

Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Környezet és Tájgazdálkodási Intézet
Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék

BAKTÉRIUM TÖRZSGYŰJTEMÉNY PAH BONTÓ KÉPESSÉGÉNEK VIZSGÁLATA ÉS FOKOZÁSA UV MUTAGENEZISSEL

Készítette: Kozár Szabolcs
Évfolyam: Környezetmérnök Msc I. évf.

Belső konzulens: Dr. Szabó István
Beosztása: Egyetemi adjunktus

Gödöllő
2014

Tartalom

1	Bevezetés	3
1.1	Célkitűzések	4
2	Irodalmi áttekintés	5
2.1	Szénhidrogének, mint szennyezőanyagok.....	5
2.2	TPH (összes alifás szénhidrogén).....	7
2.3	Aromás szénhidrogének	7
2.3.1	BTEX vegyületek (<i>benzol- és alkilbenzolok</i>).....	7
2.3.2	PAH vegyületek - policiklikus aromás szénhidrogének	9
2.4	Kármentesítési technológiák	10
2.4.1	Biodegradációs eljárások	11
2.5	Szénhidrogének biológiai lebonthatósága	13
2.5.1	Mineralizáció	14
2.5.2	Részleges biodegradáció	14
2.5.3	Alifás szénhidrogének és PAH vegyületek biodegradációja	15
2.6	Baktériumtörzsek faj szintű identifikációja.....	16
2.7	UV mutáció	17
3	Anyag és Módszer	18
3.1	A kísérleti rendszerekben alkalmazott mikroszervezetek:	19
3.2	Gravimetria.....	20
3.3	Korongdiffúziós kísérlet (Törzsgyűjtemény szelektálása)	21
3.4	Együtttes törzsszaporítási vizsgálatok	23
3.4.1	PAH bontási kísérlet folyékony közegben.....	23
3.5	PAH bontás igazolása szennyezett területről származó talajmintán (OxiTop talajrespirációs vizsgálat)	24
3.6	Mutáció Indukálása UV sugárzással	25
3.6.1	Sejtnövekedés monitorozása	26
3.6.2	Rezazurin színreakció	27
3.7	PAH bontási kísérlet folyékony közegben (UV besugárzást követően)	28
3.8	Bontási kísérlet: Gravimetria (UV besugárzást követően).....	28
4	Eredmények és értékelések.....	29
4.1	A gravimetria, a passzálás és a korongdiffúziós vizsgálat eredményei	29
4.2	Együttsszaporítási vizsgálatok	30
4.3	PAH bontási kísérlet eredményei	31
4.3.1	PAH bontás törzskeverékkel.....	31
4.3.2	PAH bontás individuális törzsekkel.....	32
4.4	Az OxiTop talajrespirációs vizsgálat eredményei.....	33
4.5	A Sejtnövekedés monitorozásának eredményei	35
4.6	Rezazurin színreakció eredményei	36
4.7	PAH bontási kísérlet folyékony közegben (UV besugárzást követően)	37
4.8	Bontási kísérlet: Gravimetria (UV besugárzást követően).....	38
5	Következtetések és Javaslatok	39
6	Összefoglalás	42
7	Köszönetnyilvánítás.....	43
8	Irodalomjegyzék	44
9	Mellékletek	47

1 Bevezetés

Napjainkban, a legnagyobb mennyiségben és legsokoldalúbban felhasznált fosszilis energiahordozók a szénhidrogének, illetve a kőolaj és származékai. Leggyakrabban üzemanyagként, szerves olajok és műanyagok alapanyagaként hasznosítják, de összetevőit nagy mennyiségben alkalmazzák oldószerként, peszticidek előállítására, illetve a gyógyszergyártás során is. Kőolajszármazékok feldolgozása, szállítása, tárolása, és használata során bekövetkező hibák, emberi mulasztások, haváriák révén az általuk okozott szennyezések megjelenésével mindenhol számolni kell. Ennek következtében elengedhetetlen az ilyen jellegű, szennyezett területek minél teljesebb körű kármentesítése, a szennyeződés kockázatának megszüntetése.

A kőolajszármazékok sokféle, egymástól különböző szénhidrogén vegyületből épülnek fel (főként szénhidrogének, valamint ezek oxigén-, kén-, halogén és nitrogéntartalmú származékai), melyek némelyike karcinogén, teratogén, illetve mutagén hatású lehet (egészségkockázat). Az ilyen jellegű vegyületek lebomlása természetes körülmények között, viszonylag lassan megy végbe. Kőolajszármazékok környezeti kockázatát ezen felül fokozza azok kémiai tulajdonságai, ugyanis mind a vizet, mind pedig a levegőt kiszorítják a talaj kapillárisaiból, ezzel, valamint egyéb toxikológiai tulajdonságaikkal, a talajlakó (főként aerob) mikroorganizmusok (és egyéb élőlények) élettani folyamatait is gátolják. Ezáltal megváltoztathatják a természetes talajközösségek biológiai összetételét, befolyásolják annak diverzitását.

Az ilyen szennyezések felszámolására, az egyik lehetséges és leginkább természet közeli módszer a szennyezett közegek biológiai tisztítása (bioremediáció). Az Amerikai Környezetvédelmi Hivatal (EPA - Environmental Protection Agency) minden olyan esetben, amelyben csak lehetséges, a biológiai módszerek alkalmazását részesíti előnyben az egyéb eljárásokkal szemben. Szakmai gyakorlatom során – melyet egy gödöllői székhelyű környezetvédelmi vállalkozásnál, valamint a Szent István Egyetem Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszékén töltöttem – lehetőségem nyílt bekapcsolódni a kőolajszármazékokon belül a poliaromás szénhidrogének (PAH-ok) biológiai lebonthatóságának vizsgálatával foglalkozó kísérletsorozatba. Ennek során betekintést nyerhettem a biodegradációs eljárások gyakorlati alkalmazásába, mind terepi, mind pedig laboratóriumi körülmények között. Ez a kísérletsorozat determinálta dolgozatom alábbi fejezetében lévő célkitűzéseimet.

1.1 Célkitűzések

Munkám célja olyan mikroszervezetek keresése volt, melyek okszerűen alkalmazhatóak poliaromás szénhidrogének (PAH vegyületek) biológiai lebontására. Ennek érdekében olyan törzsgyűjteményből származó mikroszervezetekkel végeztem bontási kísérleteket (individuálisan), amelyeket korábban szénhidrogénnel (TPH, BTEX, PAH) szennyezett területekről izoláltak. Dolgozatom további célkitűzése volt, a vizsgált mikroszervezetekből olyan törzspárok kialakítása (laboratóriumi kísérletekkel alátámasztva), melyek hatékonyan képesek poliaromás szénhidrogének degradálására.

2 Irodalmi áttekintés

A hazai jogalkotásban először a környezetvédelemmel az 1995. évi LVIII. törvény foglalkozott, mely a környezet védelmének általános szabályait, az alapvető fogalmakat, a környezeti elemek, és épített környezet védelmének alapelveit határozta meg. A környezetvédelmi szempontból kockázatosnak minősített elemek, vegyületek listáját (így a szénhidrogénekét is) a jelenleg hatályos, a földtani közeg és felszín alatti víz szennyezéssel szembeni védelméhez szükséges határértékekről, és szennyezések méréséről szóló 6/2009 (IV.14.) KvVm-EüM-FVM együttes rendelet tartalmazza. A rendelet 1. számú melléklete a földtani közegre, a 2. számú melléklete a felszín alatti vízre vonatkozóan adja meg az egyes anyagcsoportok, illetve anyagok (B) szennyezettségi határértékeit. A földtani közeg és felszín alatti víz vonatkozásában az egyes határértékek definícióját, a 219/2004 (VII.21.) Kormány rendelet határozza meg, mely szerint a (B) szennyezettségi határérték olyan, jogszabályban meghatározott szennyezőanyag koncentráció, melynek elérésekor a felszín alatti víz, illetve a földtani közeg szennyezettnek minősül.

Dolgozatom irodalmi áttekintésében bemutatásra kerülnek az egyes szénhidrogén szennyező anyagok, ezen belül is főként a célzott policiklikus aromás szénhidrogének (PAH-ok), melyeknek biológiai úton történő lebonthatóságát vizsgáltam.

2.1 Szénhidrogének, mint szennyezőanyagok

A kőolaj szerves eredetű ásvány, amely a ma elfogadott elmélet szerint tengeri élőlények maradványaiból keletkezett. Az elpusztult élőlények felhalmozódtak az üledékes kőzetekben, ahol oxigéntől elzárt közegben a szerves alkotórészeik bomlást szenvedtek (Furka, 1998). Kémiaiilag a nyersolaj különböző szerves vegyületek elegye, amely több ezer telített (egyszeres-), illetve telítetlen (többszörös kovalens kötésekkel rendelkező) szénhidrogén komponenseket tartalmaz. Ezen vegyületek összetétele tág határok között mozog: 81-87% szén, 10-14% hidrogén, 0-7% oxigén, 0-7% kén, 0-2% nitrogén. A kőolajat alkotó szénhidrogének lehetnek különböző szerkezetű, és molekulatömegű nyílt szénláncú (alifás), ezen belül egyenes szénláncú, normál (n-) paraffinok, elágazó szénláncú izo (i-) paraffinok, illetve gyűrűs szénláncú (aliciklikus), ciklo(c-) paraffinok. Valamint vannak közöttük kondenzált kovalens kötésekkel álló gyűrűt tartalmazó (aromás), illetve több aromás gyűrű kapcsolatából létrejövő poliaromás szerkezetű molekulák. A kőolajok összetételük, valamint a bennük legnagyobb mennyiségben előforduló szénhidrogén típusok alapján három csoportra oszthatóak, úgymint paraffin bázisú (főleg nyílt láncú, alifás szénhidrogének alkotják), naftén bázisú (főként aromás, illetve poliaromás szénhidrogéneket tartalmazó), valamint

átmeneti bázisúak (Bruckner, 1952; Furka, 1998; Breuer, 2003). A kőolaj feldolgozása (finomítása) desztilláló berendezésben történik (kolonna), ezekben a rendszerekben frakcionált desztilláció segítségével, a forráspont különbséget kihasználva választják szét az elegyet. Folyamat eredményeként nyerik a nyersbenzint (C_4 - C_{10}), a kerozint (C_9 - C_{16}), a gázolajat (C_{15} - C_{25}), valamint további desztillálással nehéz fűtőolajat, nyers kenőolajokat, és szilárd maradékként a pakurát és a bitument (Kovács-Halmos, 1976; Furka, 1998).

A szénatomszám általában információt ad a szénhidrogén vegyületek tulajdonságairól. Normál viszonyok között a C_1 - C_4 atomszámig gázok, C_5 - C_{17} folyadékok, az e felettiak szilárdak. Ennek megfelelően a forráspont, az olvadáspont, valamint a sűrűség is növekszik a szénatom szám növekedésével, valamint meghatározzák egyéb tulajdonságaikat is, úgy mint:

- Tenzió (gőznyomás): Egyes szénhidrogének, benzin, kerozin szabad levegőn könnyen párolognak, dízel olaj, valamint könnyű fűtőolajok lassabban, ezzel szemben magas forráspontú anyagok szinte minimálisan.

- Viskozitás: Forráspont függvényében változó érték. Magas forráspontú vegyületek viszkozitása nagy, lassabban terjednek, mozognak, mint az alacsony forráspontúak. Hőmérséklet növekedésével csökken a viszkozitás.

- Vízoldhatóság: A különböző eredetű kőolajok eltérő kémiai karakterükből adódóan más és más mértékben oldódnak vízben. A szénhidrogének közül a paraffinok oldódnak legkevésbé, míg az aromás vegyületeket tartalmazók leginkább (Barótfi, 2000).

Szénhidrogének, mint szennyezőanyagok a földtani közegbe, valamint a felszín alatti vizekbe kőolaj származékok és a fenti termékek formájában juthatnak mesterséges úton. Fenti tulajdonságaik meghatározzák a környezetben való viselkedésüket. Ezeken felül számos más tényezővel kell számolni, amennyiben szénhidrogének bekerülnek a földtani közegbe, illetve felszín alatti vizekbe.

- Az illékony komponensek a levegő oxigénjével elegyedve tűz- és robbanásveszélyt eredményezhetnek.
- Bőrön, nyálkahártyán, tüdőn keresztül is felszívódhatnak, irritáló, toxikus hatásúak lehetnek
- Bizonyos (alifás, BTEX, PAH) vegyületek mutagén (genetikai károsodást), teratogén (fejlődési rendellenességet), illetve karcinogén (daganatképző) hatásúak lehetnek.
- Apoláros jellegüknél fogva kiszorítják a vizet, levegőt a talaj kapillárisaiból, így a biodegradációs öntisztulási folyamatokat gátolják (Szoboszlai - Kriszt, 2005).

A következőkben az egyes szénhidrogén típusokat, úgymint alifás (nyílt láncú), valamint aromás, illetve poliaromás vegyületek tulajdonságait mutatom be részletesen. A szennyezőanyagok

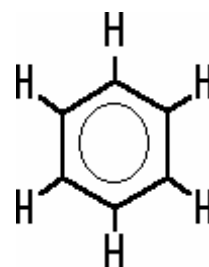
bemutatásában a kémiai szerkezetet szem előtt tartó, a felszín alatti közegekre vonatkozó csoportosítást követem az említett 6/2009. együttes rendeletnek megfelelően. Ez alapján megkülönböztetünk alifás (nyílt láncú), BTEX (benzol és alkilbenzolok), valamint policiklikus aromás szénhidrogén (PAH) vegyületeket.

2.2 TPH (összes alifás szénhidrogén)

A nemzetközi környezetvédelemben a minden olyan kőolaj eredetű szénhidrogén vegyület, amely C_5 - C_{40} atomszámban kimutatható TPH (Total Petrol Hydrocarbon) nevezéssel illet. Ezzel szemben a hazai jogszabályokban csak az olyan alifás szénhidrogének tartoznak ebbe a csoportba, amelyek szénatomszáma C_5 - C_{40} terjed. Ezek a vegyületek kőolajokban, illetve kőolajszármazékokban megtalálhatóak. Gyakorlatilag bárhol a környezeti elemekbe kerülhetnek ahol olajkitermeléssel, -szállítással, -feldolgozással, -felhasználással foglalkoznak. Minden alifás szénhidrogént a TPH vegyületek közé sorolunk, függetlenül attól, hogy azok telítettek, telítetlenek, illetve ezen belül normál, elágazást tartalmazó és/vagy gyűrűs szénláncúak. A TPH vegyületeken belül megkülönböztetünk VPH (Volatile Petrol Hydrocarbons) vegyületeket, amelyek C_5 - $C_{10(12)}$ számúak (nagy arányban a benzinben, kerozinban, gázolinban) találhatóak, valamint EPH (Extractable Petrol Hydrocarbons), amelyek nem, vagy kevésbé illékonyak (jellemzően gázolajok, fűtőolajok kenőolajok alkotóelemei) (Szoboszlai-Kriszt, 2005).

2.3 Aromás szénhidrogének

Az „aromás” elnevezés régi keletű, azon szénvegyületek eredetére utal, melyek kellemes illatú növényi aromájú termékekből nyerhetők (Bruckner, 1955). Lehetnek mono-, illetve poliaromás szerkezetűek, utóbbiak esetében több, delokalizált elektron szextettet tartalmazó gyűrű kapcsolódik össze. Ezeket a vegyületeket tulajdonképpen a benzol, mint a legegyszerűbb aromás szénhidrogén származékainak is tekinthetjük (Kovács-Halmos, 1976; Breuer, 2003).



1. ábra A benzol térbeli szerkezete

2.3.1 BTEX vegyületek (benzol- és alkilbenzolok)

Ide tartoznak azok az illékony monoaromás vegyületek, melyek közül a legjelentősebbek a csoport névadói (benzol, toluol, etil-benzol, xilol). A csoportba egyedei a benzol mellett tehát azok az alkil-benzolok, melyek esetében az aromás gyűrű hidrogén atomját egy, vagy több alkil csoport (C_nH_{2n+1}) helyettesíti. Felhasználják őket oldószerként (olajok, festékek, gyanták, lakkok), valamint gyógyszer előállításában is.

Benzol

Szintelen, jellegzetes szagú folyadék, mely vízben kevésbé (1,8 g/l) oldódik, azonban a legtöbb szerves oldószerrel korlátlanul elegyedik. Olvadáspontja 5,5°C, forráspontja 80,2°C. Szerkezetét tekintve hat szénatom szerkezetű gyűrűt alkot. A vegyületet alkotó szénatomok síkban, egy szabályos hatszög csúcsain helyezkednek el. A szénatomokhoz kapcsolódó hidrogének is ugyanebben a síkban találhatóak, valamint azok elrendezése is szabályos hatszög alakzatot mutat (1. ábra). Környezeti, valamint humán-egészségügyi szempontból kiemelkedő a benzol szerepe, ugyanis ez emberben bizonyítottan rákkeltő hatású (WHO, IARC 1999). A benzolt leginkább az ólommentes benzin adalékanyagaként használják 1 térfogatszázalékban. Megemlítendő, hogy 1 liter benzinben lévő benzol mennyiséggel kb. 8 millió liter vizet elszennyezni, hogy annak „B” szennyezettségi határértékét elérje (Szoboszlai-Kriszt, 2005; Berecz, 1991; [http1](#)).

Toluol

Szintelen, kormozó lánggal égő, aromás szagú vegyület. Olvadáspontja -97,7°C, forráspontja 110,8°C. Kémiai szerkezete szerint egy benzol gyűrűből, és egy ahhoz kapcsolódó metil-csoportból (-CH₃) áll. Megtalálható kőszénkátrányban, de elsősorban benzinreformálásnál állítják elő. Vízben kevésbé, (0,52 g/l) oldódik, szerves oldószerekben azonban oldódása jó (Furka, 1998).

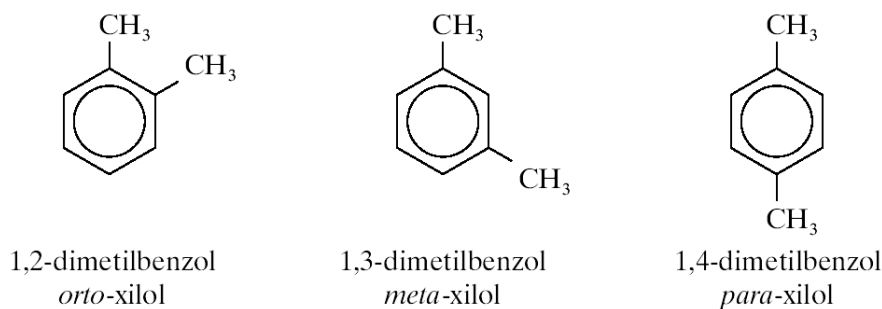
Etil-benzol

Szintelen, benzolra emlékeztető szagú folyadék. Olvadáspontja -92,8°C, forráspontja 188,5°C, vízben kevésbé oldódik (<1 g/l). Kémiai szerkezetét tekintve benzolgyűrűből, és az ahhoz kapcsolódó etil-csoportból (CH₃-CH₂-) áll. A sztirol gyártásának alapanyaga, mely során az alapmolekulát dehidrogénezik (hidrogént vonnak el). A sztirolt az iparban nagy mennyiségben alkalmazzák kiindulási anyagként polisztirol előállítására. Emellett az etil-benzol köztes termék számos más szerves vegyület előállításánál (Furka, 1998).

Xilolok

Szintelen, aromás szagú folyékony, kormozó lánggal égő vegyületek. Olvadáspontjaik -29°C-(-13°C) között, míg forráspontjai 135,5-145,9°C között mozognak. Kis részük kőolajkátrányból, jelentős hányaduk benzinformálásból származik. Nagyon jól alkalmazhatóak szerves oldószerként. Kémiai szerkezetüket tekintve dimetil-benzolok (benzolgyűrű, és két hozzá kapcsolt metil-csoport). A metil-csoportok elhelyezkedése szerint beszélhetünk meta-, orto-, és

para-xilolról. Az m-xilol felhasználása a legcsekélyebb, míg az o-, és p-xilolt a műanyagipari alapanyagként használják (Furka,1998).



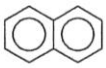
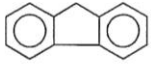
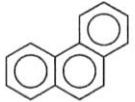
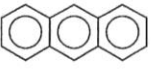
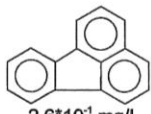
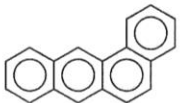
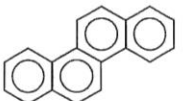
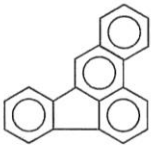
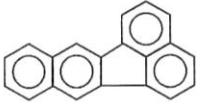
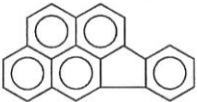
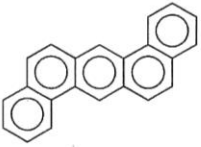
2. ábra A xilolok térbeli szerkezete

2.3.2 PAH vegyületek - policiklikus aromás szénhidrogének

A csoport neve policiklikus szénhidrogének (poliaromás szénhidrogének), az angol rövidítéséből (polycyclic aromatic hydrocarbons) származik. Közel 200 féle anyag tartozik ebbe a csoportba. Kondenzált aromás vegyületek, kettő, vagy több benzolgyűrű kapcsolódásából épülnek fel és a két gyűrűs a naftalinok (naftalin, 1-metil naftalin, 2-metil naftalin) kivételével nem illékonyak. A környezetvédelmi szempontból fontosabb vegyületeket a 3. ábra mutatja be. A hosszú szénláncú alifás szénhidrogénekhez hasonlóan a PAH vegyületek hidrofóbok, szerves oldószerekben könnyen oldódnak, vízben kevésbé.

Poliaromás szénhidrogének növényi, állati szervezetek bomlásakor, kőolaj képződésekor, szerves anyagok magas hőfokon történő tökéletlen égése során keletkeznek, így gyakorlatilag jelentős mennyiségű PAH vegyületet tartalmaz a korom, a kátrány, a szurok petróleum, a kőolaj és a dízelmotorok kipufogó gázai.

Egyes vegyületek ezek közül a perzisztens szerves szennyezők (POP vegyületek „Persistent Organic Pollutants”) közé sorolhatóak ([http7](http://7)). Ezek az anyagok rendkívül nehezen bomlanak le a környezetben, továbbá jellemző rájuk az erős toxicitás, valamint bioakkumulációs (élő szervezetekben történő felhalmozódás) készség. Eddig bizonyítottan hét vegyületről bizonyosodott be humán karcinogén hatás [benzo(a)pirén, benzo(a)antracén, dibenzo(a,h)antracén, benzo(g,h,i)perilén, benzo(e)pirén, 2-metil-krizén, krizén] (Szoboszlai-Kriszt, 2005; Anton et al., 2010;WHO, IARC 1998; [http2](http://2); [http3](http://3)).

 32 mg/L 1,145g/cm ³ naftalin*	 acenaftilén	 acenaftén
 fluorén	 fenantrén	 antracén
 2,6*10 ⁻¹ mg/L fluorantén	 pirén	 benz (a) antracén RK
 1,27 g/cm ³ krizén RK	 2,4*10 ⁻³ mg/L benz (b) fluorantén RK	 benz (k) fluorantén RK
 1,3*10 ⁻³ mg/L 1,35 g/cm ³ benz (a) pirén RK	 indenol (1,2,3-c,d) pirén RK	 dibenz (a,h) antracén RK
 benz (a) pirén	 7*10 ⁻⁴ mg/L benz (g,h,i) perilén	[mg/L] = vízdíhatóság [g/cm ³] = sűrűség RK = RÁKKELTŐ

3. ábra PAH vegyületek [Feltüntetve az ábrákon: vízdíhatóság, sűrűség és az emberben bizonyított (RK) rákkeltő hatás] (Szoboszlai-Kriszt, 2005)

2.4 Kármentesítési technológiák

Napjainkban számos kármentesítési technológia létezik szénhidrogén szennyezők eltávolítására földtani közegből, illetve felszín alatti vízből. Ezeket a módszereket tisztítási elv szerint lehet csoportosítani, úgymint fizikai-kémiai, biológiai, illetve termikus eljárások. A kármentesítési beavatkozás végezhető *in situ*, illetve *ex situ* módszerekkel.

In situ beavatkozásnál a tisztítandó földtani közeget, és/vagy felszín alatti vizet olyan eljárással tisztítják meg a szennyező anyagoktól, amely során a szennyezett közeget nem termelik ki, valamint a tisztított felszín alatti vizet visszanyeletik, szikkasztják a területen belül. Az *ex situ* kezelés létre jöhet *on site*, mikor a kitermelt közeget helyben kezelik, valamint *off site*, mely esetben elszállítják a kárhelyről, és kontrollált körülmények között történik a szennyezőanyagoktól való mentesítése (Barótfi, 2000).

Dolgozatom következő fejezetében bemutatom az egyes biológiai kármentesítési technológiákat, külön kiemelve a fent bemutatott szénhidrogének esetében leginkább alkalmazott, mikroszervezetek által végzett biodegradációs eljárásokat.

2.4.1 Biodegradációs eljárások

Olyan esetekben, melynek során szennyezőanyagok kerülnek a földtani közegbe, valamint felszín alatti vizekbe a biodegradációs eljárások hatékonyan alkalmazhatóak a szennyezőanyagok ártalmatlanítására. Ahogy azt a bevezetésben említettem, az Amerikai Környezetvédelmi Hivatal (EPA, Environmental Protection Agency) minden olyan esetben, amelyben lehetséges, a biodegradációs eljárásokat részesíti előnyben (Szoboszlay et al., 2002). Más eljárásokkal szemben, biológiai módszerek alkalmazása a felszín minimális bolygatásával jár, nagy kiterjedésű területekre is alkalmazhatóak, a talaj élővilágával kíméletesek és a leginkább természet közeli megoldásnak tekinthetők, valamint a szennyezők a teljes bontási folyamat eredményeként (mineralizáció) veszélytelen anyagokká alakulnak át (szén-dioxid, és víz).

Biodegradációs eljárások tervezése, alkalmazása során a következőket kell figyelembe venni:

- alacsony hőmérsékleten a bontás csökken, leáll
- a mikroszervezetek szennyezőanyag tűrő képessége véges
- a biodegradációs módszerek alkalmazása előtt a szabad fázisban lévő szennyező anyagokat el kell távolítani (anaerob körülmények elkerülése miatt)
- patogén, vagy fakultatív patogén mikroszervezetek felszaporítása, alkalmazása egészségügyi kockázatokkal járhat (Anton et al., 2010; Szoboszlay-Kriszt, 2005)

A biodegradációs eljárásoknak többféle módja is lehetséges, úgymint ellenőrzött- (spontán), stimulált- (irányított) biodegradáció, ezen felül alkalmazhatóak levegőközléses, talajlazításos, valamint tartályos eljárások, továbbá tervezett oltóanyag használata. Ezeket a típusokat az alábbiakban mutatom be részletesen.

- *Ellenőrzött (spontán) biodegradáció*

A kárhelyen élő mikroszervezetek által végzett természetes lebontási folyamat, annak nyomon követése kémiai analitikai, illetve biológiai monitoringgal. Az eljárás folyamán nincs mesterséges beavatkozás. Hátránya lehet, hogy a degradációs folyamatok lassan mennek végbe, ugyanis nem biztos, hogy az adott mikroszervezetek rendelkeznek olyan enzimszisztemmel, amely a kárhelyen lévő szennyezőanyag teljes spektrumát bontani képes. Ezen felül más tényezők is, úgymint az említett elektron akceptorok (pl: O_2 , CO_2 , SO_4^{2-} , NO_3^-), és tápanyagok hiánya is (N, P, K) befolyásolhatják ennek az eljárásnak a sikerességét.

- *Stimulált (irányított) aerob biodegradáció*

Mesterséges beavatkozással felgyorsított kármentesítési eljárás. Az eljárás lényege, hogy a lebontásban részt vevő mikroorganizmusok számára optimális körülményeket teremtünk. Ez oxigén, illetve tápanyagok (szénforrás, nitrogén, kálium, foszfor) pótlásával, kiegészítésével történik. A kármentesítés során patogén, és fakultatív patogén mikroszervezetek is előfordulhatnak, ezért a terület kémiai, és mikrobiológiai monitoringját folyamatosan végezni kell.

- *Levegőközléses eljárások*

Az oxigén ellátás javítása érdekében a közegbe perforált csöveken keresztül levegőt, vagy oxigénnel dúsított vizet juttatnak. Az eljárás alkalmas tápanyag, illetve nedvesség utánpótlásra. Amennyiben nem zárt rendszerű a kármentesítési folyamat, illékony szerves szennyezők esetében fennáll annak a veszélye, hogy más közegeket is elszennyezhetünk. Az oxigén-fejlesztő anyagok adagolása a rendszerbe abban az esetben alkalmazható, amennyiben nincs a mikroszervezetekre gyakorolt toxikus hatása.

- *Talajlazításos eljárások*

A közeg lazításával (mélylazítás, forgatás, tárcsázás) biztosítják a lebontáshoz szükséges oxigén mennyiséget, valamint a művelet során adalékanyagokat is juttatnak a szennyezett közegbe, amely általában víz, valamint szerves tápanyagok. *Ex situ* technológia során, az adalékanyagokat kiegészíthetik térfogatnövelő szerves anyagokkal (CNP-műtrágyák), melyeknek segítségével lebontást fokozó C:N arány állítható be. Ezen eljárás esetében is fennállhat a szennyezés-átvezetés másik közegbe, amennyiben a rendszer nem zárt.

- *Tartályos eljárások*

A szennyezett talajt magas nedvességtartalmú zaggyá szuszpendálják, majd keverik, levegőztetik, így törekedve a minél jobb körülmények megteremtésére. A tisztítás után a szuszpendált talajt víztelenítik. A kitermelt szennyezett talajvizet tartályokban, aerob viszonyok között, a mikroszervezetek felszaporítása érdekében kezelik. Az esetleges károsító anyagokat (kő, kavics, egyéb anyagok) a tartályba helyezés előtt célszerű szelektálni. A tisztított talajnak megváltozik szerkezete, mikrobapopulációja, ezáltal tápanyag-szolgáltató képessége csökkenhet.

- *Tervezett oltóanyag használat*

Azokat az eljárásokat soroljuk ebbe a csoportba, melyek faji szinten identifikált ismert tulajdonságokkal rendelkező mikroszervezeteket alkalmaznak. Az oltás során nagy csíraszámú mikroba szuszpenziót juttatnak a szennyezett közegbe. A kijutatott oltóanyagnak az alábbi követelményeknek kell megfelelnie: Csak indentifikált mikroba fajokat tartalmazhat, melyeknek a bontási spektruma korábbi vizsgálatokból ismert. Fontos, hogy a használt oltóanyagnak obligát, és fakultatív patogén mikrobáktól mentesnek kell lennie, ezen kívül ismerni kell a benne lévő mikroszervezetek nehézfém tűrő képességét. Ezen szabályok közé tartozik továbbá, hogy az oltóanyagként használt mikroszervezet letétbe legyen helyezve legalább egy nemzetközi mikrobiológiai törzsgyűjteményben. Hazánkban ilyen a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye (NCAIMB) (Anton et al., 2010; Szoboszlai-Kriszt, 2006).

Biodegradációs célokra szánt oltóanyagok estében tehát elengedhetetlenül fontos az oltóanyagban megtalálható mikroorganizmusok faj szintű meghatározása, különösen mivel obligát, illetve fakultatív patogén mikroszervezetek - köz- és környezetegészségügyi kockázatuk miatt - nem alkalmazhatók a kármentesítés során.

2.5 Szénhidrogének biológiai lebonthatósága

Az 1960-as évek óta kutatási cél a mikroorganizmusok azon tulajdonságainak vizsgálata, mely a környezetbe kerülő xenobiotikumokat az emberre ártalmatlan végtermékké képesek átalakítani (Anton, 2010). Ez a folyamat természetes körülmények között is lezajlik, de egyes szennyezőanyagok lebonthatósága annyira korlátozott, hogy emberi beavatkozás nélkül a szennyezés mértéke nem csökken, ezáltal tartós szennyezés alakul ki az adott területen.

A biológiai lebomlás (biodegradáció) a mikroorganizmusok által végzett biológiai-biokémiai folyamatokon keresztül megvalósuló lebontási (katabolikus), illetve átalakítási (transzformációs) folyamatok összessége, melyeket a mikroorganizmusok végeznek enzimeik

segítségével. Ezen képességüket kihasználva lehetőség nyílik arra, hogy mesterségesen a környezetbe kerülő szennyezőanyagokat ártalmatlanítsuk. A biodegradáció lehet teljes (mineralizáció), illetve részleges (Anton et al., 2010; Pesti et al., 2001; Szoboszlai-Kriszt, 2005).

2.5.1 Mineralizáció

Mineralizációnak vagy ásványosodásnak a teljes lebontási folyamatot nevezzük, mely során a mikroorganizmusok olyan természetes katalizátorokat, enzimeket termelnek, melyek a szerves vegyületeket (így akár a szennyezőanyagokat) széndioxid (CO_2), metán (CH_4), víz (H_2O) és szervesetlen sók keletkezése mellett bontják le. A folyamat célja, hogy a mikroorganizmusok anyagcsere-folyamataikhoz, új sejtek felépítéséhez szükséges építőelemeket és energiát nyerjenek. A bioszintézis anabolikus reakciói kapcsolják össze az építőelemeket, eközben energiát, elektron donorokat és elektron akceptorokat használnak fel. Aerob körülmények között a végső elektronakceptor a levegő oxigénje, anaerob feltételek mellett alternatív elektron akceptorként Fe^{3+} ionok, szén-dioxid, nitrát, szulfát szolgál (Anton et al., 2010).

2.5.2 Részleges biodegradáció

Részleges biodegradáció következhet be olyan esetekben, melyek során a lebontást, átalakítást végző mikroszervezetek számára nem optimálisak a körülmények. Ezek adódhatnak az elektron akceptortok, a víz, vagy a nyomelemek hiányából. Előfordulhat, hogy a lebontást végző mikroszervezetek élettani tulajdonságaik alapján nem képesek teljes mértékben degradálni az adott szennyező anyagokat.

A részleges biodegradációnak három típusa ismert:

- kometabolizmus (kooxidáció)
- átalakítást végző enzimek hiánya
- polimerizáció

Az első típus a kooxidáció, amely során a kiindulási vegyület részleges, néha teljes oxidációja lezajlik, de a lebontást végző mikroszervezetek a folyamatból származó energiát nem használják fel. Kometabolizmus során a szennyezőanyag a mikroorganizmus számára nem szolgál tápanyagul, azonban más, hasznosítható szubsztrát jelenlétében annak átalakulásával egybekötve zajlik a szennyezőanyag biotranszformációja, valamint a szennyező anyagok transzformációját (átalakítását) teszi lehetővé, ásványosítását (mineralizációját) nem. Azonban része lehet a mineralizáció folyamatának, amennyiben a szennyező anyagok kometabolikus átalakításakor keletkező anyagok, tápanyagul szolgálnak más lebontó szervezetek számára.

A második típus, során a lebontást, átalakítást végző enzimek közül valamelyik hiányzik, ezért a folyamat megreked egy köztes termékénél, vegyületénél. A lebontási folyamatból származó energiát a mikroszervezet hasznosítja.

A harmadik típusába azok a folyamatok tartoznak, melynek során a hasonló elemek összeépülnek polimerizálódnak, vagyis a szintézis folyamatok révén a kiindulási anyagoknál összetettebb, stabilabb vegyületek keletkeznek.

Enzimkatalizált reakciók során, melynek eredményeként végbemennek a biodegradációs folyamatok, olyan termékek is keletkezhetnek, melyek a kiindulási anyagoknál toxikusabbak lehetnek. Gyakran akkumulálódhatnak, felhalmozódhatnak az átalakítást végző szervezetekben, vagy beépülhetnek a közeg természetes rendszerébe (pl. talaj), annak anyagaiba (pl. humusz). (Anton et al., 2010; Szoboszlay-Kriszt, 2005; Szabó, 1989).

2.5.3 Alifás szénhidrogének és PAH vegyületek biodegradációja

Az alifás szénhidrogének biodegradációja aerob körülmények között viszonylag gyorsan mehet végbe (összevetve az oxigénhiányos közegekkel). Lebomlásukat a nyers kőolaj legfőbb alkotói, az n-alkánok példáján keresztül mutatom be. Ezen vegyületek lebomlása aerob körülmények között alkán-monooxygenáz enzimek segítségével a szénlánc általában terminális szénatomjának oxidációjával indul, a reakció eredményeként alkohol keletkezik. Ezt dehidrogenáz enzim aldehiddé, majd zsírsavvá alakítja, a bomlási folyamat tehát az alkán → alkohol → aldehyd → zsírsav útvonalon keresztül megy végbe. A telítetlen, kettős kötést tartalmazó szénhidrogének lebontása oxigén-szegény környezetben különböző szulfát-redukáló és egyéb anaerob baktériumok által történő oxidáció során mehet végbe.

A PAH vegyületeket általában 3 benzolgyűrűig tekintjük jól lebonthatónak, e feletti gyűrűszám esetében a lebonthatóság, vízzoldékonyság, valamint a biológiai hozzáférhetőség csökken. Ennek tulajdonítható, hogy kármentesítés során, a magas atomszámú PAH vegyületek feldúsulnak a közegben. Egyes bioremediációs szakirodalmak a PAH vegyületeket 3 benzolgyűrű feletti szám esetében nagy molekulatömegűnek („high molecular weight”) nevezik (Kanally et al., 2000).

A PAH vegyületek lebomlása, a monoaromás vegyületek lebomlásával megegyező módon megy végbe. Az egyes benzol gyűrűk egymás után bomlanak fel, majd szervesetlen vegyületek képződnek (mineralizáció). A folyamatot a mikroorganizmusok által termelt monooxygenáz, dioxigenáz enzimek katalizálják (Anton et al., 2010; Haritash et al., 2009; Martinkova et al., 2009; http4).

Számos különböző baktérium, valamint gomba csoport tagjai rendelkeznek olyan tulajdonságokkal, mely során szénhidrogén vegyületeket képesek degradálni. Ilyen tulajdonságokkal többek között az *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus* fajok rendelkeznek (Anton et al., 2010; Haritash et al., 2009; Kim et al., 2007). Policiklikus aromás szénhidrogének biológiai lebonthatóságát több kutatási eredményben publikálták. Az egyes eredmények arról számolnak be, hogy antarcén, fluorantén és benz(a)antracén bontására képesek *Pseudomonas*, *Sphingomonas* fajok (Mrozik et al., 2002; Schneider et al., 1996). Más kutatások során benz(a)pirén-en közel 85%-os bontást értek el *Bacillus subtilis* fajt alkalmazva (Madhuri et al., 2009), de sikeres bontásról számolnak be egyes *Mycobacterium*, *Novosphingobium*, *Arthrobacter* fajok esetében is (Willumsen et al., 2001; Kallimanis et al., 2009; Yuan et al., 2009). Ezen felül több kutatási eredmény is megmutatta, hogy mikrobakonzorciumok képesek nagy molekulatömegű („high molecular weight”) poliaromás vegyületek hatékony lebontására (Luan et al 2006, Yu et al 2005). Ezen felül egyes szakirodalmak arról számolnak be, hogy mikroszervezetekre gyakorolt UV besugárzás alkalmazásával, a szénhidrogén bontási potenciál növelhető (B. Debajit et al., 2012; Vivek et al., 2011).

2.6 Baktériumtörzsek faj szintű identifikációja

A bioaugmentáció során alkalmazott baktériumok, mind prokarióták, vagyis nem rendelkeznek körülhatárolt sejtmaggal, bennük a DNS molekula általában cirkuláris, szuperhelikális állapotban található. Tartalmazhatnak még további, önálló replikációra képes genetikai elemeket, plazmidokat, melyek kis cirkuláris DNS molekulák; ezek a sejtnak a környezet megváltozása esetén gyorsabb adaptációs és védelmi képességeket is biztosíthatnak (pl. enzimek, toxinok termelése, antibiotikum rezisztencia stb.), illetve sok esetben a degradációs képesség is plazmidokon kódolt.

Fontos tulajdonság a riboszómák felépítése és tulajdonságai is, mert a riboszómális RNS-ek lassan változnak és könnyen izolálhatók, mint az őket kódoló rDNS szakaszok is. A riboszómák a fehérjeszintézis színhelyéül szolgálnak, fehérjemolekulákból és riboszómális RNS-ből állnak. Megtalálhatóak a sejthártya belső felszínéhez tapadva, a citoplazmában szabadon. mRNS láncokkal összekapcsolódva kromoszóma-poliszóma komplexet hozhatnak létre. A citoplazmából centrifugálás útján elválaszthatók ülepedési sebességük alapján. Prokarióták esetében az ülepedési állandó 70S (S = Swedberg féle centrifugális ülepedési állandó), mely két alegységre, a 30S és 50S egységekre bontható. A 30S alegység 21 különböző fehérjéből és egy 16S riboszómális RNS-ből áll. A prokarióta baktériumokban a 16S rDNS kb. 1500 bázispár hosszúságú szakasz, melynek végei a legtöbb baktériumfajban megegyeznek, ezek az ún. konzervált régiók. A konzervált szakaszok közötti variábilis részek azonban már fajonként eltérőek, ezen szakaszok szekvencia

sorrendjének összehasonlító vizsgálata alapján lehetővé válik az egyes törzsek faj szintű identifikációja (Szeberényi, 2004). Amennyiben a 16S rDNS szekvencia analízis során egyes törzsek bázissorrendjének hasonlósága 98% feletti, azonos fajokról beszélhetünk (Tindall et al, 2010).

Dolgozatom következő alfejezetében bemutatnám, hogy UV sugárzás hatására miként következhet be mutáció a DNS-ben, mely intenzívebb biodegradációt eredményezhet.

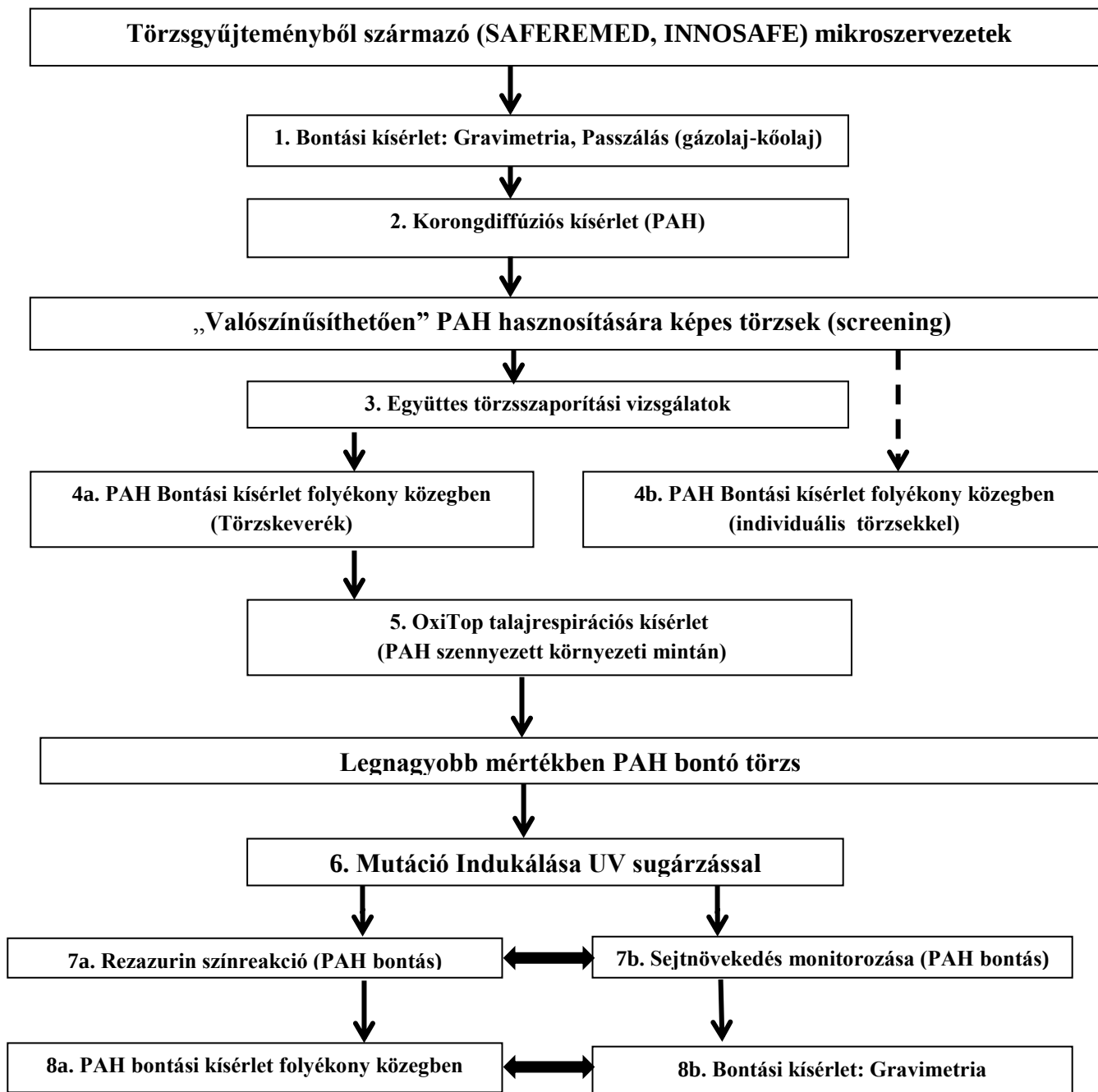
2.7 UV mutáció

Mutációk nemcsak spontán módon mehetnek végbe, hanem indukálhatók is. Történhetnek fizikai (UV sugárzás), kémiai, biológiai tényezőkkel (Szabad, 2006). Az UV sugárzás, melynek hullámhossztartománya $\sim 260\text{nm}$, a DNS számára leginkább abszorbeálható (Madigan et al., 2000). UV sugárzás közvetve okoz bázispárcseréket, melynek hatására a DNS fonálban a két szomszédos pirimidinbázis (citozin, vagy timin) között kovalens kötések képződhetnek, melyek többnyire timindimerek. A timindimerek nem szolgálnak templátként a replikáció folyamán, velük szemben véletlenszerűen épít be nukleotidokat a DNS-polimeráz enzim, végeredményben bázispár-szubsztitúciók következnek be (Szabad, 2006). Amennyiben ezek nem a megfelelő bázispárok, akkor mutáció történik. Az UV besugárzás eredményeként olyan nukleotid sorrend jöhet létre, mely eredményezheti a lebontásban résztvevő enzim/enzimek termelődésének fokozását. A vad típusú törzs minél több klón telepének szénhidrogén bontási képességét vizsgáljuk, annál nagyobb a valószínűsége, hogy olyan klónt találunk, melyben létrejön a mutáció.

3 Anyag és Módszer

Munkánk során olyan mikroszervezetekkel végeztünk bontási kísérleteket, melyek szénhidrogénnel szennyezett területekről származtak, ugyanis feltételezésünk szerint szénhidrogénnel szennyezett közegből nagyobb valószínűséggel izolálhatók olyan mikroszervezetek, melyek megfelelő bontási potenciállal rendelkeznek. Ezen szervezetek izolálása, identifikációja (16S rDNS szekvencia analízis alapján), valamint humán, és környezetegészségügyi kockázatot jelentő besorolása a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszéken korábban megtörtént.

Ezeket a mikrobákat szintén korábban két tanszéki törzsgyűjteményben (SAFEREMED, INOSAFE) helyezték el. A törzsgyűjteményi mikroszervezetek bontási kapacitásának vizsgálatára irányuló kísérleteket, azok egymásra épülésének folyamatát, a célkitűzéseknek megfelelően az alábbi, 4. ábrán szemléltetem.



4. ábra PAH vegyületek lebonthatóságának vizsgálatára kidolgozott kísérleti rendszer

3.1 A kísérleti rendszerekben alkalmazott mikroszervezetek:

A vizsgálati rendszerben az alábbi két törzsgyűjtemény tagjainak bontási kapacitását vizsgáltuk TPH, valamint PAH vegyületeken, ugyanis korábbi vizsgálatok azt igazolták, hogy ezen mikroszervezetek jelentős szénhidrogén bontási potenciállal rendelkeznek.

.SAFEREMED törzsek: AK-35 (*Rhodococcus erythropolis*), AK-36 (*Rhodococcus globerulus*), AK-37 (*Rhodococcus pyridinivorans*), AK-38 (*Rhodococcus gordoniae*), AK-40 (*Rhodococcus rhodochrous*), AK-44 (*Rhodococcus aetherivorans*), CHB-15p (*Rhodococcus pyridinivorans*),

CHB-20p (*Chryseobacterium hungaricum*) NCP-3 (*Pseudomonas putida*) NCAIMB-1494 (*Pseudomonas putida*)

INNOSAFE törzsek: TBF2/20.2 (*Olivibacter oleidegradans*), ZFM 23.1 (*Rhodococcus erythropolis*), S-8 (*Rhodococcus ruber*), OM-7.2 (*Rhodococcus erythropolis*), SZM5/4.2 (*Pseudomonas mandelii*)

A 4. ábrán szemléltetett módon, első lépésként a kísérleti rendszerekben alkalmazott mikroszervezetek szénhidrogén bontási kapacitását vizsgáltam gravimetriás módszerrel.

3.2 Gravimetria

A 16S rDNS szekvencia analízis során meghatározott fajú, nem patogén törzsekkel kezdtük munkánkat, melyeknek első lépésben szénhidrogén bontó képességét vizsgáltuk gravimetriás módszerrel, a folyamatábrának megfelelően (1. lépés). A baktériumokból ferde agaron 24 órás friss tiszta tenyészetet készítettem. Az így előkészített mikroba telepeket inkubációs idő (24h) leteltével steril üvegbot segítségével 50 ml folyékony táplevesbe mostam (LB tápleves). A beoltott lombikok 72 órán át rázódtak 28°C-on, 170-rpm fordulatszámon. Az így nyert szuszpenzióból 5-5 ml-t 100 ml OIR III. tápoldatba mértem, [5,0 g (NH₄)₂SO₄; 1 g K₂HPO₄; 0,5 g KH₂PO₄; 0,5 g MgSO₄×7H₂O; 0,2 g CaCl₂×6H₂O, 0,01 g FeSO₄×7H₂O, 1000 cm³ desztillált víz, sterilizés: 121 °C, 1 bar, 15 perc], mely egyedüli szénforrásként 2 ml (nagyjából 1,7 g) 3:2 arányú nyers gázolaj-kőolaj keveréket tartalmazott. A minták mellett baktérium szuszpenziót nem tartalmazó gázolaj-kőolajjal hasonlóan kiegészített OIR-III és tápoldatot alkalmaztam kontrollként. A lombikokat ezután 28°C-on, 120 órán át, 170 rpm fordulaton inkubáltam.

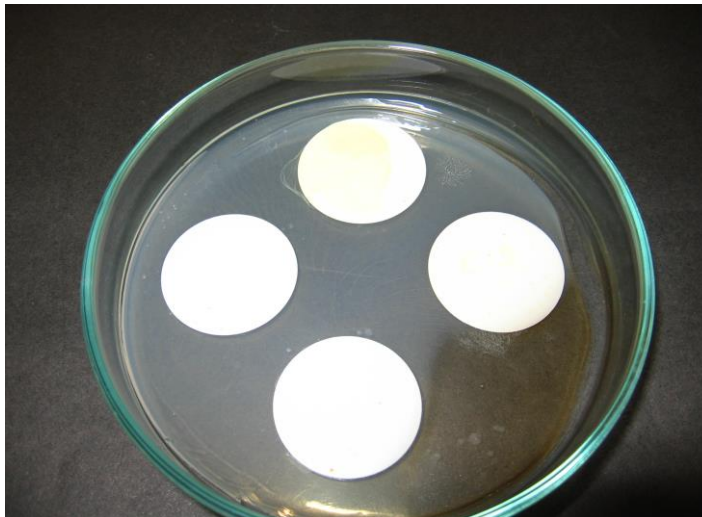
Az inkubációs idő után az olajos rázóként használt Erlenmeyer lombik tartalmát rázótölcsérbe öntöttem, majd 50 ml petrolétert adtam hozzá, különös figyelmet fordítva, hogy átmossam azzal a lombik falát, így lemosva róla a maradék olajszármazékot. Alapos keverés után két fázis különült el a rázótölcsérben. Egy vizes-, valamint egy olajos-oldószeres fázis. A petroléter fajsúlyából adódóan a vizes fázis felett helyezkedik el. A fázissétválasztás után a vizes fázist visszaöntöttem a rázótölcsérbe, míg az oldószeres, olajos fázist szűrőpapíron átszűrtem (a folyamatot megelőzően a szűrőpapírra nátrium-szulfátot szórtam, az esetleges pontatlan fázissétválasztásból adódóan visszamaradt víz megkötésére). A petroléterrel történő átmosást háromszor egymás után végeztem el. Ezek után a maradék olaj kioldása céljából a lombikot egyszer átmostam kloroformmal. A kloroformmal történő ráztatás, (kloroform esetében, annak fajsúlyából adódóan az oldószeres-olajos fázis került a rázótölcsér aljára), majd szűrés után előzőleg ezredgramm pontossággal lemért gömblombikba öntöttem az oldószeres-olajos elegyet. Heidolph típusú bepárlókészülék segítségével forráspontkülönbség alapján (petroléter forráspontja: 50-60°C,

kloroform forráspontja: 60-65°C) szétválasztottam az olajat az oldószerektől. A gömblombik a bepárlás után elvileg már csak azt a visszamaradt olajat tartalmazta, amely korábban a rázatott Erlenmeyer lombikban volt. A folyamat után a gömblombikokat szárítószekrényben 65°C-on 45 percig szárítottam, az esetlegesen visszamaradt víz, valamint oldószer eltávolítása céljából. A baktérium inokulumot nem tartalmazó mintákkal ugyanígy jártam el. A szárítás befejeztével a gömblombikokat ismét lemértem analitikai mérleggel. Ha az így kapott tömegből kivontam a lombikok kiindulási tömegét, akkor megkaptam a lombikban lévő olaj tömegét, amely a bontás után visszamaradt olaj tömege. Ezt összehasonlítva a kontroll mintában lévő olaj mennyiségével, megkaptam a %-ban kifejezett szénhidrogén bontási eredményt. Kísérleteink első lépéseként az INNOSAFE, valamint SAFEREMED törzsgyűjtemény tagjainak olajbontását vizsgáltuk gravimetriás módszerrel, majd ezeket a törzseket háromszoros olajos rázatással passzáltuk annak érdekében, hogy a szénhidrogén bontási képességet fokozzuk. A passzálás során, a fejezet elején ismertetett módon baktérium szuszpenziót készítettem, melyből 5-5ml-t mértem 100ml OIR-III ásványi tápoldatba, melyhez egyedüli szénforrásként 2 ml (3:2) arányú nyers gázolaj-kőolaj keveréket adtam. Ezt követően 28°C-on, 170 rpm fordulatszámon, 120 órán át inkubáltam. Az inkubációs idő leteltével a lombikokból 5-5ml-t átoltottam friss, 100 ml OIR-III tápoldatot, és 2 ml (3:2) arányú gázolaj-kőolaj keveréket tartalmazó Erlenmeyer lombikokba. Az inkubációs idő szintén 120 óra volt 28°C-on, 170 rpm fordulatszámon. Ezt a folyamatot még egyszer megismétltem, majd az előbbieken ismertetett módon meghatároztam a passzált törzsek szénhidrogén bontási képességét gravimetriás módszerrel, valamint ezen törzseket, a további használat céljából 2 példányban -80°C-on tároltam. Az említett vizsgálatok eredményeit az „Eredmények” című fejezetben mutatom be.

3.3 Korongdiffúziós kísérlet (Törzsgyűjtemény szelektálása)

Kísérleti rendszerünk második lépéseként szükségünk volt egy olyan módszerrendszerre, melynek segítségével a törzsgyűjteményekből ki tudjuk választani azokat a mikroszervezeteket, melyek alkalmazhatóak poliaromás szénhidrogének degradálására. A törzsgyűjtemény szelektálására azokat a baktériumokat választottuk ki, amelyek a passzálás és a gravimetria eredményei alapján jelentős (50% feletti) bontási kapacitással rendelkeztek. Rajtuk egy kínai kutatócsoport által kifejlesztett 'screenelési' technológiát alkalmaztunk (Zhao B. et al 2009). A kísérlet során három PAH vegyületen [benz(a)pirén (BaP), benz(a)antracén (BaA), fluorantén (Flu)] vizsgáltuk a baktériumok bontási képességét. Első lépésben a fent bemutatott OIR III (1,5%-os) ásványi táptalajra (petri csészében) 4 darab 2,5 cm átmérőjű 0,45 µm pórusátmérőjű Millipore szűrőt (MERCK Millipore cat. no. HAWP02500) helyeztem steril csipesszel (1. kép).

Ezt követően 5000 ppm végkoncentrációban készítettem törzsoldatot dietil-éterben oldva a vizsgálni kívánt három PAH vegyülettel szeptummal lezárt vialos üvegbe. A filterre 100 μ l mennyiségben szélesztettem a kiválasztott PAH törzsoldatot steril üvegbottal. A négy szűrőből háromra tehát egy-egy PAH vegyületet (BaP, BaA, Flu) tartalmazó törzsoldat került, a negyedik filter kontrollként szolgált, amelyet tiszta dietil éterrel kezeltem. Ezt a folyamatot 5 perces szárítás követte elszívófülkében. A PAH vegyületet tartalmazó törzsoldatot üvegfecskendővel, és fém tűvel vettem ki az üvegből a tetején lévő teflon szeptumon át, majd a megfelelő filterre injektáltam. Az oldószer elpárolgása után a baktérium szuszpenzió szélesztése történt a filterre 100 μ l mennyiségben steril üvegbottal, melyet előzetesen LB táptalajon szaporítottam fel az alábbiak szerint. A



1. Kép a kísérlet folyamán alkalmazott filterek

törzsgyűjteményből származó baktériumokat steril üvegbottal szélesztettem LB (10 g tripton; 5 g élesztőkivonat, 10 g NaCl; 18 g bakteriológiai agar; 1000 cm³ desztillált víz) tápagarra. A lemezekről az inkubációs idő leteltével (28°C, 72 óra) egy-egy típusos telep beoltása történt sterilen, üvegbot segítségével 50 ml LB táplevesbe. Az inkubációs idő 72 óra, 28°C-on, 170 rpm fordulattal történt. Ezt követően a 72 órás inokulumokat centrifugáltam (4600 rpm, 20 perc), a felülúszót leöntöttem, steril desztillált vízzel átmostam, majd újra centrifugáltam. A mosott pelletet szuszpendáltam steril desztillált vízben, ezt követően spektrofotométer segítségével a sejtsűrűséget egységesen OD₆₀₀=1 értékre állítottam be. A különálló filterekre az így elkészített baktériumszuszpenzió került. Az inkubációs idő a filtereken 10 nap volt, 25°C-on.

Minden esetben a telepképződést, valamint telepnövekedést figyeltem. Mivel a rendszerben egyedüli szénforrásként a törzsoldatban lévő PAH vegyület hasznosítható, (OIR III ásványi táptalaj nem tartalmazott szénforrást) így elvárásunk szerint csak azok a mikroszervezetek szaporodtak a filtereken, melyek képesek túlélni a vizsgált PAH vegyület jelenlétében. A továbbiakban a vizsgált törzset a jelölt PAH vegyületet „valószínűsíthetően bontóként” jegyeztük fel.

A szakirodalmak szerint, a háromnál több aromás gyűrűt tartalmazó vegyületek esetében a vízőldékonyság, a lebonthatóság, és a biológia hozzáférhetőség is csökken. Ezen felül több irodalom is beszámol arról, hogy policiklikus aromás szénhidrogének hatékony degradációjára mikroba konzorciumok lehetnek képesek (Yu. et al 2005). Ennek érdekében törzspárokat

alakítottam ki a SAFEREMED, valamint az INNOSAFE törzsgyűjteményekből a korongos vizsgálatok, továbbá a gravimetriás kísérlet eredményeinek függvényében.

3.4 Együttes törzsszaporítási vizsgálatok

Kísérleti rendszerünk következő lépésében a 3.2 fejezetben leírt módon inokulumokat készítettem a vizsgálandó mikroszervezetekből. Annak érdekében, hogy a kiindulási sejtszám megközelítőleg azonos legyen, a 72 órás friss inokulumok sejtsűrűségét egységesen $OD_{600}=0,6$ értékre állítottam. Ebből, egyenként 2,5-2,5 ml szuszpenziót steril, LB táploldatba mértem, majd 72 órán át, 28°C-on, 170 rpm fordulaton inkubáltam. A törzspárok együttes szaporítása során az egyes tagok élő sejtszámát 24 óránként lemezöntéssel határoztam meg. Ehhez hígítási sort készítettem. A szuszpenzió 1 ml-ét 9 ml steril desztillált víz, és TWEEN 80 keverékébe pipetázva megkaptam a minta 10^1 hígítási fokát. Ebből újabb 1ml-t pipetázva 9ml steril desztillált víz, és TWEEN 80 keverékbe, egészen 10^{10} hígítási fokig készítettem a sort. A 10^4 - 10^{10} hígítási tagokból 100 μ l-t mértem LB agarra, melyet steril üvegbottal szélesztettem. A lemezeket 28°C-on inkubáltam, 96-120 óra után a lemezeken képződött telepeket eltérő telepmorfológia alapján számoltam meg. A PAH bontási kísérletet az együttes szaporíthatóság eredményeinek függvényében végeztem el.

3.4.1 PAH bontási kísérlet folyékony közegben

A folyamatábrának megfelelően, munkánk 4. lépéseként, folyékony táptalajban rázatott mikroba keveréket alkalmaztam annak érdekében, hogy folyékony közegben elemezzem azok PAH degradációs képességét. Ezen vizsgálati részben olyan törzspárosításokat alkalmaztunk, melyek az együtt szaporítási kísérletek során egymás növekedését nem gátolták.

A három PAH vegyületből, benz(a)pirénből, benz(a)antracénből és fluoranténből egyenként 15 mg/ml koncentrációjú törzsoldatot készítettem, ehhez minden vegyületből 300 mg-ot adagoltam, majd 20 ml acetonban oldottam. A bontási kísérletben a PAH vegyületek együttes lebontását vizsgáltuk úgy, hogy azok együttes végkoncentrációja a bontási rendszerben 450 ppm (mg/l) legyen (150-150-150 ppm). A továbbiakban 300 ml-es előzetesen sterilizett Erlenmeyer lombikokba elszívó fülke alatt minden törzsoldatból 500 μ l mértem, majd az oldószer elpárolgása után 45-45 ml Bushnell-Haas (B-H; 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,02 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 1 g KH_2PO_4 ; 1 g K_2HPO_4 ; 1 g NH_4NO_3 ; 0,05 g $FeCl_3$; 1000 cm^3 desztillált víz) táploldatot mértem steril mérőhengerrel, mely 1 v/v%-ban Tween80 detergenst tartalmazott. A Tween80 irodalmi kutatásaink alapján növeli a biodegradáció hatékonyságát, valamint segíti a vegyületek oldódását ([http5](#), [http6](#)).

A már ismertetett módon baktérium szuszpenziót készítettem. A törzspárosítás egyes tagjainak szuszpenzióiból 2,5-2,5 ml-t mértem a PAH vegyületet tartalmazó 45 ml Bushnell-Haas

tápoldathoz, így az 50 ml térfogatú tápoldat PAH koncentrációja 450 ppm lett. Az inkubációs idő 14 nap volt, 28°C-on 170 rpm fordulaton. A kísérlet három párhuzamos beállásban történt, kontrollként baktérium szuszpenziót nem, csak PAH vegyületeket azonos koncentrációban tartalmazó tápoldatot használtam.

A screenelési (korongos kísérlet) vizsgálatokra alapozva elindítottunk egy másik kísérleti rendszert, melyben azokat a törzseket vizsgáltuk folyékony közegben, melyek a filteren telepeket képeztek. Ebben a kísérletben az inkubációs idő nem 14, hanem 21 napig tartott, szintén 28°C-on, 170 rpm fordulaton. Ebben az esetben, csak individuális törzsekkel vizsgáltuk a bontást. A 14, illetve a 21 napos inkubációs idő leteltével a mintákat analitikai vizsgálatra küldtük.

3.5 PAH bontás igazolása szennyezett területről származó talajmintán (OxiTop talajrespirációs vizsgálat)

Az OxiTop vizsgálatainkat a 3.4 fejezetben említett együttes szaporíthatóság eredményeinek függvényében végeztük el PAH komponensekkel szennyezett talajmintán. Az OxiTop



2. Kép OxiTop talajrespirométer

talajrespirációs vizsgálat a CO₂ kibocsátás mérésére szolgál (2. kép). A zárt rendszerben a talajlégzésből származó CO₂-ot NaOH oldatban kötjük meg, melynek eredményeként a zárt rendszerben mikrovákuum keletkezik, melynek nagyságából (nyomáscsökkenés) következtetni lehet a talajlégzés aktivitására. Az OxiTop rendszer a vákuum mértékét regisztrálja nagy precizitással. A zárt rendszerben bekövetkező nyomás változását az eszköz fej egysége regisztrálja, anélkül, hogy a minta bármilyen bolygatása szükséges lenne. Az

adatok leolvasása egy leolvasó egységen keresztül

történik infra adatátvitellel. Az edényeket a rendszerhez tartozó termosztátban digitálisan beállított hőmérsékleten ($\pm 2^\circ\text{C}$ eltéréssel) tároltam. A záró fejek nyitására abban az esetben volt szükség, ha a rendszerből az oxigén mennyiségét pótolni kellett. Ilyenkor a respirációs görbe szellőztetés előtti végpontja, és a szellőztetés utáni kezdőpontja összeilleszthető.

Az OxiTop rendszerben a SAFEREMED törzsgyűjteményből származó törzspároknak bontási kapacitását vizsgáltuk PAH komponensekkel szennyezett talajmintán. Első lépésként egy kőolajjal szennyezett hazai kárhelyről származó, homok talajféleségű talajközeget keveréssel

homogenizáltuk. A talajmintából 150 – 150 g-ot a SAFEREMED-ből származó AK-35 + AK-38 (*R. erythropolis* + *R. gordoniae*) törzskeverék tagjaival oltottuk be, mivel ezek a törzsek megfelelő élő sejtszámban voltak képesek együtt szaporodni, valamint korábbi vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy egyenként jó TPH bontási kapacitással rendelkeznek, valamint saját vizsgálataink alapján törzspárként PAH bontó képességgel is bírnak.

Az inokulum készítéshez, a törzseket 24 órás ferde agarról 50 ml TGE-5 (tripton: 5,0 g; élesztőkivonat: 2,5 g; glükóz: 5,0 g; 1000 ml desztillált víz) táplevesbe mostam be steril üvegbot segítségével. Az így beoltott táptalajokat 72 órán keresztül, szobahőmérsékleten, 150 rpm fordulaton inkubáltam. A rázatást követően a sejtsűrűséget egységesen $OD_{600}=0,6$ -ra állítottam, folyékony TGE-5-tel. Ezt követően az AK-35, és AK-38 törzsekkel külön-külön 2,5-2,5 ml-rel (összesen 5ml) oltottam be a talajokat három ismétlésben, az inkubációs idő 14 nap volt. A vizsgálat eredményeire alapozva, melyet a 4.4-es fejezetben mutatok be, a kísérletet megismételtük. A második Oxitop talajrespirációs vizsgálatban az AK-38 + NCP-3 (*R. gordoniae*+*Pseudomonas putida*), valamint a CHB-15p + AK-40 (*R. pyridinivorans* + *R. rhodochrous*) törzskeverékeket alkalmaztuk, ugyanis ezek a törzsek megfelelő élő sejtszámban voltak képesek együtt szaporodni, valamint korábbi vizsgálatok eredményeként jó TPH bontási kapacitással bírnak. A két törzskeverékkel kezelt talajmintákat kiegészítettük az előzőekben is alkalmazott desztillált vizes kezeléssel, valamint egy kezeletlen kontroll mintával, szintén három párhuzamos ismétlésben. 50 ml LB táptalajon előzetesen kiválasztott külön-külön felszaporított törzskeveréket készítettem. Ebből individuális baktérium szuszpenziót hoztam létre centrifugálással a fenti fejezetekben leírtaknak megfelelően. A keverékben lévő két törzset külön-külön $OD_{600}=1$ -re beállítottam desztillált vízzel, amiből 2,5-2,5 ml-rel oltottam a 150 g talajmintát, melyet 14 napig inkubáltam 20°C-on.

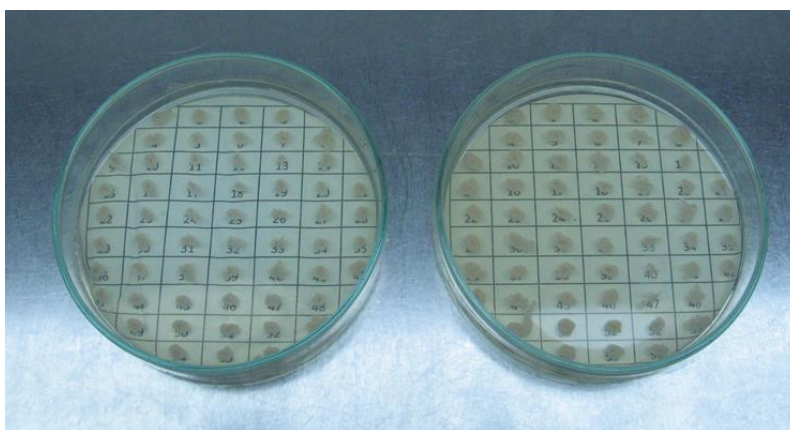
Eddigi kísérleteinkre alapozva, melyekben a poliaromás szénhidrogén bontó képességét vizsgáltuk a két törzsgyűjtemény egyes tagjainak, azt az eredményt kaptuk, hogy az AK-35 (*Rhodococcus erythropolis*) volt képes a legnagyobb mértékben csökkenteni a poliaromás szennyezőanyagok mennyiségét. További célul tűztük ki (folyamatábrának megfelelően 6. lépés), hogy a vizsgált törzs szénhidrogén bontó képességét fokozzuk UV besugárzás alkalmazásával.

3.6 Mutáció Indukálása UV sugárzással

A kísérletben az AK-35 (*Rhodococcus erythropolis*) jelű törzset steril üvegbottal szélesztettem LB (10 g tripton; 5 g élesztőkivonat, 10 g NaCl; 18 g bakteriológiai agar; 1000 cm³ desztillált víz) tápagarra. A lemezekről a telepeket az inkubációs idő leteltével (28°C, 72h)

beoltottam 30 ml LB tápoldatba, majd 72 órán át 28°C-on rázattam 170 rpm fordulaton. Az inkubációs idő leteltével a törzs inokulumból 10 ml-t egységesen steril LB tápoldattal $OD_{600}=0,25$ -re állítottam, ugyanis korábbi tapasztalatok szerint ez az optikai densitás bizonyult a legalkalmasabbnak az UV mutagenezéshez. Ezt követően a szuszpenziót steril Falcon csőben centrifugáltam (4600 rpm, 4°C), majd átmostam steril desztillált vízzel (10ml). A folyamatot megismétltem, majd a felülúszót dekantáltam, és 5 ml steril LB tápoldattal felöntöttem. A következő lépésben a baktérium szuszpenziót szonikáltam (Branson Digital Sonifier®) 10 mp-ig, három ismétlésben, mellyel azt kívántuk elérni, hogy a sejtfal roncsolódása által az UV fény a sejten belüli térbe jusson. Ezt követően hígítási sort készítettem. A szuszpenzió 1ml-ét 9ml desztillált víz, és TWEEN 80 keveréket tartalmazó oldatba pipettáztam, így megkaptam a minta 10^1 hígítását, majd ebből 1ml-t pipetázva jutottam a 10^2 hígításhoz, melyből 100 μ l-t szélesztettem LB tápagra. A továbbiakban a szélesztett törzseket UV fénnel sugároztam be, három párhuzamos beállításban 10, 20, illetve 30 másodpercig, 30 cm távolságból, majd inkubáltam 28°C-on, 72 órán át.

A következő szakaszban szükségünk volt egy olyan módszerrendszerre, mellyel az UV sugárzásnak kitett telepek közül kiválasszuk azokat, amelyek a „vad típusú” törzsnél nagyobb mértékben képesek hasznosítani PAH vegyületeket. Első szelekciós kísérletünk (B. Debajit et al., 2012



3. Kép A szelekciós kísérletekben alkalmazott mikroszervezetek

nyomán) microplate-en összeállított bontási rendszer volt, melyben benz(a)pirén alkalmazásával monitoroztuk a sejtnövekedést. Ezzel párhuzamosan szintén szelekciós céllal alkalmaztunk rezaurin színreakción alapuló módszert (T.F. Guerin et al., 2001 nyomán). A kísérletet megelőzően a különböző időtartamú UV kezelésem átesett telepeket szélesztettem (LB tápagra) számozott jelöléssel ellátott petricsészére annak érdekében, hogy a két párhuzamos kísérlethez egyazon telepeket használhassuk (3. kép).

3.6.1 Sejtnövekedés monitorozása

Munkánk ezen szakaszában (7.a) egy olyan „screenelési” technológiát alkalmaztunk (B. Debajit et al., 2012) , mellyel ki tudtuk választani azokat az UV sugárzással kezelt telepeket,

melyek a vad típusú törzsnél nagyobb mértékben képesek növekedni PAH vegyület jelenlétében. A kísérletet microplate-en végeztem (96 well), melynek első lépéseként a vizsgált PAH vegyületből, (benz(a)pirén) 100 ppm koncentrációban (15mg benza(a) pirént, 1,5ml acetonban), törzsoldatot készítettem, majd az oldószer elpárolgását követően 1v/v%-ban TWEEN 80 detergenst tartalmazó Bushnell-Haas (B-H; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,02 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 1 g KH_2PO_4 ; 1 g K_2HPO_4 ; 1 g NH_4NO_3 ; 0,05 g FeCl_3 ; 1000 cm^3 desztillált víz) tápoldatot mértem be 200 μl /well mennyiségben. Ezt követően a számozott jelöléssel ellátott petricsészékről a megfelelő sorszámú telepet steril fogpiszkálóval a well-ekbe mostam. Kontrollként az AK-35 vad típusú törzset alkalmaztam (1-6 well). A telepeket microplate-rázón inkubáltam 28°C-on, 216 órán keresztül. Minden esetben a sejtnövekedést monitoroztam, ($\text{OD}_{620\text{nm}}$) melyet 24 óránként olvastam le. Amennyiben az egyes UV sugárzással kezelt telepek sejtnövekedése meghaladta a vad típusú törzs növekedését, azt a továbbiakban más típusú bontási rendszerben vizsgáltuk.

3.6.2 Rezazurin színreakció

Az előző kísérlettel párhuzamosan (7.b), szintén szelekciós céllal végeztünk Rezazurin színreakción alapuló módszert (T.F. Guerin et al., 2001). A Rezazurin (más néven, Alamar Kék) egy vízben oldható, sötétkék indikátor festék, mely a rendszerben lezajló redukciós folyamatok eredményeként rózsaszínű lesz (Resorufin), amennyiben szénhidrogént bontó mikroszervezet van jelen a rendszerben (Tizzard et al., 2006). Rezazurinból 50 mg-t 1 ml desztillált vízben feloldottam, majd ebből 100 μl mennyiséget mértem 100 ml Bushnell-Haas ásványi tápoldathoz, mely 1v/v%-ban tartalmazott TWEEN-80 detergenst. Benz(a)pirén-ből, 100 ppm koncentrációban (15 mg benz(a)pirén, 1,5ml acetonban oldva) törzsoldatot készítettem, majd az oldószer elpárolgását követően 200 μl /well mennyiségben Bushnell-Haas ásványi tápoldatot mértem be. A kísérletben az AK-35 jelű törzs sorszámmal ellátott klónját alkalmaztam, továbbá kontrollként (1-6 well) a törzs vad típusú telepeit. Minden esetben a színreakciót figyeltem, melyet vizuális megfigyeléssel elemeztem.

A két szelekciós kísérlet eredményei alapján öt klónt választottunk ki, melyek a kísérletek eredményeként benz(a)pirén jelenlétében nagyobb sejtnövekedést mutattak az AK-35 vad típusú törzsnél, valamint a Rezazurin színreakció alapján volt szénhidrogén hasznosítás a rendszerben. A következőkben a klónok PAH bontási potenciálját (rázólombikos kísérlet, 8.a), valamint szénhidrogén bontó képességét vizsgáltuk (gravimetriás módszer, 8.b).

3.7 PAH bontási kísérlet folyékony közegben (UV besugárzást követően)

A kísérlettel azt kívántam igazolni, hogy egy microplate-en összeállított bontási rendszer mellett, egy rázó lombikos kísérletben igazolható e, az UV fénnel kezelt telepek nagyobb mértékű PAH hasznosítása a vad típusú törzzsel szemben.

Első lépésként az UV-zott telepekből törzsinokulumot készítettem (LB tápleves), melyet 28°C-on, 170 rpm fordulaton, 72 óráig inkubáltam. Ezt követően benz(a)pirénből törzsoldatot készítettem, (50 mg BaP-t, 10 ml acetonban feloldva), melyből 1 ml mértem az előzetesen sterilizett 300 ml-es Erlenmeyer lombikokba. Az oldószer elpárolgását követően 45ml Bushnell-Haas ásványi tápoldatot mértem rá, amely 1 v/v%-ban tartalmazott TWEEN 80 detergenst. A törzsinokulumot centrifugáltam 4600 rpm fordulaton steril Falcon csőben, majd a felülúszót dekantáltam és steril Bushnell-Haas ásványi tápoldattal öntöttem fel, ezt követően újra centrifugáltam. Az inokulumokat egységesen $OD_{600}=1$ értékre állítottam, majd 5ml-t mértem a 300 ml-es Erlenmeyer lombikokba, így kiegészítve 50 ml-re. Az UV fénnel kezelt telepeken kívül alkalmaztunk egy mikrobamentes kontrollt, valamint az AK-35 vad típusú törzset, mint második kontrollt. Az inkubációs idő leteltével (14 nap, 28°C, 170rpm) a mintákat kémiai analitikai vizsgálatra küldtük.

3.8 Bontási kísérlet: Gravimetria (UV besugárzást követően)

Az UV sugárzással kezelt telepekből törzsinokulumot készítettem (30ml LB tápleves), melyet 72 órán át rázattam 28°C-on, 170-rpm fordulatszámmon. Az így nyert szuszpenzióból 5-5 ml-t 100ml OIR III. tápoldatba mértem, [5,0 g $(NH_4)_2SO_4$; 1 g K_2HPO_4 ; 0,5 g KH_2PO_4 ; 0,5 g $MgSO_4 \times 7H_2O$; 0,2 g $CaCl_2 \times 6H_2O$, 0,01 g $FeSO_4 \times 7H_2O$, 1000 cm³ desztillált víz], melyhez egyedüli szénforrásként 2 ml (nagyjából 1,7g) 3:2 arányú nyers gázolaj-kőolaj keveréket adtam. A minták mellett baktérium szuszpenziót nem tartalmazó gázolaj-kőolajjal hasonlóan kiegészített OIR-III ásványi tápoldatot alkalmaztam kontrollként, valamint az AK-35 vad típusú törzset. A lombikokat ezután 28°C-on, 120 órán át, 170 rpm fordulaton rázatva inkubáltam. A szénhidrogén bontási képesség vizsgálatát a 3.2 fejezetben leírtaknak megfelelően végeztem el.

4 Eredmények és értékelések

4.1 A gravimetria, a passzálás és a korongdiffúziós vizsgálat eredményei

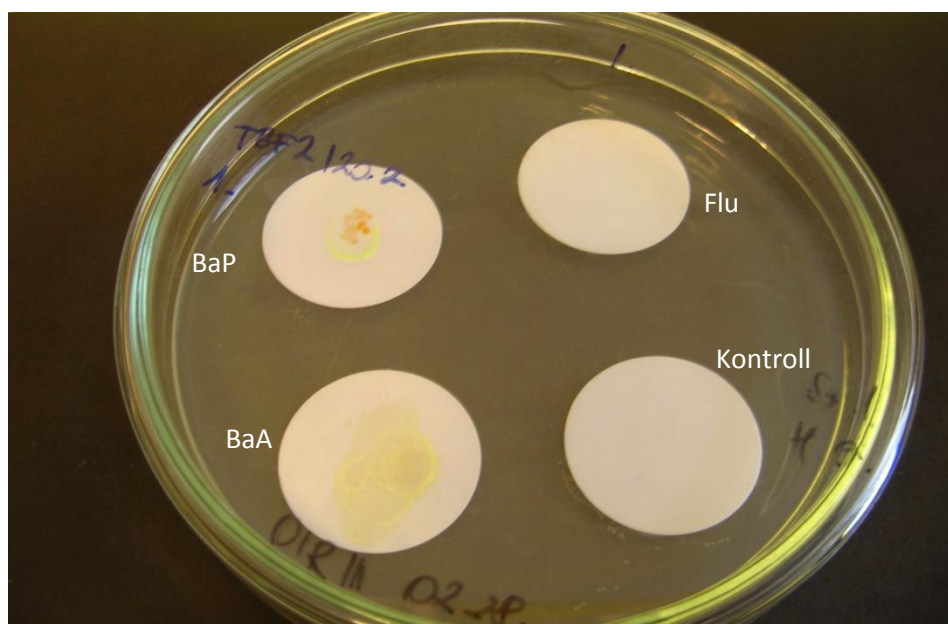
Mint azt a 3. fejezetben bemutattam, vizsgálatainkat olyan mikroszervezetekkel végeztem, melyek szénhidrogénnel szennyezett területekről származnak. Első lépésben az INNOSAFE, valamint SAFEREMED törzsek szénhidrogén bontását vizsgáltam gravimetriás módszerrel, majd ezeket háromszoros olajos rázatással passzáltam annak érdekében, hogy a bontási képességüket fokozzam. Hosszú időn keresztül laboratóriumi körülmények között tárolt, bontó törzsek esetében ugyanis előfordulhat, hogy bontási képességük csökken, mivel a rendszeres átoltások során a mikrobák enzيمrendszere adaptálódik a táptalajokban alkalmazott glükózhoz, mint szénforráshoz. Ezt követően elvégeztem a gyűjteményes törzsek PAH bontási képességét felmérő korongdiffúziós kísérleteket.

Törzsek jele		Fajnév	TPH		PAH korong		
			Gravimetria	Passzálás	BaP	BaA	Flu
			3 párhuzamos mérés átlaga				
SAFEREMED	AK-35	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	26,16	65,55	+	+	+
	AK-36	<i>Rhodococcus globerulus</i>	21,60	35,57	-	-	-
	AK-37	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	2,51	26,96	+	+	+
	AK-38	<i>Rhodococcus gordoniae</i>	57,17	73,30	-	-	-
	AK-40	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	44,89	69,25	+	+	+
	AK-44	<i>Rhodococcus aetherivorans</i>	20,60	53,40	+	+	+
	CHB-20p	<i>Chryseobacterium hungaricum</i>	n/sz				
	CHB-15p	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	n/a	n/a	+	+	+
	NCP-3	<i>Pseudomonas putida</i>	19,18	22,11	-	-	-
	NCAIMB-1494	<i>Pseudomonas putida</i>	n/a	n/a	-	-	-
	DSM 7226	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	n/a	n/a	-	-	-
INNOSAFE	TBF2/20.2	<i>Olivibacter oleidegradans</i>	21,23	58,33	+	+	-
	ZFM 23.1	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	37,19	1,85	-	-	-
	S-8	<i>Rhodococcus ruber</i>	44,80	19,82	-	-	-
	OM-7.2	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	34,08	37,80	-	-	-
	SZM5/4.2	<i>Pseudomonas mandelii</i>	n/sz				

1. táblázat A vizsgált törzsek szénhidrogén (TPH) bontó képessége és növekedése a PAH korongokon

Jelmagyarázat: n/a: nincs adat, n/sz nem szaporodott fel, -: nem növekedett a korongon, +: telepek a korongon, piros cella: 50%-nál nagyobb bontás, sárga cella: 40%-nál nagyobb bontás

Az 1. táblázat tartalmazza, a gyűjteményes törzsek gravimetriás méréseit, a passzált törzsek szénhidrogén bontási eredményeit, valamint a korongdiffúziós kísérletek (PAH korong) leolvasásait. A táblázat adatai alapján látható, hogy a gravimetriás mérések eredményéhez képest, a passzálást követően egyes törzsek bontó kapacitása jelentősen megnőtt. Ezek közül is kiemelkedően magas, az AK-35 (*Rhodococcus erythropolis*), az AK-38 (*Rhodococcus gordoniae*), az AK-40 (*Rhodococcus rhodochrous*), az AK-44 (*Rhodococcus aetherivorans*), valamint a TBF2/20.2 (*Olivibacter oleidegradans*), melyek esetében közel 30-40%-al nőtt a bontási potenciál. Hozzájuk hasonlóan az AK-36 (*Rhodococcus globerulus*), az AK-37 (*Rhodococcus pyridinivorans*), valamint az NCP-3 (*Pseudomonas putida*) esetében is 15-25% növekedés figyelhető meg a kezdeti gravimetriás mérésekhez viszonyítva. A korong diffúziós vizsgálatok során, a SAFEREMED tagjai közül az AK-35, AK-37, AK-40, AK-44, és a CHB-15p (*Rhodococcus pyridinivorans*) jelölésűek növekedtek benz(a)pirén (BaP), benz(a)antracén, (BaA), és fluorantén (Flu) vegyületekkel kezelt korongokon. Az INNOSAFE törzsgyűjteményből kizárólag a TBF2/20.2 mutatott növekedést, továbbá a 3 PAH vegyület közül csak a benz(a)pirén (BaP), és benz(a)antracén, (BaA) vegyületekkel kezelt korongokon (4. kép) jelent meg.



4. Kép A TBF2/20.2 törzs növekedése a PAH vegyületekkel kezelt korongokon, benz(a)pirén (BaP), benz(a)antracén (BaA) és fluorantén (Flu) kezelés esetén

4.2 Együttzaporítási vizsgálatok

A PAH bontási kísérletbe olyan törzsekből alakítottunk ki törzspárokat, melyek a passzálás, valamint a gravimetria eredményei alapján jelentős (50% feletti) szénhidrogén bontási kapacitással rendelkeztek és/vagy a korong diffúziós vizsgálat eredményeként telepeket képeztek a PAH

vegyülettel kezelt korongokon. Azt vizsgáltuk, hogy egymás jelenlétében milyen mértékben képesek szaporodni, illetve gyakorolnak-e egymásra gátló hatást. A 3.4 fejezetben ismertetett módon az élősejt számolás eredményeit a 2. táblázat tartalmazza, melyet eltérő telepmorfológia alapján állapítottunk meg.

Vizsgált törzspárok	CFU/ml 72 óra után
AK-35 + AK-38 (<i>R. erythropolis</i> + <i>R. gordoniae</i>)	$10^9 \setminus 10^8$
AK-40 + CHB-15p (<i>R. pyridinivorans</i> + <i>R. rhodochrous</i>)	$10^9 \setminus 10^9$
AK-38 + NCP-3 (<i>R. gordoniae</i> + <i>Pseudomonas putida</i>)	$10^8 \setminus 10^9$
TBF2/20.2 + AK-35 (<i>O. oleidegradans</i> + <i>R. erythropolis</i>)	$10^5 \setminus 10^9$
TBF2/20.2 + AK-40 (<i>O. oleidegradans</i> + <i>R. pyridinivorans</i>)	$10^8 \setminus 10^0$
TBF2/20.2 + AK-44 (<i>O. oleidegradans</i> + <i>R. aetherivorans</i>)	$10^9 \setminus 10^0$

2. táblázat a PAH bontási kísérletben alkalmazott törzspárok együtt szaporítási eredményei

Az eredményekből látható, hogy a 72 órás rázatást követően az AK-35 + AK-38, az AK-40 + CHB-15p, valamint az AK-38 + NCP-3 törzspárok voltak képesek közel azonos, és kellőképpen magas élő sejtszámban (CFU/ml, vagyis ml-kénti összes élő sejtszám) szaporodni. A TBF2/20.2 + AK-35 törzspárok esetében a 72 órás rázatást követően az AK-35 volt képes magas élő sejtszámban (10^9 CFU/ml) szaporodni, a TBF2/20.2-vel szemben (10^5 CFU/ml). A TBF2/20.2 + AK-40, valamint a TBF2/20.2 + AK-44 vizsgálata azt az eredményt mutatta mindkét esetben, hogy csak a TBF2/20.2 törzs volt képes növekedésre az együtt szaporítás során. Mivel az AK-35 + AK38 (*Rhodococcus erythropolis* + *R. gordoniae*) törzspár a 72 órás rázatást követően közel azonos és magas élő sejtszámban volt képes szaporodni, a továbbiakban elsőként ezen páros bontási képességét vizsgáltam folyékony tápoldatban, PAH vegyületek bontására.

4.3 PAH bontási kísérlet eredményei

4.3.1 PAH bontás törzskeverékkel

Az analitikai vizsgálatra küldött tápoldatokból visszamért egyes PAH vegyületek mennyiségének átlagát, valamint a kontroll minták (ásványi tápoldat és Tween 80 keveréke) átlagához viszonyított eredményeit a 3. táblázat mutatja be az AK-35 + AK-38 törzskeverék esetében. A táblázat első oszlopában az alkalmazott PAH vegyületeket tüntettem fel. A második oszlopban a kontroll minták eredményei láthatóak, ehhez hasonlítottuk a harmadik oszlopban található, törzspárral beoltott minták eredményeit. A méréseket akkreditált kémiai analitikai laboratórium végezte.

	Kontroll	AK-35 + AK-38 3 ismétlés átlaga	Törzsek bontási%-a kontrollhoz képest
	µg/minta		
BaA	6200	5320	14,2
BaP	6425	5005	22,1
Flu	7305	6835	6,4
BaA + BaP + Flu	19930	17160	13,9

3. táblázat: a 14 napos bontási kísérlet során kémiai analitikával visszamért eredmények

Az eredmények alapján az AK-35 + AK-38 törzskeverék 6-22% közötti mennyiségben bontotta a vizsgált PAH vegyületeket, legnagyobb mértékben (20% feletti) a benz(a)pirént. A három PAH vegyületet együttesen tartalmazó oldat esetében 14% körüli bontást mutatott a kontrollhoz képest az analitikai vizsgálat. A bontások nem jelentős mértékűek, de figyelembe kell venni, hogy a kísérlet időtartama mindösszesen 14 nap volt.

4.3.2 PAH bontás individuális törzsekkel

A törzspárokkal végzett bontási kísérlettel párhuzamosan PAH bontást végeztük individuális törzsekkel is, melyek esetében az inkubációs időt 14 napról 21 napra emeltük. Ezen törzseket a korongdiffúziós vizsgálatok eredményei alapján választottuk ki (1. táblázat). A kísérlet eredményeit a 4. táblázat tartalmazza. Ezen vizsgálatokat 3 párhuzamos ismétlésben végeztem. A mintákat szintén akkreditált laboratórium vizsgálta be.

Minta jele	Bontási % (3 párhuzamos mérés átlaga)		
	Flu	BaA	BaP
AK-35	2,3	0,0	0,6
AK-37	7,8	0,9	11,6
AK-40	12,2	0,7	5,5
AK-44	15,5	1,1	12,2
CHB-15p	2,5	0,0	0,2
TBF2/20.2	0,8	0,0	0,0

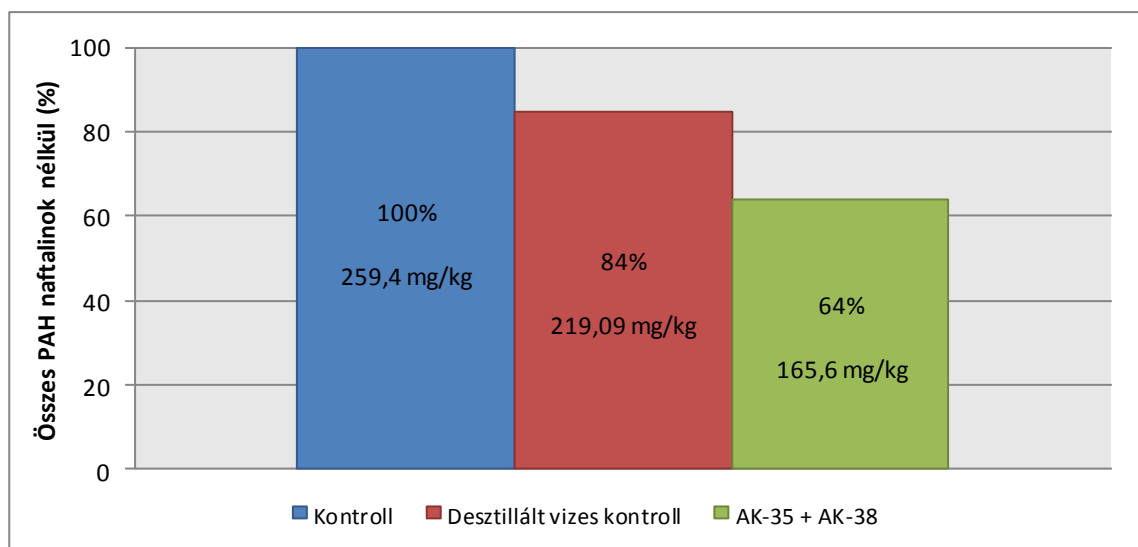
4. táblázat a PAH bontás %-ban a kontrollhoz viszonyítva

Az eredményekből látható, hogy 10% feletti bontást az AK-37, az AK-40, továbbá az AK-44 mutatott. Az előzetesen elvégzett korongos vizsgálat eredményeként ezek a törzsek mindegyike képzett telepeket a filteren. Megfigyelhető, hogy ez esetben a legnagyobb bontási kapacitás 12,2% volt benz(a)pirénre nézve (AK-44), míg az előzőekben leírt törzspár (AK-35+AK-38) ennek közel dupláját eredményezte, kevesebb időintervallum alatt. Ezek alapján elmondható, hogy a két törzset

tartalmazó mikroba konzorciumok nagyobb mértékben voltak képesek a bontásra, annak ellenére, hogy az individuálisan vizsgált törzsek esetében az inkubációs időt egy héttel megnöveltük.

4.4 Az OxiTop talajrespirációs vizsgálat eredményei

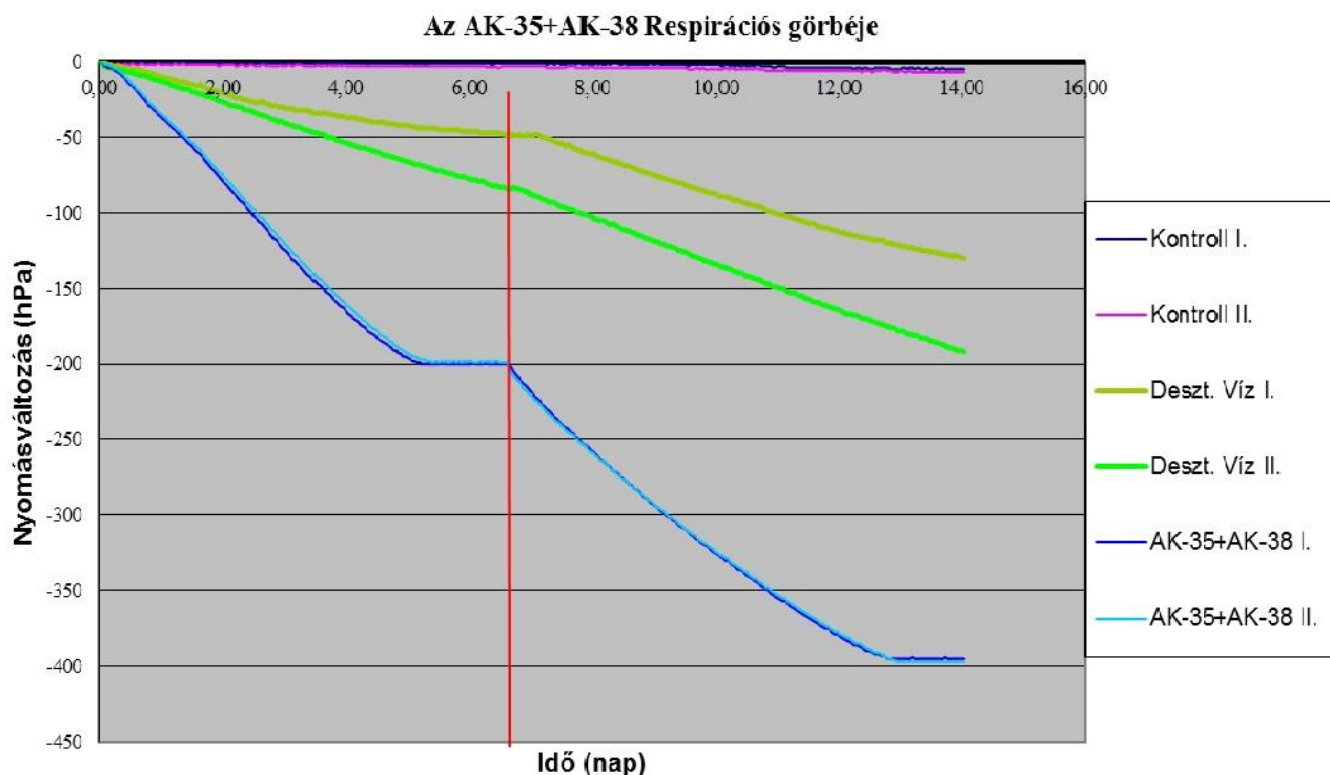
A kísérletben az egyes törzskeverékek, első lépésben az AK-35 + AK-38 bontási képességét vizsgáltuk PAH komponensekkel szennyezett környezeti mintán. A vizsgált törzskeverék egyes tagjai, ugyanis közel azonos, és kellőképpen magas élő sejtszámban voltak képesek szaporodni (4.2 fejezet), valamint eredményeink alapján PAH bontó képességgel bírhatnak. Az OxiTop vizsgálat indításával egy időben a PAH komponensekkel szennyezett kiindulási talajminta kémiai analitikai vizsgálata is megtörtént. Az 1. számú mellékletben tüntettem fel az analitikai vizsgálatok eredményeinek teljes jegyzékét.



5. táblázat Az OxiTop kísérlet kémiai analitikai eredményei

Amennyiben az összes PAH eredményt tekintjük látható, hogy a kiindulási talajminta (1. számú melléklet) eredményéhez (299,59 mg/kg) képest a kezeletlen (Kontroll) minták méréseinek értéke is kevesebb (259,4 mg/kg). Ez 13%-os csökkenést jelent, amely a rendszerben az abiotikus veszteség. A két törzzsel (AK-35+AK-38) beoltott rendszer átlag értéke (165,6 mg/kg), ami összehasonlítva a kezeletlen kontroll átlagával (259,4 mg/kg) 36%-os bontást jelent, de a desztillált vizes kontroll is közel 15%-os csökkenést mutatott. Ez alapján megállapítható, hogy a desztillált vizes kezelés az alkalmazott talajon elősegítette a biodegradációs folyamatokat, de az AK35 + AK-38 törzskeverékkel kezelt talajminta magasabb bontást mutatott.

Az 5. ábrán az OxiTop vizsgálat nyomásváltozásának görbét tüntetem fel. Az ábrán az x tengelyen az idő tényezőt, az y tengelyen a nyomásváltozás látható. Piros vonallal a szelőztetés időpontját jelöltem.

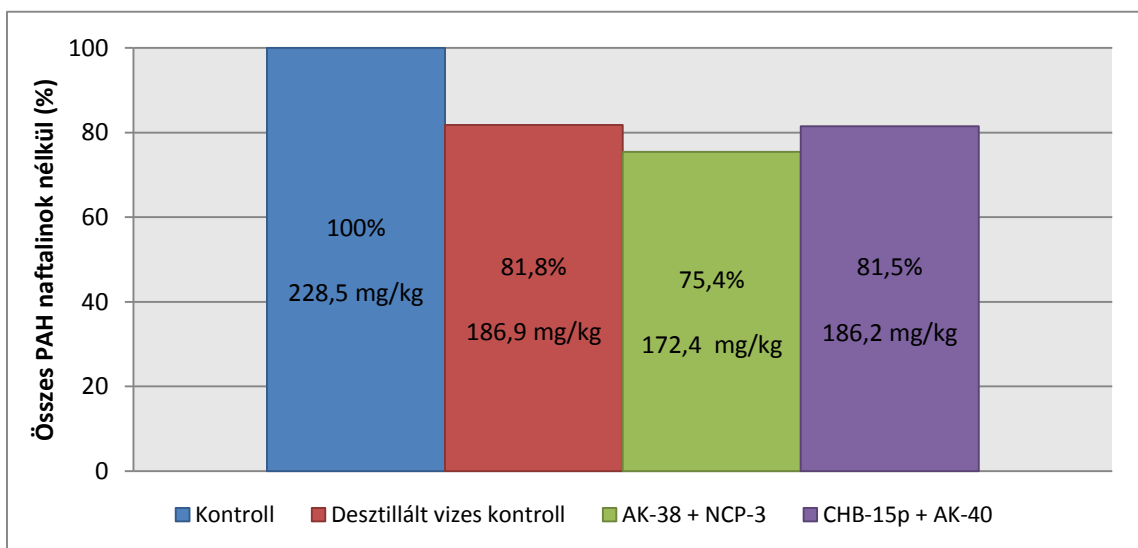


5. ábra Az 1. OxiTop kísérlet során bekövetkezett nyomásváltozás görbéje a különböző kezelések esetében

A vizsgálat során a kezeletlen Kontroll I. és Kontroll II. jelű talajminták esetében minimális respirációs értékek láthatóak, a kirajzolt görbék esetében megfigyelhető, hogy alig hagyják el a 0-10 hPa közötti értéket. Ezzel szemben a desztillált vízzel kezelt talajminták (Deszt. Víz I., Deszt. Víz II.) esetében már közepes respirációs aktivitás figyelhető meg. A törzskeveréket tartalmazó talajminták magas respirációs értékeket adtak a vizsgálat ideje alatt, mely mindkét esetben -390 hPa körüli érték volt. Átlagos nyomáscsökkenés: Kontroll I.-II. = -6 hPa; Deszt. Víz I.-II. = -161 hPa; AK-35+AK-38 I.-II. = -396 hPa.

A következőkben azt kívántuk igazolni, hogy más törzspárokat alkalmazva, melyek együttesen szaporítva kellően magas élő sejtszámban voltak képesek növekedni, továbbá igazoltan jó TPH bontással rendelkeznek, képesek e, ebben a közegben a szennyezőanyagok hasonló mértékű eliminálására. Ebben a kísérletben az AK-38 + NCP-3 (*R. gordoniae* + *Pseudomonas putida*), valamint a CHB-15p + AK 40 (*R. pyridinivorans* + *R. rhodochrous*) párosítással, kiegészítve az előzőekben is alkalmazott desztillált vizes kezeléssel, valamint egy kezeletlen kontroll mintával szintén három párhuzamos ismételtsben. A második OxiTop kísérletben alkalmazott talajmintát újra

homogenizáltuk. A 2. számú mellékletben feltüntettük a homogenizált kiindulási talajminta (RTK-0229) analitikai eredményit. A kezeletlen kontroll minták (Kontroll átlag), a desztillált vízzel kezelt minták- (Desztillált víz), illetve a törzspárokkal {(AK38 + NCP3), (CHB15p + AK-40)} kezelt minták eredményeinek átlaga a 6. táblázatban látható.



6. táblázat A második OxiTop kísérlet kémiai analitikai eredményei

Az első OxiTop-os vizsgálat eredményeihez hasonlóan a desztillált vizes kezelés ebben az esetben is csökkentette (18%-al) a PAH vegyületek mennyiségét, vagyis igazoltuk, hogy a desztillált vizes kezelés esetében is megfigyelhető biodegradáció. Az AK-38 + NCP-3 törzskeverék a kontroll mintához viszonyítva 24%-os bontást mutatott PAH vegyületeken, amely a desztillált vizes kezeléshez viszonyítva 7% többlet. A CHB15p + AK-40 törzskeverék a kezeletlen kontroll mintához viszonyítva közel 18%-os bontást eredményezett, amely a desztillált vizes kezelést kapott minta bontási százalékát megközelítő érték. A vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a kísérletbe vont két új törzspár kevésbé hatékony a PAH vegyületek bontása tekintetében, mint az előzőekben vizsgált AK-35 + AK-38 törzskeverék. A további genetikai nemesítési feladatba ezek alapján az AK-35 (*Rhodococcus erythropolis*) jelzésű törzset vontam be, mivel az eddigi eredmények alapján ez a törzs volt képes a vizsgált törzsgyűjtemény tagjai közül a legnagyobb mértékben poliaromás szénhidrogének bontására.

Dolgozatom következő szakaszában bemutatom az UV besugárzást követően végzett kísérletek eredményeit.

4.5 A Sejtnövekedés monitorozásának eredményei

A bontási kísérletet microplate-n (96 well) állítottam össze. Az UV besugárzást követően az egyes telepeket izoláltam, majd sorszámmal ellátott petricsészére szélesztettem, így minden egyes

telep meghatározott sorszámmal rendelkezett. A szelekciós kísérletben, így különböző időtartamú UV besugárzással (10, 20, 30 másodperc) 90 kezelt telepnek vizsgáltuk a sejtnövekedését, továbbá 6 wellben az AK-35 vad típusú törzset. A rendszerben egyedüli szénforrásként benz(a)pirén állt rendelkezésre. Elsődleges célunk volt, hogy kiválasszunk olyan potenciálisan PAH hasznosító mikroszervezeteket, melyek az UV besugárzás hatására a vad típusú törzsnél nagyobb mértékben képesek poliaromás szennyezőanyagok hasznosítására. Az alábbi, 7. táblázatban láthatóak a kísérlet eredményei.

	Telepek sorszáma	Inkubáció idő (216h)							Növekedési ráta	Sejtnövekedés (%-ban)
		OD _{620nm}								
		0h	24h	48h	72h	120h	168h	216h		
AK-35 vad típus		0,384	0,442	0,834	1,121	1,179	1,194	1,193	0,810	100%
UV-10 sec	12	1,063	1,151	1,382	1,449	1,499	2,154	2,401	1,273	157%
	28	0,763	1,000	1,228	1,394	1,410	1,654	2,036	1,338	165%
UV-20 sec	4	0,520	1,001	1,345	1,424	1,327	1,580	1.619	1,060	130%
	15	0,761	1,120	1,467	1,590	1,573	1,711	1.762	0,950	117%
UV-30 sec	13	0,606	0,940	1,236	1,427	1,581	1,628	1,615	1,009	124%

7. táblázat Az OD_{620nm}-en mért sejtnövekedés eredményei

A táblázat első oszlopában az AK-35 vad típusú törzset, valamint az UV sugárzás időtartamát (10, 20, 30 sec) jelöltük. A vizsgált öt klón sorszáma a táblázat második oszlopában látható. A táblázatban a 216 óra alatt mért optikai denzitás értékek láthatóak, az egyes klónokra, illetve a vad típusú törzsek (6 db) átlagára vonatkoztatva. Mivel a kiindulási érték nem azonos, így a mért értékekből növekedési rátát számoltunk. Az inkubációs idő végén (216 óra), és a nulladik órában mért érték különbségéből megkaptuk a növekedési rátát, melynek értéke %-ban, az AK-35 vad típusú törzsek átlagához viszonyítva, a táblázat utolsó oszlopában látható. Amennyiben a klón növekedési ráta értéke (10% felett) meghaladta a vad típusú törzset, azt a továbbiakban a rázó lombikos kísérletben vizsgáltuk. A táblázatban a vizsgált klónok közül azt az öt telepet tüntettük fel, melyekre ez a feltétel teljesült.

4.6 Rezazurin színreakció eredményei

A második szelekciós kísérletben Rezazurin reagenst alkalmaztunk a szénhidrogén bontás kimutatására. A micropalte-n összeállított rendszerben egyedüli szénforrásként benz(a)pirén állt rendelkezésre. Amennyiben történik szénhidrogén bontás a rendszerben, az pozitív színreakciót eredményez. A kísérlet eredményeit az alábbi, 8. táblázat tartalmazza. A kísérletben az AK-35 vad típusú törzset, valamint a „sejtnövekedés monitorozása” kísérletben jelentős változást mutató, UV

sugárzással kezelt klónokat alkalmaztuk, melyeknek sorszáma a táblázat második oszlopában látható. A Rezazurin sötétkék színű indikátor festék. Amennyiben szénhidrogén hasznosítás történik a bontási rendszerben, az rózsaszín színt eredményez, melyet a vad típusú törzs, és az egyes UV sugárzással kezelt telepek esetében „+”-al jelöltünk.

	Telepek sorszáma	Inkubáció idő (216h)					
		Vizuális meghatározás					
		24h	48h	72h	120h	168h	216h
AK-35 vad típus		-	-	+	+	+	+
UV-10sec	12	+	+	+	+	+	+
	28	+	+	+	+	+	+
UV-20 sec	4	+	+	+	+	+	+
	15	+	+	+	+	+	+
UV-30 sec	13	+	+	+	+	+	+

8. táblázat A rezazurin színreakció eredményei
Jelmagyarázat: „+” színreakció történt „-” nem történt színreakció

4.7 PAH bontási kísérlet folyékony közegben (UV besugárzást követően)

A kísérlettel azt kívántuk igazolni, hogy a microplate-n összeállított bontási rendszerrel szemben, az egyes UV sugárzással kezelt telepek PAH bontó képessége meghaladja e, az AK-35 vad típusú törzs bontási képességét rázó lombikos kísérletben. A szelekciós kísérletekre alapozva azokat az UV sugárzással kezelt telepeket alkalmaztuk, melyeknek sejtnövekedése meghaladta a vad típusú törzset, valamint a Rezazurin színreakció során pozitív eredményt mutatott. A kísérlet eredményeit a 9. táblázat tartalmazza.

PAH bontási kísérlet folyékony közegben (UV) (3 párhuzamos mérés átlaga)		
	Telepek sorszáma	Bontási % (Kontroll)
UV 10sec.	12	24%
	28	23%
UV 20sec.	4	13%
	15	17%
UV 30sec.	13	0%
AK-35 vad típus		22%

9. táblázat A PAH bontási kísérlet eredményei

A táblázat első oszlopában jelöltük az UV sugárzás időtartamát, és a hozzá tartozó klón sorszámat, valamint az AK-35 vad típusú törzset. Az eredmények alapján az a megállapítható, hogy az UV sugárzással kezelt telepek bontási potenciálja nem haladta meg a vad típusú törzs bontási képességét, hiszen a mikrobamentes kontrollhoz viszonyítva a vad típusú törzs 22%-ban, a vizsgált

telepek közül a két legjobb (12, valamint a 28 jelölésű) 24%-ban volt képes a benz(a)pirén bontására a 14 napos inkubációs idő alatt. A bontási százalék a kísérlet eredményei alapján meghaladja a törzskeverékek (4.3 fejezet) esetében tapasztalt nagyságrendet. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy itt azért lehetett intenzívebb a bontás, mert ez esetben csak egy PAH vegyület [benz(a)pirén] szerepelt az oldatban.

4.8 Bontási kísérlet: Gravimetria (UV besugárzást követően)

A szelekciós kísérletekre alapozva, a rázó lombikos kísérlettel párhuzamosan a vad típusú törzs, és az UV sugárzással kezelt telepek szénhidrogénbontó képességét is vizsgáltuk gravimetriás módszerrel. A kísérlettel szintén azt kívántuk igazolni, hogy az egyes UV sugárzással kezelt telepek szénhidrogén bontó képessége meghaladja e, a vad típusú törzs bontó képességét. Az eredményeket az alábbi, 10. táblázat tartalmazza.

Gravimetria (UV) (3 párhuzamos mérés átlaga)		
	Telepek sorszáma	Bontási %
UV 10sec.	12	44%
	28	27%
UV 20sec.	4	18%
	15	31%
UV 30sec.	13	23%
AK-35 vad típus		35%

10. táblázat A gravimetriás mérések eredményei

Az eredmények alapján elmondható, hogy az AK-35 vad típusú törzs 35%-os bontást mutatott, mely értéket az egyes klón telepek közül, a 12. sorszámu volt képes a legnagyobb mértékben meghaladni, így 44%-al csökkenteni a mintha szénhidrogén tartalmát. Vagyis, az UV sugárzás hatására sikerült intenzifikálnunk valamelyest a szénhidrogének bontását. Volt tehát egy olyan klónunk, amelynek a degradációs eredményei (három ismételts szerint) megnövekedtek a 10 másodperces UV sugárzás hatására. Azt, hogy a változás valóban mutáció eredménye genetikai módszerekkel kellene vizsgálnunk, amelyek elvégzése a jövő kutatási feladata.

5 Következtetések és Javaslatok

Vizsgálataink során két szénhidrogénbontásban alkalmazott törzsgyűjtemény, a SAFEREMED, valamint az INNOSAFE tagjainak bontási képességét vizsgáltuk összes alifás szénhidrogén (TPH), valamint policiklikus aromás szénhidrogének (PAH) vonatkozásában.

Első lépésként a törzsgyűjtemény tagjainak szénhidrogén bontó képességét vizsgáltuk gravimetriás módszerrel, majd háromszoros olajos rázatással passzáltuk a törzseket, melynek során a SAFEREMED törzsgyűjtemény tagjai közül az AK-35 (*Rhodococcus erythropolis*), AK-38 (*Rhodococcus gordoniae*), AK-40 (*Rhodococcus rhodochrous*), AK-44 (*Rhodococcus aetherivorans*), továbbá az INNOSAFE törzsgyűjteményből a TBF2/20.2 (*Olivibacter oleidegradans*) mutatott 50% feletti bontást.

Poliaromás szénhidrogének lebonthatóságának vizsgálatát a korongdiffúziós eljárással kezdtük, eszerint a törzsgyűjtemény tagjait szelektáltuk PAH vegyületeken történő növekedésük alapján. A korong diffúziós vizsgálatok során, a SAFEREMED tagjai közül az AK-35 (*Rhodococcus erythropolis*), AK-37 (*Rhodococcus pyridinivorans*), AK-40 (*Rhodococcus rhodochrous*), AK-44 (*Rhodococcus aetherivorans*), és a CHB-15p (*Rhodococcus pyridinivorans*) törzsek növekedtek benz(a)pirén (BaP), benz(a)antracén, (BaA), és fluorantén (Flu) vegyületekkel kezelt korongokon. Az INNOSAFE törzsgyűjteményből kizárólag a TBF2/20.2 (*Olivibacter oleidegradans*) mutatott növekedést, továbbá a 3 PAH vegyület közül csak a benz(a)pirén (BaP), és benz(a)antracén, (BaA) vegyületekkel kezelt korongokon. Ezen törzseket a továbbiakban bontási kísérletbe vontuk. Első lépésben fenti mikrobák tagjaiból törzspárokat alakítottunk ki, amelyekkel vizsgáltuk a PAH vegyületek bontásának mértékét folyékony közegben. Ezzel párhuzamosan végeztünk PAH bontási kísérleteket individuális törzsekkel is, szintén szubmerz tenyészetekben. Az eredmények alapján elmondható, hogy az individuális törzsek esetében az AK-37, AK-40, AK-44, 7,8-15,5% közötti értékben bontották a fluorantént, valamint 5,5-12,2% közötti értékben a benz(a)pirént. Ezzel szemben az AK-35+AK-38 törzskeverék 6-22% közötti mennyiségben bontotta a vizsgált PAH vegyületeket, legnagyobb mértékben (22% feletti) a benz(a)pirént. Mivel a három vizsgált PAH vegyület együttesen volt jelen a rendszerben, egyes szakirodalmak szerint, ezen anyagok gátolhatják egymás lebonthatóságát (Haritash et al.,2009), így elképzelhető, hogy a vizsgált mikroszervezetek ennek következtében nem tudták nagyobb mértékben hasznosítani ezen vegyületeket. Azonban az eredmények alapján megállapítható, hogy a törzskeverék nagyobb bontási potenciállal rendelkezett poliaromás szennyezőanyagok esetében.

Az OxiTop talajrespirációs vizsgálatot két párhuzamos ismételtsben végeztük el. Az eredmények alapján az a megállapítás tehető, hogy az AK-35+AK38 törzskeverék 36%-ban csökkentette a vizsgált talajminta poliaromás szennyezőit. Az AK-38+NCP-3, illetve a CHB15p+AK40 törzspár bontási kapacitása ettől elmaradt. Ezen felül érdekes, hogy a desztillált vizes adagolás is biodegradációs folyamatokat eredményezett. Ennek oka az lehet, hogy a vizsgált talajminta szervezetei között lehetnek olyanok, amelyek képesek ezen szennyezők bontására, de a bontási folyamathoz szükséges víz nem állt rendelkezésre a természetes talajban, elképzelhető tehát, hogy a vizsgált mintához adagolt desztillált víz, egyfajta lökést adott a degradációra képes mikrobaközösség tagjainak. Eredményeim rámutatnak arra, hogy az OxiTop rendszer alkalmas lehet, hogy modellrendszerként alkalmazzuk annak eldöntésére, hogy a célzott talajkezelés esetében milyen beavatkozást válasszunk. A kísérleti eredmények ugyanis megmutatták, hogy megfelelő törzspárok alkalmazásával elérhető a PAH vegyületek biodegradációja, de akár egy vizes kezelés is degradációra készítheti a kárhelyen lévő mikrobaközösséget.

Kísérleti rendszerünk következő szakaszában az AK-35 jelű törzs szénhidrogén bontási képességének intenzifikálását tűztük ki célul UV besugárzás alkalmazásával. Az eddigi eredményeink ugyanis megmutatták, hogy az OxiTop rendszerben, valamint PAH bontást vizsgálva szubmerz tenyészetben ez a törzs rendelkezett legnagyobb mértékben bontó képességgel a vizsgált törzsgyűjtemény tagjai közül. Az UV sugárzásnak kitett telepeket izoláltuk, majd a petricsészére szélesztett sorszámozott telepekből (klónok) microplate-n összeállított szelekciós kísérletekkel kívántuk kiválasztani azokat a telepeket, amelyek PAH bontó képessége meghaladja a vad típusú törzsét. Az eredmények szerint öt UV sugárzással kezelt telep sejtnövekedése haladta meg a vad típusú törzsét benz(a)pirén jelenlétében, valamint ezek a telepek pozitív színreakciót mutattak Rezazurin reagens alkalmazásával. Ezen eredményekre alapozva, öt UV sugárzással kezelt telepnek vizsgáltuk a PAH bontási képességét szubmerz tenyészetben, valamint a szénhidrogén bontását gravimetriás módszerrel. A gravimetriás mérések eredményeit tekintve az 12 jelölésű klón (10 másodpercig UV kezelt) szénhidrogén bontó képessége 44%-volt, mely egyedülként haladta meg a vad típusú törzs 35%-os bontási képességét. Szintén ez a klón a mikrobamentes kontrollhoz viszonyítva 24%-os bontást mutatott, amely csak kis mértékben volt képes meghaladni a vad típusú törzs PAH bontó képességét (22%). A kísérletben csak benz(a)pirén jelenlétében vizsgáltuk a bontást, 100ppm koncentrációban, míg az előzőekben vizsgált törzsek esetében, 450ppm koncentrációban individuálisan a bontás ettől jóval elmaradt, és törzskeverék esetében is 6-22% közötti értéket kaptunk. Ezek alapján elképzelhető, hogy az egyes mikroszervezetek, a túl magas PAH koncentráció következtében nem voltak képesek ezen szennyezőanyagok hasznosítására.

Az OxiTop talajrespirációs vizsgálat, és a PAH bontás vizsgálata folyékony közegben kísérlet esetében 14 nap volt a kontaktidő, azonban néhány szakirodalom 30-40 nap lebontási időt említ, ezért elképzelhető, hogy hosszabb távú kísérlet során jobb bontási hatások érhetőek el poliaromás szennyezőanyagok tekintetében. Javaslatom a további kutatásokat illetően a következők:

- PAH bontásra alkalmas mikroszervezetek további keresése, bontó képességük vizsgálata a kísérleti rendszerünk alapján.
- Az OxiTop rendszerben a desztillált vizes kezelés igazoltan biodegradációs folyamatokat eredményezett, ezért ebből a vizes közegből bontó mikroszervezetek izolálása, faj szintű identifikációja (16S rDNS szekvencia analízis alapján). Amennyiben ezek humán-, és környezetegészségügyi kockázatot nem jelentő törzsek, szénhidrogén bontási kísérletbe történő bevonásuk.
- Az egyes izolált mikroszervezetek PAH bontó képességének vizsgálata mesterségesen kontaminált laboratóriumi mintán, vizsgálva a törzsek individuális bontási képességét.
- Az individuális bontás eredményei alapján azon törzsek kiválasztása, melyek PAH bontási képességgel bírnak, valamint ezen vizsgált törzseknek együttes szaporíthatóságának vizsgálatára irányuló kísérletek elvégzése törzspárok kialakítása céljából.
- Amennyiben a szénhidrogén bontási képesség növekedése igazolt az UV besugárzást követően, a vizsgált törzseknek molekuláris biológiai módszerekkel, a mutáció igazolására irányuló vizsgálatok elvégzése szükséges.
- Fermentációs vizsgálatok az egyes - igazoltan jó bontási képességgel, meghatározott bontási spektrummal rendelkező - törzsekkel, így vizsgálva azok ipari méretű szaporíthatóságának lehetőségét, valamint azt, hogy a későbbiekben alkalmazhatóak-e mint oltóanyag alkotó törzsek bioremediációs kármentesítési technológiákban.

6 Összefoglalás

A poliaromás szénhidrogének, mint szennyezőanyagok, kőolajokban, kőolajszármazékokban, illetve termékeiben előforduló, valamint szerves anyagok tökéletlen égése során keletkező vegyületek, amelyek nehezen lebonthatók, perzisztensek. Környezetvédelmi jelentőségüket növeli, hogy humán egészségügyi hatásaikat tekintve eddig hét PAH vegyületről bizonyosodott be humán karcinogén hatás, továbbá egyeseknek mutagén, teratogén, valamint hormonháztartást zavaró (EDC) hatásaik is ismertek. Munkám célja olyan mikroszervezetek keresése volt, melyek okszerűen alkalmazhatóak PAH vegyületek biológiai lebontására.

Ennek érdekében a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék törzsgyűjteményének felhasználásával olyan mikrobákat választottunk ki, amelyeket korábban kőolajszármazékokkal (TPH, BTEX, PAH) szennyezett területekről (talaj-, talajvízmintákból) izoláltak. A kiválasztott mikroszervezetekkel bontási kísérleteket végeztünk, amelyek során degradációs képességüket vizsgáltuk három munkafázisban. Az első lépésben három PAH vegyület [benz(a)pirén, benz(a)antracén, fluorantén] bontására alkalmas törzseket szelektáltunk. A második szakaszban folyékony táptalajban rázatott mikroba tenyészetet alkalmaztunk, hogy a törzsek PAH degradációs képességét elemezzük. A harmadik munkaszakaszban OxiTop respirációs vizsgálatot végeztünk PAH, és TPH szennyezett kárhelyről származó talajmintán.

Ezen eredményekre alapozva kiválasztottunk olyan törzseket, melyeknek a PAH bontási képességét kívántuk fokozni UV besugárzás alkalmazásával. Egyes szakirodalmak szerint ezzel a módszerrel magasabb bontási képesség érhető el. A módszer lényege olyan genetikai mutáció indukálása, amellyel a degradációs képesség fokozható. A kísérletet három beállításban végeztük, melyben a legjobb bontó (*Rhodococcus erythropolis*), AK-35 vad típusú törzsek telepeit 10, 20, valamint 30 másodpercig UV fénnel kezeltük. A kezelt telepekkel microplate-n összeállított bontási rendszert állítottunk össze, amelyben benza(a)pirén-t alkalmaztunk. Elsődleges célunk volt, hogy kiválasszuk azokat a telepeket, melyek az UV besugárzás hatására magasabb sejtnövekedést mutatnak (OD mérés alapján), mint a vad típusú törzs. Ezzel párhuzamosan szintén szelekciós céllal alkalmaztunk rezazurin színreakción alapuló módszert. A rezazurin reagens pozitív színreakciót ad, amennyiben szénhidrogén bontás történik a rendszerben. Az eredmények alapján kiválasztottuk azokat a telepeket, amelyek a két szelekciós kísérlet alapján jobb eredményt mutattak a vad típusú törzsnél, majd ezeknek *in vitro* folyékony közegben vizsgáltuk a bontási képességét benz(a)pirénnel, illetve gázolaj-kőolaj keverékével. A gravimetrias mérések eredményeként egy UV sugárzással kezelt telep szénhidrogén bontó képessége haladta meg a vad típusú törzsét.

7 Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Szabó István konzulensemnek, valamint a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék, és a Regionális Egyetemi Tudásközpont minden dolgozójának, a rengeteg segítséget, tanácsot, és határtalan türelmet, mely nélkül dolgozatom nem jöhetett volna létre.

A kutatási munka a Kutató Kari Kiválósági Támogatás - Research Centre of Excellence - 17586-4/2013/TUDPOL valamint a GOP 1.1.1-09/1-2010-0224 pályázatok támogatásával valósult meg.

8 Irodalomjegyzék

1. A.K. Haritash, C.P. Kaushik, (2009).: Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of hazardous materials*, **169**, 1-15.3
2. Anton A. (2010) – Bioremediáció: Mikrobiológiai kármentesítési eljárások. Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium, Kármentesítési kézikönyv 5, 5-54p.
3. Atlas R. M. (1981) – Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews*, Vol. 45,(1,): 180-209p
4. Barótfi I. (2000) – Környezettechnika. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 981 p., 312-317p, 566-584p.,
5. Berecz E., Kirnerné Kiss A., Montovay T., Péter L., Raisz I., Sipos L., Szita L., Vorsatz B. (1991) – Kémia műszakiaknak. Tankönyvkiadó, Budapest, 816p., 470-560p.
6. Breuer, H. (2003): Atlasz kémia, Atheneum 2000 kiadó, Budapest, 470 p., 299-334 p
7. Bruckner Gy. (1952): Szerves kémia, I. Kötet, Tankönyvkiadó, Budapest, 795 p., 69-78 p
8. Bruckner Gy. (1955): Szerves Kémia, II. Kötet, Tankönyvkiadó, Budapest, 916 p., 4-102 p
9. Darvas B., Székács A., (2006). Mezőgazdasági Ökotoxikológia. In. Szabad J. (Szerk.): A mutagenitás alapjai. L'Hartmann, Budapest. 143-150p.
10. Debajit Borah., R.N.S. Yadav, (2012):. UV Treatment Increases Hydrocarbon Degrading Potential of *Bacillus spp.* Isolated from Automobile Engines. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, **12**, (6):, 760-763, 2012
11. Furka Á. (1998): Szerves kémia, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest 930 p., 63-318 p
12. Kallimanis A., Kavakiotis K., Perisynakis A., Spröer C., Pukall R., Drainas C., Koukkou A. I., (2009):- *Arthrobacter phenanthrenivorans sp. nov.*, to accommodate the phenanthrene-degrading bacterium *Arthrobacter sp.*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **59**, 275–279p.
13. Kim. J.D., Lee.C.G.,(2007):. Microbial degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil by Bacterium-Fungus Co-cultures. *Biotechnology and Bioprocess engineering*, **12**, 410-416
14. Kovács K., Halmos M. (1976) – A szerves kémia alapjai. Tankönyvkiadó, Budapest, 670 p.
15. Madhuri K. L., Ashutosh B., Koushalya Da., Veena G. (2009):- Degradation of *benzo [a] pyrene* by a novel strain *Bacillus subtilis* BMT4i, *Brazilian Journal of Microbiology*, **40**, 884-892p
16. Madigan M.T., Martinko M.J., Parker J., (2000). Brock, Biology of Microorganism, Chapter 9: Microbial Genetics. 298-299p.
17. Martínková L., Uhnáková B., Pátek M., Nešvera J., Křen V.,(2009): Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*, *Environment International* **35**, 162–177
18. Pesti M., Bíró S., Hornok L., Kevei F., Kucsera J., Maráz A., Szűcs Gy., Vágvolgyi Cs. (2001) – Általános mikrobiológia. Dialóg Campus Kaidó, Budapest-Pécs, 304 p., 60-85. p.

19. R.A.Kanally., S.Harayama., (2000).: Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *Journal of Bacteriology* **182**, 8, 2059-2067
20. Szabó I. M. (1989) – A bioszféra mikrobiológiája, II. kötet. Akadémia Kiadó, Budapest. 1208-1227 p.
21. Szeberényi J. (2004) – Molekuláris sejtbiológia. Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs, 553p., 30-65p., 95-100 p.
22. Szoboszlai S., Kriszt B. (2005) – Környezeti elemek védelme I. Egyetemi jegyzet, Gödöllő
23. Szoboszlai S., Kriszt B. (2006) – Környezeti elemek védelme II. Egyetemi jegyzet, Gödöllő
24. Szoboszlai S., Solymosi J., Kriszt B. (2002) - The biodegradation of hydrocarbon compounds concerning to environmental safety. *Academic and Applied Research in Military Science* 1, 103-106. p.
25. T.F. Guerin., M. Mondido., B. McClenn., B. Peasley.,(2001): Application of resazurin for estimating abundance of contaminant-degrading micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology* **2001**, **332**, 340±-345
26. T.G. Luan., Keith S.H., Yu,Y., Zhong,H.W., Zhou,C.Y.Lan, Nora.,F.Y.Tam., (2006).: Study of metabolites from the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Chemosphere* **65**,1,1 2289-2296
27. Tindall B. J., Rosselló-Móra R., Busse H.-J., Ludwig W., Kampfer P. (2010): Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes,. *International Journal of Systematic an Evolutionary Microbiology*, **60**,:249-2666p.
28. Vivek Kumar. Chaudhary., Debajit Borah B. (2011).: Isolation and Molecular Characterzation of Hydrocarbon Degrading Bacteria from Tannery Effluent. *International Journal of Plant, Animal, and Environmental Sciences*.**1**, 22,, 2231-4490 2011
29. Willumsen P., Karlson U., Stackebrandt E., Kroppenstedt M. R. (2001)- *Mycobacterium frederiksbergense* sp. nov., a novel polycyclic aromatic hydrocarbondegrading *Mycobacterium* sp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*,**51**, 1715–1722
30. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer,(1998): *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Certain Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Heterocyclic Compounds, Volume **3**, 45
31. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer,(1999): *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Some Industrial Chemicals and Dyestuffs Volume **29**, 93
32. Yu S. H., Ke L., Wong Y. S., Tam N. F. (2005) - Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Environment International*, **Vol 31**,(2),:149-1544
33. Yuan J., Lai Q., Zheng T., Shao Z., (2009)- *Novosphingobium indicum* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from a deep-sea environment, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **59**, 2084–2088
34. Zhao B., Wang H., Mao X., Li R. (2009): A rapid screening method for bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons, *Letters in Applied Microbiology*, **49**, 3, p. 408–410)

Felhasznált Internetes oldalak:

http1: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0004/170734/e96640.pdf

http2: http://www.kvvm.hu/cimg/documents/Egeszseg_fugg2_OETI.pdf

http3: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>

http4: <http://enfo.agt.bme.hu/drupal/sites/default/files/Biodegrad%C3%A1ci%C3%B3.pdf>

http5: <http://enfo.agt.bme.hu/drupal/sites/default/files/etanf4.pdf>

http6: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21862321>

http7: <http://www.chem.unep.ch/pops/alts02.html>

A dolgozatomban felhasznált jogszabályok, rendeletek, jegyzéke:

1. Az 1995. évi LIII tv. a környezet védelmének általános szabályairól
2. 6/2009. (IV. 14.) KvVM–EüM–FVM együttes rendelete a földtani közeg és a felszín alatti víz szennyezéssel szembeni védelméhez szükséges határértékekről és a szennyezések méréséről
3. 219/2004 (VII.21.) kormányrendelet a felszín alatti vizek védelméről

9 Mellékletek

1. számú melléklet

Komponens	A minta jele				K bont %	DV bont%
	RTK-1 talajminta	RTK-1 átlag	RTK-1DV átlag	RTK1-AK átlag		
	kiindulási		deszt. víz	AK35/AK38		
	mg/kg					
Naftalin	68,6	59,5	37,05	8,92	85,01	75,9
1-Metilnaftalin	88,4	75,45	70,4	66,07	12,43	6,15
2-Metilnaftalin	102	85,85	73,3	53,33	37,88	27,2
Naftalinok összesen	259	220,8	180,75	128,32	41,88	29,0
Acenaftilén	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	-	-
Acenaftén	1,34	0,86	1,105	1,05	-22,09	4,98
Fluorén	7,5	6,63	6,455	6,19	6,64	4,11
Fenantrén	21,9	20,7	20,1	20,03	3,24	0,35
Antracén	0,61	0,85	0,995	0,8	5,88	19,6
Fluorantén	0,48	0,48	0,5	0,48	0,00	4
Pirén	1,72	1,73	1,815	1,69	2,31	6,89
Benzo[a]antracén	0,9	0,84	0,865	0,79	5,95	8,67
Krizén	3,93	3,58	3,65	3,37	5,87	7,67
Benzo[b]fluorantén	0,5	0,25	0,26	0,3	-20,00	-15
Benzo[k]fluorantén	<0,02	0,25	0,305	0,24	4,00	21,3
Benzo[e]pirén	1,27	1,57	1,545	1,56	0,64	-1
Benzo[a]pirén	0,11	0,27	0,29	0,21	22,22	27,6
Indeno[1,2,3-cd]pirén	<0,02	0,17	0,125	0,14	17,65	-12
Dibenzo[a,h]antracén	0,14	0,2	0,17	0,18	10,00	-5,9
Benzo[ghi]perilén	0,19	0,27	0,165	0,23	14,81	-39
Összes PAH naftalinok nélkül	299,59	259,4	219,09	165,6	36,16	24,4
Összes alifás szénhidrogén	43100	46750	40900	38700	17,22	5,38

11. táblázat A 1. OxiTop kísérlet kémiai analitikai eredményei

2. számú melléklet

Komponens	Kiindulás	Kontroll	Deszt. víz		AK38-NCP3			CHB15p-AK40		
	RTK-0229	átlag	átlag	bont%	átlag	K bont%	DV bont%	átlag	K bont%	DV bont%
Naftalin	60,40	42,95	25,75	40,05	17,60	59,02	31,65	26,07	39,31	-1,23
1-Metilnaftalin	82,70	67,55	60,35	10,66	58,13	13,94	3,67	60,20	10,88	0,25
2-Metilnaftalin	131,00	83,05	66,60	19,81	61,43	26,03	7,76	65,87	20,69	1,10
Naftalinok összesen	274,10	193,55	152,70	21,11	137,17	29,13	10,17	152,13	21,40	0,37
Acenaftilén	<0,02	<0,02	<0,02	-	<0,02	-	-	<0,02	-	-
Acenaftén	0,85	0,81	0,98	-21,74	0,80	1,04	18,71	0,94	-17,18	3,74
Fluorén	6,21	5,13	5,40	-5,37	6,29	-22,80	-16,54	5,94	-15,97	-10,06
Fenantrén	24,90	21,35	20,40	4,45	20,60	3,51	-0,98	20,60	3,51	-0,98
Antracén	0,50	0,42	0,48	-13,10	0,50	-18,25	-4,56	0,45	-6,35	5,96
Fluorantén	0,19	0,96	0,95	1,05	0,72	24,96	24,16	0,32	66,84	66,49
Pirén	0,63	1,19	1,16	2,94	1,29	-8,68	-11,98	0,99	16,81	14,29
Benzo[a]antracén	0,44	0,39	0,38	2,60	0,48	-24,68	-28,00	0,41	-7,36	-10,22
Krizén	1,60	1,95	1,71	12,08	1,55	20,48	9,55	1,50	22,88	12,28
Benzo[b]fluorantén	0,52	0,60	0,58	3,36	0,65	-9,24	-13,04	0,61	-1,96	-5,51
Benzo[k]fluorantén	0,47	0,06	0,05	9,09	0,05	9,09	0,00	0,03	39,39	33,33
Benzo[e]pirén	1,31	1,63	1,61	1,53	1,73	-6,13	-7,79	1,71	-4,91	-6,54
Benzo[a]pirén	0,19	<0,02	<0,02	-	<0,02	-	-	<0,02	-	-
Indeno[1,2,3-cd]pirén	0,19	<0,02	<0,02	-	<0,02	-	-	<0,02	-	-
Dibenzo[a,h]antracén	0,20	0,23	0,26	-10,87	0,25	-10,14	0,65	0,24	-4,35	5,88
Benzo[ghi]perilén	0,26	0,24	0,24	-2,13	0,34	-44,68	-41,67	0,31	-30,50	-27,78
Összes PAH naftalinok nélkül	312,56	228,47	186,87	18,21	172,41	24,54	7,73	186,18	18,51	0,36
(TPH C5-C40)	42500,00	42400,00	42500,00	-0,24	43366,67	-2,28	-2,04	42900,00	-1,18	-0,94

12. táblázat A 2 OxiTop vizsgálat kémiai analitika eredményei