A vizsgálatok során felhasznált vegyszereket a Molar Chemicals Kft, Merck, Reanal és VWR Avantor cégektől lettek beszerezve. A kenőolajjal szennyezett talajmintát a MÁV Szolgáltató Központ és a MÁV-START Zrt. biztosította.

3.2. Felhasznált talajminta

A kísérleteinkhez a HKO-szennyezett talajmintát 2023. október 3-án gyűjtötték be a Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai Tanszékének munkatársai egy Szeged belterületén található rendező pályaudvarról (1.A ábra), ahol a vasúti szerelvényekből csöpögő használt (MOL MK8 típusú) motorolaj évtizedek óta problémát okoz.



1. ábra: A (A) mintavétel helyszíne és (B) az egyes mintavételi pontokból meghatározott, extrahálható kőolaj-eredetű szénhidrogének (EPH) mennyisége.

A mintavételezés a szervízvágányok mentén, összesen 6 pontból (a, b, c, d, és f) történt a katéna-elv alapján. Az egymástól nagyjából 2 méterre elhelyezkedő mintavételi pontokból átlagminta-képzéssel kb. 10-10 kg HKO-szennyezett talaj lett begyűjtve a talaj felső 25 centiméteres rétegéből. A szennyezett vágányoktól kb. 7-8 méter távolságból potenciálisan nem szennyezett talaj is mintázásra került, amely a talaj extrém antropogén eredetű

olajszennyezését megelőző állapotot volt hivatott szemléltetni. Az Egyesült Nemzetek Szervezete (ENSZ) Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Szervezetének (*Food and Agriculture Organization*, FAO) osztályozása alapján ebben a régióban az agyagos Vertisol típusú talajok fordulnak elő leggyakrabban (Bodor és mtsai 2021). A korábbi vizsgálatok alapján a nem szennyezett talaj sötét színű, viszonylag magas szervesanyag-tartalmú (23,5%), agyagos textúrával, közel semleges pH-val (pH=7,79) és nagy víztartó képességgel (*water holding capacity*, WHC=47,2%) rendelkező, gyengén sós (0,11%) talaj (Bodor és mtsai 2020a).

A mintavételt követően a légszáraz talajokat kézzel homogenizáltuk, eltávolítottuk a kavicsokat, köveket és növényi részeket. Ezt követően az egyes HKO-szennyezett talajmintákat egyenlő arányban összekeverve kompozit talajt hoztunk létre, amelyet közvetlenül használtunk fel a kísérleteink összeállításához.

3.3. Talajvizsgálati módszerek

A kísérleteinkben felhasznált talajnak több fizikokémiai paraméterét is szükséges volt megállapítani. A talajnedvességet gravimetriás módszerrel, a nedves és a 105 °C hőmérsékleten súlyállandóságig szárított talajok tömegének különbségéből kaptuk meg (Keveiné Bárány és Farsang 2002). A talaj összes szén- és nitrogéntartalmát a Kakuk és munkatársai (2017) által részletezett üzemeltetési beállításokkal Vario Max CN Analyzer (Elementar Group, Hanau, Németország) segítségével állapítottuk meg. A hozzáférhető foszfor-tartalom meghatározásakor Bodor és munkatársainak (2020a) kolorimetriás módszerét alkalmaztuk. Röviden: 2,5 g talajt 5 mL desztillált vízben felfuszpendáltunk, és 30 percig ráztuk 150 rpm percenkénti fordulatszámú rázatási sebességgel. A szuszpenzió centrifugálásával (5 perc, 13000 rpm) kapott felülúszó 900 µL részletét 256 µL vanadát-molibdát-reagenssel [VM-reagens: 1,25 g/L NH₄VO₃, 25 g/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄ × 4H₂O és 330 mL/L cc. HCl], 128 µL desztillált vízzel, valamint 10 µL cc. kénsavval elegyítettük, és 10 percig inkubáltuk. Végül a 405 nm hullámhosszon mért abszorbancia értékből kalibráció segítségével számoltuk ki az ortofoszfátokból származó foszfortartalmat (Bodor és mtsai 2020a).

3.4. A *M. luteus* EOM előállítása

Az EOM előállításához a *M. luteus* IAM 14879 (JMC 21373=NCIMB 13267) baktériumtörzset használtuk, amelyet a felhasználásig a lizogén tápoldatból (*lysogeny broth*, LB: 10g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5g/L élesztő kivonat) készített, agarral szilárdított táplemezen (15 g L⁻¹ Bacto agar) tartottunk fenn. Az Rpf fehérjét tartalmazó EOM-et Bodor és

munkatársainak (2021) módszere alapján állítottuk elő. A *M. luteus* LB-tápoldatba leoltott starter kultúráját 30 °C hőmérsékleten és 160 rpm sebességgel OD₆₀₀=1,0 optikai denzitásig inkubáltuk. Ezt követően a sejteket lecentrifugáltuk (13000 rpm, 10 perc, 4°C), majd LMM-tápoldatban [LMM: 4 g/L NH₄Cl; 1,4 g/L KH₂PO₄; 0,005 g/L biotin; 0,02 g/L metionin; 0,04 g/L tiamin; 0,03 g/L MgSO₄; 13,6 mL/L tejsav; 1,5 mL/L nyomelemoldat (0,375 g/L CuSO₄ × 5H₂O; 0,785 g/L MnCl₂ × 4H₂O; 0,183 g/L FeSO₄ × 7H₂O; 0,029 g/L Na₂MoO₄ × 2H₂O és 0,089 g/L ZnSO₄ × 7H₂O); pH=7,5] felfuszpendáltuk. Ezt az inokulumot 4 (V/V)% koncentrációban oltottuk át tiszta LMM-tápoldatba, és a *M. luteus* kultúrát a korábbiakkal megegyező körülmények között addig inkubáltuk, amíg a szaporodása elérte a késői exponenciális fázist. A sejt kultúrát végül lecentrifugáltuk, és 0,22 µm pórusátmérőjű szűrőn átszűrtük. Az így kapott, sejtmentes felülúszó az EOM, amelyet a felhasználásáig -20 °C hőmérsékleten tároltunk.

3.5. Megnövelt léptékű *ex situ* talajmikrokozmosz kísérletek összeállítása

A különböző bioremediációs kezelések – különösen az ismételt EOM-adagolás – hatását megnövelt léptékű *ex situ* mikrokozmosz rendszerek segítségével modelleztük, amelyek összeállításához a HKO-szennyezett kompozit talajt használtuk (3.2. fejezet). A kísérleti elrendezés részleteit az 1. táblázat mutatja be.

1. táblázat: Kísérleti elrendezés. A mikrokozmosz rendszerek összeállításakor minden esetben 10 kg használt kenőolajjal (HKO) szennyezett talajt használtunk fel, amelynek a nedvességtartalmát az egyes kezeléseknek megfelelő adalékanyagokkal együtt 30 (m/m)%-ra állítottuk be.

Kezelés	Adalékanyagok	Kezelés célja
NA	Víz	Természetes csillapodás
BS	+ NPK ^a (C/N/P~500/10/1)	Biostimuláció
BS+EOM ^b	+ NPK (C/N/P~500/10/1) + 10% EOM	Biostimuláció + EOM
BS+2×EOM	+ NPK (C/N/P~500/10/1) + 10% EOM + 5% EOM a 20. napon	Biostimuláció + EOM + EOM

^aNPK: szervesetlen nitrogén-, foszfor- és káliumforrást tartalmazó keverék

^bEOM (extracellular organic matter): a *Micrococcus luteus* extracelluláris szervesanyaga

A mikrokozmosz rendszerekben a következő kísérleti körülményeket vizsgáltuk: (a) természetes csillapodás (NA, a HKO-szennyezett talaj saját magából eredő szénhidrogén-bontása), (b) biostimuláció (BS, a HKO-szennyezett talaj bennszülött mikrobiális közösségének serkentett szénhidrogén-bontása), (c) biostimuláció és EOM-adagolás (BS+EOM, Rpf-tartalmú EOM hozzáadásával fokozott biostimuláció), (d) BS+EOM és megismételt EOM-adagolás az

inkubáció 20. napján (BS+2×EOM, az Rpf-tartalmú EOM kezdeti serkentő hatásának fenntartása és a biostimuláció további fokozása). 10 (m/m)% *M. luteus*-ból származó EOM hozzáadásával hatékonyan serkenthető az endogén mikrobiális közösség aktivitása és/vagy újraaktiválhatók annak VBNC tagjai, ez a serkentő hatás azonban leginkább az inkubáció kezdeti szakaszában (kb. 20-30 nap) érvényesül (Bodor és mtsai 2021). Éppen ezért a 20. napon megismételt, 5 (m/m)% EOM-adagolást annak érdekében alkalmaztuk, hogy a HKO-biodegradáció hatékonyságát fenntarthassuk és/vagy fokozhassuk a kezdeti EOM-hatás lecsengését követően is. A mikrokozmosz rendszerek összeállításához minden kezelés esetében 10 kg HKO-szennyezett kompozit talajt mértünk egy műanyag tárolóedénybe (magasság: 27 cm, szélesség: 32 cm, mélység: 27 cm, térfogat: 13 L). A talajok nedvességtartalmát a kiinduláskor 30 (m/m)%-ra állítottuk be steril desztillált vízzel, majd az inkubáció során a WHC kb. 30-60%-ának megfelelő tartományban, 15 (m/m)% és 30 (m/m)% között tartottuk. Mivel a NA jelű mikrokozmoszszal a HKO-szennyezett talaj önálló lebontási képességét modelleztük, így ehhez a rendszerhez nem adagoltunk tápanyagokat sem. Ez a rendszer szolgált tehát kontrollként. Minden más talajmikrokozmoszhoz úgy adagoltuk a vízzoldható, szervesetlen nitrogén-, foszfor- és káliumforrásként (NPK) szolgáló K_2HPO_4 -ot és NH_4NO_3 -ot, hogy azokban a C/N/P arány megközelítse a szennyezett talajokban a HKO-ok biodegradációjához optimális 500:10:1 értéket (Lee és mtsai 2007). Az így összeállított talajmikrokozmoszokat szobahőmérsékleten (kb. 20-25 °C) inkubáltuk 60 napon keresztül, és minden második nap alaposan átkevertük őket a megfelelő levegőellátás elérése érdekében.

A talajmikrokozmoszokból a tárolóedény három különböző pontjáról, egy erre a célra kialakított, üreges mintavevővel történt a mintavétel a kísérlet összeállításakor (0. nap), valamint az inkubáció 10., 15., 20., 25., 35., 50. és 60. napján. A kb. 20 mm átmérőjű, függőleges talajoszlopokat egyenként homogenizáltuk, majd ezekből kerültek meghatározásra a szénhidrogén-tartalmak, telepkepző sejtszámok és talajenzim aktivitások.

3.6. A talaj szénhidrogén-tartalmának meghatározása

Annak érdekében, hogy nyomon követhessük a különböző kármentesítési módszerek hatékonyságát, a kísérlet során Bodor és munkatársainak (2021) módszerével a 0., 10., 15., 20., 25., 35., 50. és 60. napokon is meghatároztuk a HKO-szennyezett talajokból összeállított mikrokozmosz rendszerekben az extrahálható kőolaj-eredetű szénhidrogének (EPH) mennyiségét. Az előzőleg 105 °C hőmérsékleten kiszárított a talajminta 1 g tömegéhez 10 mL szén-diszulfidot mértünk extrahálószerként. A lezárt üvegeket vortex segítségével

homogenizáltuk, majd 1 órán keresztül rázattuk 250 rpm sebességgel. Az extraktumot ezután lecentrifugáltuk (3 perc, 13000 rpm, 4 °C), hogy elválasszuk a talajszemcséktől, végül a felülúszót egy TOG/TPH Analyzer CVH-1 (Wilks Enterprise, Norwalk, USA) küvettás TPH-mérő segítségével vizsgáltuk. A minták EPH-tartalmát az infravörös abszorbancia értékek kalibrálásával számoltuk ki (a nem szennyezett talajminta háttér abszorbanciáját minden értékből kivontuk). Az EPH-tartalmat a talaj száraztömegére vonatkoztatva, mg/kg egységben fejeztük ki. Az így kapott eredményekből az alábbi egyenlettel (1.) kiszámolható a kezelések során elért biokonverziós hatékonyság:

$$B\% = [(C_0 - C_v) / C_0] \cdot 100, \quad (1. \text{ egyenlet})$$

ahol C_0 a talaj kezdeti EPH-tartalmát (mg/kg), C_v pedig a talaj adott mintavételi időpontban mért EPH-tartalmát (mg/kg) jelenti.

Megjegyzendő, hogy a TPH-tartalom magába foglalja az illékony és az extrahálható szénhidrogéneket is (Kuppusamy és mtsai 2020), amelyeket a mintafeldolgozás során a 105 °C hőmérsékleten végzett szárítással elveszítenénk. Mivel azonban az általunk vizsgált talajban a szennyezőanyag HKO volt, amely a vasúti gépjárművek motorjában korábban már magas hőmérsékleti hatásoknak volt kitéve, így feltételeztük, hogy a minta nem (vagy csak elhanyagolható mennyiségben) tartalmaz illékony szénhidrogéneket. Éppen ezért a kísérleteink során meghatározott EPH-tartalom megközelítőleg megfelel a TPH-tartalomnak.

A talajmikrokozmoszok EPH-lebontási rátáinak becslésére az elsőrendű bomlási modell egyenletét (2.) használtuk fel (Wang és mtsai 2016):

$$C_v = C_0 \exp(-kt), \quad (2. \text{ egyenlet})$$

ahol C_v pedig a talaj adott mintavételi időpontban mért EPH-tartalmát (mg/kg), C_0 a talaj kezdeti EPH-tartalmát (mg/kg), k a lebontási rátát (1/nap), t pedig az inkubáció időtartamát (nap) jelenti.

3.7. Mikrobiális respirációs vizsgálatok

A különböző bioremediációs kezeléseknek alávetett talajok mikrobiális respirációs aktivitását (RA) gázkromatográf segítségével nyomon követett CO₂-termelődés mértékével jellemeztük. Ehhez a műanyag tárolóedényekből vett talajminták 6 g mennyiségét 125 mL térfogatú szérumüvegekbe mértük, gumiszeptummal lezártuk, és 10 napon keresztül sötétben inkubáltuk (25 °C). Ez idő alatt minden második nap lemértük a minták légterének CO₂-tartalmát, majd a mérést követően az üvegeket felnyitottuk, átlevégőztettük (ezzel igyekeztünk az edényekben lévőhöz hasonló oxigénellátottságot biztosítani), újra lezártuk, és

viSSzahelyeztük az inkubátorba. A CO₂-mérés során Hamilton-fecskendővel 100 µL gázmintát fecskendeztünk a lezárt minták gázteréből egy Agilent 7890N típusú gázkromatográfbba (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). A mérés paraméterei: hővezető-képességi detektor (*thermal conductivity detector*, TCD), 300°C detektorhőmérséklet, HP-PLPT/Q kolonna (30 m × 320 µm × 20 µm), 45°C kolonnahőmérséklet, 5 mL/perc áramlási sebesség, He vivőgáz. A megfelelő retenciós időnél kapott gázkromatográfiás egységekből (*gas chromatography unit*, GCU) kalibrációval kiszámoltuk a gáztér CO₂-tartalmát, majd annak kumulatív mennyiségét a száraz talajtömegre mg CO₂/g vagy a RA eredményeinél mg CO₂/g/48 óra mértékegységekben adtuk meg. Annak érdekében, hogy minél jobban leképezhessük a műanyag edényekben összeállított talajmikrokozmoszok respirációs változásait, a 60 napos kísérlet során minden 10. napon elhagytuk az összes addigi szérumüveget, hogy aztán tiszta üvegekbe újabb talajmintákat mérjünk a talajmikrokozmoszokból, amelyeket a korábbiakkal megegyező módon inkubáltunk tovább a respirációs mérésekhez.

3.8. Telepképző sejtszámok meghatározása

Az aerob heterotróf baktériumok (AHB) telepképző sejtszámának (*colony forming unit*, CFU) meghatározása Bodor és munkatársainak (2021) módszere alapján történt: 5 g talajmintához 0,9 (m/m)%-os steril NaCl-oldatot adtunk, majd 150 rpm sebességgel 30 percig rázattuk. Végül az ebből a szuszpenzióból készített hígítási sort LB-táplemezre cseppentettük ki, és a 3 napos inkubáció után kifejlődő telepek száma alapján következtettünk a telepképző AHB sejtszámokra. A szénhidrogénbontó baktériumok (*hydrocarbon utilizing bacteria*, HUB) CFU értékeinek meghatározásához ugyanezt a hígítási sort minimál tápoldatból (*minimal medium*, MM: 0,68 g/L KH₂PO₄; 0,87 g/L K₂HPO₄; 0,58 g/L NaCl; 0,125 g/L MgSO₄ × 7H₂O; 0,044 g/L CaCl₂ × 2H₂O; 1,2 g/L NH₄NO₃; 0,014 g/L FeSO₄; 0,0093 g/L EDTA; 0,0002 g/L ZnSO₄ × 7H₂O; 0,00006 g/L MnCl₂ × 7H₂O; 0,0006 g/L H₃BO₄; 0,0004 g/L CoCl₂ × 6H₂O; 0,00002 g/L CuCl₂ × 2H₂O; 0,00004 g/L NiCl₂ × 6H₂O és 0,000046 g/L NaMoO₄ × 6H₂O) készített agarlemezre (15 g/L Bacto agar) is kicseppentettük, amelynek felszínére előzőleg 100 µL hexadekánt szélesztettünk kizárólagos szén- és energiaforrásként. Az AHB és HUB sejtszámokat száraz talajtömegre vonatkoztatva, log₁₀CFU/g egységben fejeztük ki.

3.9. A talaj enzimatis aktivitásának meghatározása

A CAT aktivitást Stepniewska és munkatársainak (2009) titrimetriás módszerével határoztuk meg. Ehhez 2 g talajmintát 40 mL desztillált vízzel és 5 mL 0,3%-os H_2O_2 -oldattal kevertünk el, majd 20 percig ráztuk (160 rpm). Ezt követően 5 mL 1,5 M-os H_2SO_4 -oldattal leállítottuk a reakciót, végül a talajszuszpenziót leszűrtük, és 0,02 M-os KMnO_4 -oldattal megcitráltuk. A talaj CAT aktivitását az elreagáló titráló oldat mennyiségéből fejeztük ki.

A talaj DH aktivitásának meghatározására Wolińska és munkatársainak (2016) kolorimetriás módszerét alkalmaztuk, amely a 2,3,5-trifenil-tetrazolium-klorid (TTC) trifenil-formazánná (TPF) redukálásán alapul. Előbb 6 g talajmintához adtunk 120 g CaCO_3 -ot, amelyet 1 mL 3%-os TTC-oldattal és 4 mL desztillált vízzel kevertünk el. A 20 órás inkubáció (30 °C, 160 rpm) után 25 mL etanolt mértünk a mintához, amellyel újabb 1 órán keresztül sötétben ráztuk (160 rpm). A folyamat végén kapott, leszűrt extraktum 485 nm hullámhosszon mért abszorbanciájából kalibráció segítségével kaptuk meg a DH aktivitást, amelyet száraz talajtömegre vonatkoztatva, $\mu\text{g TPF/g/24}$ óra mértékegységben fejeztünk ki.

Az FDA-hidrolizáló aktivitás meghatározására Adam és Duncan (2001) módszerét követtük. 2 g talajhoz adtunk 15 mL 60 mM-os foszfát-puffert (pH=7,6) és 0,2 mL FDA-oldatot (1000 $\mu\text{g/mL}$), majd ezt a szuszpenziót 20 percig inkubáltuk (30°C, 160 rpm). A reakciót 15 mL kloroform:metanol=2:1 eleggyel állítottuk le. Ezt követően lecentrifugáltuk a szuszpenziót, és a felülúszó abszorbanciáját 490 nm hullámhosszon megmértük. Az FDA aktivitást kalibráció segítségével, száraz talajtömegre vonatkoztatva mg fluoreszcein/g/24h egységben fejeztük ki.

A SUC aktivitás mérését Feng és munkatársai (2022) kolorimetriás módszere alapján végeztük. A folyamat a szukróz hidrolízise során felszabaduló redukáló cukrok szabad karbonil-csoportjának detektálásán alapul. 3 g talajmintához hozzáadtunk 5 mL 50 mM-os foszfát-puffert (pH=5,5), 0,25 mL toluolt és 15 mL 8 (m/m)%-os szukróz-oldatot, majd a szuszpenziót 24 órán át inkubáltuk 37 °C hőmérsékleten. Ezt követően a szuszpenzió szűrletének 0,5 mL részletéhez 1 mL dinitro-szalicilsav (3,5-dinitrosalicylic acid, DNSA)-oldatot adtunk, és az elegyet a színreakció elősegítésére 5 percre forró vízfürdőbe helyeztük. Végül 10 mL desztillált víz hozzáadásával hűtöttük le az elegyet, és 508 nm hullámhosszon mértük meg az abszorbanciáját. A SUC aktivitást kalibráció segítségével, száraz talajtömegre vonatkoztatva mg glükóz/g/24 h egységben fejeztük ki.

3.10. Talaj fitotoxikológiai tesztek

A fitotoxikológiai tesztek a 60 napos kísérlet kezdetén és az inkubáció végén is elvégeztem, hogy nyomon követhessem a bioremediációs kezelések hatását a HKO-szennyezett talajokra. A tesztek elvégzésekor Bodor és munkatársainak (2021) módszerét követtük azzal a különbséggel, hogy tesztorganizmusként ezúttal a szegedi Gabonakutató Nonprofit Kft-től beszerzett repce növényt (*Brassica napus* L. c.v. Gabriella) használtuk fel. A repce a második legfontosabb olajnövény a világon, ráadásul rendkívül érzékeny az abiotikus stresszhatásokra (Mészáros és mtsai 2022), ezért feltételeztük, hogy ideális bioindikátorként tudjuk alkalmazni a kísérleteinkben. A fitotoxikológiai vizsgálatokhoz 20 g nedves talajt mértünk egy steril Petri-csészébe (átmérő: 60 mm), ezután egymástól nagyjából egyenlő távolságra 20 db repcemagot helyeztünk el a talaj felszínére. A talajt desztillált vízzel nedvesítettük, majd a Petri-csészéket lecsuktuk, és sötét helyen inkubáltuk (25 °C, 4 nap). A teszt során azokat a magokat tekintettük csírázottnak, amelyeknek a maghéja megpattant, és látható gyökérrel rendelkeztek. A csíranövények gyökereinek hosszát a gyökérnyaktól a gyökércsúcsig mértük. A csírázási indexet (*germination index*, GI) a következő egyenlet (3.) alapján számoltuk ki:

$$GI\%=[(\text{csírázási}\%)\cdot(\text{gyökérhossz}\%)]/100, \quad (3. \text{ egyenlet})$$

ahol a csírázási% és a gyökérhossz% a kontroll értékekhez hasonlított csírázási arány és relatív gyökérhossz. Kontrollként minden esetben a mintavételi helyszínről származó, nem szennyezett talajmintát használtuk. A repcemagok csírázókéességét pedig minden teszt előtt nedves szűrőpapíron teszteltük.

3.11. Statisztikai analízis

Az eredményeket átlag $\pm$ standard hiba (SE) formátumban ábrázoltuk. A statisztikai elemzéshez SigmaPlot 12 szoftvert alkalmaztunk, az összehasonlító tesztek egyutas variancia-analízis (ANOVA, $P \leq 0,05$) és Duncan-teszt alkalmazásával végeztük el.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKEKELÉSÜK

4.1. A használt kenőolajjal szennyezett talaj jellemzői

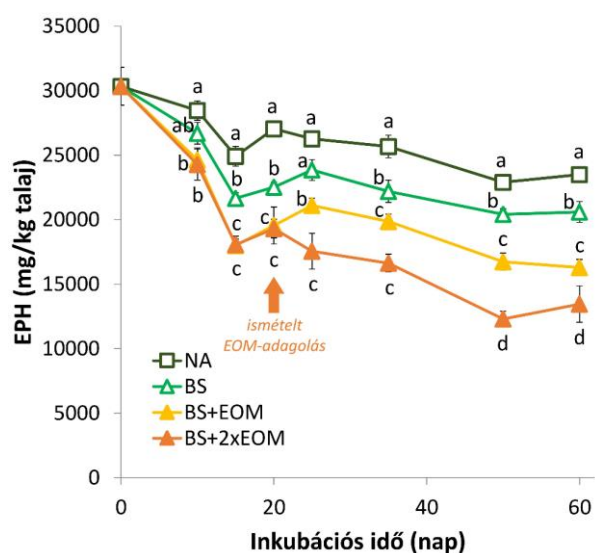
A szegedi rendező pályaudvarról begyűjtött HKO-szennyezett talaj EPH-tartalma (7000-57300 mg/kg) minden mintavételi pontban (1.B ábra) lényegesen meghaladta a 6/2009. (IV. 14.) KvVm-EüM-FVM együttes rendelet 1. mellékletében a C₅-C₄₀ szénatomszámú alifás szénhidrogénekre vonatkozóan megadott, 100 mg/kg-os határértéket (Hatályos Jogszabályok Gyűjteménye). A szerelvényekből csöpögő HKO tehát a fenntartó igyekezete ellenére továbbra is problémát okoz a helyszínen. A hat mintavételi pontból képzett kompozit talaj EPH-tartalma ennek megfelelően szintén magas (30300 mg/kg), ahogy a C/N aránya (39,4) is, hozzáférhető foszforban azonban meglehetősen szegény (0,322 mg/g). A hosszan tartó és nagymértékű szennyezettség ellenére továbbra is viszonylag nagy mennyiségben fordulnak elő benne aerob heterotróf baktériumok (10⁷ CFU/g), amelyek jelentős része lehet szénhidrogénbontó a HKO-komponensek tartós jelenléte miatt. Az Egyesült Államok Környezetvédelmi Ügynökségének (*United States Environmental Protection Agency*, US EPA) ajánlása szerint akár 10³ CFU/g sejtszám is elegendő lehet az olajszennyezett talajok bioremediációjához (Lin és mtsai 2010), így feltételeztük, hogy a limitáló tápanyagok biztosításával és az EOM-adagolással kivitelezhetők lesznek az általunk tervezett biostimulációs kezelések.

4.2. Az EOM hatása a szénhidrogének biodegradációjára

A megnövelt léptékű *ex situ* talajmikrokozmosz rendszerek összeállításával (3.5. fejezet) az volt a célunk, hogy realisztikus talajkörnyezetben modellezzük a HKO-szennyezett talaj biostimulációs lehetőségeit, különös tekintettel az Rpf-tartalmú EOM-adagolással serkentett kezelésekre. A feltételezésünk az volt, hogy a 20. napon, vagyis a szénhidrogénbontás első, gyors biodegradációs periódusának végén az EOM-kezelés megismétlésével fenntartható és/vagy fokozható az EOM kezdeti serkentő hatása és így a szennyezőanyag lebontásának hatékonysága is.

A 60 napos inkubációs idő alatt folyamatosan nyomon követtük a talajmikrokozmoszokból meghatározott EPH-tartalmakat (3.6. fejezet), és az így kapott eredményeket a 2. ábra szemlélteti. A kísérlet során az EPH-tartalom a kezdeti 30300 mg/kg értékről 13500-23500 mg/kg közötti értékekre csökkent a különböző kezelések hatására. A szennyezettség a megismételt EOM-adagolás (BS+2×EOM) hatására mérséklődött a legnagyobb mértékben, míg a természetes csillapodás (NA) eredményezte a legkisebb változást az EPH-tartalomban. A 2. ábrán megfigyelhető továbbá, hogy a kísérlet első 20-30 napjában

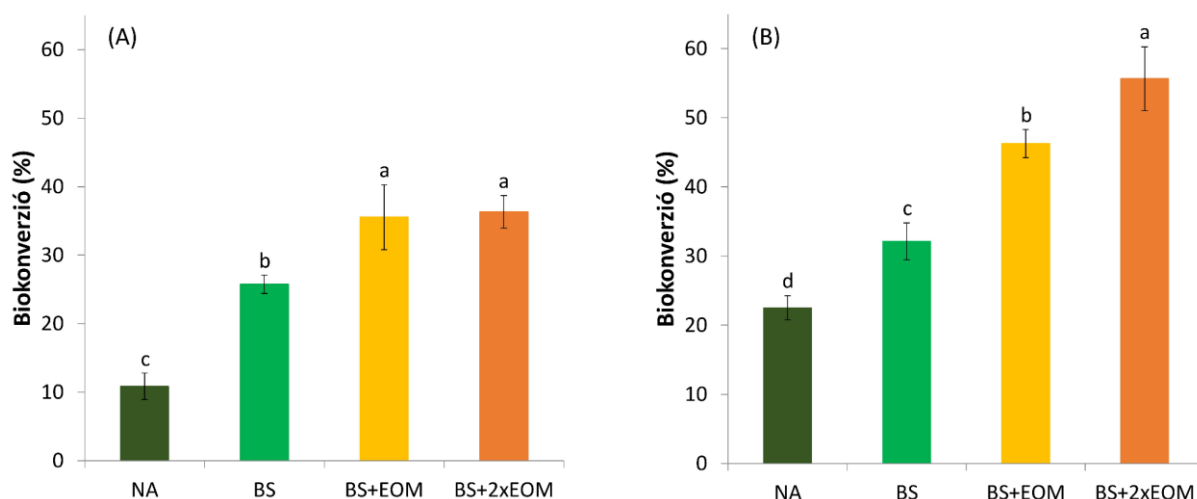
minden kezelés esetében intenzívebb a szénhidrogén-tartalom csökkenése, ezután a görbék trendjei fokozatosan telítésbe futnak, vagyis a fennmaradó időszakban egy lassabb, kisebb meredekségű lebontási lépcső következik. Ezt a kétlépcsős mintázatot, illetve az EPH-tartalom mérsékeltebb csökkenését a második lebontási periódusban több molekuláris esemény (és azok kombinációja) is magyarázhatja. A mikroorganizmusok eleinte a könnyebben bontható és hozzáférhető szénhidrogéneket hasznosítják, ám az inkubáció előrehaladtával ezek mennyisége és hozzáférhetősége is folyamatosan csökken. Ráadásul a biodegradáció során felhalmozódhatnak mérgező bomlástermékek is, vagy éppen a stimulánsok hatására elszaporodó mikroorganizmusok felületaktív anyagai mobilizálhatnak korábban nem hozzáférhető, toxikus HKO-komponenseket (Bodor és mtsai 2021). Tekintve, hogy a víz és makronutriensek (N és P) mennyiségét rendszeresen monitoroztuk (és ha szükség volt rá, pótoltuk), így az ezek hiányából fakadó limitáló hatást kizártuk. Érdeemes megfigyelni, hogy az első lépcső végéig a BS+EOM és BS+2×EOM jelű rendszerek EPH-görbéi együtt futnak, hiszen ekkor még nincs eltérés ezen talajmikrokozmoszok kezelése között. Miután azonban a 20. napon megtörténik az ismételt EOM kezelések, a második lebontási periódusban végig szignifikánsan alacsonyabb EPH-tartalmakat mértünk a BS+2×EOM jelű mintákban, mint a kontroll kezelésekénél (NA és BS) egyébként szintén szignifikánsan hatékonyabb BS+EOM esetében.



2. ábra: Az EPH-tartalmak változásai a különböző bioremediációs módszerekkel kezelt talajmikrokozmosz rendszerekben. Az eltérő betűk egy adott mintavételi napon belül szignifikáns különbségeket jelölnek a Duncan-teszt alapján ($n=6$; $P \leq 0,05$).

A lebontási folyamat könnyebb átláthatósága érdekében az EPH-tartalmak alapján számolt biokonverziós hatékonyságokat (3.6. fejezet) külön is ábrázoltuk a 20 és 60 napos

inkubációt követően, vagyis nagyjából az első lebontási periódus végén és a teljes inkubációs időszak végeztével, amelyeket a 3. ábra mutat be. A 3.A ábrán látszik, hogy 20 nap után a talaj nedvességtartalmának egyenletes szinten tartásával (NA) is elbomlik a kiindulási EPH-tartalom 11%-a, vagyis kedvező időjárási körülmények között természetes csillapodással, akár emberi beavatkozás nélkül is csökkenhet a szennyezőanyag koncentrációja. Ez az eredmény, valamint az NPK-adagolással biostimulált mintákban (BS) tapasztalt szignifikánsan hatékonyabb, 26%-os biokonverzió jelzi, hogy a tartósan HKO-szennyezett talaj mikrobiálisan aktív, és az endogén mikroközösség tagjai között akadnak olyanok, amelyek képesek lebontani a szénhidrogéneket. Az első lebontási lépcső végére a leghatékonyabb biokonverzió (36-36%) az EOM-kezelt mintákban volt megfigyelhető, ahol a BS+EOM jelű rendszerekben 37% HKO-biokonverziót tapasztaltak. Az EOM tehát a jelen kísérletben is eredményesen fokozta a biostimuláció hatékonyságát, amely visszavezethető az Rpf és az egyéb újraéledést segítő EOM-komponensek újraaktiváló és/vagy serkentő hatására (Bodor és mtsai 2020b, 2021).



3. ábra: Az EPH-biokonverzió hatékonysága (A) 20 nap és (B) 60 nap inkubációt követően a különböző bioremediációs módszerekkel kezelt talajmikrokozmosz rendszerekben. Az eltérő betűk szignifikáns különbségeket jelölnek a Duncan-teszt alapján ($n=6$; $P \leq 0,05$).

A 20. napon a BS+2×EOM jelű talajmikrokozmoszban megismételtük az EOM-kezelést, amelynek hatására ebben a rendszerben a második lebontási lépcső során még a BS+EOM jelűben tapasztaltnál képest is végig hatékonyabb HKO-biokonverziót detektáltunk. A 60 napos kísérlet végére (3.B ábra) a BS+2×EOM esetében 56%, a BS+EOM, BS és NA esetében pedig 46%, 32% és 22% volt a biokonverzió hatékonysága. A természetes csillapodás esetében ez az érték nagyjából megegyezik a Lee és munkatársai (2018) által a WHC 50%-ára beállított víztartalommal kapottak (kb. 25%), a biostimuláció esetében pedig nagyságrendileg megfelel Lee és munkatársainak (2007) C/N/P=500/10/1 arányú biostimulációs eredményének

(kb. 44%). Mindemellett az NA, BS és BS+EOM kezelések egyaránt hasonló eredményt hoztak, mint Bodor és munkatársainak (2021) korábbi munkája. A 60. napra a BS+2×EOM bizonyult a leghatékonyabb kezelésnek, amelynek a hatékonysága meghaladta a korábbi munka (Bodor és 2021) EOM-adagolással fokozott bioaugmentációs kezelésének hatékonyságát. Tehát az EOM nem csak hogy hatékony biostimuláns, de a második EOM-kezeléssel sikerült tovább fokozni az EPH-biodegradációt. Ez gazdasági szempontból jelentős lehet, hiszen az ismételt EOM-adagolással kiváltható a bioaugmentációhoz használt, több baktériumtörzsből álló inokulum előállításának költsége. Ráadásul az EOM Rpf-tartalma -20 °C hőmérsékleten tárolva tovább megőrizheti a muralitikus aktivitását (Su és mtsai 2015b), így egy fermentációval megoldható a kezdeti és az ismételt adagolás is.

Mivel a 2. és a 3. ábrán is látszik, hogy a HKO-biodegradáció sebessége lecsökkent a 20-30. nap után, így azért, hogy ezt számszerűsíthessük, az első rendű kinetika modellje alapján (3.6. fejezet) minden talajmikrokozmoszra vonatkozóan kiszámítottuk az EPH-lebontási rátákat az első (0-20. nap), a második (20-60. nap), illetve a teljes biodegradációs periódusban (0-60. nap). Az így kapott eredményeket a 2. táblázat mutatja.

2. táblázat: Az EPH-biokonverzió mértéke és az elsőrendű kinetika alapján számolt lebontási ráták a különböző bioremediációs módszerekkel kezelt talajmikrokozmosz rendszerekben.

Kezelés	NA	BS	BS+EOM	BS+2×EOM
<i>Első lebontási periódus (0-20. napig)^a</i>				
EPH biokonverzió (%)	11	26	36	36
Lebontási ráta (1/nap)	0,006	0,015	0,022	0,023
<i>Második lebontási periódus (20-60. napig)^b</i>				
EPH biokonverzió (%)	11	6	10	20
Lebontási ráta (1/nap)	0,003	0,002	0,005	0,009
<i>Teljes lebontási periódus (0-60. nap)</i>				
EPH biokonverzió (%)	22	32	46	56
Lebontási ráta (1/nap)	0,004	0,006	0,01	0,014

^aAz inkubáció kezdetétől a TPH-biokonverziós trendek kiegyenlítődéséig tartó időszak.

^bAz első lebontási periódus végétől (20. nap) a kísérlet végéig (60. nap) tartó időszak.

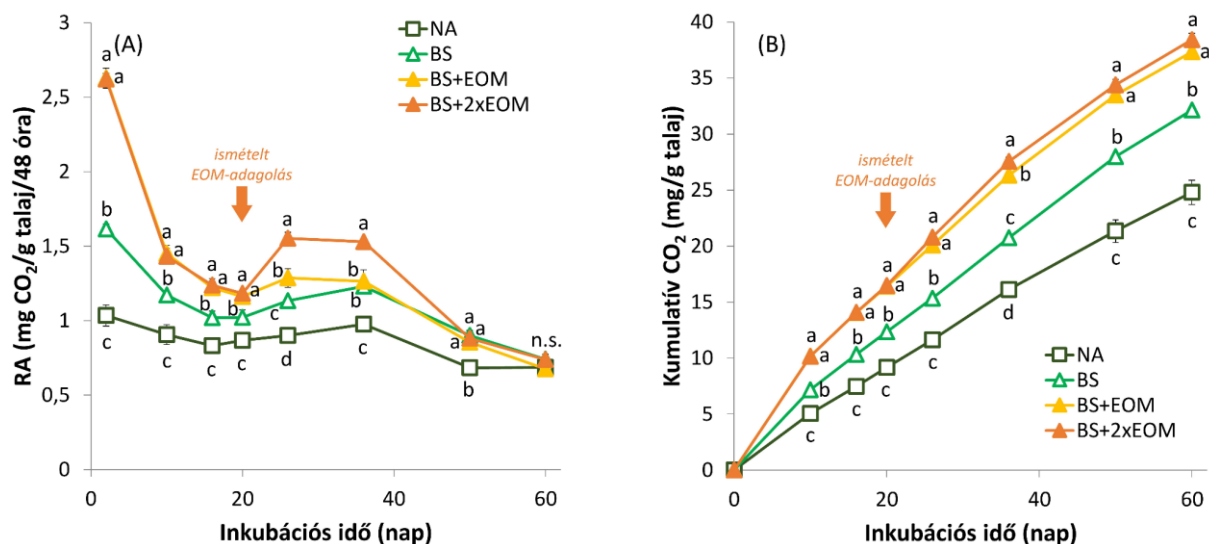
Az első lebontási periódusban a BS+EOM (0,022 1/nap) és BS+2×EOM (0,023 1/nap) kezelések eredményezték a leggyorsabb biodegradációt, míg a BS (0,015 1/nap) és NA (0,006 1/nap) kezelések elmaradtak ettől. A 20. napon a BS+2×EOM esetében megismételtük az EOM adagolását, amelynek következtében bár a többi kezeléshez hasonlóan itt is jelentősen lassult a HKO-biodegradáció a második lépcsőben. Ám míg az NA esetében a lebontási ráta

eleve alacsony volt, a BS és BS+EOM jelű rendszerekben pedig közel nyolcadára és negyedére esett vissza, addig a BS+2×EOM esetében csak valamivel kevesebb, mint felére. Így a biodegradáció második periódusában ennél a kezelésnél adódott a legmagasabb lebontási ráta (0,009 1/nap). Ezek az eredmények szintén arra utalnak, hogy a megismételt EOM-adagolással elnyújtható az EOM pozitív hatása, és fokozható az endogén mikrobiális közösség HKO-biodegradációs aktivitása a talajban.

Érdemes azonban megjegyezni, hogy bár a gyakorlatban az elsőrendű kinetika modellje jó közelítéssel használható a szennyezőanyag sorsának becslésére, a modell kritériumai (pl. a szubsztrát koncentrációjának exponenciális csökkenése, nulla aszimptota és a koncentrációval arányos bomlási sebesség) nem feltétlenül teljesülnek a biodegradáció során a szénhidrogén-szennyezett talajokban. Éppen ezért ennek a becslési módszernek is megvannak a maga limitációi (Lee és mtsai 2007).

4.3. A mikrobiális aktivitás és sejtszámok változása a bioremediáció során

A talajrespiráció a szervesanyagok biodegradációjának következménye, így a teljes (mikro)biológiai aktivitás egyik gyakori indikátora (Lee és mtsai 2007). Az általunk összeállított talajmikrokozmosz rendszerek gázterében felhalmozódó CO₂ kumulatív mennyiségét és respirációs aktivitását (RA) a 4. ábra mutatja be.

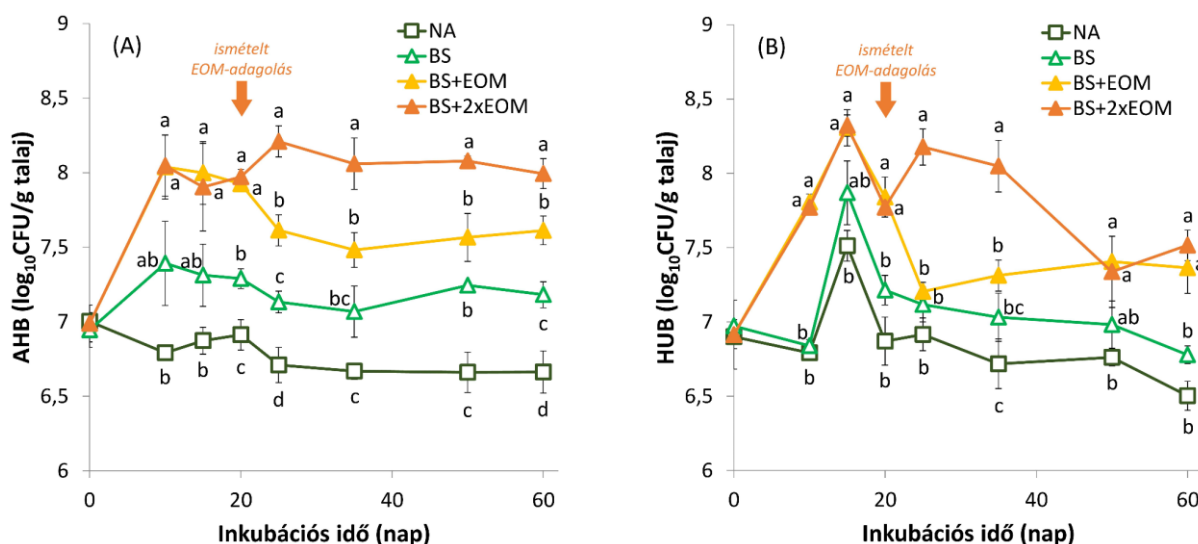


4. ábra: A különböző bioremediációs módszerekkel kezelt talajmikrokozmosz rendszerek (A) respirációs aktivitásának és (B) kumulatív CO₂-teremlésének változásai. Az eltérő betűk egy adott mintavételi napon belül szignifikáns különbségeket jelölnek a Duncan-teszt alapján (n=3; P≤0,05).

A RA (4.A ábra) és a kumulatív CO₂-termelés (4.B ábra) alapján még a NA jelű rendszerrel is megfigyelhető egy alapszintű, egyenletes talajrespiráció, vagyis a potenciálisan

biodegradációra képes mikroorganizmusok metabolikusan ténylegesen mutattak aktivitást. Ráadásul a biostimulált rendszereknél (BS, BS+EOM, BS+2×EOM) a hozzáadott tápanyagok miatt ez a mikrobiális aktivitás fokozódott, így jelentősebb CO₂ mennyiség termelődött (4.B ábra). A 4.A ábra alapján a legaktívabb respirációt a biodegradáció első periódusában a BS+EOM, illetve BS+2×EOM rendszerek mutatták (ekkor még nem különbözött a két kezelés egymástól), amelynek oka az intenzív HKO-biodegradáció mellett a szénforrásként könnyen hasznosítható EOM-komponensek is lehettek. Az EOM kezdeti serkentő hatásának lecsengésével azonban mindkét rendszer RA-ja fokozatosan csökkent, és megközelítette a BS respirációjának szintjét. A BS+2×EOM esetében a 20. napon megismételt EOM-adagolásnál látható, hogy az RA – és így feltehetően a mikrobiális aktivitás is – fokozódik, és hosszan elnyújtva csökken vissza a többi kezelés szintjére. A második EOM-kezelés azonban már nem jár akkora mértékű RA növekedéssel, mint az első. A kísérlet végére a különböző bioremediációs kezelések közötti különbségek fokozatosan kiegyenlítődtek (4.A ábra), amelyet magyarázhatnak a 4.2. fejezetben már említett, a kétlépcsős biodegradációs mintát is okozó molekuláris események (Bodor és mtsai 2021).

A 3.8. fejezetben leírt módon folyamatosan nyomon követtük az AHB és HUB telepkepző sejtszámokat is a kísérlet során (5. ábra).



5. ábra: Az (A) aerob heterotróf baktériumok és a (B) szénhidrogénbontó baktériumok telepkepző sejtszámainak változásai a különböző bioremediációs módszerekkel kezelt talajmikrokozmosz rendszerekben. Az eltérő betűk egy adott mintavételi napon belül szignifikáns különbségeket jelölnek a Duncan-teszt alapján (n=3; P≤0,05).

Az 5. ábra alapján az inkubáció időtartama alatt a biostimulációs kezelések mindegyike (BS, BS+EOM, BS+2×EOM) növelte az AHB és HUB telepkepző sejtszámokat a közel állandó értékeket mutató természetes csillapodáshoz (NA) képest. Az AHB sejtszámok (5.A ábra) a BS

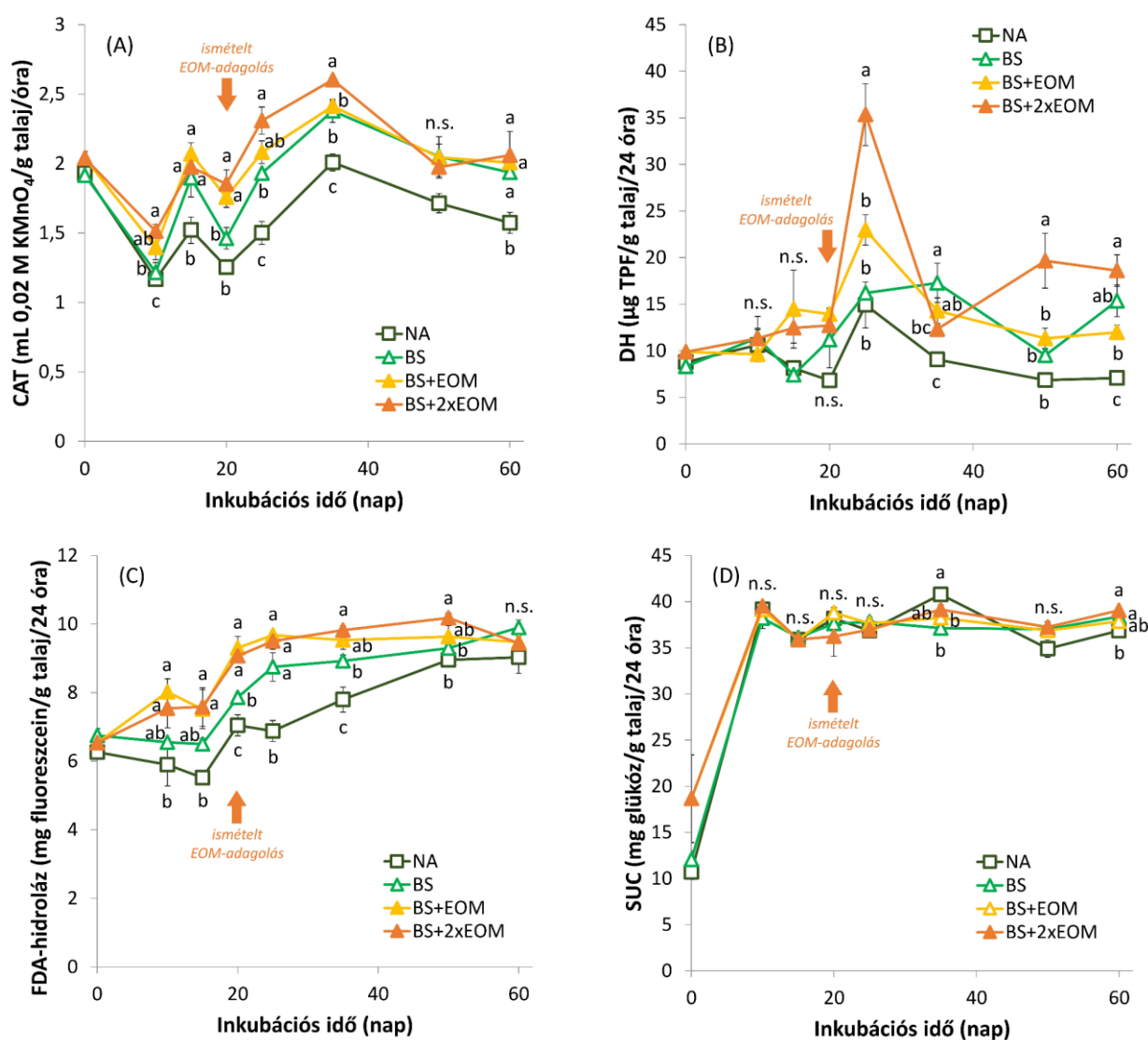
jelű talajmikrokozmoszban az enyhe, kezdeti növekedést követően szintén végig egyenletesek maradtak. A kísérlet kezdeti szakaszában az EOM hatására gyorsan emelkedtek az AHB sejtszámok, amely magyarázhatja az első lépcső intenzív HKO-biokonverzióját (2. és 3.A ábra). A biomassa mennyisége a 20. nap után enyhén csökken a BS+EOM esetében, de végül nem éri el a kiindulási értéket ($P=0,001$). Ezzel szemben az ismételt EOM-adagolás hatására a sejtszámok egyenletesen magas szinten maradnak a BS+2×EOM jelű talajmikrokozmoszban, és a végére szignifikánsan magasabbak, mint a kiindulási érték volt ($P<0,001$). Hasonló trendek figyelhetők meg a HUB telepképző sejtszámok alakulásában is (5.B ábra) azzal a különbséggel, hogy a biomassa mennyisége itt minden kezelés esetében a 15. nap környékén éri el a csúcst, majd visszacsökken a kiindulásihoz hasonló sejtszámmra. Ez alól egyedül a BS+2×EOM a kivétel, ahol a csökkenés jóval elnyújtottabb, és a kísérlet végén mért telepképző sejtszámok is szignifikánsan magasabbak, mint a kísérlet kezdetén ($P=0,017$). A sejtszámok változásai összességében azt jelzik, hogy az EOM megismételt adagolásával a mikrobiális biomasszára gyakorolt kedvező hatás fenntartható/elnyújtható, amely végső soron elősegítheti a hatékonyabb HKO-biodegradációt.

A kármentesítés során a talajenzimek aktivitásváltozásainak monitorozása a biológiai aktivitás jellemzésének gyors és költséghatékony módszere, amely fontos ökotoxikológiai információt nyújthat a szennyezett talaj mikrobiális közösségének funkcionális és strukturális változásairól, így összességében a talaj állapotának alakulásáról (Wolińska és mtsai 2016). Éppen ezért a 3.9. fejezetben leírtak alapján nyomon követtük a CAT, DH, FDA-hidroláz és SUC enzimek aktivitását a teljes kísérlet során (6. ábra), amely alapján megállapítható, hogy a telepképző sejtszámokhoz hasonlóan ezek aktivitásának legjelentősebb változásai is nagyrészt lezajlanak a 60 napos kísérlet első felében.

A talaj CAT aktivitása az aerob, metabolikusan aktív mikroorganizmusok jelenlétére utal (Stepniewska és mtsai 2009). Ezek aktivitása a 6.A ábra alapján minden biostimulált talajmikrokozmoszban (BS, BS+EOM, BS+2×EOM) növekedett a természetes csillapodást modellező rendszerhez képest (NA), a második EOM-kezelés pedig kismértékben még tovább is tudta fokozni ezt abban az időszakban, amíg a HUB telepképző sejtszámokat is (5.B ábra).

A DH a szervesanyagok lebontásában és a tápanyagkörforgásban vesz részt (Wolińska és Stepniewska 2012, Zuccarini és mtsai 2023), sőt a szénhidrogének mikrobiális degradációjában is több lépést is dehidrogenázok katalizálnak (Koshlaf és Ball 2017), így egyszerre használható a talaj állapotának és a TPH-lebontásnak az indikátoraként (Bodor és mtsai 2021, 2024). Ráadásul sok más talajenzimmel ellentétben a DH nem független az élő sejtszámtól sem (Zuccarini és mtsai 2023), éppen ezért nem meglepő, hogy a mikrobiális biomassa

menyiségének a megismételt EOM-adagolás hatására bekövetkező növekedése (5.A ábra) – azon belül is különösen a HUB telepkepző sejtszámok megemelkedése (5.B ábra) – a DH szignifikáns emelkedéséhez vezetett a BS+2×EOM rendszerben (6.B ábra). Ez a megfigyelés egybevág az ugyanezen talajmikrokozmosz esetében megfigyelt, fokozottabb EPH-biokonverzióval is (2. és 3.A ábra, 2. táblázat). A kontroll kezelések DH aktivitásai hasonló trendet mutattak, mint Bodor és munkatársainak 2021-ben közölt eredményei, a BS+2×EOM DH aktivitása pedig ebben az esetben is az ottani EOM-mel serkentett bioaugmentáció eredményeihez hasonlítható. Ez tovább erősíti a bioremediáció során ismételt EOM-adagolás költséghatékonyságával kapcsolatos felvetésünket (4.2. fejezet).



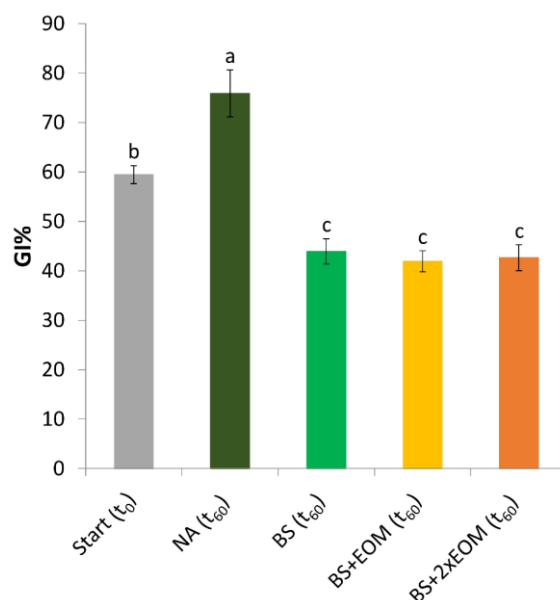
6. ábra: A különböző bioremediációs módszerekkel kezelt talajmikrokozmosz rendszerek (A) kataláz, (B) dehidrogenáz, (C) FDA-hidroláz és (D) szukráz aktivitásának változásai. Az eltérő betűk egy adott mintavételi napon belül szignifikáns különbségeket jelölnek a Duncan-teszt alapján ($n=3$; $P \leq 0,05$).

Az FDA-t számos enzim (pl. proteázok, észterázok, lipázok) képes hasítani, ezért a talaj FDA-hidroláz aktivitása szintén jó indikátora lehet a teljes mikrobiális aktivitásnak – és így a talaj általános állapotának és egészségének is (Adam és Duncan 2001, Bodor és mtsai 2024). A 6.C ábrán látható, hogy minden talajmikrokozmosz FDA-hidroláz aktivitása növekedett a kísérlet során, vagyis már a víztartalom beállítása is kedvező hatással volt a mikrobiális aktivitásra. A különböző szénhidrogén-származékok okozta szennyezéseknél (pl. kerozin, kevés aromás gyűrűvel rendelkező PAH-ok) gyakran csökkent FDA-hidroláz aktivitás mutatható ki Song és Bartha 1990, Li és mtsai 2023), így az általunk megfigyelt fokozatos emelkedéshez valószínűleg hozzájárulhatott az EPH-tartalom csökkenése is az inkubáció során (2. ábra). Az NA-hoz képest az NPK-adagolás szignifikánsan fokozta az FDA-hidroláz aktivitást, amely az EOM-kezelések mindegyikével (különösen az EOM ismételt hozzáadásával) tovább növelhető volt a legtöbb mintavételi napon – bár érdemes megjegyezni, hogy az EOM egyes komponensei szubsztrátként is szolgálhattak ehhez. A kísérlet vége felé azonban fokozatosan csökkent a különbség a különböző talajmikrokozmoszok aktivitása között, míg végül a 60. napra teljesen kiegyenlítődt. Ekkorra az egyes talajmikrokozmoszok már a respirációs aktivitásukban sem különböztek (4.A ábra).

A SUC a talajok C-körforgásának egyik fontos extracelluláris enzime, mivel a szukróz hidrolízisét katalizálja, amely során glükóz és fruktóz szabadul fel (Shen és mtsai 2019). Ezek vízzoldható és a mikroorganizmusok számára könnyen hozzáférhető tápanyagok (Xu és mtsai 2021). A 6.D ábrán látható, hogy a kiindulási értékekhez képest minden kezelés esetében hirtelen és jelentősen nőtt a talajmikrokozmoszok SUC aktivitása, amely aztán végig magas maradt a 60 napos bioremediációs kísérlet során.

4.4. A különböző kezelések hatása a talajok fitotoxicitására

A szennyezett közeg kármentesítésekor az egyik legfőbb cél a szennyezőanyag koncentrációjának csökkentése. Az olajszennyezett talajok esetében azonban előfordulhat, hogy a TPH-tartalom csökkenésével párhuzamosan nem javul, sőt akár növekedhet is a toxicitás. Így a kármentesítést követően is nélkülözhetetlen, hogy felmérjük a talaj állapotát (Jiang és mtsai 2016). A bioremediációs kezelések utánkövetéséhez azért választottuk a csírázási indexet, mert a relatív csírázási adatokat és a gyökérhosszakat is magába foglaló paraméterrel komplexebb képet kaphatunk arról, hogy a 60 napos inkubáció végére (t_{60}) hogyan változott a különböző bioremediációs módszerekkel kezelt talajok minősége a kezdeti állapothoz (t_0) képest. A 3.10. fejezet alapján elvégzett tesztek eredményeit a 8. ábra szemlélteti.



7. ábra: A repcenövények csírázási indexei (GI%) a HKO-szennyezett kompozit talajban (t_0) és a különböző bioremediációs módszerekkel kezelt talajokban (t_{60}). Az eltérő betűk szignifikáns különbségeket jelölnek a Duncan-teszt alapján ($n=6$; $P \leq 0,05$).

A repcenövény GI% értékei minden biostimulált rendszerben (BS, BS+EOM, BS+2×EOM) szignifikánsan csökkent (42-44%) a kiindulási HKO-szennyezett kompozit talaj GI% értékéhez képest (59%). Ennek oka feltehetően az lehet, hogy az előrehaladott HKO-biodegradációs folyamatok során olyan köztitermékek halmozódhattak fel, amik toxikus hatással bírnak, esetleg a mikrobiális felületaktív anyagok termelődésével mobilizálódhattak az ártalmas, korábban nem hozzáférhető HKO-komponensek (Bodor és mtsai 2021). Ezek mind gátolhatták a repcemagok csírázását és a gyökerek fejlődését. Megfigyelhető, hogy a talaj fitotoxicitása kizárólag az NA rendszerben csökkent, ugyanis egyedül itt állapítottunk meg a kiinduláshoz képest nagyobb GI% értékeket (76%) a 60. napra. A természetes csillapodással elért kismértékű EPH-csökkenés kedvezőbb körülményeket jelenthetett a csíranövények számára, mint az eredeti HKO-szennyezett kompozit talaj szennyezettsége, valószínű azonban, hogy még nem halmozódtak fel olyan mennyiségben az ártalmas vegyületek, hogy ellensúlyozzák ezt a pozitív hatást.

Ahogy az az eredményekből is látszik, elengedhetetlenül fontos a talajok kezelését követő monitoring (és ha szükséges, a célzott utókezelés is), hiszen a szénhidrogén-tartalom csökkenése nem feltétlenül jár talaj fitotoxicitásának mérséklődésével (Jiang és mtsai 2016, Bodor és mtsai 2021).

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A munkánk során HKO-szennyezett talajok *ex situ* biostimulációs kármentesítésének fokozása és a serkentő hatás fenntartása céljából Rpf-tartalmú EOM-et adagoltunk a talajmikrokozmosz rendszerekhez a kísérlet összeállításakor (0. nap), majd a HKO-biodegradáció kezdeti szakaszának végén (20. nap) is, amikor az első EOM-adagolás kezdeti hatása már lecsengett. A 60 napos inkubáció során monitoroztuk az EPH-tartalom, mikrobiális respiráció, telepkepző sejtszámok és talajenzimek aktivitásának alakulását, továbbá meghatároztuk a kezeléseket követően a talaj fitotoxicitásában bekövetkező változásokat is.

Az eredményeink alapján a HKO-szennyezett talajok kiindulási EPH-tartalma (30300 mg/kg) az egyszeri EOM-kezelés hatására (BS+EOM) 46%-kal, a 20. napon megismételt EOM-kezeléssel (BS+2×EOM) pedig 56%-kal csökkent a 60 napos kísérlet végére. Az EPH-lebontási ráta alapján szintén a BS+2×EOM esetében bizonyult a leggyorsabbnak a HKO biokonverziója a második lebontási lépcsőben (20-60. nap). A kontroll rendszerek értékeihez képest a megismételt EOM-adagolás serkentette a talajmikrokozmoszok respirációját, fokozta a CAT, DH, FDA-hidroláz és SUC talajenzimek aktivitását, valamint az AHB és HUB telepkepző sejtszámokban is szignifikáns emelkedést váltott ki. A HKO-lebontásra és mikrobiális aktivitásra gyakorolt általános pozitív hatás ellenére a kiindulási HKO-szennyezett talajhoz képest az összes biostimulációs kezelés növelte a talaj fitotoxicitását, ugyanis a kezelt talajokban tesztorganizmusként növesztett repce csírázási indexe csökkent.

Összességében elmondható, hogy a kezdeti EOM-hatás lecsengésekor megismételt EOM-adagolás hatékonyan stimulálja a HKO-szennyezett talaj mikrobiális aktivitását és így annak HKO-biodegradációja is fokozódik. Az ismételt EOM-kezeléssel kivitelezett biostimuláció hatékonysága összevethető az korábban publikált, EOM-adagolásával serkentett bioaugmentáció hatékonyságával. Ez költséghatékonyság szempontjából jelentős lehet, hiszen így akár kiválthatóvá válik a bioaugmentációhoz használt, több baktériumtörzsből álló inokulum előállításának költsége.

IRODALOMJEGYZÉK

- Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z., & Wassie, M. (2017). The role of microorganisms in bioremediation-A review. *Open Journal of Environmental Biology*, 2(1), 038-046.
- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. (2018). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment: an overview. *Microbial Action on Hydrocarbons*, 353-386.
- Abdulsalam, S., Bugaje, I. M., Adefila, S. S., & Ibrahim, S. (2011). Comparison of biostimulation and bioaugmentation for remediation of soil contaminated with spent motor oil. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 8, 187-194.
- Adam, G., & Duncan, H. (2001). Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(7-8), 943-951.
- Adeniji, A. O., Okoh, O. O., & Okoh, A. I. (2017). Analytical methods for the determination of the distribution of total petroleum hydrocarbons in the water and sediment of aquatic systems: A review. *Journal of Chemistry*, 2017(1), 5178937.
- Biswas, B., Qi, F., Biswas, J. K., Wijayawardena, A., Khan, M. A. I., & Naidu, R. (2018). The fate of chemical pollutants with soil properties and processes in the climate change paradigm—A review. *Soil Systems*, 2(3), 51.
- Bodor, A., Bounedjoum, N., Feigl, G., Duzs, Á., Laczi, K., Szilágyi, Á., ... & Perei, K. (2021). Exploitation of extracellular organic matter from *Micrococcus luteus* to enhance *ex situ* bioremediation of soils polluted with used lubricants. *Journal of Hazardous Materials*, 417, 125996.
- Bodor, A., Bounedjoum, N., Vincze, G. E., Erdeiné Kis, Á., Laczi, K., Bende, G., ... & Rákhely, G. (2020b). Challenges of unculturable bacteria: environmental perspectives. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 19, 1-22.
- Bodor, A., Feigl, G., Kolossa, B., Mészáros, E., Laczi, K., Kovács, E., ... & Rákhely, G. (2024). Soils in distress: The impacts and ecological risks of (micro) plastic pollution in the terrestrial environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 269, 115807.
- Bodor, A., Petrovszki, P., Erdeiné Kis, Á., Vincze, G. E., Laczi, K., Bounedjoum, N., ... & Perei, K. (2020a). Intensification of *ex situ* bioremediation of soils polluted with used lubricant oils: A comparison of biostimulation and bioaugmentation with a special focus on the type and size of the inoculum. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(11), 4106.
- Botas, J. A., Moreno, J., Espada, J. J., Serrano, D. P., & Dufour, J. (2017). Recycling of used lubricating oil: Evaluation of environmental and energy performance by LCA. *Resources, Conservation and Recycling*, 125, 315-323.
- Cai, J., Liu, J., Pan, A., Liu, J., Wang, Y., Liu, J., ... & Su, X. (2020). Effective decolorization of anthraquinone dye reactive blue 19 using immobilized *Bacillus* sp. JF4 isolated by resuscitation-promoting factor strategy. *Water Science and Technology*, 81(6), 1159-1169.
- Cai, J., Pan, A., Li, Y., Xiao, Y., Zhou, Y., Chen, C., ... & Su, X. (2021). A novel strategy for enhancing anaerobic biodegradation of an anthraquinone dye reactive blue 19 with resuscitation-promoting factors. *Chemosphere*, 263, 127922.
- Cordier, T., Alonso-Sáez, L., Apothéoz-Perret-Gentil, L., Aylagas, E., Bohan, D. A., Bouchez, A., ... & Lanzén, A. (2021). Ecosystems monitoring powered by environmental genomics: a review of current strategies with an implementation roadmap. *Molecular Ecology*, 30(13), 2937-2958.
- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International*, 2011(1), 941810.
- Das, S. K., & Varma, A. (2011). Role of enzymes in maintaining soil health. *Soil enzymology*, 25-42.
- Dong, K., Pan, H., Yang, D., Rao, L., Zhao, L., Wang, Y., & Liao, X. (2020). Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(1), 149-183.
- Feng, X., Wang, Q., Sun, Y., Zhang, S., & Wang, F. (2022). Microplastics change soil properties, heavy metal availability and bacterial community in a Pb-Zn-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 424, 127364.
- Graj, W., Lisiecki, P., Szulc, A., Chrzanowski, Ł., & Wojtera-Kwiczor, J. (2013). Bioaugmentation with petroleum-degrading consortia has a selective growth-promoting impact on crop plants germinated in diesel oil-contaminated soil. *Water, Air, & Soil pollution*, 224, 1-15.
- Halász, J., Hannus, I., & Kiricsi, I. (2007). Környezetvédelmi technológia, JATEPress. Szeged
- Han, Z., Lin, Q., Zhang, S., Zhou, X., Li, S., Sun, F., ... & Su, X. (2023). High PCBs mineralization capability of a resuscitated strain *Bacillus* sp. LS1 and its survival in PCB-contaminated soil. *Science of The Total Environment*, 856, 159224.

- Hatályos Jogszabályok Gyűjteménye (utoljára megtekintve: 2024. 10. 02.). 6/2009. (IV. 14.) KvVM-EüM-FVM együttes rendelet a földtani közeg és a felszín alatti víz szennyezéssel szembeni védelméhez szükséges határértékekről és a szennyezések méréséről [WWW Dokumentum]. URL. <https://uj.jogtar.hu/#doc/db/1/id/A0900006.KVV/>.
- Jiang, Y., Brassington, K. J., Prpich, G., Paton, G. I., Semple, K. T., Pollard, S. J., & Coulon, F. (2016). Insights into the biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soils by bioaugmentation and nutrient stimulation. *Chemosphere*, 161, 300-307.
- Jung, J., Philippot, L., & Park, W. (2016). Metagenomic and functional analyses of the consequences of reduction of bacterial diversity on soil functions and bioremediation in diesel-contaminated microcosms. *Scientific Reports*, 6(1), 23012.
- Kakuk, B., Kovács, K. L., Szuhaj, M., Rákhely, G., & Bagi, Z. (2017). Adaptation of continuous biogas reactors operating under wet fermentation conditions to dry conditions with corn stover as substrate. *Anaerobe*, 46, 78-85.
- Khan, M. A. I., Biswas, B., Smith, E., Naidu, R., & Megharaj, M. (2018). Toxicity assessment of fresh and weathered petroleum hydrocarbons in contaminated soil-a review. *Chemosphere*, 212, 755-767.
- Koshlaf, E., & Ball, A. S. (2017). Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. *AIMS Microbiology*, 3(1), 25.
- Kuppusamy, S., Palanisami, T., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2016). In-situ remediation approaches for the management of contaminated sites: a comprehensive overview. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 236*, 1-115.
- Kuppusamy, S., Maddela, N. R., Megharaj, M., & Venkateswarlu, K. (2020). An overview of total petroleum hydrocarbons. *Total Petroleum Hydrocarbons: Environmental Fate, Toxicity, and Remediation*, 1-27.
- Laczi, K., Erdeiné Kis, Á., Szilágyi, Á., Bounedjoum, N., Bodor, A., Vincze, G. E., ... & Perei, K. (2020). New frontiers of anaerobic hydrocarbon biodegradation in the multi-omics era. *Frontiers in Microbiology*, 11, 590049.
- Laczi, K., Kis, Á., Horváth, B., Maróti, G., Hegedüs, B., Perei, K., & Rákhely, G. (2015). Metabolic responses of *Rhodococcus erythropolis* PR4 grown on diesel oil and various hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 9745-9759.
- Ławniczak, Ł., Woźniak-Karczewska, M., Loibner, A. P., Heipieper, H. J., & Chrzanowski, Ł. (2020). Microbial degradation of hydrocarbons—basic principles for bioremediation: a review. *Molecules*, 25(4), 856.
- Lee, S. H., Ji, W., Kang, D. M., & Kim, M. S. (2018). Effect of soil water content on heavy mineral oil biodegradation in soil. *Journal of Soils and Sediments*, 18, 983-991.
- Lee, S. H., Lee, S., Kim, D. Y., & Kim, J. G. (2007). Degradation characteristics of waste lubricants under different nutrient conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 143(1-2), 65-72.
- Li, X., Ren, Q., Sun, Z., Wu, Y., & Pan, H. (2024). Resuscitation Promotion Factor: A Pronounced Bacterial Cytokine in Propelling Bacterial Resuscitation. *Microorganisms*, 12(8), 1528.
- Li, Y., Wang, Z., Tian, H., Megharaj, M., Jia, H., & He, W. (2023). Using soil enzyme Vmax as an indicator to evaluate the ecotoxicity of lower-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in soil: Evidence from fluorescein diacetate hydrolase kinetics. *Science of The Total Environment*, 874, 162521.
- Lim, M. W., Von Lau, E., & Poh, P. E. (2016). A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil—present works and future directions. *Marine Pollution Bulletin*, 109(1), 14-45.
- Lin, Q., Zhou, X., Zhang, S., Gao, J., Xie, M., Tao, L., ... & Su, X. (2022). Oxidative dehalogenation and mineralization of polychlorinated biphenyls by a resuscitated strain *Streptococcus* sp. SPC0. *Environmental Research*, 207, 112648.
- Lin, T. C., Pan, P. T., & Cheng, S. S. (2010). Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1-3), 27-34.
- Luther, R. (2017). Lubricants in the environment. *Lubricants and Lubrication*, 153-236.
- Maletić, S., Dalmacija, B., & Rončević, S. (2013). Petroleum hydrocarbon biodegradability in soil—implications for bioremediation. *Hydrocarbon*, 16, 43-64.
- Mang, T., & Gosalia, A. (2017). Lubricants and their market. *Lubricants and Lubrication*, 1-10.
- Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., & Naidu, R. (2011). Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective. *Environment International*, 37(8), 1362-1375.
- Mészáros, E., Bodor, A., Szierer, Á., Kovács, E., Perei, K., Tölgyesi, C., ... & Feigl, G. (2022). Indirect effects of COVID-19 on the environment: How plastic contamination from disposable surgical masks affect early development of plants. *Journal of Hazardous Materials*, 436, 129255.
- Minami, I. (2017). Molecular science of lubricant additives. *Applied Sciences*, 7(5), 445.
- Mishra, M., Singh, S. K., & Kumar, A. (2021). Environmental factors affecting the bioremediation potential of microbes. In *Microbe Mediated Remediation of Environmental Contaminants* (pp. 47-58). Woodhead Publishing.

- Montagnolli, R. N., Lopes, P. R. M., & Bidoia, E. D. (2015). Screening the toxicity and biodegradability of petroleum hydrocarbons by a rapid colorimetric method. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 68, 342-353.
- Nowak, P., Kucharska, K., & Kamiński, M. (2019). Ecological and health effects of lubricant oils emitted into the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(16), 3002.
- Ossai, I. C., Ahmed, A., Hassan, A., & Hamid, F. S. (2020). Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. *Environmental Technology & Innovation*, 17, 100526.
- Ossai, I. C., Hamid, F. S., Aboudi-Mana, S. C., & Hassan, A. (2024). Synergistic Actions of Biostimulation and Bioaugmentation in Microbial Biodegradation of Total Petroleum Hydrocarbons (TPH) Using Keratinaceous Materials. *Water, Air, & Soil Pollution*, 235(8), 541.
- Pacwa-Płociniczak, M., Biniecka, P., Bondarczuk, K., & Piotrowska-Seget, Z. (2020). Metagenomic functional profiling reveals differences in bacterial composition and function during bioaugmentation of aged petroleum-contaminated soil. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2106.
- Paniagua-Michel, J., & Fathepure, B. Z. (2018). Microbial consortia and biodegradation of petroleum hydrocarbons in marine environments. *Microbial Action on Hydrocarbons*, 1-20.
- Pinheiro, C. T., Ascensão, V. R., Cardoso, C. M., Quina, M. J., & Gando-Ferreira, L. M. (2017). An overview of waste lubricant oil management system: Physicochemical characterization contribution for its improvement. *Journal of Cleaner Production*, 150, 301-308.
- Pinheiro, C. T., Rendall, R., Quina, M. J., Reis, M. S., & Gando-Ferreira, L. M. (2017). Assessment and prediction of lubricant oil properties using infrared spectroscopy and advanced predictive analytics. *Energy & Fuels*, 31(1), 179-187.
- Pinheiro, C. T., Quina, M. J., & Gando-Ferreira, L. M. (2021). Management of waste lubricant oil in Europe: A circular economy approach. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 51(18), 2015-2050.
- Prince, R. C., Amande, T. J., & McGenity, T. J. (2019). Prokaryotic hydrocarbon degraders. *Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-degrading Microbes*, 1-39.
- Ramamurthy, T., Ghosh, A., Pazhani, G. P., & Shinoda, S. (2014). Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. *Frontiers in Public Health*, 2, 103.
- Roy, A., Dutta, A., Pal, S., Gupta, A., Sarkar, J., Chatterjee, A., ... & Kazy, S. K. (2018). Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. *Bioresource Technology*, 253, 22-32.
- Sales da Silva, I. G., Gomes de Almeida, F. C., Padilha da Rocha e Silva, N. M., Casazza, A. A., Converti, A., & Asfora Sarubbo, L. (2020). Soil bioremediation: overview of technologies and trends. *Energies* 13, 4664.
- Shen, F., Wu, J., Fan, H., Liu, W., Guo, X., Duan, H., ... & Wei, X. (2019). Soil N/P and C/P ratio regulate the responses of soil microbial community composition and enzyme activities in a long-term nitrogen loaded Chinese fir forest. *Plant and Soil*, 436, 91-107.
- Shi, J., Zhou, X., Zhang, S., Sun, F., Shen, C., & Su, X. (2024). Unveiling the distribution characteristics of rpf-like genes and indigenous resuscitation promoting factor production in PCB-contaminated soils. *Journal of Environmental Management*, 357, 120803.
- Song, H. G., & Bartha, R. (1990). Effects of jet fuel spills on the microbial community of soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(3), 646-651.
- Stepniewska, Z., Wolińska, A., & Ziomek, J. (2009). Response of soil catalase activity to chromium contamination. *Journal of Environmental Sciences*, 21(8), 1142-1147.
- Su, X., Chen, X., Hu, J., Shen, C., & Ding, L. (2013). Exploring the potential environmental functions of viable but non-culturable bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 2213-2218.
- Su, X., Liu, Y. D., Hashmi, M. Z., Ding, L. X., & Shen, C. F. (2015b). Culture-dependent and culture-independent characterization of potentially functional biphenyl-degrading bacterial community in response to extracellular organic matter from *Micrococcus luteus*. *Microbial Biotechnology*, 8(3), 569-578.
- Su, X., Li, S., Cai, J., Xiao, Y., Tao, L., Hashmi, M. Z., ... & Sun, F. (2019a). Aerobic degradation of 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl by a resuscitated strain *Castellaniella* sp. SPC4: kinetics model and pathway for biodegradation. *Science of the Total Environment*, 688, 917-925.
- Su, X., Li, S., Xie, M., Tao, L., Zhou, Y., Xiao, Y., ... & Sun, F. (2021). Enhancement of polychlorinated biphenyl biodegradation by resuscitation promoting factor (Rpf) and Rpf-responsive bacterial community. *Chemosphere*, 263, 128283.
- Su, X., Wang, Y., Xue, B., Hashmi, M. Z., Lin, H., Chen, J., ... & Sun, F. (2019b). Impact of resuscitation promoting factor (Rpf) in membrane bioreactor treating high-saline phenolic wastewater: performance robustness and Rpf-responsive bacterial populations. *Chemical Engineering Journal*, 357, 715-723.
- Su, X., Sun, F., Wang, Y., Hashmi, M. Z., Guo, L., Ding, L., & Shen, C. (2015a). Identification, characterization and molecular analysis of the viable but nonculturable *Rhodococcus biphenylivorans*. *Scientific Reports*, 5(1), 18590.
- Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223, 277-286.

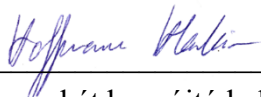
- Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2017). A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 120, 71-83.
- Wang, S. Y., Kuo, Y. C., Hong, A., Chang, Y. M., & Kao, C. M. (2016). Bioremediation of diesel and lubricant oil-contaminated soils using enhanced landfarming system. *Chemosphere*, 164, 558-567.
- Wolińska, A., Kuźniar, A., Szafrank-Nakonieczna, A., Jastrzębska, N., Roguska, E., & Stępniewska, Z. (2016). Biological activity of autochthonic bacterial community in oil-contaminated soil. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227, 1-12.
- Wolińska, A., & Stępniewska, Z. (2012). Dehydrogenase activity in the soil environment. *Dehydrogenases*, 10, 183-210.
- Xie, M., Li, Y., Xu, L., Zhang, S., Ye, H., Sun, F., ... & Su, X. (2021). Optimization of bacterial cytokine protein production by response surface methodology for environmental bioremediation. *RSC advances*, 11(57), 36105-36115.
- Xu, Z., Yang, Z., Zhu, T., Shu, W., & Geng, L. (2021). Ecological improvement of antimony and cadmium contaminated soil by earthworm *Eisenia fetida*: soil enzyme and microorganism diversity. *Chemosphere*, 273, 129496.
- Yu, C., Liu, Y., Jia, Y., Su, X., Lu, L., Ding, L., & Shen, C. (2020). Extracellular organic matter from *Micrococcus luteus* containing resuscitation-promoting factor in sequencing batch reactor for effective nutrient and phenol removal. *Science of The Total Environment*, 727, 138627.
- Zawierucha, I., & Malina, G. (2011). Bioremediation of contaminated soils: effects of bioaugmentation and biostimulation on enhancing biodegradation of oil hydrocarbons. *Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol*, 187-201.
- Zhang, Q., Wang, Y., Jamal, M., Wang, R., He, Q., Sun, F., ... & Su, X. (2023). Anaerobic biodegradation of anthraquinone dye reactive black 19 by a resuscitated strain *Bacillus* sp. JF4: Performance and pathway. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(5), 111144.
- Zhao, X., Zhong, J., Wei, C., Lin, C. W., & Ding, T. (2017). Current perspectives on viable but non-culturable state in foodborne pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 8, 580.
- Zuccarini, P., Sardans, J., Asensio, L., & Peñuelas, J. (2023). Altered activities of extracellular soil enzymes by the interacting global environmental changes. *Global Change Biology*, 29(8), 2067-2091.

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott Hoffmann Klaudia nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott „Egy használt kenőolajjal szennyezett talaj ex situ biostimulációs kármentesítésének fokozása a *Micrococcus luteus* extracelluláris szervesanyagának ismételt adagolásával” című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

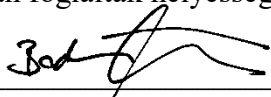
Részfeladat	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán [#] jellemezve)
Talajmintavétel, -feldolgozás, talajvizsgálati módszerek ^{m1}	3
Talaj szénhidrogén-tartalmának meghatározása	4
Respirációs vizsgálatok	5
Telepképző sejtszámok meghatározása ^{m1}	3
Talajenzimek aktivitásának meghatározása ^{m1}	3
Fitotoxikológiai tesztek	5
Az adatok statisztikai feldolgozása	4

Kelt: Szeged, november 8.



Pályamunkát benyújtó hallgató
(Hoffmann Klaudia) aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Témavezető (Dr. Bodor Attila, SZTE TTIK
Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék)
aláírása

#Magyarázat:

A munkafolyamatokban való részvétel mértékét ötfokozatú skálán kérjük értékelni. A skála egyes értékeinek jelentése:

5 – Felkészítés után a feladat teljes egészét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

4 – Felkészítés után a feladat több mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

3 – Felkészítés után a részfeladat felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

2 – Felkészítés után a részfeladat kevesebb mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

1 – A részfeladatot folyamatos segítséggel végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

^{m1}A szerző hallgató minden megjelölt részfeladatban aktívan részt vett. Azonban egy-egy mintavétel és a hozzátartozó vizsgálatok olyan mértékű leterheltséget jelentenek, amelyet segítség nélkül nem lehet egyszerre, a minél pontosabb eredményt megkövetelő gyorsasággal elvégezni. Éppen ezért a mintavételi napokon ezeket a méréseket csapatban végeztük, és a szerző hallgató vetésforgó-szerűen vett részt bennük. Ilyenkor az adott részfeladatot a felkészítés után minden esetben önállóan végezte.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom a néhai Dr. Rákhely Gábornak, aki lehetővé tette, hogy a kísérletes munkámat a Biotechnológiai Tanszéken végezhessem el.

Köszönöm a témavezetőmnek, Dr. Bodor Attilának. Szakmai tudása és iránymutatása nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el.

Hálás vagyok Mészáros Enikőnek, Papp Saroltának és Dr. Feigl Gábornak, akik rengeteget segítettek abban, hogy a mintavételi napokon minden gördülékenyen mehessen.

Köszönettel tartozom Dr. Perei Katalinnak a dolgozat megírása során nyújtott észrevételeiért és tanácsaiért.

Végezetül szeretném megköszönni a Magyar Államvasutak munkatársainak, Gyarmati Gyula telephelyvezetőnek (MÁV-START Zrt. Járműbiztosítási Igazgatóság Szeged, Szeged-Rendező pályaudvar), Tóth Péter környezetvédelmi szakértőnek (MÁV Szolgáltató Központ Zrt., Szeged) és Redenczki Fanni környezetvédelmi szakelőadónak (MÁV Szolgáltató Központ Zrt., Szeged), hogy a kísérletek során felhasznált talajmintát biztosították.