

Mészáros Éva

**Tetra- és triklóretén talajvíz-szennyezők lebontásában résztvevő anaerob  
mikrobaközösségek vizsgálata**

Doktori értekezés tézisei



Témavezető:  
Dr. Márialigeti Károly  
egyetemi tanár

Doktori Iskola vezető:  
Dr. Jánosi Imre  
egyetemi tanár

Programvezető:  
Dr. Ács Éva  
tudományos tanácsadó

ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszék  
Budapest  
2015.

## I. Bevezetés

A múlt század elejétől jelentősen megnövekedett ipari, mezőgazdasági és katonai tevékenység óriási mértékű környezetszennyezést idézett elő világszerte. A környezetbe jutott számos antropogén eredetű vegyület komoly kihívást jelent a környezet számára, mivel a természetes rendszerek nem adaptálódtak ezeknek az anyagoknak a gyors lebontásához.

A halogénezett szénhidrogének, köztük a klórozott rövid szénláncú vegyületek (pl. tetraklórétén [PCE], triklórétén [TCE], diklórétén [DCE], vinil-klorid [VC], széntetraklorid, kloroform, diklórmetán és klórmetán) a leggyakoribb talajvíz-szennyezők közé tartoznak Magyarországon (több ezer szennyezett helyszín található hazánkban). Egykor széleskörűen használták azokat az iparban, a mezőgazdaságban és a háztartásokban oldószerként, csíraölőként és zsirtalanítóként. Akut és krónikus mérgezőképességük, a környezetben való felhalmozódásuk, nehézkes lebomlásuk miatt e vegyületek nagy gondot jelentenek mind a természetes környezetre, mind ránk, emberekre nézve.

Fiziko-kémiai tulajdonságaik miatt akumulálódhatnak anoxikus ökoszisztémákban: üledékben, iszapban, talajban és talajvízben. A szennyezők kis koncentrációban folyamatosan beoldódhatnak a talajvízbe, hosszú időre elszennyezve a területet. A talajvíz áramlásával a szennyezés igen messzire eljuthat a forrásától, ivóvízbázisokat veszélyeztethetve.

A felszín alatti vizek védelme, illetve a nagy elterjedtségű és jelentős mérgezőképességű klórozott szénhidrogén szennyeződéstől való kármentesítése kiemelt fontosságú, hiszen Magyarországon az ivóvízellátás 95%-a felszín alatti vizekből történik.

## II. Célkitűzések

Munkánk során négyféle különböző vizsgálatot végeztünk a dehalogénáló közösségek részletesebb megismerésére, feltárására.

Az első kísérletsorozatban célunk volt többféle kémiai és geológiai paraméterű területről, több különböző mélységből vett talajvízminta Archaea közösségének részletesebb megismerése, diverzitásának vizsgálata molekuláris ujjlenyomat módszerekkel. Ehhez olyan monitorozási eljárásokat kellett kidolgoznunk, amelyek gyorsak, hatékonyak, nagy mintaszámnál is kivitelezhetőek és alkalmasak a diverzitás-különbségek detektálására összefüggésben a kémiai paraméterekkel. A kémiai eredményekre alapozva egyéb (nem Archaea) mikrobacsoportok jelenlétére is következtetni szerettünk volna, továbbá az alkalmazott *in situ* bioremediációs technikát is értékeltük.

A második vizgálatsorozatban különböző deklorináló rendszerek (talajvíz, mesterséges lúp, mikrokozmosz és dúsító kultúrák) *Dehalococcoides* sp. és redukív dehalogenáz (*tceA*, *bvcA* és *vcrA*) diverzitását vetettük össze. A rendszereknek ugyanaz a talajvíz volt a forrásuk, ám eltértek az „uralkodó” környezeti feltételekben, a rendszer komplexitásában és heterogenitásában ugyanúgy, mint a deklorinációs aktivitás fokában. Ezek a különbségek okozhatták a *Dehalococcoides* populációk szelektív dúsulását különböző dehalogenáz génekkel, ami aztán hatással lehetett az *in situ* deklorinációs aktivitásra. Ebben a kísérletsorozatban a következő kérdéseket fogalmaztuk meg: 1) a laboratóriumi mikrokozmoszokban dúsított *Dehalococcoides* sp. reprezentálja-e a teljes vizgált terület *Dehalococcoides* diverzitását; 2) hogyan befolyásolják a környezeti körülmények (pl. kémiai- és geológiai paraméterek), beleértve a dúsítási körülményeket is, a *Dehalococcoides* diverzitást és annak kulcs enzimeit; és 3) a *vcrA* és a *bvcA* gének együttesen társulnak-e a klórozott etének teljes dehalogenációjához?

Harmadik vizgálatunkban egy molekuláris módszert „single-nucleotide primer extension” (SNuPE) módszert fejlesztettünk, amellyel PCR termékekben található specifikus szekvenciák, jelen esetben különböző redukív dehalogenáz (RDáz) gének kimutatását és azonosítását kívántuk megvalósítani.

Negyedik vizgálatunkban háromfázisú mikrokozmoszokat állítottunk össze talaj, szubsztrátok és nyomelemek adagolásával, mivel korábbi elemzések a TCE részleges deklorinációját mutatták kétfázisú rendszerekben. Ez feltételezhetően a megfelelő felület, és ezáltal a biofilm képzés képességének hiányával volt magyarázható. Komplex kémiai és molekuláris biológiai megközelítést alkalmaztunk, molekuláris ujjlenyomat módszerekkel követtük nyomon a bakteriális közösség szerkezetben kialakult változásokat, meghatároztuk a halorespiráló baktériumok jelenlétét és következtettünk aktivitásukra különböző mikrokozmosz körülmények között. Vizgálatunk célja az volt, hogy stimuláljuk a TCE teljes bomlását, és hogy meghatározzuk az *in situ* bioremediáció során alkalmazható legsikeresebb elektron donort.

### III. Az alkalmazott módszerek

**Mintavétel.** Az Archaea diverzitás-vizgálatokhoz és a háromfázisú mikrokozmosz kísérletekhez egy magyarországi szennyezett ipari területről gyűjtöttük mintáinkat. A diverzitás vizgálatokhoz a szennyezett terület különböző pontjairól, illetve a szennyezés különböző mélységeiből és a csóva eltérő koncentrációjú pontjaiból vettünk mintát. A háromfázisú mikrokozmoszok összeállításához használt talajvíz minták egy *in situ* bioremediációs beavatkozás után

gyűjtöttük. A *Dehalococcoides* diverzitás-vizsgálatokhoz és a SNUPE módszer fejlesztéshez használt talajvíz, mesterséges lár és mikrokozmosz minták mind egy klórozott eténnel szennyezett csóvából származtak, ami a Bitterfeld/Wolfen ipari szennyezett területen, Németország keleti felén található.

**Kísérletek összeállítása.** Anaerob mikrokozmoszokat állítottunk össze a SNUPE módszer fejlesztéshez. Acetát szolgált szénforrásként, a hidrogén pedig elektron donorként. Elektron akceptorként VC, c-DCE, TCE és PCE szolgált. A különböző típusú mikrokozmoszokat 1 ml *BTF08* dúsító kultúrával oltottuk be.

A háromfázisú mikrokozmosz kísérletekhez 2 liter talajvizet koncentráltunk 0,2 µm pórusméretű membránon szűrve egy általunk fejlesztett, új, anaerob eljárást alkalmazva. A szűrés alatt, a talajvízmintába folyamatosan nitrogén gázt áramoltattunk, hogy az üvegben folyamatos túlnyomás biztosítsunk, kényszerítve ezáltal a talajvíz mintát, hogy a másik csövön át távozzon a szűrőberendezésre, ami a 0,2 µm pórusméretű membránt tartalmazta. A szűrőberendezés felső részét folyamatos szén-dioxid áram alatt tartottuk, így elkerülve az oxigén beoldódását. A membránt anaerob tápközegbe helyeztük, ez szolgált később oltókultúráként. Talajt alkalmaztunk harmadik fázisként, hogy biztosítsuk a megfelelő felületet a baktériumok megtelepedéséhez. Acetátot adagoltunk szénforrásként, hidrogént pedig elektron donorként, az elektron akceptor TCE volt.

**Kémiai mérések.** A kémiai mérésekre egy akkreditált laboratóriumban került sor, ahol vízkémiai paramétereket, *etánt*, *etént*, *metánt* és *halogénezett szénhidrogéneket* mértek számunkra. A biodegradációs folyamatokat gázkromatográfiás módszerekkel követtük nyomon, láng ionizációs detektálást alkalmazva.

**Nukleinsav kivonás.** Az Archaea közösségi vizsgálatok során a DNS kinyerést a membrán „szűrőkből” végeztük UltraClean™ Water DNA Isolation Kittal a gyártó előírásait követve hajtottuk végre. A *Dehalococcoides* diverzitás-vizsgálatoknál a DNS kivonás a membrán szűrőkből és a mikrokozmosz mintákból történt. A háromfázisú mikrokozmoszok esetében 1.5 ml vízmintát vettünk minden mikrokozmoszból a közösségi DNS kivonáshoz, amit MoBio Soil Kit alkalmazásával, a gyártó útmutatását követve, az alternatív lízis protokollt alkalmazva végeztünk.

A SNUPE módszer fejlesztése során teljes RNS-t izoláltunk a különböző kezelésű mikrokozmosz mintákból. A teljes RNS kivonáshoz RNeasy mini kitet használtunk, a sejteket mechanikailag tártuk fel FastPrep készülék segítségével. A háromfázisú mikrokozmosz minták esetében a teljes RNS-t egy alternatív protokollt követve.

**Polimeráz lánreakció (PCR).** A 16S rRNS gén felszaporítását Bacteria-, illetve Archaea specifikus univerzális primerekkel végeztük. Taxon-specifikus 16S rRNS-alapú PCR amplifikációkat alkalmaztunk a deklorináló mikroorganizmusok kimutatására, úgy, mint *Dehalococcoides* sp., *Desulfitobacterium dehalogenans*,

*Dehalobacter restrictus*, *Desulfomonile tiedjei*, *Desulfuromonas chloroethenica*. Három RDáz gént – *vcrA*, *bvcA* és *tceA* – amplifikáltunk PCR során.

**Kalibrációs eljárások a *Dehalococcoides* diverzitás-vizsgálatokhoz.** A diverzitás-vizsgálatok során, a Cornell és Pinellas alcsoportok sokféleségét a *Dehalococcoides*-en belül direkt bázissorrend elemzéssel vizsgáltuk.

**Az új módszer fejlesztése – SNUPE.** Egy újfajta molekuláris próbát fejlesztettünk a különböző dehalogenáz csoportok expressziójának kimutatására, ami SNUPE módszeren alapult. Hét különböző RDáz csoportot azonosítottunk a klónszekvenciák alapján és öt csoport-specifikus SNUPE próbát terveztünk, amelyek az öt főbb csoportot célozták meg.

**Reverz transzkripció.** Az RT reakcióhoz RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit-et, illetve random hexamer primert használtunk és a gyártó útmutatását követtük.

**Archaea közösség elemzés.** A restriktions enzimekkel emésztett, majd etanol precipitációval tisztított PCR termékeket kapilláris gélelektroforézissel választottuk el. Az elektroferogramokat GeneMapper v3.7 szoftver segítségével, Microsatellite módszerrel elemeztük.

**Bacteria közösség elemzés.** A baktérium közösség szerkezetében időben bekövetkező változások vizsgálatára T-RFLP molekuláris ujjlenyomat módszert alkalmaztunk. Az elemzést az Archaea közösség elemzésnél leírtaknak megfelelően végeztük el. Az adatokat T-REX (T-RFLP Analysis Expedited) szoftverrel dolgoztuk fel és elemeztük.

**Klónkönyvtár létrehozása.** Kék-fehér szelekción alapuló eljárással klónkönyvtárat hoztunk létre, klónjainkat ARDRA módszerrel csoportosítottuk és a csoportreprezentánsokat bázissorrend analízissel határoztuk meg.

**Filogenetikai vizsgálatok.** A rokon taxonok szekvenciáit az RDP és az NCBI adatbázisból töltöttük le. Az így kapott szekvenciákat a saját klón szekvenciáinkkal ARB-SILVA internetes programcsomag segítségével illesztettük. Filogenetikai törzsfát szerkesztettünk.

**Statisztikai módszerek.** Az Archaea diverzitás-vizsgálatok során a környezeti változók és a T-RFLP eredmények közötti összefüggéseket többváltozós statisztikai módszerrel vizsgáltuk, ordinációs eljárást alkalmazva. A háromfázisú mikrokozmoszok T-RFLP adatainak elemzéséhez a T-REX program által számolt mátrixot, ami a csúcs alatti területeken alapult, kétdimenziós *főkomponens elemzéshez* használtuk fel PAST programban.

## IV. Összefoglaló értékelés

I. Az első kísérletek során egy *in situ* kármentesítési terület Archaea közösségek diverzitását vizsgáltuk ujjlenyomat módszerekkel.

1. Kidolgoztunk egy **gyors, monitorozási eljárást, amivel képesek voltunk a diverzitás-különbségeket detektálni összefüggésben a kémiai paraméterekkel.**

2. A kémiai eredmények értékelése során megállapítottuk, hogy **a hatékony dehalogenációs folyamatokat leginkább a szulfát és a TOC koncentrációja, a beadagolt szubsztrát tulajdonságai és a terület geológiai paraméterei** (pl. a talajvíz áramlási iránya) **befolyásolják.**

3. A **többszörös statisztikai vizsgálatokból** meghatároztuk, hogy mely **kémiai paraméterek gyakorolnak együttes hatást a minták elválására**, tehát közvetve az Archaea közösség diverzitására. Megfigyeltük, hogy bizonyos T-RF-ek (illetve a nekik megfelelő taxonómiai egységek) minden mintában abundánsak voltak, míg mások területspecifikusnak bizonyultak.

II. A második vizsgálat során, a *Dehalococcoides* sp. jelenlétét illetve diverzitását vizsgáltuk, és a három RDáz génjét különböző rendszerekben, amelyek olyan talajvízzel voltak táplálva, amelyek ugyanabból a Bitterfeld/Wolfen forrásból származtak.

1. Eredményeink azt mutatták, hogy a bitterfeldi területről származó, **dúsított *Dehalococcoides* sp. jellemző a vizsgált területre** és minden rendszerben jelen van. Továbbá, mindkét vinil-klorid redukáló dehalogenáz kulcs enzimet, a *vcrA*-t és a *bvcA*-t, párhuzamosan ki tudtuk mutatni, ami arra utal, hogy **mindkét gén fontos a klórozott etének etéig történő dehalogenációjában.**

2. Megállapítottuk, hogy **a *Dehalococcoides* 16S rRNS gén diverzitását nem befolyásolták a különböző környezeti vagy dúsítási körülmények.** Ezzel szemben, az RDáz gén diverzitását befolyásolták, igazolva ezzel, hogy **monitorozási célból, a kulcs lebontó gének detektálása nagyobb fontossággal bír,** összehasonlítva a kizárólagos riboszómális gének kimutatásán alapuló vizsgálattal. A *tceA* gén esetében, a pozitív PCR amplifikáció hiánya nem feltétlenül helytálló, mivel ugyanazok vagy sok más szervezet, hasonló génekkel, átveheti a TCE dehalogenációt. Mindamellet, *tceA*-t nem tudtunk kimutatni az általunk vizsgált rendszerekben. Azonban, ezt nem jelenti azt, hogy a TCE nem bomlott le, mivel ezt a folyamatot sikerült kimutatnunk a mikrokozmoszokban, így ez is alátámasztja, hogy **azonos 16S szekvenciával rendelkező *Dehalococcoides* törzsek különböző**

**funkcionalitással rendelkeznek, vagyis nagyon különböző enzimekészleteket tartalmazhatnak.**

3. Vizsgálataink azt mutatták, hogy **egy faj, sőt egy törzs lehet jelen, de e mögött az egy törzs mögött számos genetikailag különböző katabolikus génkészlet található és a környezeti tényezőktől függően az egyik illetve a másik populáció válik dominánssá.**

4. Gyakorlatban, amikor a klórozott etének eténig történő dehalogenációs potenciálját próbáljuk felbecsülni, a specifikus dehalogenáz gének jelenlétét és diverzitását is meg kell vizsgálnunk. Megállapítottuk, hogy **a geokémiai paraméterek állandó monitorozása mellett szükség lehet a taxon-specifikus és a deklorinációban részt vevő katabolikus gének jelenlét/hiány-alapú vizsgálatára, ahhoz, hogy jobban megismerhessük a klórozott eténekkal szennyezett területeken zajló mikrobiális folyamatokat.**

**III.** A halogénezett szénhidrogén szennyezések esetében fontos tisztában lennünk a szennyezett területen jelenlévő mikrobiális és a lebontás szempontjából fontos funkciógen diverzitással.

1. Ezért fejlesztettünk **egy új molekuláris módszert, ami lehetőséget adott a dehalogenáz gének kimutatására és vizsgálatára szennyezett területeken.** Továbbá meghatároztuk a lehetséges redukív dehalogenázok szubsztrát tartományát, illetve vizsgáltuk expressziójukat különböző körülmények között.

2. Megállapítottuk, hogy korlátai/hibái mellett, illetve ezek ismeretében **a SNUPE módszer alkalmas lehet katabolikus gének, jelen esetben a dehalogenációs folyamatokban alapvető fontosságú RDáz gének expressziójának vizsgálatára.** Két csoportot sikerült detektálnunk mRNS alapú vizsgálatok során, melyek közül az egyik **feltételezhetően egy új triklóretén redukáz gén.**

**IV.** A háromfázisú mikrokozmosz kísérletekben TCE bontásra képes mikrokozmoszokat állítottunk össze egy szennyezett területről származó koncentrált talajvizet alkalmazva.

1. **A leghatékonyabb TCE deklorináció a bennszülött mikrobák által valósult meg elektron donor adagolás nélkül, ahol a VC nagyobb koncentrációban képződött, mint bármelyik más mikrokozmoszban.** A TCE bontás egy lépéssel tovább is ment és **etén megjelenését** tudtuk detektálni a biotikus mikrokozmoszokban.

2. **Az elektron donor és a hidrogén adagolás gyors, de nem teljes, VC-ig történő TCE degradációt eredményezett.** Ezek a megfigyelések **ellentmondanak a korábbi kísérleti eredményeknek,** ahol molekuláris hidrogén és acetát, mint elektron donor illetve szénforrás adagolással teljes TCE degradációt értek el.

3. A biotikus kontroll esetében feltételeztük, hogy a korábbi, a **mintavételi területen történt, savanyú savó adagolás következtében az inokulánsként alkalmazott őshonos mikroba közösség pusztán tápanyag adagolással is képes volt a dehalogenációra.** A deklorináló baktériumokat, amelyek már a kiindulási mintában jelen voltak, a bennszülött mikroorganizmusok koncentráálásával és tápanyag illetve B<sub>12</sub> vitamin adagolással dúsítottuk.

4. A kémiai vizsgálatok, a taxon- és funkció specifikus kimutatások azt mutatták, hogy **minden mikrokozmoszban megvolt a lehetőség a TCE teljes, eténig történő degradációjára, de az acetát adagolás mérsékelte a közösségi lebontást.** Ezt később a T-RFLP molekuláris ujjlenyomat eredmények is alátámasztottak. **Jelentős csökkenést figyeltünk meg a mikrokozmoszok bakteriális diverzitásában minden mikrokozmosz esetében és a deklorináló baktériumok kisselektálódását.** A biotikus mikrokozmoszban, ahol a TCE biodegradációja eténig történt meg, a fő csúcs *AluI* emésztést követően a 130 bp-os volt, mely a *Dehalococcoides* sp.-nek feleltethető meg. Az acetát kezelésű mikrokozmoszban a fő csúcs a 113 bp-os volt, amely a *S. halorespirans*-nak feleltethető meg. Továbbá, utalva a relatív T-RF csúcs alatti területekre RNS alapon, a kiindulási mintában a *S. halorespirans* és a *Dehalococcoides* sp. aránya 15,8:4,3% volt. Az acetát kezelésű mikrokozmoszok esetében ez az arány 32,5:0,3% volt, míg a biotikus kontroll esetében 2,4:29,7%. Ezek az adatok is megerősítik, hogy a különböző szerkezetű bakteriális közösségek teljesen különböző dehalogenációs képességekkel jellemezhetőek.

5. A laboratóriumi mikrokozmosz kísérletek értékes eredményeket szolgáltatottak egy *in situ* bioremediációs beavatkozás tervezéséhez, és igazolták a három-fázisú mikrokozmoszok szükségességét ahhoz, hogy autentikusabban tudjuk követni az *in situ* zajló mikrobiális folyamatokat.



## V. A tézisek alapjául szolgáló közlemények

**Mészáros, É., Sipos, R., Pál, R., Romsics, Cs., Márialigeti, K.** 2013. Stimulation of trichloroethene biodegradation in anaerobic three-phase microcosms. *International Biodeterioration and Biodegradation* 84: 126-133.

**Mészáros, É., Imfeld, G., Nikolausz, M., Nijenhuis, I.** 2013. Occurrence of *Dehalococcoides* and reductive dehalogenase genes in microcosms, a constructed wetland and groundwater from a chlorinated ethene contaminated field site as indicators for *in situ* reductive dehalogenation. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224: 1768.

## VI. Egyéb, a témában megjelent közlemények

Révész, S., Sipos, R., Kende, A., Rikker, T., Romsics, C., **Mészáros, É.,** Mohr, A., Táncsics, A., Márialigeti, K. 2006. Bacterial community changes in TCE biodegradation detected in microcosm experiments. *International Biodeterioration and Biodegradation* 58, 239-247.

Imfeld, G., Aragones, C.E., Fetzer, I., **Mészáros, É.,** Zeiger, S., Nijenhuis, I., Nikolausz, M., Delerce S., Richnow H.H. 2010. Characterization of microbial communities in the aqueous phase of a constructed model wetland treating 1,2-dichloroethene-contaminated groundwater. *FEMS Microbiology Ecology* 72, 74-88.

## VII. Egyéb közlemények

Tamás, É., Mara, Gy., Sipos, R., **Mészáros, É.,** Márialigeti, K., Lányi, Sz. 2010. Detection of genes from soil bacteria with role in the organic nitrogen and phosphorus mobilization, *Studia UBB Chemia*, LV, Sp. Iss., 143-150.

Pohner, Zs., Ács, É., Borsodi, A., Kiss, K.T., Palatinszky, M. Nagy Reskóné, M., Várbíró, G., **Mészáros, É.,** Duleba, M., Bíró, P. 2011. Bevonatban élő mikrobaközösségek genetikai diverzitásának összehasonlítása a Balaton két eltérő medencéjében, *Hidrológiai közlöny*, 91: 68-72.