B 3869

A PSEUDOMONAS BUTANOVORA BIOTECHNOLÓGIAI ALKALMAZÁSAINAK VIZSGÁLATA

Doktori értekezés

Készítette:

Kesserű Péter

molekuláris biológia és biotechnológia ágazatú biológus

Témavezető:

Dr. Kovács Kornél

Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány Biotechnológiai Intézet

Szeged, 2002.

TARTALOMJEGYZÉK

I. Bevezetés 4

II. Irodalmi áttekintés 5

Nitrátmentesítés jelentősége, a nitrát káros hatásai 5

1. A nitrát szerepe a természetben 5

2. A nitrát emberi szervezetre gyakorolt hatása 8

2.1. A nitrát szervezetbe kerülésének módjai 8

2.2. A nitrát egészségkárosító hatása 10

2.2.1. Methemoglobinemia 10

2.2.2. Rákos folyamatok előidézése 11

2.2.3. A nitrát- és nitritionok hatása a reprodukciós folyamatokra 13

3. A nitrát mennyiségének kontrollálása, egészségügyi határértékek meghatározása 13

4. Nitrátmentesítő technológiák 14

4.1. Kémiai rendszerek, ioncsere, membrán technológia 14

4.2. Biológiai rendszerek 14

4.2.1. Denitrifikáló bioreaktorok 17

4.2.2. Immobilizálás gélmátrix belsejébe 18

4.2.2.1. Az alginát bemutatása 18

4.2.2.2.A Gellan gum bemutatása 20

4.3. Kombinált rendszerek 21

5. A biológiai denitrifikáció 21

5.1. A denitrifikáció enzimrendszere 21

5.1.1. A denitrifikáció első lépése 22

5.1.2. A denitrifikáció második lépése 23

5.1.3. A denitrifikáció harmadik lépése 24

5.1.4. A denitrifikáció negyedik lépése 24

5.2. A denitirifkáció szabályozása 25

5.2.1. A szabályozás génszintű mechanizmusa 25

5.2.2. Szabályozás az enzimműködés szintjén 27

5.2.3. Szabályozás az elektrontranszport szintjén 27

6. A denitrifikálók Martienssen és Schöps féle rendszere 27

A “hasznos” nitrát ionok alkalmazás bioremediációs eljárásokban 29

7. Az aromás és policiklusos aromás szénhidrogének (PAH) 29

8. A PAH lebontás biokémiai és genetikai háttere 30

9. Bioremediációs technológiák 32

10. A nitrát szerepe az in situ bioremediációban 33

11. A *Pseudomonas* genus tagjainak szerepe a talajok nitráttartalmának csökkentésében 35

12. *P. butanovora* bemutatása 37
III. Célkitűzések 38
IV. Anyagok és módszerek 40
1. Anyagok 40
2. Törzsizoláció, törzsszelekció 40
2.1. A baktériumok izolálása és tenyésztési körülményeik 40
2.2. A vizsgált mikroorganizmusok 41
3. Denitrifikáló bioreaktor kifejlesztése 41
3.1. Nitrát-, nitritredukció meghatározása. 41
3.2. Nagy nyomású folyadék kromatográfiás (HPLC) analízis 42
3.3. A biofilmhordozók eredete és a hordozók nitrátkötésének vizsgálata 42
3.4. Reaktor típusú nitrátkötési kísérletek 43
3.5. A baktériumok kikötődésének vizsgálata, biofilm képzés 43
3.6. A biofilm mennyiségének meghatározása 43
3.7. A biofilm denitrifikációs aktivitásának meghatározása 44
3.8. Immobilizálás kompozit mátrixba 44
3.9. Bioreaktorok I. működtetése 45
3.10. Bioreaktorok II. működtetése 46
3.11.A pilot bioreaktor működtetése 46
3.12. A HRT és a denitrifikációs aktivitások kiszámítása 47
3.13. A *P. butanovora* sejtek oxigénfogyasztásának meghatározása 48
4. Denitrifikáció magas só- és nitrát-koncentrációk mellett 48
4.1. A baktériumnövekedés sótoleranciájának meghatározása 48
4.2. A denitirifikáció magas Na^+- és NO_3^--N-koncentráció mellett 49
4.3. A nitrát-és nitritredukció pH-függésének meghatározása 49
4.4. A magas nitrát-, és sókoncentráció mellett működő bioreaktorok 50
5. Aromás anyagok és a nitrát kometabolizmusa 50
5.1. Szalicilát mennyiségének mérése 50
5.2. A szalicilát-hidroxiláz aktivitásának mérése 50
5.3. Katekol 2,3-dioxigenáz enzim mérése 51
5.4. A nitrát-szalicilát kometabolizmus mérése kemosztátban 51
5.5. Foszfát- és szulfátionok hatása a szalicilát kometabolizmusra 52
5.6. A nehézfémionok hatása a növekedésre, a denitrifikációra, a szalicilát bontására 52
6. Felhasznált eszközök, berendezések listája 53
7. Alkalmazott statisztikai módszerek 53
V. Eredmények 54
V.1. Denitrifikáló bioreaktor kifejlesztése 54
1.1 Denitrifikáló baktériumok izolálása 55
1.2. A bioreaktorok I. aktivitásainak vizsgálata 56

1.2.1. A felületi hordozók nitrát kötésének vizsgálata 56
1.2.2. A baktériumok kikötődésének vizsgálata, ... 57
a biofilmek denitirifikációs aktivitásai
1.2.3. A *P. butanovora* bioreaktorok aktivitásának bemutatása 58
1.2.4. A *P. denitrificans* bioreaktorok aktivitásának bemutatása 59
1.2.5. A kompozit gyöngyös reaktorok összehasonlítása 60
1.2.6. A *P. butanovora* és a *P. stutzeri* reaktorok összehasonlítása 60
1.2.7. A részeredményenek összefoglalása 61
1.3. Bioreaktorok II. működtetése 62
1.3.1. Denitrifikációs aktivitások 9:1-es C:N arány mellett 62
1.3.2. Denitrifikációs aktivitások 6:1-es C:N arány mellett 64
1.3.3. Denitrifikációs aktivitások 3:1-es C:N arány mellett 65
1.3.4. A részeredmények összefoglalása 67
1.4. A pilot bioreaktor működtetése 68
1.4.1. A denitrifikáció lépéseinek térbeli elkülönülése 68
1.4.2. A szerves szénforrás hasznosítása 70
1.4.3. Az immobilizált sejtek oxigénfogyasztása 72
1.4.4. Denitrifikációs aktivitás 3:1 C:N tömegarány mellett 72
1.4.5. Denitrifikációs aktivitása 1.5:1 C:N tömegarány mellett 74
1.4.6. A pilot bioreaktor eredményeinek összefoglalása 76
V.2. Denitrifikáció magas só-, és nitrát-koncentrációk mellett 79
2.1. A NaCl hatása a növekedésre 80
2.2. Denitrifikációs aktivitások magas Na^+-ion koncentrációk mellett 81
2.3. A tesztoldatok pH-jának változása a denitrifikáció során 82
2.4. Bioreaktorok működése magas só-, és nitrát-koncentrációk mellett 84
2.5. A részeredmények összefoglalása 85
V.3. Aromás anyagok és a nitrát kometabolizmusa 86
3.1. Aromás anyagok bontására képes baktériumok izolálása 87
3.2. A szalicilát és nitrát kometabolizmusa 88
3.3. A katekol gyűrűnyitásának vizsgálata 90
3.4. Nehézfémionok hatása a növekedésére, ... 91
a szalicilát bontására és a denitrifikációra
3.5. A részeredmények összefoglalása 92
VI. Eredmények összefoglalása 94
VII. Irodalomjegyzék 98
VIII. Köszönetnyilvánítás 105
IX. Saját közlemények jegyzéke 106
X. Summary 108

BEVEZETÉS

A huszadik század örökségeként az emberiség olyan környezeti problémákkal találja magát szemben, amelyekre két emberöltővel azelőtt sosem gondolt volna.

Veszélyben vannak ivóvízkészleteink, vízgyűjtő területeink, termőföldjeinkre évről-évre ellenőrizetlenül kerülnek ki a toxikus anyagok.

A világon mindenütt így van ez. Az emberi felelőtlenség számára nincsenek országhatárok és sajnos az előírások és rendeletek is csak ritkán rendelkeznek elegendő visszatartó erővel.

Ma Magyarországon több mint száz kisebb település fúrt kutjaiból származó víz nem hogy ivásra, de még öntözésre sem alkalmas. A Tolna megyében 1997-ben elvégzett felmérés szerint az első vízzáró rétegbe érő kutak 80%-ának nitráttartalma többszörösen meghaladta az egészségügyi határértéket.

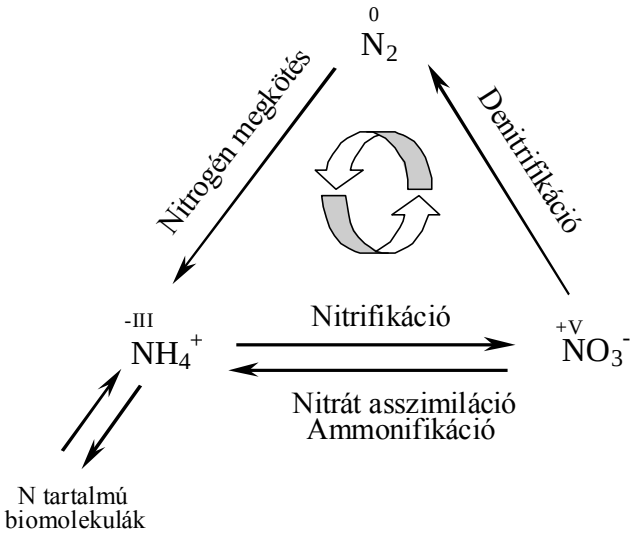
Az Európai Unióhoz történő csatlakozásunk egyik sarkalatos pontja Magyarország környezeti állapota. A környezetszennyezés csökkentése hosszútávon a felnövekvő generációk, környezeti károk elődizésének elkerülésére irányuló, tudatos nevelésével érhető el, míg a meglévő problémákat csakis a környezetvédelem és a környezetvédelmi biotechnológia rohamléptékű fejlődése oldhatja meg.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

NITRÁTMENTESÍTÉS, A NITRÁT KÁROS HATÁSAI

1. A nitrát szerepe a természetben

A nitrát a nitrogén egyik szervetlen, oxidált megjelenési formája a nitrogén körforgásban (1. ábra). Természetes körülmények között a nitrogén megkötését, vagy a nitrogéntartalmú szerves anyagok lebontását követő nitrifikáció útján képződhet, amelyet csakúgy, mint a ciklus más lépéseit, baktériumok visznek végbe. A nitrát anoxikus környezetben a denitrifikáció során nitrogénné, vagy a nitrátlégzés során nitritté, vagy a belőle kialakuló nitrit további redukciós folyamatain keresztül ammóniává alakulhat. Az ammonifikáció és a denitrifikáció disszimilatív, energia-konzerváló folyamataival szemben a nitrát asszimilatív módon is kiléphet időlegesen a nitrogénkörforgásból, amikor a belőle képződő ammónia szerves vegyületekbe épül be. Az itt bemutatott folyamatok egymástól függő és egymásra épülő lépéseinek köszönhető, hogy a nitrogénnek, mint biogén elemnek a mennyisége a természetben tökéletesen szabályozott.

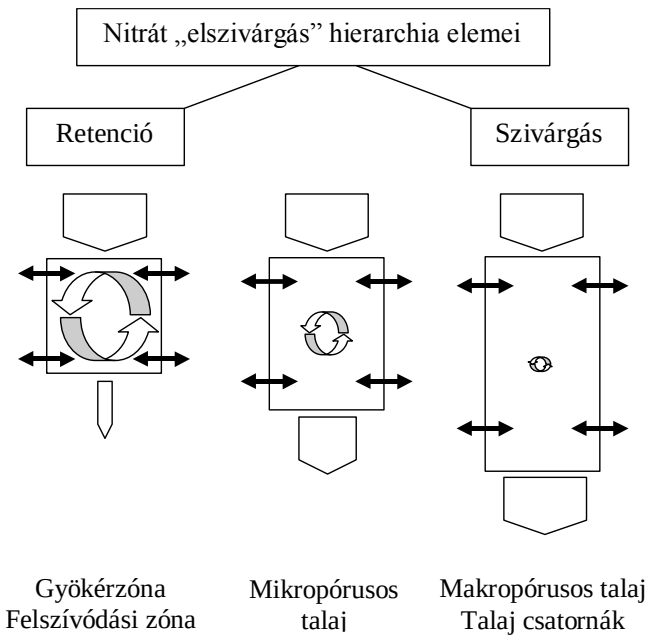


1. ábra
A nitrogén természetes körforgása

A nitrogénkörforgás természetes egyensúlya azonban az emberi beavatkozásnak köszönhetően felborult. Az emberi beavatkozás egymagában évről-évre közel ugyanannyi nitrogént juttat a talajba, mint minden egyéb természetes folyamat együttvéve (Haag és Kaupenjohann 2001).

Mindezért a világszerte nem kielégítően működő szennyvíztisztító üzemek, a csatorna-hálózatra nem kötött közművek és a nagy mennyiségű híg trágyát kibocsátó állattelepek additív hatásán túl elsősorban a műtrágyázáson alapuló nagyüzemi mezőgazdaság tehető felelőssé.

Az ún. mezőgazdasági ökoszisztémákra a természetes ökoszisztémákkal szemben az jellemző, hogy a rövid időperiódusokban ismétlődően, nagy mennyiségben bekerülő szervetlen anyagok, szinte majdnem azonos sebességgel és mennyiségben kilépésre is kerülnek. A túlzott vegyszeres földművelésnek köszönhetően a talajban akkumulálódni csak kis mértékben képes szervetlen ionok nagy része elfolyik, megzavarva így a természetes ökoszisztémák anyagmérlegét is. A felmérések szerint az európai mezőgazdasági területek átlagos nitrátvesztesége 15 kg hektár^{-1} év^{-1}, ennek köszönhetően az európai folyókba kerülő összes nitrogénmennyiség közel 55%-a a feleslegben alkalmazott műtrágyákból származik (Haag és Kaupenjohann 2001).



2. ábra

A nitrogén elfolyás lehetséges módjai Haag és Kaupenjohann (2001) szerint.

A mezőgazdasági területek nitrátmegtartó képessége alapvetően két folyamat együttes hatásától függ, mégpedig a retenciós hatások és a nitrát talajvízbe kerülésének leggyorsabb módját biztosító szivárgás egymáshoz való viszonyától (2. ábra). A nitrát negatív töltésének köszönhetően nagyon rosszul kötődik a szintén negatív töltést hordozó talajkolloidok felszínén, így a gravitációs mozgást követő vízfolyásokkal hamar eljut a talajvízbe, vagy egyéb víztestekbe (szivárgás). Az elszivárgás mennyisége természetesen a talaj szerkezetétől és helyzetétől is függ, mindemellett szezonális hatásokat is figyelembe kell venni. A legnagyobb nitrátefluxokat mindig a téli hóolvadást követően lehet kimérni. A makropórusos szerkezettel és kevés növényzettel rendelkező talajok nitrátmegtartó képessége nagyon kicsi. Az ilyen esetekben a talajszelvénybe bekerülő nitrátmennyiség szinte teljes egészében eljut a talajvízig, mivel a nitrátnak az elfolyó víz sebességével megegyező mozgása túl gyors ahhoz, hogy bakteriális denitrifikáció hatékonyan tudjon érvényesülni és a növények is csak kis részét képesek felvenni. Az előzőekhez képest a mikropórusos talajokban a bekerülő nitrát

kevesebb része lép ki a talajszelvényből és nagyobb mennyisége tud a nitrogén-körforgásban részt venni, a denitrifikáció és a növények nitrát felvétele által.

A talajnak természetesen van olyan része, ahol a bekerülő nitrát nagy mennyisége felszívódik (gyökérzóna), megkötődik, vagy a denitrifikáció útján eliminálódik. A növények nitrogénigényük fedezéséhez jelentős mennyiségű szervetlen nitrogént vesznek fel. A feleslegben lévő nitrogénforrás azonban biomassza túltermeléshez vezethet, amelynek rövidtávú pozitív hatását később messzemenően felülmúlja az a tény, hogy az elpusztuló növényi részekben raktározott nitrogén végül újra nitrát formájában fog folyamatosan nagy koncentrációban a rendszerbe távozni. A denitrifikáció folyamatának sikeressége pedig nagyban függ a rendszeren áthaladó nitráttartalmú víz mennyiségétől, sebességétől, továbbá a talaj hőmérsékletétől, szervesanyag tartalmától és az aktuális mélységtől. A felmérések szerint 100%-os hatékonyságú denitrifikáció csak a 10 m-nél mélyebb talajszelvényekben megy végbe (Haag és Kaupenjohann 2001).

Egy vizsgált terület nitrátmegtartó képességét tehát nagyban befolyásolja az, hogy a bemutatott talajtípusok milyen arányban vesznek részt az adott talaj szerkezetének kialakításában, mindemellett figyelembe kell venni a nitrátnak a talajvíz mozgásából adódó, a különböző talajtípusok közötti mozgását is, amely hozzájárulhat a kialakuló nitrát akkumulációhoz, vagy veszteséghez.

A nitrogénkörforgás egyensúlyának megzavarásával nemcsak ivóvizeink tisztaságát veszélyeztetjük, hanem a megbolygatott rendszerből egyre nagyobb mennyiségben felszabaduló N_2O gáznak az ózonrétegre kifejtett káros hatása miatt, az egész földi életet (Mchamon és Dennehy 1999, Haag és Kaupenjohann 2001).

2. A nitrát emberi szervezetre gyakorolt hatása

A nitrátfogyasztás egészségkárosító hatásával kapcsolatban a mai napig sokféle nézet és elmélet alakult ki, amelyek hátterében sokszor nem állnak tudományos vizsgálatok. Ebben a fejezetben az *Environmental Protection Agency* (EPA) (1995) által elvégzett részletes tanulmány adatainak bemutatásán keresztül megpróbálunk egy átfogó képet adni az eddig elért eredményekről.

2.1. A nitrát szervezetbe kerülésének módjai

A különböző szerzőktől származó felmé-rések mind egyetértenek abban, hogy egy átlagos ember napi nitrátfelvételének döntő többsége, meglepő módon, az étrendet kísérő, vagy az azt teljesen kitevő különböző zöldségfajták elfogyasztásából származik. Vita tárgyát képezi azonban az exogén forrásokból a szervezetbe bekerülő nitrát valós mennyisége, valamint, hogy a szervezetben kimutatható nitráttartalom hány százalékát teszi ki az endogén forrásból származó (szervezetben szintetizálódó) nitrát-mennyiség.

Az alábbiakban olyan összegyűjtött adatokat mutatunk be, amelyekből kitűnik, hogy nincs egységesen kialakult kép az adott kérdés tekintetében. Jones és mtsai (1992) az USA-ra vonatkozóan a következő táblázatban (1. táblázat) foglalta össze a nitrátfogyasztás mértékét és forrásait, figyelembe véve annak endogén szintézisét is.

1. táblázat

Átlagos nitrát fogyasztás Jones és mtsai (1992) szerint

Nitrátforrás	Dózis (mg nap^{-1})	%
Zöldségek	65	86
Gyümölcsök, gyümölcslevek	4	5
Tartósított hústermékek	2	3
Péksütemények	2	3
Egyéb élelmiszer	1	1
Vezetékes víz	2	3
Külső forrásból származó nitrát teljes mennyisége átlagosan	76	100
Endogén szintézisből származó nitrát	62	
Teljes napi mennyiség	138	

Más szerzők (NRC 1981) a úgy adják meg a nitrát fogyasztás %-os összetételét, hogy az endogén szintézist nem, de a szélsőséges étrendeket, illetve a nitráttal szennyezett víz fogyasztását is figyelembe veszik (2. táblázat) (USA-ra vonatkozó adatok).

2. táblázat

A napi nitrátbevitel és százalékos megoszlása az egyes forrásokban, a szélsőséges eseteket is figyelembe véve.

Nitrát-forrás	USA átlag értékek		Tartósított hústermékek fogyasztása		Vegetáriánus diéta		Nitrátban gazdag víz	
	(mg nap^{-1})	%	(mg nap^{-1})	%	(mg nap^{-1})	%	(mg nap^{-1})[1]	%
Étrend	73	97	76	97	266	99	73	31
Ivóvíz	2	3	2	3	2	1	160	69
Összesen	75		78		268		233	

A magas nitrátkoncentrációk mellé nagyon ritkán némi nitrit mennyiség is párosulhat. A nitritionok legnagyobb táplálékeredetű forrásai a tartósított hústermékek. Egyes sonkafajtákban a nitrit mennyisége elérheti a törvényileg szabályozott maximális értéket, a 120 mg l^{-1}-es koncentrációt. Egyéb esetekben a nitrit megjelenése ivóvízben vagy élelmiszerben mindig bakteriális fertőzöttségre utal. A 3. táblázatban a nitrit szervezetbe történő bekerülésének módjait és százalékos megoszlását tüntettük fel (NRC 1981).

3. táblázat

A napi nitritbevitel és százalékos megoszlása az egyes forrásokban, a szélsőséges eseteket is figyelembe véve.

Nitrát-forrás	USA átlag értékek		Tartósított hústermékek fogyasztása		Vegetáriánus diéta		Nitrátban gazdag víz	
	(mg nap^{-1})	%	(mg nap^{-1})	%	(mg nap^{-1})	%	(mg nap^{-1})	%
Étrend	0.76	99	1.69	99	0.76	99	0.76	99
Ivóvíz	0.01	1	0.01	1	0.01	1	0.01	1
Összesen	0.77		1.70		0.77		0.77	

Az EPA által készítetett tanulmány eredményeihez hasonló értékeket tartanak reálisnak az európai felmérések, miszerint a napi nitrátbevitelt vezetékes, nitrátmentes víz esetében 43-131 mg nap^{-1}, míg nitráttal erősen szennyezett víz fogyasztása esetében 64-297 mg nap^{-1} közötti értékre becsülik (ECETOC 1988). Természetszerűen mindez erősen függ az egyes emberek életmódjától is. A nitrátfogyasztás szempontjából, mint ahogy az a tanulmányokból kitűnik, nagyon fontos szerep jut a különböző zöldségféléknek. Ezek nitráttartalmának additív hatása

jelentős lehet a nitráttal szennyezett ivóvíz fogyasztásakor. A felmérések szerint a legtöbb nitrátot akkumulálni képes növények sorrendje a következő: zeller > spenót > fejes saláta > cékla, répa > különböző retekfélék > dinnyék. Nem ritka, hogy az említett növények nitrát-tartalma, meghaladja a 1000 mg nitrát növény kg^{-1}arányt (Walker 1990). Nagy figyelmet kell szentelnünk a növények fentiekben vázolt tulajdonságának, hiszen Magyarországon az elmúlt évben is történt methemoglobinemia-s megbetegedés, amikor egy csecsemőt nem megfelelő minőségű zöldségpéppel tápláltak.

2.2. A nitrát egészségkárosító hatása

2.2.1. Methemoglobinaemia

A nitrát fogyasztására visszavezethető, a csecsemők anaemiás megbetegedéséhez, súlyosabb esetben fulladásos halálához (kék csecsemők) vezető methemoglobinaemia kialakulása hívta fel először a figyelmet a nitrát egészségkárosító hatására.

A methemoglobinaemia kialakulásának előfeltétele a nitrát nitritté történő bakteriális átalakítása. Az emésztőrendszerbe bekerülő nitrát gyorsan felszívódik a száj, a gyomor és a belek vérereibe, ahonnan pillanatok alatt eljut a szervezet más részeibe is. Gyakorlatilag az összes testnedvből, illetve a kiválasztó szervek termékeiből kimutatható (nyál, széklet, vizelet) (ECETOC 1988, EPA 1990a).

A nitrátból származó nitrit szintéziséért a szájban és a gyomorban élő baktériumok felelősek. A nitrátból kialakuló nitrit mennyisége nagyban függ a baktériumok mennyiségétől és minőségétől. A felnőttek gyomrának kémhatása általában elég alacsony ahhoz, hogy a baktériumok növekedése és azok élettevékenységeiből adódó nitrátredukció elhanyagolható legyen. A gyerekek gyakoribb methemoglobinaemiás megbetegedése a lúgosabb gyomor-traktusra vezethető vissza, ahol a nitrátredukáló baktériumok szaporodási feltételei kedvezőbbek. A felmérések szerint az emberi szervezetbe kerülő nitrát mennyiségének kevesebb, mint az 5%-ka redukálódik nitritté (Stephany és Schuller 1980, Eisenbard és mtsai 1981, Walters és Smith 1981).

A nitrit a hemoglobint methemoglobinná alakítja át azáltal, hogy a központi Fe^{2+} iont Fe^{3+} ionná oxidálja, így az képtelenné válik az oxigén szállítására. Methemoglobin alacsony koncentrációban (0.5-3.0%) normális esetben is előfordul az emberi vérkeringésben, és egészen 10%-ig nem okoz kóros tünetet. 10% fölött már cianózis alakulhat ki, 25% fölött vérnyomásesést, a pulzusszám növekedését és szapora légzést eredményez, amely szoros összefüggésben áll a nitritionok vazodilatátor hatásával is. A nitritionok alacsony vérnyomást

képesek előidézni annak köszönhetően, hogy erős izomlazító hatással bírnak. Ezt a hatásukat valószínűleg a guanilát-cikláz enzim aktiválásával érik el (Knowles és mtsai 1989). A vazodilatátor hatás kialakításáért felelős nitrit koncentrációtartománya már közel esik ahhoz a mennyiséghez, ami methemoglobinaemiat okoz (Sollman 1957).

Bár a betegekben a kialakult hipoxia háttere kettős (vazodilatáció, illetve methemoglobin kialakulása) a halálos mértékű oxigénhiányért egyértelműen a methemoglobin szintézise a felelős. A nitrit metilén-kék festékanyaggal kiszorítható a hemoglobin aktív centrumából, ezáltal a halált okozó hatás megszüntethető, a vérnyomás mesterséges szintentartása azonban sosem vezetett pozitív eredményre nitrit mérgezett egyedek esetében (Smith és Wilcox 1994). A methemoglobin 50% feletti koncentrációja a vérben már halálos is lehet.

2.2.2. Rákos folyamatok előidézése

EPA által végzett széleskörű laboratórium állatkísérletek bizonyították, hogy a nitrát- és nitritionok egészen a 1755 mg kg^{-1} nap^{-1} nitrát és 550 mg kg^{-1} nap^{-1} nitrit koncentrációkig önmagukban nem bizonyultak karcinogéneknek abban az esetben, ha stabil aminok nélkül jutatták be azokat a tesztállatok szervezetébe (EPA 1990a). Ha azonban a nitritionokat különböző aminvegyületekkel szimultán adták az állatoknak, a gyomorsav hatására kialakuló nitrozoaminok sokféle rákos elváltozást eredményeztek. Greenblatt és Mirvish (1972) hím egereket 0 és 6250 mg l^{-1} piperazinnal kezelt táppal etették 20 héten át, az ivóvizüket pedig 0, 50, 250, 500, 1000, és 2000 mg l^{-1} $NaNO_2$-tel egészítették ki. Az 50 mg l^{-1} -t meghaladó nitrit-koncentrációk esetében szignifikánsan megnőtt a tüdőrák kialakulása, a kóros elváltozás mértéke pedig egyenes arányban állt a növekvő nitrit mennyiségekkel.

A tüdő sejtek kontrollálatlan osztódása viszont egyik olyan esetben sem indult meg amikor nitritet, piperazint vagy nitrátot adtak egymagában az állatoknak. Thamavit és munkatársai (1988) 0, 1000 mg l^{-1} aminopirint és ugyanilyen koncentrációban nitritet tartalmazó tápszeren tartottak hörcsögöket. Bizonyos idő eltelte után a kifejlődött májrák tüneteit mutatták ki a kezelt állatokon, míg azok az egyedek teljesen egészségesek maradtak, amelyek csak az egyik vagy másik anyagot kapták.

Mokhtar és mtsai (1988) megegyező eredményt kaptak egereknél Na-nitrit és dibutilamin alkalmazásával. A differenciálatlan sejtosztódás beindításáért a fent említett kutatók a nitrozoaminokat tették felelőssé, bár azok szintézisét nekik nem sikerült kimutatniuk.

Először Yamamoto és mtsai (1989) mutatták ki patkány vizeletéből endogén szintézisből származó N-nitro(2-hidroxipropil)amin jelenlétét, amely (2-hidroxipropil)amin és $NaNO_2$ reakciójából keletkezett. Antioxidánsok pl. az E, vagy a C vitamin jelenléte, megakadályozta a rákkeltő aminok kialakulását.

A probléma felismerése óta évente számos tanulmány készül, amely a nitrát-, és nitrit-ionok hatását vizsgálja különböző humán rákos folyamatok kialakulásában. A sok esetben geográfiai szempontokat is figyelembe vevő széles körben elvégzett felmérések ellenére sem egységes a kép, amit 4. táblázat is szemléltet.

4. táblázat

Kóresetek és nitráttal való kapcsolatuk

Nitrát-, nitritbevitel módja	Betegség	Nitrát- és nitritbevitel és a betegség kialakulása közötti korreláció	Hivatkozás Előfordulás
Műtrágyagyár dolgozói, napi kontaktus	Gyomorrák kialakulása	A gyárban dolgozók és a kontroll csoport esetében a betegség azonos gyakoriságú	Rademacher és mtsai 1992 USA
Nitráttartalmú ételek gyakori fogyasztása	Gyomorrák kialakulása	Pozitív korreláció nitrátra, negatív nitritre Nézve	Gonzalez és mtsai. 1994 Spanyolország
Nitráttartalmú ételek gyakori fogyasztása	Gyomorrák kialakulása	Negatív korreláció nitrátra nézve	Bulatti és mtsai 1990 Olaszország
Nitráttartalmú ételek gyakori fogyasztása	Gyomorrák kialakulása	Nincs összefüggés	Hansson és mtsai 1994 Svédország
Nitráttartalmú ivóvíz fogyasztása	Gyomorrák kialakulása	Pozitív korreláció nitrátra nézve (egyetlen esetben)	Juhász és mtsai 1980 Magyarország
Nitráttartalmú ivóvíz fogyasztása	Gyomorrák kialakulása	Nem volt különbség a betegség kialakulásának gyakoriságában a 90 mg l^{-1} vagy annál kevesebb nitrátot tartalmazó víz fogyasztása esetén.	Davis 1980 UK
Nitráttartalmú ivóvíz fogyasztása	Gyomorrák kialakulása	Erős összefüggés volt kimutatható (a tanulmány nem vizsgálta azonban más rizikófaktorok additív hatását)	Gilli és mtsai 1984 Olaszország
Nitráttartalmú ivóvíz fogyasztása	Gyomorrák kialakulása	Pozitív korreláció nitrátra nézve (a tanulmány nem vizsgálta más rizikófaktorok additív hatását)	Anquela és mtsai 1989
Nitráttartalmú ivóvíz fogyasztása	Gyomorrák kialakulása	Pozitív korreláció nitrátra, negatív nitritre nézve	Xu és mtsai 1992 Kína
Vegetáriánus diéta	Glioma, meningioma	Nem volt szignifikáns összefüggés kimutatható	Boeing és mtsai. 1993 Preussman 1984

A bemutatott adatok alapján nehéz egyértelműen állást foglalni a nitrát- és nitritionok rákkeltő hatását illetően. Természetesen az is előfordulhat, hogy nincs szignifikáns összefüggés a betegségek kialakulása és az említett anionok szervezetbe történő bevitele között, vagy csak a hosszú akkumulációs idő miatt nehéz kimutatni a direkt összefüggéseket. Az emberek nagy része az ivóvízen kívül még számos formában juttathat nitrát- vagy nitritionokat a szervezetébe. Ismert ezeknek az ionoknak az endogén szintézise is, amelynek mértéke nagyfokú egyéni varianciát mutat, így nehezen adható meg egyes esetekben az adott ionokra vonatkozó dózisfüggő hatás. Figyelembe kell venni továbbá azt is, hogy sok faktor gátolhatja meg, hogy a nitritből a rákos folyamatok indukciójáért felelős nitrozoaminok keletkezzenek (egyéni étrendből származó eltérő mennyiségű növényi eredetű antioxidánsok). Nagy az egyéni varianciája az olyan amin típusú vegyületek fogyasztásának is, amelyekkel a nitritionok reagálni képesek. Végezetül a felmérések nagy részében kifogásolható az alacsony vizsgálati mintaszám, sok esetben nem vették figyelembe más rizikófaktorok additív hatását, valamint nem végeztek időrendi vizsgálatokat a vizsgált ionok fogyasztása és a kialakult kórkép esetében.

2.2.3. A nitrát és nitrit ionoknak a reprodukciós folyamatokra kifejtett hatásai

A kiterjedt állatkísérletek és a gazdag humán vonatkozású információ anyag ellenére sem bizonyítható egyértelműen, hogy a nitrát-, illetve nitritionok károsan befolyásolnák az egyedfejlődés vagy a szaporodás folyamatait. Az állatkísérletekben is csak akkor kaptak pozitív korrelációt, ha olyan nagy dózisban alkalmazták a nitrátot, hogy az anyában methemoglobinaemia a lépett föl.

3. A nitrát mennyiségének kontrollálása, egészségügyi határértékek alakulása

A nitráttal kapcsolatos általános környezeti problémák (eutrofizáció, növekvő N_2O-emisszió) és a methemoglobinaemias megbetegedések egyre gyakoribb kialakulása szükségessé tette, hogy a nitrát környezetben megengedhető maximális koncentrációját törvényileg szabályozzák. A hetvenes években világszerte meghatározták azokat a még ma is érvényben lévő egészségügyi határkoncetrációkat, amelyek alatt még megengedett a nitrát mennyisége a talajban vagy a talajvízben.

1970-ben az ENSz egészségügyi szervezete (WHO) kimondta, hogy 11 mg l^{-1} NO_3^--N az abszolút felső határ, ami felett már jelentős a methemoglobinaemia veszélye. 1974-ben az amerikai EPA 10 mg l^{-1} NO_3^--N-ben és 1 mg l^{-1} NO_2^--N-ben határozta meg a nitrát és nitrit

ionok ivóvízben megengedhető maximális mennyiségét. A magyar szabályozás sem késlekedett sokáig, 1978-ban született meg az előírás, amely szerint 9 mg l^{-1} NO_3^--N és 0.3 mg l^{-1} NO_2^--N koncentrációnál több iont tartalmazó víz a csecsemők és terhes anyák számára toxikusnak tekintendő. Jól láthatóan a törvényi szabályozásban meghatározott értékek közel azonosak, de vannak országok, ahol a nemzetközi szabványhoz képest szigorúbb határokat vesznek figyelembe, mint pl Németország és Dél-Afrika (4 mg l^{-1} NO_3^--N).

4. Nitrátmentesítő technológiák

A nitrát egészségkárosító hatásának felismerésével szinte egy időben megindult a nitráttal szennyezett vizek különböző technológiák segítségével történő nitrátmentesítése, amelyek fejlesztése még a mai napig is tart. Az alábbiakban a nitrát koncentrációjának csökkentésére irányuló főbb módszereket mutatjuk be.

4.1. Kémiai rendszerek, ioncsere, membrántechnológia

A tisztán kémiai technológiák, mint az ioncserélő gyanták alkalmazása a nitrát fiziko-kémiai tulajdonságát használják ki annak szelektív megkötésére (Lauch és Guter 1986, Dimotsis és MGarvey). A membrántechnológia már kevésbé szelektív, mivel ebben az esetben általában méret szerinti szeparáció, szűrés történik, amely rendszerint a nitrátot kísérő kationokat is kivonja a vízből, ezáltal a nitrátmentes effluens iontartalmát oly mértékben megváltozatja, hogy az a további kezelés nélkül fogyasztásra alkalmatlanná válik.

Mindkét eljárás előnye, hogy gyors és viszonylag költségkímélő, azonban egyik sem segíti elő a nitrát nitrogénjének a természetes körforgásba történő visszajutását. Az ionszelektív gyanták ugyan kivonják a kezelendő vízből a nitrátot, de a telítődésüket követő NaCl-os, vagy $NaHCO_3$-os regenerálás után az oszlopokról lefolyó oldat szennyvíznek minősül, mivel nagy mennyiségben tartalmazza a regeneráláskor az oszlopra kikötődő Cl^- ionok kationpárjait, valamint nitráttartalma az oszlop töményítő hatásának köszönhetően akár egy nagyságrenddel is nagyobb lehet, mint a kezelt vízé. A membrán-technológiáknál szintén gondot jelent a nagy mennyiségben keletkező koncentrált nitráttartalmú szennyvíz elhelyezése, kezelése.

4.2. Biológiai rendszerek

A kémiai eljárásokkal szemben a biológiai nitrátmentesítés a baktériumok azon speciális tulajdonságát használja ki, hogy azok a denitrifikáció redukciós lépésein keresztül a nitrát

nirogénjét nitrogéngáz formájában képesek felszabadítani és visszajuttatni a körforgásba (1. ábra). Ez az anaerob, energia konzerválással járó disszimilatív folyamat azonban csak megfelelő elektrondonorok jelenlétében tud lejátszódni.

A szerves elektrondonorok alkalmazásán alapuló heterotróf denitrifikáló technológiák, mely esetekben az elektrondonorok egyben szénforrásként is hasznosulnak, hatékonyságuk miatt egyre elterjedtebbek, és évről-évre újabb és újabb megoldások látnak napvilágot. A heterotróf rendszerekben az egyszerű savakon, cukrokon és alkoholokon túl bonyolult összetételű, akár még aromás anyagokat tartalmazó szennyvíz is szerepelhet elektronforrásként a reakció során.

A heterotróf denitirifikáció folyamatának általános érvényű leírásakor a következő egyenletek adhatóak meg (Drtill és mtsai 1995).

A nitrát nitritté történő redukciója ($NO_3^- \rightarrow NO_2^-$):

$$C_xH_yO_z + (2x+½y-z)NO_3^- = x\ CO_2+½yH_2O + (2x+½y-z)NO_2^-$$

A nitrit nitrogénné történő redukciója ($NO_2^- \rightarrow N_2$):

$$3C_xH_yO_z + (4x+y-2z)NO_2^- = 3xCO_2 + (y-2x+z)H_2O + (4x+y-2z)OH^- + (2x+½y-z)N_2$$

A két egyenletet összegezve a következőt kapjuk:

$$5C_xH_yO_z + (4x+y-2z)NO_3^- = 5xCO_2 + (2y-2x+z)H_2O + (4x+y-2z)OH^- + (2x+½y-z)N_2$$

A fenti egyenlet felhasználásával meg lehet adni a gyakorlati alkalmazás során szükséges szerves szénforrás elméleti mennyiségét, az ún. szén:nitrogén tömegarányt (C:N) (5. táblázat) (Drtil és mtsai 1995).

5. táblázat

Szén:nitrogén arányok alakulása heterotróf denitrifikáció esetén

Szénforrás	C:N arány		Hivatkozás
	Számított	Kísérletileg meghatározott	
Glükóz	1.07	1.10	Lee (2001)
Ecetsav	1.07	1.70	Croll (1985)
Etanol	0.71	1.25	Mohseni-Bandpi (1998)
Metanol	0.71	1.10	Gómez (2000)

A kísérleti rendszerekből kapott eredmények sok esetben jól közelítik az elméleti értékeket, ám a bioreaktorok felépítéséből és működtetéséből adódó sajátságok sokszor hozzájárulnak az ideális értéktől eltérő arányok kialakulásához.

Elméletileg az ideális C:N arány alkalmazása maximális denitrifikációs aktivitást vonna maga után, azonban a szénforrás mennyiségének változtatásával azt is megállapították, hogy magasabb C:N arányokat használva, a denitrifikációs ráta tovább emelkedik. Ez az effektus különösen a kevert mikroorganizmus-populációkat tartalmazó rendszerek esetében volt jellemző (Lee 2001). Ennek oka kettős: egyrészt az alkalmazott szerves szénforrás nemcsak a denitrifikáció folyamatában, hanem egyéb metabolikus folyamatokban (asszimilatív folyamatok) is felhasználódik, így például a mikroorganizmus-populáció növekedéséhez is hozzájárul, és a stabilabb populáció magasabb denitrifikációs aktivitást eredményez. Másrészt egy kevert mikroorganizmus-populációban versengés folyik a tápanyagért. Ebben a kompetícióban nemcsak a denitrifikáló baktériumok vesznek részt, így a szerves szénforrás egy része nem kizárólag a célzott folyamatra fordítódik (Carucci és mtsai 1999, Kesserű és mtsai 2002).

A heterotróf eljárások sok esetben további megoldandó problémát vetnek fel. Gondot jelenthet a nagy mennyiségű biomassza kialakulása és távozása a rendszerből, és az effluensben lévő felesleges szerves anyag megjelenése, így ezeket a megoldásokat minden esetben egy költséges utótisztítási fázisnak kell kísérni.

A baktériumokat alkalmazó technológiák másik irányvonalát jelentik az autotróf denitrifikációt hasznosító módszerek (Gross és Treutler 1986). Ennek előnye, hogy a baktériumok működésükhöz nem igényelnek szerves szénforrást, ezáltal az effluens szervesanyag-tartalma is kisebb, mint a heterotróf eljárásoké. Továbbá a reaktorok baktérium-populációjának összetételét, a könnyen felvehető szerves szénforrás hiányában, csak kis mértékben veszélyezteti más denitrifikációra képtelen baktériumok felszaporodása. Ezekben az esetekben problémát jelenthet azonban az elektronforrásként szereplő hidrogén biztosítása, előállítása, dozírozása. Figyelembe kell venni továbbá azt is, hogy a heterotróf rendszerekhez képest általában aktivitásukban is elmaradnak az autotróf módon működtetett víztisztító berendezések.

A heterotróf denitrifikáció természetes folyamatának alkalmazása a szennyvízkezelési technológiákban már régóta ismert, azonban az izolált és szelektíven felszaporított denitrifikáló baktériumokat tartalmazó bioreaktorok tesztelése csak az utóbbi két évtizedben kezdődött meg.

4.2.1. Denitrifikáló bioreaktorok

A nitrátszennyezettség mértékétől, az alkalmazott baktériumok, illetve a reaktor felépítésétől függően számos technikai megoldás született, és születik évről-évre (6. táblázat). Abban azonban mindegyik eljárás megegyezik, hogy a biokatalizátorként funkcionáló baktériumokat valamely immobilizálási technikával rögzítik a rendszerben.

A leggyakoribb és legegyszerűbb technológiákban (fluidágyas reaktorok) a baktériumok hordozók felszínére történő kitapadását használják ki (Hirata és Meutia 1996, Bosander és Westlund 2000, Alves és mtsai 2002). Problémát okozhat azonban a stabil biofilm kialakítása, valamint a reaktor oly módon történő üzemeltetése, hogy a biofilm jelentősen ne sérüljön. Az ilyen rendszerek általában rosszul viselik a hirtelen változásokat (áramlási sebesség ugrásszerű megnövekedése, tápanyag limitáció), és eredeti aktivitásukat csak hosszabb regenerálódás után nyerik vissza (6. táblázat).

A baktériumok gélmátrixba történő rögzítésével az influens által kifejtett mechanikai nyíróhatás kiküszöbölhető, és egyben megoldható a nagy mennyiségű aktív biomassza reaktor belsejében tartása. Az ilyen reaktorok általában aktivitásukban is felülmúlják a fentebb tárgyalt típusokat, valamint a hirtelen terhelésekkel szemben is ellenállóbbak (Aravinthan és mtsai 1998, Nagadomi és mtsai 2002) (6. táblázat).

6. táblázat

Heterotróf denitrifikáló technológiák bemutatása

Reaktor típusa	Sejt immobilizálás módja	Denitrifikációs aktivitás (kg N m^{-3} nap^{-1})	Hivatkozás
Kompozit gyöngyös oszlop reaktor	Alginát-akrilamid kompozit	0.6-0.70	Chang és mtsai 1998.
SCBP	Felületen: polietilén	1.32	Welander és mtsai 1998.
Fluidágy	Felületen:homok	0.55	Werner és Kayser 1991
SCBP	Felületen	0.67	Rusten és mtsai 1995
Kompozit gyöngyös oszlop reaktor	Alginát-gelrite kompozit	0.8-1.63	Kesserű és mtsai 2002.
Membrán bioreaktor	Membrán szeparáció	0.18	Nuhoglu és mtsai 2002.

SCBP=suspended carrier biofilm process BIOFOR=packed bed biofilm reactor

A bioreaktorok harmadik típusát jelentik azok a legújabb eljárások, amikor a denitrifikáló baktériumokat szemipermeábilis membránnal választják el a kezelendő oldattól. Ezek a módszerek általában aktivitásukban elmaradnak mindkét, már említett megoldástól (6.

táblázat), nagy előnyük azonban, hogy a keletkező effluens összetétele kedvezőbb, mert a baktériumok közvetlenül nem érintkeznek a tisztítandó vízzel: így a csíraszámuk és oldott szervesanyag-tartalmuk is egészen alacsony (Mansell és Schroeder 1998, Lee és Rittman 2000).

A denitrifikáció ipari méretekben történő alkalmazásakor sok szempontot kell figyelembe venni. A hatékonyság mellett igen nagy hangsúlyt kell fektetni a rendszer költségigényére, illetve a technológia biztonságosságára.

4.2.2. Immobilizálás gélmátrix belsejébe

A folyamatosan működtetett, nagy hatékonyságú ipari technológiák esetében a rögzített sejtek alkalmazása elengedhetetlen. A sejtek legnagyobb mennyiségben, nagy hatékonysággal valamely szerves gélképző mátrix belsejébe immobilizálhatók könnyedén, amely eljárásnak számos előnye van. A baktériumok nem vesztik el életképességüket, így bonyolult anyagcsere folyamatok elvégzésére is képesek. Az ily módon történő fizikai rögzítés gátolja a kultúra kimosódását, mivel a gélképző térhálósítása során olyan pórusméretű gél jön létre, amely a baktériumok kijutását megakadályozza, ezáltal lehetővé teszi a mikrobák többszöri felhasználását. Különböző mikroorganizmusok koimmobilizálása többféle anyagcseretermék áramlását is lehetővé teszi a sejtek között, így hasznosítható szénforrás, valamint katalizátor is biztosított az egyik mikroorganizmus által a másik számára.

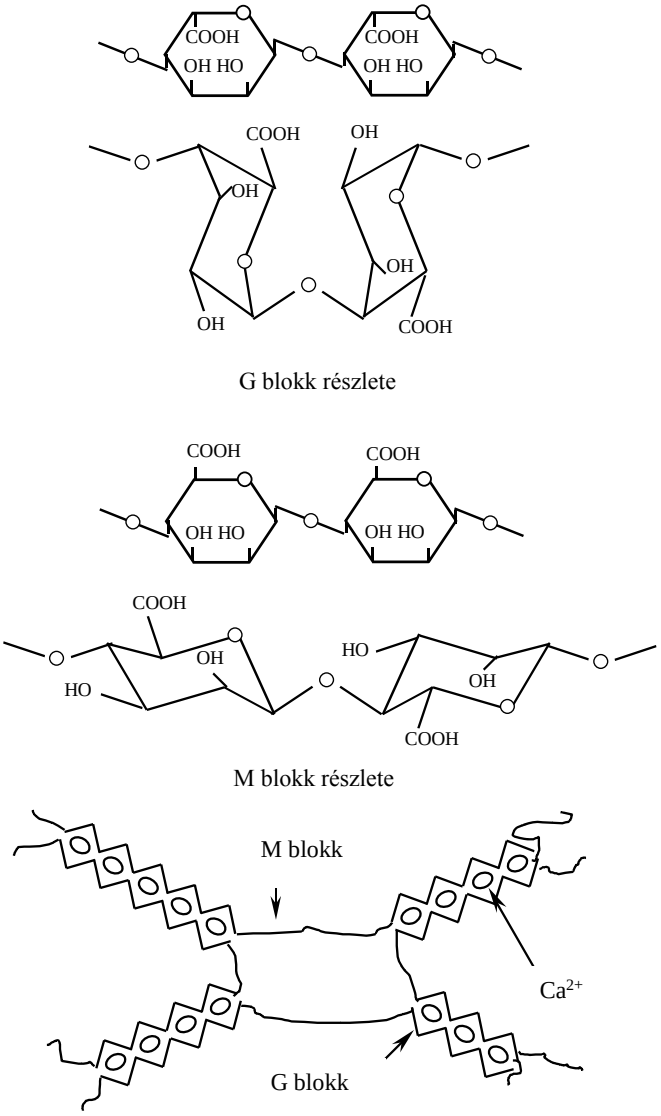
A sejtek immobilizálása során sokféle polimer használható. A *szénhidrátok* közül elterjedt a cellulóz, az agar, agaróz, κ-carrageenan, alginát, gelrite, pektin és a kitozán. Immobilizálásra alkalmazott, fehérjetermészetű anyag a kollagén és a zselatin. Számos szintetikus polimer is használható, úgymint a poliakrilamid és egyéb akrilát származékok, a poliuretán, valamint a poli-vinilalkohol (Nagadomi és mtsai 2002).

4.2.2.1. Az alginát bemutatása

Az egyik leggyakrabban alkalmazott immobilizálásra szolgáló polimer az alginát, melyet barnamoszatokból nyernek. Az így kapott alginsav tulajdonságai számos tényezőtől függnek (milyen moszatból, illetve annak melyik részéből tisztították, milyen eljárást alkalmaztak). Az alginát széleskörű felhasználását (pl. élelmiszeripar, festékgyártás) lehetővé teszi, hogy az egészségre nem ártalmas.

Az alginát, valamint két- és többértékű kationokkal alkotott sóinak többsége vízben nem oldódik, míg monovalens kationokkal alkotott sói igen. Ennek a jelenségnek a magyarázata az alginsav szerkezetében keresendő.

Az alginát két uronsavból (mannuronsav és guluronsav) épül fel úgy, hogy az egyes monomerek 1-4 glükozidos kötéssel kapcsolódnak egymáshoz (3. ábra). Az egyes monoszacharidok eloszlása a láncban nem azonos. Vannak csak mannuronsavat tartalmazó részek (M blokk), csak guluronsavat tartalmazó szakaszok (G blokk), valamint a két monomer által közösen létrehozott régiók is (MG blokk). A guluronsav molekulák α 1-4 glükozidos kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz, míg a mannuronsavak β 1-4 kötéssel. Így az MG blokkokban nem tud olyan kristályszerű térszerkezet kialakulni, mint az M, vagy a G blokkok esetében. Ez magyarázza, hogy az előbbi területen lényegesen gyorsabb a savas hidrolízis. A monomereken levő hidroxil- és karboxilcsoportok hidrogénkötések kialakítását teszik lehetővé a polimerek között, ami az alginát térszerkezetét stabilizálja, a vízmolekulák számára nehezen hozzáférhetővé teszi. Abban az esetben, ha egyértékű kation szerepel ellenionként az alginát mellett, nincs lehetőség a keresztkötések kialakítására, a polimer sója vízben oldódni fog.



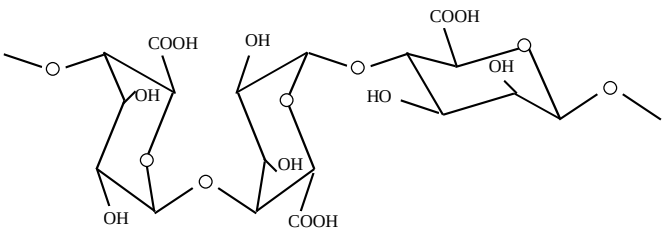
3. ábra
Az alginát felépítése

Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal megállapították, hogy a Ca-alginát térháló pórusmérete 5 és 150 nm között van (Martinsen és mtsai 1989), így a negatív töltésű, körülbelül 3 nm nagyságú globuláris fehérjék méretüktől függően változó sebességgel ki tudnak diffundálni a gélből. Nagyobb molekulák esetében csökkent a gélben való elmozdulás

sebessége, amelynek mértékét a gél és a fehérje sajátságai közösen befolyásoltak. Mivel az alginátok negatív töltése karboxilcsoportjaik disszociációjából ered, a gél diffúziós sajátságait a pH is erősen befolyásolja. Magasabb pH-értékeknél fokozódik a polimer negatív töltése, ami a hasonlóan negatív töltésű ionok kidiffundálását segíti elő a gélből, míg a pozitív töltésű szubsztrátok, valamint termékek esetében ellentétes hatás figyelhető meg (Martinsen és mtsai 1992).

4.2.2.2. A Gellan gum bemutatása

A Gelrite, mint táptalajkomponens ismert, olyan mikroorganizmusok tenyésztése során, amelyek az agar hidrolízisére képesek. Igy ennek a heteropoliszacharidnak (4. ábra). az algináttal szemben az az előnye, hogy ellenáll a baktériumok által végzett enzimatikus bontásnak.



4. ábra

A gelrite szerkezete

A gelrite molekulák felépítésében 1-4, valamint 1-3 glükozidos kötéssel kapcsolódó glükuronsav, glükóz, ramnóz, valamint ezek O-acetil származékai vesznek részt, el nem ágazó láncot alkotva (Neil 1983). Ha a polimerből készített oldathoz egyértékű vagy kétértékű kationokat adunk, akkor szilárd gél fog kialakulni. Ennek erősségét a gelrite koncentrációja valamint az adott ion mennyisége, illetve az alkalmazott kation minősége határozza meg. Nagyobb polimer-, illetve kation-koncentráció erősebb gélt eredményez. A kétértékű kationok már lényegesen kisebb koncentrációban is előidézik a megszilárdulást, mint az egyértékűek.

A gelrite molekulák a szilárd fázisban hármas hélix szerkezetet vesznek fel (Carrol és mtsai 1982). Ezt az elrendeződést az O-acetil csoportok nagyban befolyásolják. A legnagyobb mértékű kristályosság a fenti szubsztituensek hiányában jön létre, ami rigid gélek képződéséhez vezet.

A gelrite nemcsak önmagában alkalmazható, hanem más polimerekkel keverve is, mint alginát, zselatin, és az így nyert kompozit gél erőssége, stabilitása meghaladja bármely egyedi komponenséét (Kovács és mtsai 1991). A gelrite-nak az algináthoz hasonlóan nincs egészségkárosító hatása.

4.3. Kombinált rendszerek

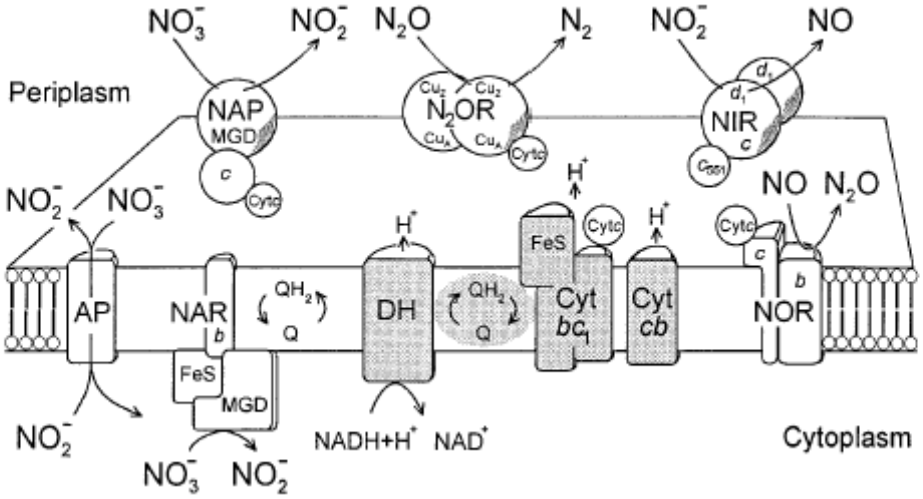
A kémiai technológiák hatékonyságát, biztonságát és a bakteriális denitrifikáció által nyújtott tényleges megoldást kívánják ötvözni az ún. kombinált technológiák. Ezeknek a megoldásoknak a fő előnye, hogy a kémiai nitrátmentesítés és a biológiai denitrifikáció folyamata úgy épül egymásra, hogy a tisztítandó víz csak a kémiai folyamattal kerül kapcsolatba. Így az elfolyó vizet nem terheli a rendszerből kikerülő szerves szénforrás vagy bakteriális kontamináció, míg a kémiai technológiában keletkező koncentrált, nitrátos szennyvíz kezelése, elkülönítve, biológiailag úton történik.

Az utóbbi években ugyan születtek már megoldások mind az nitrátmentesítő ionszelektív gyanták regenerálásakor keletkezett oldat (Hoek és Klapwijk 1988), mind pedig a membrán-technológia alkalmazása során keletkező szennyvíz biológiai rendszerrel történő kezelésére (Barreiros és mtsai 1998), a fejlesztő munkálatok még a mai napig is tartanak.

5. A biológiai denitrifikáció

A denitrifikáció folyamatát elsőként Kluyver írta le 1926-ban, amelyet nitrátból kiinduló, kizárólagosan csak baktériumok által végrehajtott anaerob anyagcsere-folyamatnak deffiniált, mely nitrogéngáz felszabadulásával és energiakonzerválással jár. Bár mára már a gombák világában is találtak részleges denitrifikációra (N_2O felszabadulás) képes törzseket (Bleakley és mtsai 1982, Shoun és mtsai 1992) a nitrogénkörforgás ezen részéért a baktériumok felelősek.

5.1. A denitrifikáció enzimrendszere



5. ábra

A *P. stutzeri* denitrifikációs enzimrendszere Zumft szerint (1997) AP: nitrát nitrit anitoporter; NAR: nitrát-reduktáz (légzési); NIR: nitrit-reduktáz; NOR: NO-reduktáz; N_2OR: N_2O-reduktáz; NAP: periplazmatikus nitrát-reduktáz. A konstitutív aerob anyagcsere elektrontranszport lánca szürkével jelölve.

A denitrifikáció teljes lejátszódásához 4 enzim és közel 50 gén összehangolt működése szükséges. Az alábbiakban a *P. stutzeri* denitrifikációs enzimrendszerének felépítését és működését mutatjuk be.

5.1.1. A denitrifikáció első lépése, $NO_3^- \rightarrow NO_2^-$

A folyamat széles körben elterjedt az élővilágban. Növényi sejtek, baktériumok, gombák nagy része képes a nitrát-nitrit átalakulás katalizálására. A folyamatért felelős nitrát-reduktáz a legtöbb esetben membránhoz kötött integráns fehérje, amelynek belsejében egy oxidációsszám változásra képes Mo^{2+} ion található.

A denitrifikáció első lépését megelőzően a nitrátnak be kell jutni a citoplazmatikus térbe, ugyanis a periplazmatikus nitrát-reduktázzal (NAP) nem rendelkező denitrifikáló baktériumok esetében a nitrátlégzésért felelős enzim (NAR) aktív centruma a citoplazma felé néz (5. ábra). Ez a folyamat a transzmembrán nitrát-nitrit antiporter fehérjén keresztül valósul meg (AP),

amelynek meglétét elsőként a *Paracoccus denitrificans*-nál írták le, klorát-redukciós kísérlet segítségével (Stouthamer 1990). A citoplazmatikus membránban elhelyezkedő nitrát-reduktázok tisztított formában a klorátot ugyanolyan aktivitással képesek redukálni, mint a nitrátot, míg az intakt sejtek erre képtelenek. Ez alapján feltételezhető volt egy szelektív transzportfolyamat működése. A nitrát citoplazmába történő bejutása nem eredményez töltésváltozást a citoplazmamembrán két oldalán, ez arra utal, hogy a folyamatot szimultán nitritkijutás kíséri. Később a nitrit-reduktázok periplazmatikus elhelyezkedése is igazolta ezt a feltevést (Zumft 1997).

A *P. stutzeri* három alegységes, membránhoz kötött nitrát-reduktáza (NAR), mely a *narGHIJ* operon terméke, felépítésében megfelel a denitrifikáló baktériumokban megtalálható nitrát-reduktázoknak. Az enzim a 45 kDa-os γ alegységen keresztül kapcsolódik a citoplazma-membránhoz és a benne található Fe-S csoportok segítségével adja tovább az elektront a 60 kDa-os β alegység Fe-S csoportjainak, ahonnan az elektronok végül a katalitikus részt (molibdén kofaktort) tartalmazó 112 kDa-os α alegységben a nitrát redukciójára fordítódnak. A legtöbb denitrifikáló baktérium csak membránhoz kötött nitrát-reduktázzal rendelkezik, de egyes esetekben ehhez társulhat egy klorátredukcióra képtelen, oxigén toleránsabb, nem membránkötött, a periplazmatikus térben elhelyezkedő nitrát-reduktáz is (NAP) (5. ábra).

5.1.2. A denitrifikáció második lépése, $NO_2^- \rightarrow NO$

A denitrifikáció második lépésében a citoplazmatikus térből kikerülő nitrit redukciója zajlik a nitrit-reduktázok által (5. ábra). A denitrifikációra képes baktériumoknál eddig felépítésében és prosztetikus csoportjában két teljesen eltérő fajta nitrit-reduktázt írtak le. Az egyik nagy csoport képviselői a *Pseudomonas* genus tagja is, amelyek az ún. cd_1 típusú nitrit-reduktázokkal rendelkeznek, míg a másik csoportba azok a nitrit-reduktázok tartoznak, amelyek Cu^{2+} iont tartalmaznak prosztetikus csoportként (*Achromobacteraceae* család egyes tagjai).

A *P. stutzeri* cd_1 nitrit-reduktáza, hasonlóan a csoport többi enziméhez egy homodimer (65 kDa-os alegységekkel), amely prosztetikus csoportként hem *c*-t és hem d_1-et tartalmaz. Az enzim a periplazmatikus térben helyezkedik el, a citoplazma membránhoz csak lazán kötődve. Az enzim legfőbb érdekessége a kettős működés, miszerint a katalitikus centrumában (hem d_1) nemcsak nitritet képes redukálni, hanem mint citokróm-oxidáz oxigént is elfogad elektron-akceptorként, amelynek eredményeképp víz és hidrogén-peroxid is keletkezhet (Fülöp és

mtsai 1995). Azonban az oxigén redukcióját mintegy 100-szor lassabban viszi végbe. A cd_1 nitrit-reduktáz másik sajátsága, hogy szekunder aminok nitrálását képes katalizálni, hozzájárulva a nitrit karcinogén hatásának kialakításához.

5.1.3. A denitrifikáció harmadik lépése, $NO \rightarrow N_2O$

A NO redukciója és intermedierként való megjelenése a denitrifikáció folyamatának talán legvitatottabb pontja volt. Sokáig nem sikerült bizonyítani, hogy a nitritredukció végterméke, és a N_2O-ot eredményező redukciós folyamat kiindulási anyaga a NO lenne, egy olyan vegyület, amely instabilitása és nagy reakcióképessége miatt igen nagy toxicitással bír.

A DNS-re gyakorolt mutagén hatása (oxidatív reakciók, deaminálás, nitrálás, C-T, AT-GC cserék indukálása) és a repair mechanizmusra kifejtett káros hatásai miatt a NO 1 mM-nál nagyobb koncentrációban sejthalált eredményez (Zumft 1997).

Annak ellenére, hogy a NO minden tulajdonsága ellentmond annak, hogy egy élő szervezetben egy redukciós folyamat köztiterméke legyen, hemoglobin kötési próbával, nitrozil-hemoglobin kialakulása mellett sikerült igazolni jelenlétét (Goretski és Hollocher 1988). Később a folyamatos denitrifikáció során beállt anyagmérleg mellett sikerült kimérni a periplazmatikus térben akkumulálódó mennyiségét is, amely általában nM-os koncentráció tartományt ér csak el (50 nM a *P. stuzeri* esetében) (Zafiriou és mtsai 1989). Mint látható, ez a mennyiség jóval alacsonyabb a letális dózisnál.

A NO-reduktázok tisztítása során fény derült arra is, hogy a csak anaerob körülmények között szintetizálódó membrán-integráns fehérje katalitikus centruma a periplazmatikus tér felé néz (5. ábra). Ennek nagy szerepe lehet a sejt védelmében, ugyanis mielőtt a nitrit-redukcióból felszabaduló NO a citoplazmába tudna diffundálni, a NO-reduktáz működésbe lép. Az általában két alegységből felépülő, hem *b* és hem *c* prosztetikus csoportokat tartalmazó NO-reduktáz további érdekessége, hogy eddig ez az egyetlen enzim, amely N-N kötés kialakítására képes.

5.1.4. A denitrifikáció negyedik lépése, $N_2O \rightarrow N_2$

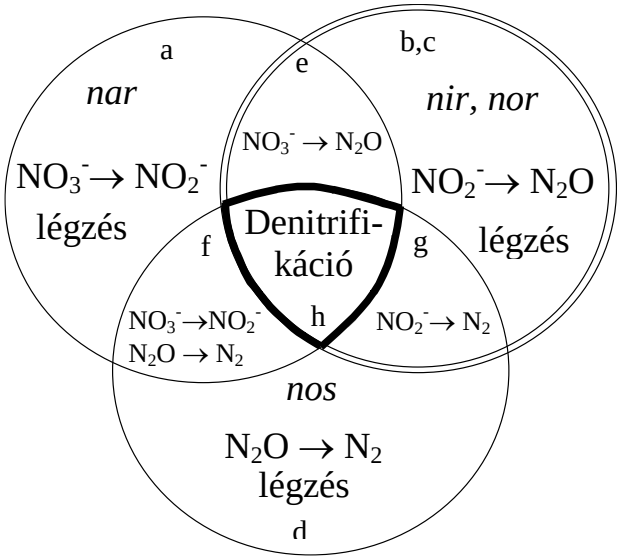
A denitrifikáció utolsó lépését katalizáló periplazmatikus enzim a két alegységes N_2O-reduktáz, amely általában 4 Cu^{2+} iont tartalmaz prosztetikus csoportként. Anaerob körülmények között szintetizálódik, és a denitrifikáció megelőző lépéseitől függetlenül is képes működni. Ezáltal egyes denitrifikáló baktériumok szerves szénforrás és N_2O hozzáadásával szaporodásra is képesek.

5.2. A denitirifkáció szabályozása

A denitirifikáció összetettségéből adódóan annak szabályozása is nagyon bonyolult, így a folyamat még a mai napig sem tisztázott minden lépésében. A DNS-szinten bekövetkező indukció, valamint az elektrontranszport lánc vagy az enzimek szintjén érvényesülő gátlóhatások és ezek fordítottja szabályozzák együttesen a denitrifikáció enzimrendszerét.

5.2.1. A szabályozás génszintű mechanizmusa

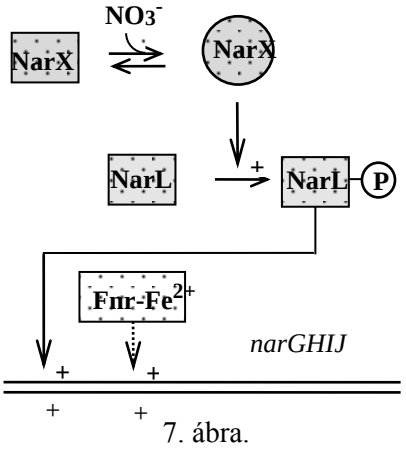
A denitrifikáció egymásra épülő folyamatainak Zumft (1997) szerinti moduláris szintű bemutatása alapján megállapítható, hogy csak az a baktérium képes teljes denitrifikációt végezni, amely mindhárom modullal rendelkezik (4. ábra h). Ebben az esetben van csak jelen minden olyan enzim, amely a nitrát nitrogéngázig tartó redukciós folyamatát végig képes vinni. Minden más esetben, amikor valamely modul genetikai állománya hiányzik, vagy átírása gátolt, csak valamely NO_x légzés, átfedés esetén különböző NO_x légzés enzimei lesznek jelen.



6. ábra

A denitrifikáció folyamatainak moduláris szerveződése Zumft szerint (1997).

A nitrát-reduktáz alegységeit kódoló gének kifejeződését külső és belső környezetből érkező jelek befolyásolják. A *narGHIJ* operon átírását a citoplazmában megjelenő nitrát indukálja, amely folyamatot elsőként az *E. coli* esetében írták le (Stewart és Berg 1988). A reakció első lépéseként a citoplazmába érkező nitrátot a NarX nitrátszenzor fehérje megköti, és így konformáció változáson megy keresztül. A



7. ábra.

A nitrát-reduktáz génjének szabályozása *E. coli*-ban. (A.M. Stouthamer alapján)

megváltozott térszerkezetű NarX fehérje már képes a NarL fehérje foszorilációjára, amely a DNS-hez kötődve elősegíti a *narGHIJ* operon átíródását. A sejt redox állapota, mint környezeti faktor szintén hatással van a génexpresszióra, amelyet az FNR fehérje családba tartozó Fnr-Fe^{2+} transzkripciós faktor közvetít. Az Fnr-Fe^{2+} transzkripciós faktor az anaerob metabolizmus indukáláshoz és fenntartásához nagy mennyiségben szükséges fehérje (Trageser és Unden 1989), amely megfelelő körülmények között a *narGHIJ* operon aktivátoraként működik (Spiro és mtsai 1989). Az *E. coli* esetében ismertetett szabályozást más denitrifikáló baktériumoknál még nem sikerült minden elemében felderíteni.

A denitrifikáció enzimeit kódoló gének indukciójával szemben a legnagyobb represszíós hatással az oxigén bír, köszönhetően annak, hogy a denitrifikáció alapvetően anaerob folyamat. Természetesen a különböző denitrifikáló és nitrátlégző baktériumok esetében nagy eltéréseket mutat az oxigén hatása, amely ha nem is minden enzim szintézisét, de a denitrifikáció globális folyamatát mindenképpen gátolja.

A *Paracoccus denitrificans* esetében Baumann és mtsai (1996) mRNS szintjén vizsgálták az egyes reduktázok indukcióját és szintézisét, különböző tenyésztési körülmények között. Ha magas oxigéntenzión nevelt sejteket anaerob körülmények közé helyeztek, akkor legelőször a nitrát- és a NO-reduktázt kódoló gének aktiválódtak. Később bizonyították, hogy az egyidejű indukció hátterében az áll, hogy a kódoló szekvenciák közel helyezkednek el egymáshoz az operonban, így az átíródás során egy közös policisztronos mRNS-re kerülnek át. Ezekhez képest jóval később indukálódott a nitrit-reduktáz génje, amelyet egy különálló mRNS kódol.

Ha a tenyészeteket az oxigénmentes környezetből áthelyezték aerob körülmények közé, akkor a vizsgált géneknek semmiféle újbóli aktiválódását nem sikerült kimutatni és az addig működő denitrifikáció is leállt. A reduktázok közül egyedül a nitrit-reduktáz tartotta meg kismértékben az aktivitását, amely annak részleges oxidáz-aktivitásával magyarázható.

A *P. stuzeri* esetében az aerob tenyésztés során egyedül a N_2O-reduktáz aktivitás volt kimutatható a sejtekből, sem a nitrát- sem pedig a nitrit-reduktáz szintézise nem indult meg (Körner és Zumft 1989).

Léteznek azonban olyan baktériumok is, mint pl. a *Thiosphaera pantotropha*, amelyek a periplazmatikus nitrát-reduktázuk segítségével aerob körülmények között is képesek nitrátot redukálni. Robertson és Kuenen (1984) szerint a baktérium denitrifikációs enzimrendszere konstitutívan szintetizálódik, ugyanis a sejtek szaporodásában nem következett be *lag* periódus, miután a tápoldatot anoxikussá tették. Ezzel szemben Moir és mtsai (1995) arra az eredményre jutottak, hogy a baktérium nitrit-reduktázának szintézise mindenképp gátolt aerob körülmények között.

5.2.2. Szabályozás az enzimműködés szintjén

Mint minden egymásra épülő lépésekből álló enzimatikus reakciósorozat esetén, ebben az esetben is a folyamat kiindulási anyaga és köztitermékei hatással vannak a következő, vagy az előző redukciós lépésekre. Így a nitrátról ismert, hogy bizonyos koncentráció felett gátolja a nitrit-, illetve a NO-reduktáz működését (Körner és Zumft 1989). A felhalmozódó intermedierek nemcsak a denitrifikáció egyes enzimeire hathatnak, hanem a sejt egészére is káros hatással lehetnek (NO_2^-, NO karcinogén hatása).

A denitrifikáció kulcsenzime, a nitrit-reduktáz sajátos érzékenységet mutat a tápoldat kémhatásával és sótartalmával szemben is, a legérzékenyebben azonban a környezet oxigénszintjére reagál. A nitritredukció azonnal lelassul, vagy teljesen leáll, amennyiben a rendszerbe szabadon felvehető oxigén kerül. Ennek hátterében az enzim már említett kettős tulajdonsága áll, miszerint részleges oxidáz aktivitással is bír (Fülöp és mtsai 1995). Az oxigén felé mutatott affinitása jóval nagyobb, és annak redukciója mintegy 100-szor lassabb, mint a nitrité (Zumft 1997).

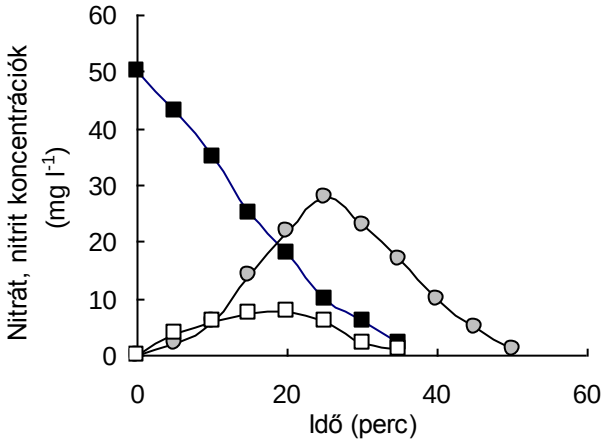
5.2.3. Szabályozás az elektrontranszport szintjén

Az elektrontranszport szintjén zajló folyamatokat először Ferguson és Stouthamer (1990) vizsgálták. Azt tapasztalták, hogy az általuk aerob, illetve anaerob módon tenyésztett *Paracoccus denitrificans*-ban az elektronok megoszlása az elektrontranszport során eltérő volt, és ez nagy mértékben kihatott az adott sejtek denitrifikációs képességére is. Mivel a denitrifikáció összetett folyamatában reduktázok, oxidázok és kevert tulajdonságú enzimek (nitrit-reduktáz) vesznek részt, a szabályozás során végső soron arról lehet szó, hogy a rendszerbe bekerülő elektronok a működő oxidázok és reduktázok között hogyan oszlanak el.

6. A denitrifikálók Martienssen és Schöps féle rendszere

A denitrifikációs aktivitás mértéke az eddig bemutatott tényezőkön túl függ még az egyes enzimek hatékonyságától, működési sebességétől is. Ennek alapján hozták létre Martienssen és Schöps (1999) rendszerüket, melyben a baktériumok három csoportját különítették el. Az első csoportba (A) az ún. nitrátlégző baktériumok tartoznak, amelyek csak a nitrát-nitrit átalakulás katalizálására képesek. A második csoport (B) tagjaira az jellemző, hogy az ide tartozó baktériumok nitrit-reduktázai sokkal nagyobb aktivitással rendelkeznek, mint a nitrát-

reduktázaik, így bár némi nitrit-akkumuláció kimutatható a folyamat során, a nitrátredukció végére a nitrit bontása is befejeződik (6. ábra). A B típusú denitrifikálók denitrifikáló rendszerekben történő alkalmazása azonban nagyon kedvező, hiszen az egyidejű nitrát- és nitrit-redukciónak köszönhetően a nitráttal szennyezett víz kezelési ideje jelentősen megrövidül.



8. ábra

A denitrifikálók két csoportja Martienssen és Schöps szerint (1999).

B típus nitrát nitrit

C típus nitrát

A harmadik csoportba (C) tartozik a denitrifikálók zöme. Ezeknél a denitrifikáció során, jelentős nitrit-akkumuláció jön létre, amelynek mértéke az adott baktérium nitrát- és nitrit-reduktázának aktivitásbeli különbségéből származik (6. ábra). Nem ritka, hogy a nitrit-reduktázok sebessége harmada csupán ugyanazon baktérium nitrát-reduktázának sebességének.

A “HASZNOS” NITRÁT IONOK ALKALMAZÁSA BIOREMEDIÁCIÓS ELJÁRÁSOKBAN

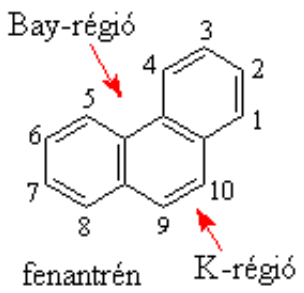
Az ipari termelés utóbbi évtizedekben bekövetkezett rohamszerű növekedésének köszönhetően több millió olyan szerves vegyület került előállításra, amelyek azelőtt sosem léteztek, s ezek 80%-nak az élő szervezetre gyakorolt hatása nem ismert (Page G. W. 1998). Ezek igen nagy hányadát képezik az aromás vagy policiklusos aromás vegyületek.

7. Az aromás és policiklusos aromás szénhidrogének (PAH)

Az aromás és a policiklusos aromás szénhidrogének (**p**olycyclic **a**romatic **h**ydrocarbons, PAH) mindennapi életünk résztvevői. A természetben nagy számban találhatóak meg: előfordulnak kőszénkátrányban (antracén, fenantrén), kőolajban (naftalin), míg mások növényi olajok (szalicilsav) (Cornelus és mtsai 1996) alkotórészei. Az ipar nagy mennyiségben dolgozza fel a különféle származékokat. A gyógyszergyártás éppúgy nem nélkülözheti ezeket a vegyületeket (szalicilsav → aszpirin), mint a festékgyártás, vagy az üzemanyag-gyártás (benzin oktánszámának növelésére használt toluolt) de a kozmetikai ipar is jelentős mennyiséget használ fel.

Az aromás szénhidrogének és a PAH egy vagy több aromás gyűrűt tartalmaznak, ezáltal kis vízoldékonyságú, erősen hidrofób molekulák. Vízoldhatóságuk a gyűrűk számának növekedésével logaritmikusan csökken. A talajvízzel kevéssé mobilizálhatóak, képesek erősen kötődni a talaj szerves anyagaihoz, pl. a huminsavakhoz (Descenes és mtsai 1996, Mulder és mtsai 1998, Ressler és mtsai 1999), amely tovább csökkenti mozgékonyságukat, és így akár évekig halmozódhatnak egy adott területen.

A PAH-ok széleskörű alkalmazása miatt viszonylag hamar fény derült azok komoly egészségkárosító hatására. A 3 gyűrűs fenantrén és származékai különböző rákos folyamatok kialakításáért felelősek. Szerkezetükből adódóan a genetikai információ-átadására is hatással vannak, ennek hosszú távú, örökletes hatása is lehet.



. 9. ábra

A fenantrén K- és Bay-régiója

A policiklusos vegyületek gyűrűinek egymáshoz kapcsolódásakor kialakulhatnak olyan régiók, amelyeket a szakirodalom K- és Bay-régiónak hív (9. ábra) Kísérletek bizonyítják, hogy ezeknek a térszerkezeti elemeknek fontos

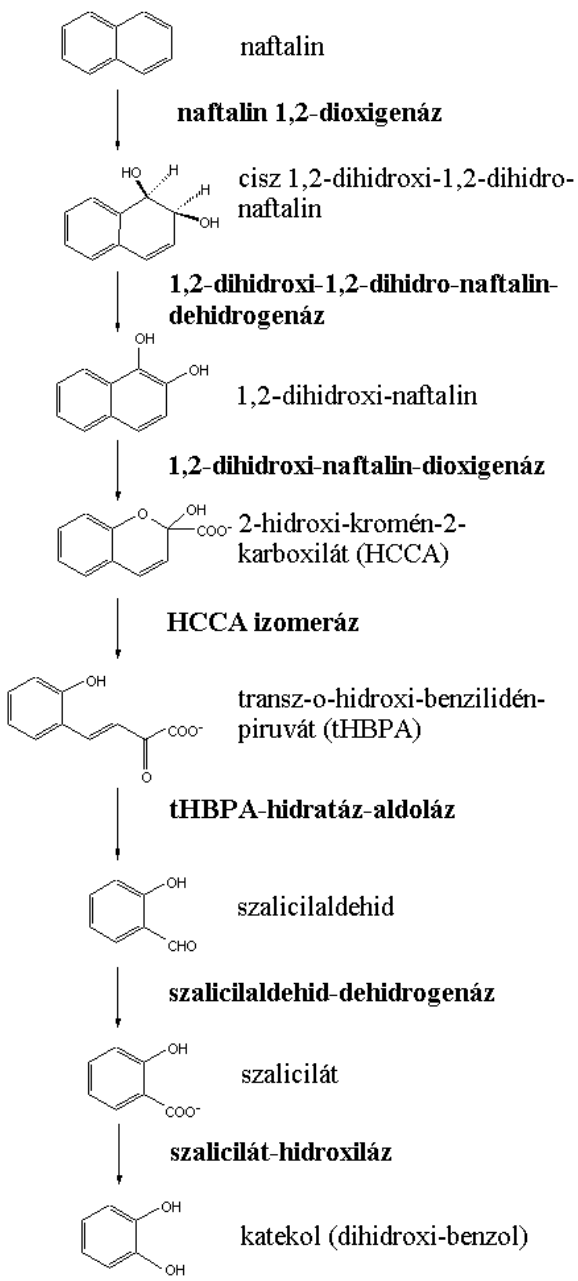
szerepe van a genetikai eredetű elváltozások előidézésében (Samanta és mtsai 1999), mivel az említett régiókkal a vegyületek könnyen beékelődhetnek a DNS láncába.

A fenantrénon kívül sok más aromás anyagnak és PAH-nak van súlyos karcinogén hatása, így kezelésük nagyfokú óvatosságot igényel. Minden elővigyázatosság ellenére évről-évre történnek azonban olyan környezetszennyezések, amelyek főszereplői ezek az anyagok, ezért már régóta folynak erőfeszítések az ilyenfajta környezeti károk csökkentésére.

8. A PAH lebontás biokémiai és genetikai háttere

A PAH-ok lebontásának első lépéseit mono- és dioxigenáz enzimek végzik, ugyanis a gyűrű felnyitása oxigén segítségével történik. A következőkben a naftalin, mint PAH, valamint a szalicilát és a katekol, mint aromás köztitermékek lebontásának enzimatikus hátterét ismertetjük.

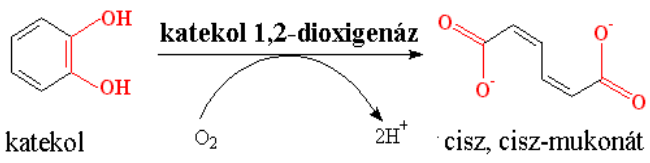
A naftalint a naftalin-dioxigenáz enzim hasítja (11. ábra), aminek eredményeként cisz-1,2-dihidroxi-1,2-dihidro-naftalin jön létre. A dioxigenázok vas-kén tartalmú proteinek, amelyek általában exogén vasat igényelnek működésükhöz. A naftalin-dioxigenáz három alegységből áll (A, B, C), és egyik alegysége egy flavoprotein, mely tartalmazza a reakcióhoz szükséges vasat. Az oxidált enzim megköti a naftalint, és két elektront fogad a NADH-tól az *A* és *C* komponens jelenlétében, míg a *B* alegység terminális dioxigenázként funkcionál (Ensley és mtsai 1983). Egyes mérések szerint érdekes módon a naftalin nem az enzim elsődleges inducere, hanem inkább egyfajta prekurzora a valódi inducernek, ami lehet a



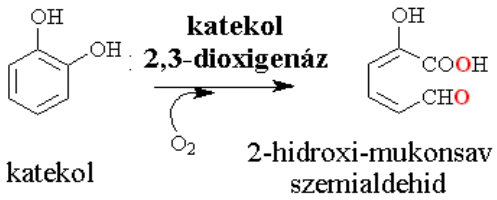
10. ábra

A naftalin és a szalicilát lebontási útvonala

szalicilát vagy a szalicil-aldehid (Cidaria és mtsai 1994). A naftalin több lépcsőben végül szaliciláttá alakul, amelynek katekollá történő bontását a szalicilát-hidroxiláz nevű flavoprotein végzi, ami tulajdon-képpen egy monooxigenáz (1-hidroxilálás, 1-dekarboxilálás). Eddig két fajtáját izolálták, melyek között apró eltérések vannak, azonban mindkét enzim externális monooxi- genáz, külső energiaforrás ként piridin nukleotidot igényelnek (Rodric és mtsai 1972, You és mtsai 1990) (11. ábra).



A katekol orto-hasítása (β-ketoadipát út)



11. ábra

A katekol meta-hasítása (α-ketosav út)

A *katekol* lebontása két úton mehet végbe: orto-, vagy meta-helyzetű hasítás révén. Az orto-helyzetű hasítást (*β-ketoadipát út*) (12. ábra) a katekol 1,2-dioxigenáz végzi és eredményeképp *cisz,cisz-mukonát* szabadul fel, míg a meta-helyzetű hasítást (*α-ketosav út*) (12. ábra) a katekol 2,3-dioxigenáz végzi, és *2-hidroxi-mukonsav-szemialdehid* keletkezik. Az enzimekre jellemző, hogy 1 mol szubsztrátba 1 mol oxigént építenek be. A katekol 2,3-dioxigenáz könnyen inaktiválható oxidáló ágensekkel, mint pl. H_2O_2-dal (Nakazawa és mtsai 1973). Az enzimet különféle nitrogéntartalmú aromás anyagok is képesek inaktiválni, mint a piridin, kinolin, vagy a m-fenantrolin (Tatsuno és mtsai 1980)

Nem minden mikroorganizmusnak van meg az a képessége, hogy aromás szénforráson képes növekedni. Azok az enzimek, amelyek lehetővé teszik az extrémnek nevezhető szénforrásokon való növekedést, általában plazmidon kódoltak. Régóta ismert, hogy *Pseudomonas* törzsekben a szalicilát és a naftalin lebontását katalizáló enzimek plazmidon kódoltak. A *P. putida* NAH7 plazmidján a *nah* és a *sal* operonban találhatóak a naftalin katabolikus enzimei, míg a szalicilát-hidroxilázt ugyanezen plazmid *nahG* génje kódolja (You és mtsai 1990). Azonban egyes kutatások alapján valószínűnek tűnik, hogy a naftalin lebontásában kromoszómális gének is közreműködnek. *Pseudomonas* fajoknál a katekol lebontásakor a β-ketoadipát út enzimei nem plazmidon kódoltak, míg az α-ketosav út enzimei a NAH plazmidon helyezkednek el (Chakrabarty és mtsai 1976, Zuniga és mtsai 1981, Connors és Barnsley 1982).

A plazmid evolúciós szempontból nagy előnyt jelent, ugyanis a bakteriális konjugáció során a donorból a recipiensbe átkerülhetnek az adaptációhoz szükséges gének (Dunn és mtsai 1973, Herrick és mtsai 1997).

9. Bioremediációs technológiák

Az évtizedek óta használt fizikai eljárásokkal szemben az utóbbi időben egyre nagyobb figyelmet kaptak a biológiai módszerek a szennyezett területek kezelésében. Bár a klasszikus, fizikai technológiák általában nagy hatásfokkal működnek, azonban számos kivetnivalót hagynak maguk után. Elsősorban nagy a költségigényük, valamit sok esetben csak "tüneti kezelés" (a szennyező anyagok kiásása és raktározása) folyik, továbbá sokszor nem fordítanak figyelmet magának a kezelésnek a hatására (pl. a hőkezelt talajok mikroflórája jelentősen károsodhat).

A biológia eljárások azon alapulnak, hogy a káros anyagok a talajlakó mikroorganizmusok számára szén- és energiaforrásként szerepelhetnek. A módszerek egyik nagy előnye, hogy (az adott anyag teljes semlegesítését elvégző tökéletesen működő ökoszisztéma esetén) nem halmozódnak fel, és nem lépnek ki a rendszerből káros melléktermékek, szemben pl. az égetés során keletkező dioxinokkal. A technológia további nagy előnye a költségkímélő működés, mivel az *in situ* bioremediációs folyamatoknál nem kell drága kiszolgáló egységeket és infrastruktúrát biztosítani a talajból kinyert veszélyes anyagok utólagos tárolásához, kezeléséhez. A bioremediáció egyetlen hátránya, hogy a tisztítási folyamat általában lassabb, mint a fizikai vagy kémiai módszerek esetében.

A biológiai úton történő dekontaminálás hatékonysága a mikroorganizmusok pontosabb megismerésével és új technológiák kidolgozásával párhuzamosan növekedett. Az első, és azóta is a legegyszerűbb remediációs módszerek kézenfekvően a szennyezett területek saját, adott biodegradációs szempontból hatékony baktériumflórájának dúsításán, felszaporításán alapultak. A baktériumpopuláció heterogenitása miatt ezek az eljárások általában kevésbé kontrollálhatóak, azonban hatásukat hosszútávon is megtartják. Köszönhető mindez annak, hogy a talajflórából kiszelektálódó, szennyezést bontó baktériumpopuláció egyes tagjai között aktív munkamegosztás jön létre. Míg az egyes fajok kimondottan csak a célszennyezés bontására képesek, addig mások a bontás során keletkezett intermedierek további degradációját, felhasználását végzik. Ilyen rendszerek esetében stabil bakteriális ökoszisztéma alakul ki.

A bioaugmentáció esetében a szennyezésre szelektíven kitenyésztett baktériumot, esetleg baktériumok keverékét alkalmazzák. A kívánt törzset, törzseket nagy mennyiségben felszaporítják, majd kijutatják a célterületre. Mivel tiszta tenyészetekről van szó, az előzetes kísérletek alapján tervezhető, előrelátható a biodegradáció hatékonysága. A hatás hosszútávú fenntarthatósága azonban attól függ, hogy a talajba jutatott baktériumok hogyan tudnak beilleszkedni a már meglévő ökoszisztémába. Sok esetben az őshonos mikroorganizmusok kompetitíven lépnek fel a mesterségesen bevitt baktériumok ellen.

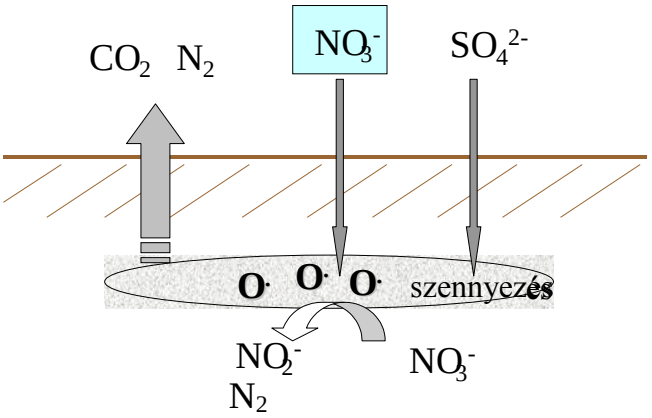
A genetika és a molekuláris biológia utóbbi két évtizedben bekövetkezett rohamos fejlődésének hatása a környezetvédelemben is tapasztalható. A baktériumok genetikai állományának célzott módosításával az adott szennyezés felszámolását nagyobb hatékonysággal véghezvivő törzsek hozhatók létre. Az így előállított sejtvonalakat azután bioaugmentációs eljárásokban alkalmazzák. Az eljárás elterjedését hátráltatja azonban a génmanipulált mikroorganizmusok felhasználásával kapcsolatos általános ellenszenv (Parke 1995).

10. A nitrát szerepe az in situ bioremediációban

Az alábbiakban a leggyakrabban használt bioremediációs technológia az ún. *in situ* bioremediáció jellemzőit tekintjük át.

Az *in situ* bioremediáció a szennyezett terület helyben történő mikrobiális kezelését jelenti aerob vagy anaerob módon. Az első esetben a tisztítandó terület oxigénellátását megoldhatják úgy, hogy célzott furatok segítségével nagy nyomású levegőt juttatnak a talajba. Ezt az eljárást általában akkor alkalmazzák, ha már mélyebb talajrétegekbe is leszivárgott a szerves szennyezés. Hátránya, hogy alkalmazhatósága nagyban függ a talaj fizikai összetételétől, szerkezetétől. Agyagos, kevésbé porózus talajok esetén a furatok körül csak kis térrészt lehet levegőztetni, így egy ilyen szerkezetű több hektáros terület megtisztítása ezzel a módszerrel nem hatásos. Amennyiben a szennyezés még a talajfelszínhez közel van, a talaj felső rétegének forgatásával, pl. szántással juttathatnak elegendő oxigént a mikroorganizmusoknak.

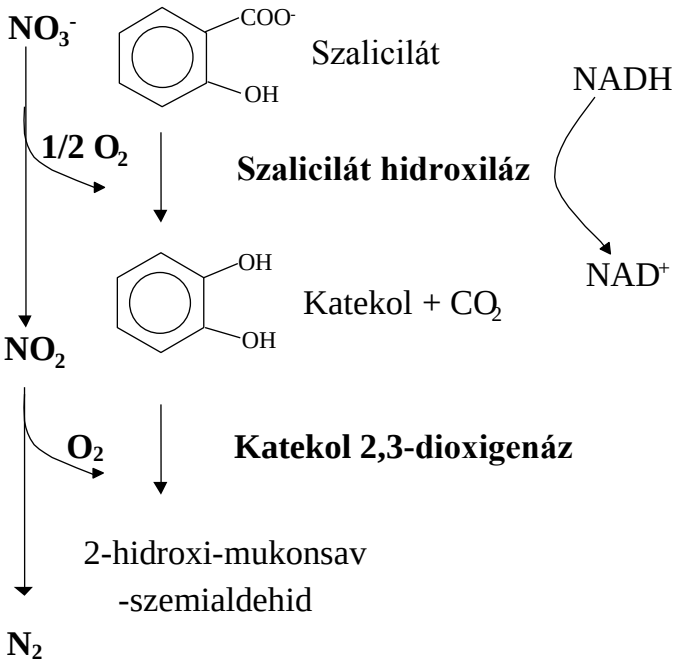
Anaerob viszonyok között az oxigén hiánya miatt az aromás vegyületek



12. ábra
A nitrát mint alternatív oxigénforrás

gyűrűnyitása nem megy végbe. Az utóbbi években, a bioremediácós eljárások szempontjából hatalmas jelentőséggel bíró felfedezést jelentett annak a speciális anyagcserének a feltárása, miszerint egyes szervetlen vegyületek redukciójára képes baktériumok anaerob körülmények között a redukálandó szubsztrát mellett képesek aromás anyagok kometabolizmusára (Kuhn és mtsai 1988, Bontig és mtsai 1995, Häggblom és mtsai 1999). A mechanizmus lényege, hogy a szulfát, illetve a nitrátionok redukálása során felszabaduló oxigéngyököket is képesek a baktériumokban lévő oxigenázok felhasználni és ezáltal a gyűrűnyitást katalizálni (10. ábra). A reakció felismerésével lehetőség nyílt olyan területek esetleges kezelésére is, amelyekről addig teljesen lemondtak, mivel az ott lévő talaj kellő mértékű oxigenellátását nem tudták volna semmilyen módszerrel sem biztosítani. A manapság még méltán technológiai újdonságnak számító eljárás további előnye, hogy a ráfordítandó költségek minimálisak. Ebben az esetben szimultán folyhatnak az anaerob folyamatok a talaj mélyebb rétegeiben, valamint az aerob folyamatok a talaj felszínén, ezért gyorsabb a lebontás. Mindehhez elegendő csupán a redukálandó ionokat a talajba oldani. Sok esetben még erre sincs szükség, ugyanis az aktív mezőgazdaságnak köszönhetően a talajok és a talajvizek nagy része jelentősen szennyezett nitrátionokkal. Az ilyen területek veszélyes szerves anyagokkal történő szennyeződése után szimultán megtörténhet a bakteriális denitrifikáció általi nitrát bontás, és a szerves anyagok eliminációja. Az oxigén teljes hiánya mellett történő remediációs eljárások egyetlen hátránya az alacsony reakciósebesség. A redukálandó ionok mennyiségének növelése és a degradáció hatékonyságának emelkedése közötti összefüggéseket eddig még nem vizsgálták.

Az általunk felvázolt feltételezett reakcióútvonal szerint, tekintetbe véve a nitrátban kötött oxigén mennyiségét, 1 mól nitrát nitrogéngázzá történő redukciójakor 3 mól oxigéngyök szabadulhat fel, ami anaerob körül-mények között egy egymást követő



13. ábra

A nitrát redukció és a szalicilát bontás között feltételezett összefüggés

momooxigenáz és egy diooxigenáz enzimreakció oxigénigényét fedezni tudná. Ez alapján 1 mól nitrát teljes redukciója pl. 1 mól szalicilát teljes lebontását lenne képes elősegíteni (13. ábra).

A fentiekben vázolt elmélet az egyszerűség kedvéért nem veszi figyelembe, hogy a baktériumok életfolyamatai során a nitrátredukció lépéseiből kilépő gyökök, atomok természetesen máshogy is hasznosulhatnak.

Az aromás vegyületek anaerob módon történő lebontásáért a legtöbb esetben valamely *Pseudomonas* törzs tehető felelőssé. A viszonylag újkeletű anaerob technológiák lehetőségei még koránt sincsenek kiaknázva, ezért az ezekkel kapcsolatos nemzetközi szintű kutatások az általános érdeklődés központjába kerültek.

11. A Pseudomonas genus szerepe a talajok nitráttartalmának csökkentésében

Nemzetközi felmérések eredményei szerint egy átlagos talaj teljes aerob élő csíraszáma 2-5 x 10^8 db baktérium g^{-1} talaj-ra tehető. Ehhez képest az anaerob baktériumok száma egy nagyságrenddel kisebb, míg a denitrifikációra képes mikroorganizusok mennyisége átlagban 2 x 10^6 db baktérium g^{-1} talaj (Gamble és mtsai. 1976, Chéneby és mtsai. 2000). A klasszikus biokémiai módszerek (Gamble és mtsai 1976) és a fejlett molekuláris technológiák bevetése (ARDRA=**a**mplified **r**ibosomal DNA **r**estriction **a**nalysis, és 16S rRNS szekvencia analízis, Chéneby és mtsai 2000) is mind azt igazolták, hogy a *Pseudomonas* genus az egyike azoknak a domináns csoportoknak, ahová a talajok denitrifikációra képes baktériumai tartoznak. Emellett az *Alcaligenes, Burkholderia-Ralstonia, Xanthomonas-Frateuria, Bacillus* és *Streptomyces* csoportok voltak jellemzőek.

A mai napig ismert és valamely *Pseudomonas* genusba besorolt baktériumoknak (106 faj) csak mintegy negyedéről ismert, hogy denitrifikációra képes (Bergey's Manuall of Deteminative Bacteriology), és azok közül is csak 12 faj denitrifikációs folyamatát, vagy nitrátredukcióját vizsgálták eddig részletesebben (6. táblázat).

A genuson belül a *P. denitrificans* nitrát- és nitrit-reduktázainak viselkedését jellemezték elsőként (Radcliffe és mtsai 1970, 1968, Brooks és mtsai 1992, Shanmugasundram és mtsai 1993,) továbbá vizsgálták már a denitrifikációs körülmények közötti szaporodási képességét és a nitrát, nitritionok és nitrogénoxidok melletti növekedésének energiamérlegét is (Koike és mtsai 1975). Számos munka született az immobilizált sejtek denitrifikációs aktivitásainak (Nilson és mtsai 1980, Santos és mtsai 1996, 1993), illetve a denitrifikációs aktivitás

változásának meghatározására aerob és anaerob körülmények között (Robertson és mtsai 1995, Kornaros és mtsai 1998, Gouw és mtsai 2001).

7. táblázat

A nitrát, nitrit redukciójáról ismert *Pseudomonas* fajok bemutatása

Fajok	D	A	Fajok	D	A
P. aeruginosa	⊕⊕⊕	⊕⊕⊕	*P. nautica*	⊕	⊕
P. alcaligenes	∅	⊕⊕	*P. nitroreducens*	∅	∅
P. aureofacines	⊕	⊕	*P. perfectomarina*	⊕	∅
P. azotoformans	⊕	∅	*P. pickettii*	∅	⊕
P. caryophylli	∅	∅	*P. plantarii*	∅	∅
P. cepacia	∅	∅	*P. pseudoalcaligenes*	∅	⊕
P. chlororaphis	⊕	⊕	*P. pseudomallei*	∅	∅
P. cichorii	∅	⊕	*P. putida*	⊕⊕	⊕⊕⊕
P. delafieldii	∅	⊕	*P. saccharophila*	∅	⊕
P. denitirificans	⊕⊕⊕	⊕	*P. solanacearum*	∅	∅
P. facilis	⊕	∅	*P. stutzeri*	⊕⊕⊕	⊕
P. fluorescens	⊕⊕	⊕⊕	*P. syringae*	∅	∅
P. mallei	∅	∅	*P. viridiflava*	∅	∅
P. mendocina	⊕	⊕	*P. butanovora*	∅	∅

D=denitrifikációt bemutató szakirodalom (⊕), A=aromás anyagok hasznosítását vizsgáló szakirodalom (⊕)
∅= adat nem fellelhető

Annak ellenére, hogy a denitrifkáció szempontjából a fent említett törzset igen régóta vizsgálják mára a *P. stutzeri* és *P. aeruginosa*-val foglakozó szakirodalmak száma meghaladta a *P. denitrificans*-ét. Mindkét baktérium esetében nagy érdeklődésre tart számot a denitrifikáció oxigén-toleranciájának vizsgálata (Su és mtsai 2001, Thomas és mtsai 1994, Körner és mtsai 1989, Hernandez és mtsai 1987) és a denitrifikációt végrehajtó enzimek genetikai hátterének jellemzése (Vollack és mtsai 2001, Braker és mtsai 2000, Hartig és mtsai 1999).

12. A P. butanovora bemutatása

A *P. butanovora*, amelynek faj szintű leírását először Takahashi és mtsai (1980) végezték el, nevét butánbontó képességéről kapta, melynek pontosabb lépéseire azonban csak később derült fény (Daniel J. Arp 1999). A metabolizmus leírása szerint a butánt egy bután-monooxigenáz segítségével először 1-butanollá alakítja, majd az butáraldehiddé, és végül butiráttá alakul. A monooxigenáz reakció 90%-os oxidációs terméke az 1-butanol, amely egy NAD^+-független elsődleges és egy NAD^+-függő másodlagos alkohol-dehidrogenáz enzim hatására alakul tovább (Vagnai és mtsai 2001). Nyomokban azonban 2-butanol is képződhet, amit szénforrásként szintén elfogadnak a sejtek.

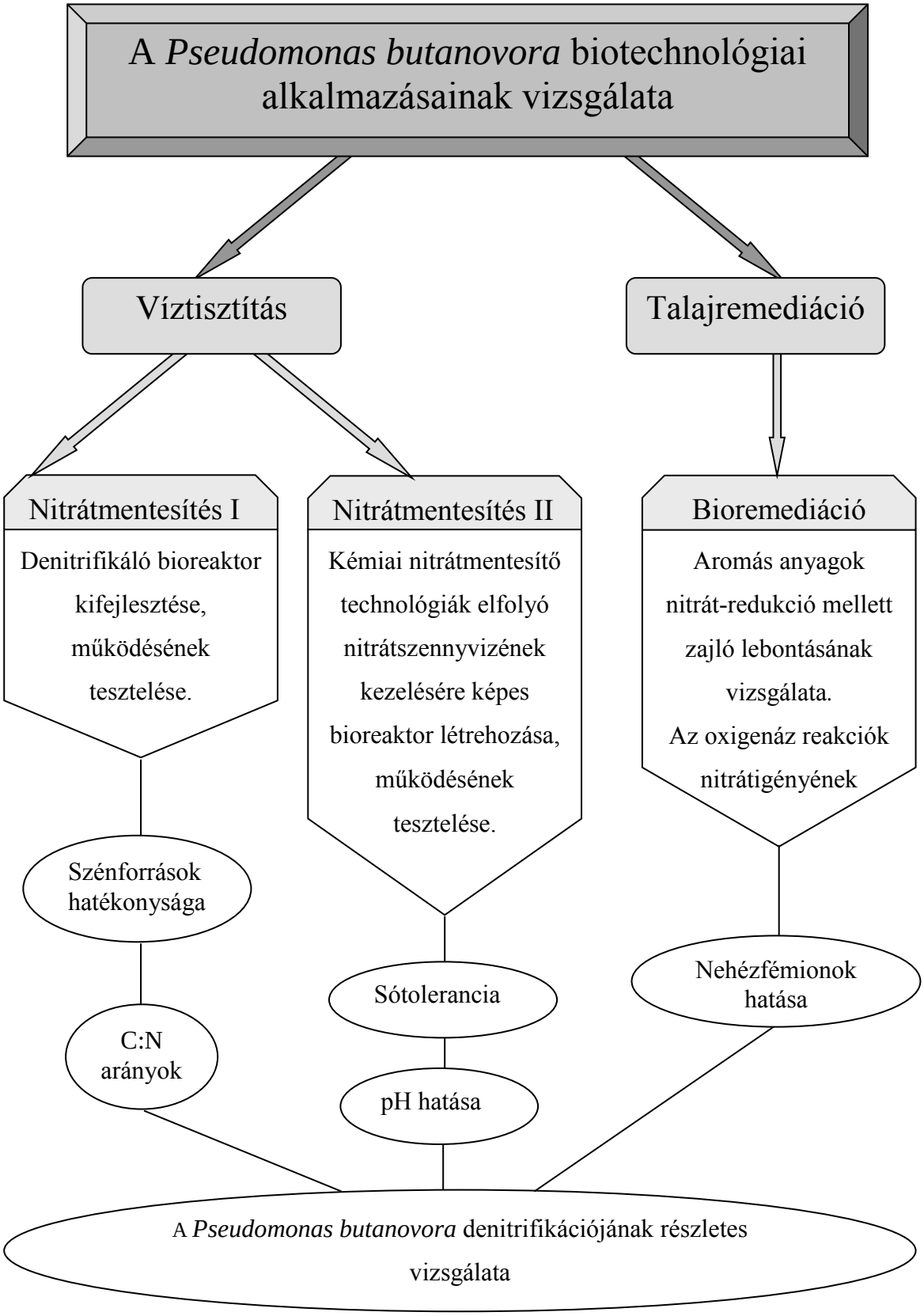
A bután-monooxigenáznak a bután oxidációja során mutatott nagyfokú specifitása ellenére (1-butanol) aspecifikus reakcióit is kimutatták egyes klórozott szénhidrogének bontásával kapcsolatban. Hamamura és mtsai (1997) egyértelmű bizonyítékokkal szolgáltak arra nézve, hogy a *P. butanovora* kloroform, triklóretilén, 1,2-cis-diklóretilén és vinil-klorid metabolizmusának hátterében a baktérium bután-monooxigenáza áll. A monooxigenáz összehasonlító vizsgálata során lényeges eltérések adódtak a korábban erről a tulajdonságáról már jól ismert *Mycobacterium vaccae* enziméhez képest, továbbá Hamamura és mtsai (1999) kimutatták, hogy a sejtvonal ammónia-monooxigenázzal is rendelkezik, amely az ammóniából hidroxil-amint képez.

A butánon kívül a sejtek növekedésük során hidroxivegyületeket, pl. etanolt, n-propanolt, n-butanolt, 1,2-propándiolt, 2,3-butándiolt és karboxivegyületeket, pl. ecetsavat, propionsavat, vajsavat, tejsavat, továbbá C_2-C_9 nyíltláncú szénhidrogéneket képesek felhasználni, melyekből poli-béta-hidroxibutirát tartaléktápanyagot képeznek. Ezzel szemben C_{10}-C_{16} szénatomszámú alkánokat, a metánt, a metanolt, a glükózt, a fruktózt, a xilózt, az etilént, a propilént, az 1-butént, a 2-butént, az 1.3-butadiént, a szorbitolt, az eritrolt szerves szénforrásként nem képesek hasznosítani.

CÉLKITŰZÉS

Célunk a *P. butanovora*-nak a víztisztítási és talajremediációs eljárásokban való alkalmazhatóságának komplex vizsgálata volt, melynek főbb lépéseit a 14. ábrában foglaltuk össze. Az alapvető irányvonalak a következők voltak:

- A *P. butanovora* vizsgálata során nitrát- és nitrit-redukciójának, illetve denitrifikációjának részletes jellemzését kívántuk megadni. Célul tűztük ki aktivitásának más fajok aktivitásával történő összehasonlítását, valamint annak vizsgálatát, hogy denitrifikációjának hatékonysága hogyan módosul különböző szerves szénforrások alkalmazása esetén, magas só-, nitrátkoncentrációk és nehézfémionok jelenléte mellett.
- Denitrifikáló bioreaktorok kifejlesztése és működésük tesztelése.
- A *P. butanovora* bioremediációs folyamatokban történő alkalmazhatóságának vizsgálata. Nitrát és valamely egyszerű aromás vegyület anaerob körülmények között zajló, szimultán bontásának vizsgálata, amely kísérletek során elsősorban arra kerestük a választ, hogy egy oxigenáz enzimreakció oxigénigényét hogyan tudják biztosítani olyan anionok (nitrát), amelyek önmaguk a reakció során redukálódnak. A kísérlet további célja egy egymást követő monooxigenáz, dioxigenáz reakció nitrátigényének megadása, amelynek segítségével exogén oxigénforrás hiányában zajló remediációs technológiák esetében az aromás szennyező anyag minőségének és koncentrációjának ismerete mellett jó közelítéssel megadható lenne a szükséges nitrát mennyisége, elkerülendő a további környezetszennyezést (talajvízzel elfolyó nitrát és nitrit ionok).


A *Pseudomonas butanovora* biotechnológiai alkalmazásainak vizsgálata
Víztisztítás
Talajremediáció
Nitrátmentesítés I
Denitrifikáló bioreaktor kifejlesztése, működésének tesztelése.
Nitrátmentesítés II
Kémiai nitrátmentesítő technológiák elfolyó nitrátszennyvizének kezelésére képes bioreaktor létrehozása, működésének tesztelése.
Bioremediáció
Aromás anyagok nitrát-redukció mellett zajló lebontásának vizsgálata.
Az oxigenáz reakciók nitrátigényének
Szénforrások hatékonysága
C:N arányok
Sótolerancia
pH hatása
Nehézfémionok hatása
A *Pseudomonas butanovora* denitrifikációjának részletes vizsgálata

14. ábra

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Anyagok

Az alkalmazott vegyszerek, táptalajkomponensek analitikai tisztaságú (Sigma Co., Reanal Rt., illetve MERCK) vegyszerek voltak.

2. Törzsizoláció, törzsszelekció

2.1. A baktériumok izolálása és tenyésztési körülményeik

A dolgozatban bemutatott *Pseudomonas* fajt egy korábban katonai célokat szolgáló földterület talajából izoláltuk, majd szelektív tápoldatokban teszteltük denitrifikációs és aromás anyag bontó képességét.

Az adott területről származó földmintát DSM 1 tápoldatba (5 g pepton, 3 g húskivonat, 1000 ml H_2O) inokuláltuk, majd az aerob tenyésztési körülmények között felnőtt kevert tenyészetből DSM 1 lemezeken (5 g pepton, 3 g húskivonat, 15 g agar, 1000 ml H_2O) morfológiai tulajdonságok alapján 14 féle baktériumot különítettünk el.

A denitrifikációs aktivitás vizsgálatához minden egyes izolátum esetében az előzetesen DSM 1 tápoldatban felszaporított sejteket a centrifugálás (500g 10 perc) és fiziológiás sóoldattal való mosás után denitrifikációs tesztoldatba (0.082 g KNO_3, 10 g Na-szukcinát, 10.7 g K_2HPO_4, 5.5 g KH_2PO_4, 1000 ml H_2O) pH 7 helyeztük úgy, hogy a tesztoldatok élősejtszáma 10^8 sejt ml^{-1} legyen, majd 24-48-72 órás, szobahőmérsékleten történő inkubáció után a tápoldat nirát-, és nitrit-koncentrációjának meghatározásához mintát vettünk a rendszerekből. (lásd 3.1. pont)

Az aromás anyagok hasznosításának vizsgálatához naftalinos szelektív tápoldatot használtunk, amelyben a biomassza növekedéséből következtettünk a naftalinbontás képességére. A naftalinos oldatok (4.6 g naftalin, 1000 ml DSM 457 ásványi sós tápoldat) izolátumokkal történő leoltását az előzőekben leírt módon végeztük el. A rázatott tenyészetekben (200 rpm, 25 °C) a baktériumok növekedését a tápoldat optikai denzitásának változása (OD 600 nm) alapján határoztuk meg 72 óra után. A naftalinos tesztoldatban felnőtt izolátumokat azt követően szalicilátos tápoldatba (0.8 g Na-szalicilát, 1000 ml DSM 457 ásványi sós tápoldat) oltottuk át. A 72 órás inkubációs idő eltelte után a rázatott tenyészetek

(200 rpm, 25 °C) szalicilát-tartalmának csökkenése alapján vizsgáltuk az adott baktérium szalicilátbontó képességét. (lásd 5.1. pont)

A DSM 457 ásványi sós tápoldat összetétele: 2.44 g Na_2HPO_4, 1.52 g KH_2PO_4, 0.82 g KNO_3, 0.2 g $MgSO_4 \times 7\ H_2O$, 0.05 g $CaCl_2 \times 2\ H_2O$, 10 ml SL-4 mikroelem oldat, 1000 ml H_2O. A $MgSO_4$ és $CaCl_2$-ot az oldat többi részétől külön kell sterilizálni.

SL-4 mikroelem oldat összetétele: 0.5 g EDTA, 0.2 g $FeSO_4 \times 7\ H_2O$, 100 ml SL-6 mikroelem oldat (0.1 g $ZnSO_4 \times 7\ H_2O$, 0.03 g $MnCl_2 \times 4\ H_2O$, 0.3 g H_3BO_3, 0.2 g $CoCl_2 \times 6\ H_2O$, 0.01 g $CuCl_2 \times 2\ H_2O$, 0.02 g $NiCl_2 \times 6\ H_2O$, 0.03 g $Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$, 1000ml H_2O) 900 ml H_2O.

A *Pseudomonas butanovora* sejtvonalának, illetve a kísérletekben szereplő további baktériumok hosszú távú fenntartására DSM 1 lemezeket, míg nagy mennyiségű biomassza előállításához DSM 1 tápoldatot, illetve az intézet fermentációs hátterét (2-80 l New Brunswick fermentorok) használtuk.

2.2. Vizsgált mikroorganizmusok

Pseudomonas butanovora (saját izolátum), rövidítése: P.but.
Pseudomonas denitrificans DSM 1650, rövidítése: P.den.
Pseudomonas aeruginosa (saját izolátum), rövidítése: P.aer.
Pseudomonas stutzeri (saját izolátum), rövidítése: P. stu.
Ochrobactrum anthropi (saját izolátum), rövidítése: O.ant.

A P. but, a P. aer. P. stu. és az O. ant. baktériumok fajszintű meghatározását a Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményének munkatársai végezték el az API-20 NE biokémiai tesztsorozat eredményei alapján.

3. Denitrifikáló bioreaktor kifejlesztése

3.1. Nitrát-, nitritredukció meghatározása.

A vizsgált minták nitrát- és nitrittartalmát kolorimetriás módszerrel, fotométer segítségével határoztuk meg. Mindkét esetben a 448/12-82 számú, ivóvízvizsgálatra vonatkozó magyar szabvány szerint jártunk el.

Nitrátmérés reagensei: 5g l^{-1} Na-szalicilát oldat, 96%-os H_2SO_4, 10 mM NaOH

A mérés menete: 500 µl mintához 100 µl Na-szalicilát oldatot adtunk; az elegy szárazra párolása (30 perc 200 °C) és lehűlése után 100 µl 96%-os H_2SO_4 hozzáadása biztosította a nitrofenol kialakulásához szükséges savas környezetet. 10 perc után a reakciót 3 ml desztillált víz és 700 µl 10 mM NaOH hozzáadásával állítottuk le. A minták optikai denzitását fotométerrel mértük 410 nm-en. (A mérés 1-50 mg l^{-1} nitrát koncentráció-tartományban alkalmazható.)

Nitritmérés reagensei: 1% szulfanil-amid oldat, 0.1% N-(1-naftil)-etilén-diamin-dihidroklorid

A mérés menete: Amennyiben a minta nitrittartalma 5-50 mg l^{-1} közé esik: 50 µl mintához 4,95 ml desztillált vizet és 100 µl szulfanil-amid oldatot adunk. 5 perc elteltével 100µl NAD oldatot adunk, majd 20 perc inkubáció után a mintákat 540 nm-en mérjük.

3.2. Nagynyomású folyadék kromatográfiás (HPLC) analízis

Az alkalmazott szerves szénforrások, (szukcinát, etanol, ecetsav) mennyiségi változásának mérése Gynkotek készüléken, SARASEP CAR-H oszlopon, 50 °C-on történt. A minták mérése 210 nm-en, UV detektorral , illetve RI detektorral történt. Eluensként 0.01 N H_2SO_4 oldatot használtunk, 0.9 ml $perc^{-1}$ áramlási sebességgel. Az adatok kiértékelését Chromeleon szoftver segítségével végeztük el.

3.3. A biofilmhordozók eredete és a hordozók nitrátkötésének vizsgálata

Ioncserélő műgyanta: a kísérletekben Varion KS komplex ioncserélő gyantát használtunk.

Ásványi zeolit:
A kifejtett ásványi zeolithoz közvetlenül a mádi külszíni fejtésből, a kitermelőtől jutottunk hozzá. A kőzet a mechanikai aprításon kívül semmiféle előzetes kezelésen nem ment át.

3.4. Reaktor típusú nitrátkötési kísérletek

Cirkuláltatott, átfolyós rendszerben a reaktortestekbe töltött 30-30 g gyanta és zeolit tölteteken steril, 100-100 ml 20 mg l^{-1} NO_3^--N tartalmú oldatot áramoltattunk át. A minták nitráttartalmát a fentiekben leírt módon, a magyar szabvány szerint mértük.
Mindkét kísérlet összeállítása előtt a gyantát és az ásványi zeolitot desztillált vízzel mostuk több lépésben, majd hősterilizáltuk.

3.5. A baktériumok kikötődésének vizsgálata, biofilmképzés

A *P. denitrificans* DSM 1 tápoldatban 25 °C-on, 180 rpm-el, illetve a *P. butanovora* és az *O. anthropi* esetében DSM 1 tápoldatban 37 °C-on, 180 rpm-el rázatott 24 órás tenyészetének lecentrifugálása (500 g 15 perc) után 100-100 ml fiziológiás sóoldatban vettük fel a sejteket. Az így kapott baktériumszuszpenziókat 24 órán keresztül cirkuláltattuk az ioncserélő gyanta, illetve az ásványi zeolit 30-30 grammját tartalmazó oszlopokon.

A *P. stutzeri* esetében a felületi rögzítés létrehozása a fent leírt módszerrel nem vezetett eredménye. A baktériumra jellemző volt, hogy folyadékkultúrában hamar sejtaggregátumok jöttek létre, amelyek lehetetlenné tették az egyenletes biofilm kialakulását. A sejtaggregátumok gyakorlatilag a felületi hordozót tartalmazó oszlopok alján kiszűrődtek, bekoncentrálódtak. Így a baktérium denitrifikációs aktivitását csak kompozit gyöngy belsejébe immobilizálva vizsgáltuk.

3.6. A biofilm mennyiségének meghatározása

A gyanta és zeolit töltetű reaktorok esetében a 24 órás baktériumkötés után 100 ml fiziológiás sóoldattal mostuk az oszlopokat, hogy a nem kötődött sejteket eltávolítsuk. Ezután a hordozókat kivettük a reaktortestekből, és homogenizáltuk, majd a töltetekhez annyi ml 2N NaOH-ot adtunk, amennyi azok g-ban mért tömege volt. 80 °C-os vízfürdőben történő 1 órás inkubációt követően az elegyeket 20 percig rázattuk, majd az elegyek felülúszójából 1-1 ml-t lecentrifugáltuk (8500 g 10 perc). A tiszta felülúszók 200 µl-es aliquotjaiból határoztuk meg a fehérjetartalmat Folin módszerrel (Lowry és mtsai 1951). Fehérje standardként BSA oldatot használtunk.

3.7. A biofilm denitrifikációs aktivitásának meghatározása

A reaktorok belsejébe töltött 30-30 g ioncserélő gyantát és ásványi zeolitot a biofilmtelepítési szakasz után eltávolítottuk a reaktorok belsejéből, majd teljes térfogatában összekevertük. Ezt követően 3-3 ismert tömegű minta denitrifikációs aktivitását vizsgáltuk. Az aktivitásméréshez használt oldat összetétele megegyezik a 2.1. pontban leírttal. Szobahőmérsékleten 24 óra leteltével mértük az oldatok nitrát- és nitrittartalmát, majd meghatároztuk a denitrifikációs aktivitásokat.

3.8. Immobilizálás kompozit mátrixba

Az immobilizálás során átlagosan 2 mm átmérőjű 5 % nedves biomasszát tartalmazó gyöngyöket készítettünk. A denitrifikáló bioreaktorok hatékonyságának összehasonlításakor minden vizsgált baktérium esetében, továbbá a léptéknövelési kísérletek során is a leírt méretű és biomassza tartalmú kompozit gyöngyöket használtuk.

A kompozit gyöngyök előállításához 2% alginát és 2% gelrite oldatok 1:1 arányú elegyét használtunk. (Kovács és mtsai 1991) Az egyes komponenseket 100 mg l^{-1} EDTA oldatban kell feloldani, majd mindkét oldatot külön sterilizálni és forrón összeönteni.

A lecentrifugált baktériumsejteket a már kihűlt kompozitképző elegyhez kevertük hozzá úgy, hogy a nedves baktérium biomassza 5%-os legyen a kompozit térfogatára nézve.

A kompozit-baktérium elegyet ezután jeges vízben hűtött 1%-os $CaCl_2$ oldatba csepegtettük. A $CaCl_2$ oldat térfogata 4-5-szöröse a kompozit gél térfogatának. A csepegtetés után 40 percig kevertettük a $CaCl_2$ oldatban a gyöngyöket, majd 12 órára 4 °C-ra tettük őket.

3.9. Bioreaktorok I. működtetése

A bioreaktorok felépítésére jellemző adatokat a 8. táblázatban foglaltuk össze. A reaktorokra minden esetben azonos összetételű oldatot áramoltattunk fel, függetlenül attól, hogy a sejteket felületi hordozó felszínére kötöttük, vagy kompozit gél mátrixba zártuk. A különbség csak az áramlási sebességek beállításában volt. A felmenő tápoldat (influens) összetétele a következő volt: 45 mg l^{-1} NO_3^--N (200 mg l^{-1} NO_3^-), 1 g l^{-1}Na-szukcinát (pH 7). A 45 mg l^{-1} NO_3^--N koncentráció a talajvíz magyarországi átlagos nitrát- szennyezettségének felel meg. A felmenő tápoldatot kiegészítettük 0.05% $CaCl_2$-dal, a kompozit gyöngyök hosszútávú stabilitásának megőrzése érdekében. A reaktorokat 25 °C-on működtettük.

A felületi hordozókra immobilizált sejtek esetében a perisztaltikus pumpák segítségével kisebb áramlási sebességet állítottunk be, elkerülendő a túlzott mértékű biomassza-lemosódást (shear stress). A gyantás és az ásványi zeolitos reaktorok átlagban 14 ml óra^{-1} áramlási sebességgel működtek, amelyek az influens esetében 3.6 órás tartózkodási időt (HRT= hydraulic retention time) jelentettek. A kompozit gyöngyöket tartalmazó reaktorok esetében, a kezdeti alacsony áramlási sebességet két nap elteltével minden esetben 20 ml óra^{-1}-ra emeltük (HRT=2.5 h). A reaktorok 12 napos üzemeltetése után a *P. but.* és a *P. stu.* kompozit gyöngyös reaktorainak esetében 40 ml h^{-1} áramlási sebességet állítottunk be (HRT=1.25). Az áramlási sebesség emelésére azért volt szükség, mert a reaktorok a 20 ml óra^{-1} sebesség mellett a nitrát- és nitritmérések adatai alapján a lehetséges maximális kapacitásukat még nem érték el.

Az immobilizát sejtek denitrifikációs aktivitásának összehasonlítása során a redukció biztosításához (elektron donor és szerves szénforrás) szukcinátot alkalmaztunk. A szukcinátot a denitrifikáló mikroorganizmusok képesek a nitrát- és nitritredukcióhoz felhasználni, de legtöbb esetben az *E. coli* metabolit szabályzásához hasonló reakció utak jellemzőek, miszerint a szukcinátból keletkező fumarát mindaddig nem képes a citrát-ciklusban enzimatikusan tovább alakulni, amíg nitrát van jelen a reakcióelegyben. A nitrát szelektíven gátolja a fumaráz gén átírását (Stouthamer 1990), így a rendelkezésre álló szénforrás alapvetően csak a redukcióra fordítódik és csak kis mértékben hasznosul, mint szénforrás. Így a részlegesen gátolt bakteriális anyagcserére való tekintettel a redukció ideje alatt nem kell számottevő biomassza-szaporulattal számolni, s ezzel az egyes baktériumok azonos biomasszamennyiségre (aktív biokatalizátor térfogat) vonatkoztatott aktivitása könnyebben megadható. Minden általunk vizsgált baktérium esetében (batch biofilm denitrifikációs

kísérletek) a HPLC analízis segítségével kimutatható volt a nitrátredukciót követő fumársav-akkumuláció (Kesserű és mtsai 2002). Az alkalmazott szukcinát mennyiségének beállításakor arra törekedtünk, hogy szénforrás-limitáció ne álljon fent, ezért a redukcióhoz biztosan elegendő C:N=9:1 tömegarányt állítottunk be.

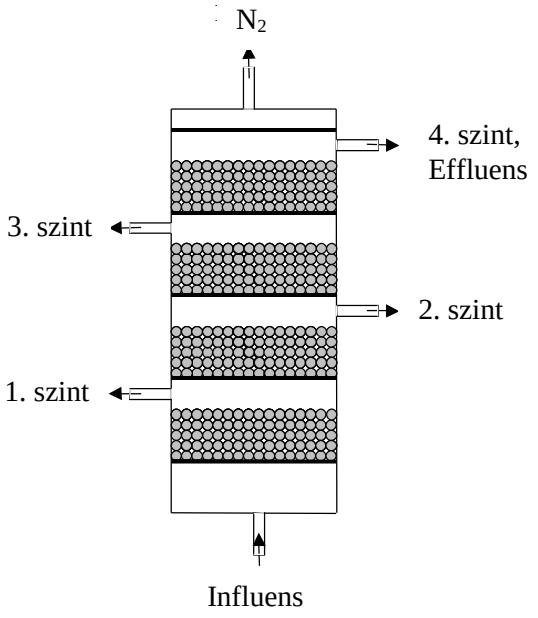
3.10. Bioreaktorok II. működtetése

A reaktorok általános paramétereit a 8. táblázatban foglaltuk össze. A reaktorokra felmenő etanolt, szukcinátot, ecetsavat különböző C:N tömegarányokban tartalmazó influens NO_3^--N koncentrációját 45 mg l^{-1}-re, pH-ját pedig minden esetben 7.0-re állítottuk be.
A felmenő oldatokat 0.05% $CaCl_2$ –dal egészítettük ki, hogy a gyöngyök szerkezeti stabilitása hosszútávon biztosítva legyen

A bioreaktorokat 25 °C-on, 36 napig üzemeltettük, mely időtartam alatt három 12 napos kísérleti periódust állítottunk be. A beállított periódusok során a felmenő tápoldatok C:N tömegarányát a kezdeti 9:1-ről először 6:1-re, majd 3:1-re csökkentettük. A reaktorokon az influensek tartózkodási idejét periódusonként csökkentettük, hogy ki tudjuk mérni a reaktorokra jellemző maximális aktivitásokat, valamint hogy a C:N tömegarány és a tartózkodási idők (HRT) változtatásának együttes hatását megvizsgáljuk az egyes bioreaktorok esetében.

3.11. A pilot bioreaktor működtetése

A pilot bioreaktor legfontosabb paramétereit a 8. táblázatban foglaltuk össze. Az aktív töltetet jelentő gyöngyöket 4 db, egymástól egyenlő távolságra elhelyezett, perforált lemezre helyeztük el (15. ábra). A reaktorra felmenő oldat nitrát-koncentrációja átlagosan 55 mg l^{-1} NO_3^--N volt. Az áramlási sebesség beállításánál arra törekedtünk, hogy az influensnek a bioreaktor teljes térfogatára vonatkoztatott tartózkodási ideje átlagosan



15. ábra

A pilot bioreaktor felépítése

2.5 óra legyen. A szénforrásként használt etanol mennyiségét úgy állítottuk be, hogy a felmenő tápoldatban a C:N tömegarány 3:1-nek, majd a kísérletek második felében 1.5:1-nek feleljen meg. A koncentrált nitrát törzsoldatból (13%) és az etanol törzsoldatból (10%) perisztaltikus pumpával juttattuk be megfelelő arányban az oldatokat a reaktor előtti influens főáramba. A reaktorra alulról fölfelé áramló influenst a gyöngyök stabilitásának megtartása érdekében 0.05% $CaCl_2$-dal egészítettük ki. A reaktort 25 °C-on működtettük. A denitrifikáció nitrát- és nitritredukciós lépésének térbeli elkülönülésének nyomon követésére, minden egyes szintről naponta vettünk mintát, és a minták nitrát- és nitrit-koncentrációját meghatároztuk a 3.1. pontban leírtak szerint. A 4. szintről lefolyó effluens pH-ját, valamint a reaktorról lejövő összsejtszámot is meghatároztuk.

8. táblázat

A bioreaktorok legfontosabb paramétereinek összefoglalása

Bioreaktorok jellemzői	Bioreaktorok I.		Bioreaktorok II. (KGY)		Pilot bioreaktor (KGY)
	F	KGY	Etanolos Ecetsavas	Szukcinátos	
Magasság/átmérő (cm)	11/3	11/3	46/5	46/5	41/15
Reaktor teljes térfogata (cm^3)	50	50	700	700	4700
F/KGY* térfogata (cm^3)	50	50	300	510	2900

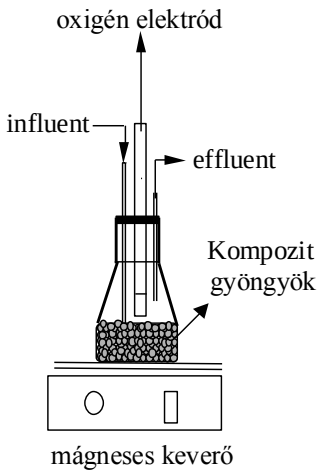
F=felületi hordozó KGY=kompozit gyöngy

3.12. A HRT és a denitrifikációs aktivitások (kg NO_3^--N m^{-3} nap^{-1}) kiszámítása

A HRT számítása során minden esetben a bioreaktorok teljes térfogatát, míg a reaktorok denitrifikációs aktivitásainak számításakor a reaktorok belsejébe elhelyezett gyöngyök térfogatát vettük figyelembe. Mindezt az indokolta, hogy a gyöngyök képezték a bioreaktorok aktív töltetét. A denitrifikációs aktivitásokat a nemzetközileg elfogadott a biokatalizátor (gyöngybe immobilizált baktériumok) egységnyi térfogata (1 m^3) által egységnyi idő (1 nap) alatt elbontott NO_3^--N kg mennyiségekben adtuk meg. Ennek számítási menete:

$$\frac{(\text{influens N konc.} - \text{effluens N konc.}) \times \text{áramlási sebesség}}{\text{gyöngy térfogat}}$$

3.13. A P. butanovora sejtek oxigén-fogyasztásának meghatározása



16. ábra

Az immobilizált sejtek oxigén-fogyasztásának kimérésére szolgáló berendezés

A sejtek oxigénfogyasztásnak meghatározásához az előzőekben leírt módon, 5% nedves biomassza tartalmú kompozit gyöngyöket készítettünk. A mérési rendszert a 16. ábra mutatja. A kísérleti rendszerben a gyöngyök és a felettük lévő influens térfogati aránya megfelelt a 4.7 literes bioreaktor első szintjéig fennálló aránynak. Az immobilizált sejtek oxigénfelvételét batch üzemmódban és folyamatosan áramló influens mellett is meghatároztuk. Az influens minden esetben 50 mg l^{-1} NO_3^--N-t és etanol tartalmazott szénforrásként, 3:1 C:N tömegaránynak megfelelő mennyiségben. A batch kísérlet során a gyöngyöket tartalmazó reakcióelegyet folyamatosan kevertettük, hogy a gyöngyök belsejébe történő oxigéndiffúziót elősegítsük.

Az influens folyamatos áramoltatása során az elegyet nem kevertettük, és az oxigén elektródot a gyöngyök felett 1 cm-rel helyeztük el, melynek horizontális helyzetét mérésről-mérésre változtattuk. Az influens áramlási sebessége megfelelt a bioreaktorra felmenő influens átlagos sebességének. Az 50 független mérés során az elektród behelyezése után 10 perccel jegyeztük le az adatokat. Ezzel elkerülhető volt, hogy a denitrifikáció során felszabadult N_2 gázbuborékok az elektród felszínén oly mértékben összegyűljenek, hogy a mérést zavarják.

4. Denitrifikáció magas só- és nitrát-koncentrációk mellett

4.1. A baktériumnövekedés sótoleranciájának meghatározása

50-50 ml DSM 1 tápoldatokban 0-tól 100 g l^{-1}-ig emelkedő NaCl koncentrációkat állítottunk be, amelyekbe a vizsgált baktériumok (P. aer. P. but. O. ant.) DSM 1 lemezen felnőtt egyedi telepeinek fiziológiás sóoldattal készített szuszpenzióiból 100-100 µl-t inokuláltunk. 24 órás kevertetés után (25 °C, 200 rpm) meghatároztuk az oldatok optikai denzitását 600 nm-en. A növekvő sókoncentrációnak a sejtek növekedésére kifejtett gátló hatásának meghatározásakor a sómentes tápoldatban nőtt biomassza turbiditási értékét vettük 100%-nak.

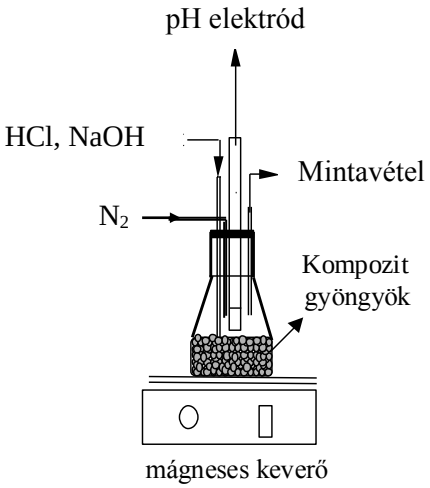
4.2. A denitrifikáció magas Na^+ és NO_3^--N koncentráció mellett

Az ioncserélő gyanták regenerálásakor keletkező effluens összetételére jellemző, hogy nagy koncentrációban tartalmazza a kivont ionokat, illetve a regeneráláshoz használt anion kation párját, jelen esetben a Na^+-ot. A denitrifikáció sófüggésének vizsgálatakor két különböző nátrium só (NaCl, $NaHCO_3$) illetve azok megfelelő arányú elegyének hatását vizsgáltuk két különböző koncentráció-tartományban.

Az anioncserélő gyanták regenerálásához 50 g l^{-1} koncentrációjú NaCl oldatot használnak általánosan, amelyben a Na^+ ion koncentrációja 0.86 M. Ennek megfelelően a tesztoldatok NaCl, $NaHCO_3$, illetve a NaCl + $NaHCO_3$ mennyiségét úgy határoztuk meg, hogy az oldatok Na^+ ion koncentrációja 0.86 és 0.43 M legyen. A 10-10 ml térfogatú tápoldatok (pH 7) élősejtszámát 10^8 ml^{-1}-re állítottuk be, és 25 °C-on 7 napig inkubáltuk őket anaerosztátban. A 0.45 g l^{-1} NO_3^--N denitrifikációjához szükséges szénforrások (etanol, ecetsav) mennyiségét a 6:1 C:N tömegaránynak megfelelően választottuk meg, hogy szénforrás-limitáció semmiképp se következzen be.

4.3. A nitrát-, nitritredukció pH-függésének meghatározása

A rázatott (200 rpm, 25 °C) DSM 1 tápoldatban felszaporított P. but. sejteket a 3.9. pontban leírtaknak megfelelően kompozit gélbe zártuk (200 ml 5% nedves biomasszát tartalmazó kompozit gyöngyök). Az immobilizált baktériumok különböző pH értékek melletti nitrát-, nitritredukciós aktivitását a 17. ábrán látható kísérleti elrendezésben határoztuk meg. Nitrogén gáz beáramoltatása mellett a tápoldatot a kísérlet végéig kevertettük. A pH elektród segítségével folyamatosan mértük a tápoldat kémhatását. A vizsgálandó pH érték megtartása érdekében, a tápoldathoz 0.1 M-os HCl-ot, illetve 0.1 M-os NaOH-ot adtunk. A tápoldat összetétele: 0.04 g KNO_3, 10 g Na-szukcinát, 1000 ml H_2O. A nitrát- és nitritredukció hatékonyságát az inkubációs idő (70 perc) végére bekövetkezett nitrát- és nitrit-koncentráció változás százalékában adtuk meg. A számítás során a kiindulási



17. ábra

A pH hatásának kimérése az immobilizált sejtek denitrifikációs aktivitására

nitrát-koncentrációt, illetve a redukció során keletkezett nitritmaximumot tekintettük a kiindulási mennyiségeknek.

4.4. A magas nitrát- és sókoncentráció mellett működő bioreaktorok

A 200 ml térfogatú, 1% nedves biomasszát tartalmazó kompozit gyöngyöket oszlopokba töltöttük, amelyek átmérője 3.5 cm, magassága 100 cm, teljes térfogatuk 900 cm^3 volt. A reaktorokat fed batch üzemmódban működtettük úgy, hogy a gyöngytérfogat háromszorosának megfelelő mennyiségű (600 ml) kezelendő nitrátos oldatot helyeztünk rájuk, amelyet az inkubációs idő alatt naponta perisztaltikus pumpák segítségével teljes térfogatában megkevertetünk. A kezelendő oldat NaCl koncentrációja 50 g l^{-1}, és NO_3^--N tartalma 0.45 g l^{-1} volt. A denitrifikációhoz felhasználandó szerves szénforrásnak az ecetsavat választottuk, amelynek mennyiségét 4:1 és 2:1 C:N tömegaránynak megfelelően választottuk meg.

5. Aromás anyagok és a nitrát kometabolizmusa

5.1. Szalicilát mennyiségének mérése

A szalicilát spektrumát 190-400 nm-es tartományban vettük fel, és három, jól elkülönülő elnyelési maximum volt kimutatható 205, 230 és 297 nm-en. A minták elnyelését 297 nm-en mértük 20× hígításban, mivel ezen a hullámhosszon zavar legkevésbé a minták nitráttartalma, amelynek 210 nm-en van elnyelési maximuma.

5.2. A szaliciláthidroxiláz aktivitásának mérése

A 2 mM Na-szalicilátot tartalmazó DSM 1 tápoldatban rázatva (200 rpm, 25 °C, 24 óra) szaporított sejtek centrifugálását (1200 g 15 perc) követően a sejtfeltárás és enzimpreparálás lépései megegyeztek a Method in Enzimology Vol LIII-ban leírtakkal (115 oldal).
A 0.3 ml enzimpreparátumhoz 2.6 ml foszfát puffert (pH 7.6), majd 8.8 µl NADH-t és 1 µl FAD-ot adtunk. 10 perc inkubálás után az így kapott elegyre nulláztuk a műszert, majd 0.1 ml 4 mM-os Na-szalicilát oldat hozzáadásával indítottuk el a reakciót. Ezt követően 296 nm-en mértük az abszorbanciacsökkenést.

5.3. Katekol-2,3-dioxigenáz enzim aktivitásának mérése

A 2 mM Na-szalicilátot tartalmazó DSM 1 tápoldatban rázatva (200 rpm, 25 °C, 24 óra) szaporított sejtek centrifugálását (1200 g 15 perc) követően a sejtfeltárás és enzimpreparálás lépései megegyeztek a Nozaki és mtsai által leírt módszerrel (1963).

Enzimaktivitás mérése: 4 ml össztérfogatú kvarcküvettában 2.7 ml desztillált vizet, 0.3 ml 0.05 M-os foszfát puffert (pH 7.5), 0.1 ml enzimpreparátumot és 20 µl frissen készített 0.01 M-os katekol oldatot elegyítve, 375 nm-en mért OD változásból számítottuk az aktivitást.
A katekol-2,3-dioxigenáz gátlása: az enzimpreparátumhoz H_2O_2-ot adtunk, hogy a reakció-elegyben koncentrációja 0.5 mM legyen. 30 perc után a még el nem bomlott peroxidot kataláz enzim hozzáadásával semlegesítettük. A katekolt mint szubsztrátot ezután adtuk a rendszerhez. A katekol-2,3-dioxigenáz peroxiddal irreverzibilisen gátolható. Amennyiben a katekol hozzáadása után 260 nm-en nem detektálható OD növekedés, az azt jelenti, hogy az adott sejtvonal nem rendelkezik katekol-1,2-dioxigenázzal. A katekol-1,2-dioxigenáz nem gátolható irreverzibilisen peroxiddal (Nakazawa és mtsai 1973).

5.4. A nitrát-szalicilát kometabolizmus mérése kemosztátban

A nitrát-szalicilát kometabolizmus vizsgálatát a New Brunswick III típusú 2 literes fermentorban, mint kemosztát rendszerben végeztük el. Ennek segítségével a kísérleti paraméterek (hőmérséklet 25 °C, oldott oxigén szint, kevertetés: 50 rpm, pH 7) jól kontrollálhatóak és mérhetőek voltak. A 7 napos kísérleti periódusok során naponta 20-20 ml mintát vettünk a tápoldatból, amely 5 mM Na-szalicilátot és 8 mM NO_3^--N-t tartalmazott DSM 457 ásványi sós tápoldatban. A mintákban a szalicilát, a nitrát és a nitrit koncentrációját, valamint a szalicilát hidroxiláz, továbbá a katekol-2,3-dioxigenáz aktivitását és 600 nm-en turbiditást határoztunk meg.

A tápoldat oxigénszintjét kezdetben 100%-os telítettségnek állítottuk be, ami egy 25 °C-os oldat esetében 8 mM oldott oxigén koncentrációt jelent. A tápoldat inokulálása után további oxigén rendszerbe történő bejutását megakadályoztuk. Ennek köszönhetően a kísérlet indításától számított 6-8 óra elteltével az oldott oxigén szintje az oldatban nullára esett vissza. A nitrát- és nitritredukció zavartalan működése is alátámasztotta az anaerob viszonyok kialakulását.

A kemosztát inokulálásához 100-ad térfogatnyi, az ott alkalmazott tápoldat összetételével megegyező tápoldatban (álló tenyészet, 25 °C) 72 órán keresztül szaporított *P. butanovora*

sejteket használtunk. Az inokulálás után a kemosztát tápoldatának kiindulási élősejtszáma átlagosan 10^5 ml^{-1} volt.

5.5. Foszfát-és szulfátionok hatása a szalicilát kometabolizmusra

A 2 mM Na-szalicilátot tartalmazó DSM 1 tápoldatban rázatva (200 rpm, 25 °C, 24 óra) szaporított sejtek centrifugálását (1200 g 15 perc), majd a pellet fiziológiás sóoldattal történő mosását követően, a sejteket 20-20 ml 5 mM Na-szalicilátot tartalmazó DSM 457-es tápoldatokba inokuláltuk, úgy hogy az oldatok élősejtszáma 10^8 ml^{-1} legyen. A légmentesen zárható szintillációs üvegekben lévő 20 ml térfogatú oldatok oxigén-mentesítésének érdekében a tápoldatokhoz minden esetben Na_2SO_3-ot adtunk (0.1 g Na_2SO_3 1000 ml oldat). Az anaerob, stacinoer állapotú sejteket tartalmazó oldatokhoz a szalicilát mennyiség teljes eloxidálásához elegendő moláris oxigénmennyiség kétszeresét tartalmazó szulfátot, foszfátot és nitrátot adtunk (1 g KNO_3, 0.08 K_2HPO_4, 0.04 KH_2PO_4, 1.65 $MgSO_4$ 1000 ml oldathoz). A 7 napos inkubációs idő elteltével, fotométer segítségével (5.1. pont) mértük a szalicilát mennyiségének csökkenését.

5.6. A nehézfémionok hatása a növekedésre, a denitrifikációra, a szalicilát bontásra

A nehézfémionokkal szembeni tolerancia-vizsgálatot különböző nehézfémsókat különböző koncentrációban tartalmazó DSM 1 lemezeken végeztük el Nieto és mtsai leírása (1989) alapján. Az alábbi nehézfémsók növekedésre, szalicilát bontó képességre és denitrifikációra kifejtett hatását vizsgáltuk: Cd^{2+} (($Cd(CH_3COO)_2x2H_2O$); Cu^{2+} ($CuCl_2x2H_2O$); Ni^{2+} ($NiCl_2x6H_2O$); Pb^{2+} ($Pb(NO_3)_2$); Zn^{2+} ($ZnSO_4x7H_2O$) és Hg^{2+} ($HgCl_2$).

A táptalajok leoltása után 25 ºC-on 3 napig inkubáltuk a lemezeket és a telepek megjelenése, vagy a növekedés elmaradása egyértelmű következménye volt az adott ion gátló hatásának. Minden baktérium toleránsnak tekinthető az adott fémionnal szemben, ha a Cd^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}, Pb^{2+}, a Zn^{2+} 1 mM és a Hg^{2+} 0.1 mM feletti koncentrációjú oldataiban növekedni képes (Nieto és mtsai 1989).

A teljes denitrifikációt követő N_2-termelés vizsgálatát 0.2 g l^{-1} NO_3^--N tartalmú DSM 1 tápoldatokban vizsgáltuk, amelyek nehézfémion-koncentrációja 0.005 mM-tól a növekedés-gátlást eredményező koncentrációig változott. A tesztoldatok inokulálása (10^8 sejt ml^{-1}) után 72 órán át inkubáltuk őket 25 ºC-on, anaerob boxban. A teljes denitrifikációt a Durham csövekben megjelent nitrogéngáz-buborékok jelezték (Franzman és mtsai 1987).

A nehézfémionok szalicilátbontásra gyakorolt hatását a DSM 1 oldat összetevőit tizedakkora koncentrációban tartalmazó (0.5 g pepton, 0.3 g húskivonat, 1000 ml H_2O) tápoldatokban és táptalajon is vizsgáltuk, ahol a szalicilát koncentrációját minden esetben 10 mM-nak választottuk. A tápoldatok és a táptalajok fémion-koncentrációja 0.005 mM-tól a növekedés gátlást eredményező koncentrációig nőtt. A szalicilát katekolon keresztül történő teljes lebontásának jeleként megjelenő sárgaszínű intermediert is detektáltuk, és megadtuk azokat a fémion-koncentrációkat, ahol az még mérhető volt.

6. Felhasznált eszközök, berendezések listája

New Brunswick fermentorok, 2 l és 80 l Pilot Plant

Gynkotek 480 gradiens pumpa

Gynkotek UV-D 160 detektor

Shodex Refraktív Index detektor

Chromeleon 3.14 D shoftware

Bactron Anaerobic Chamber, anaerob boksz

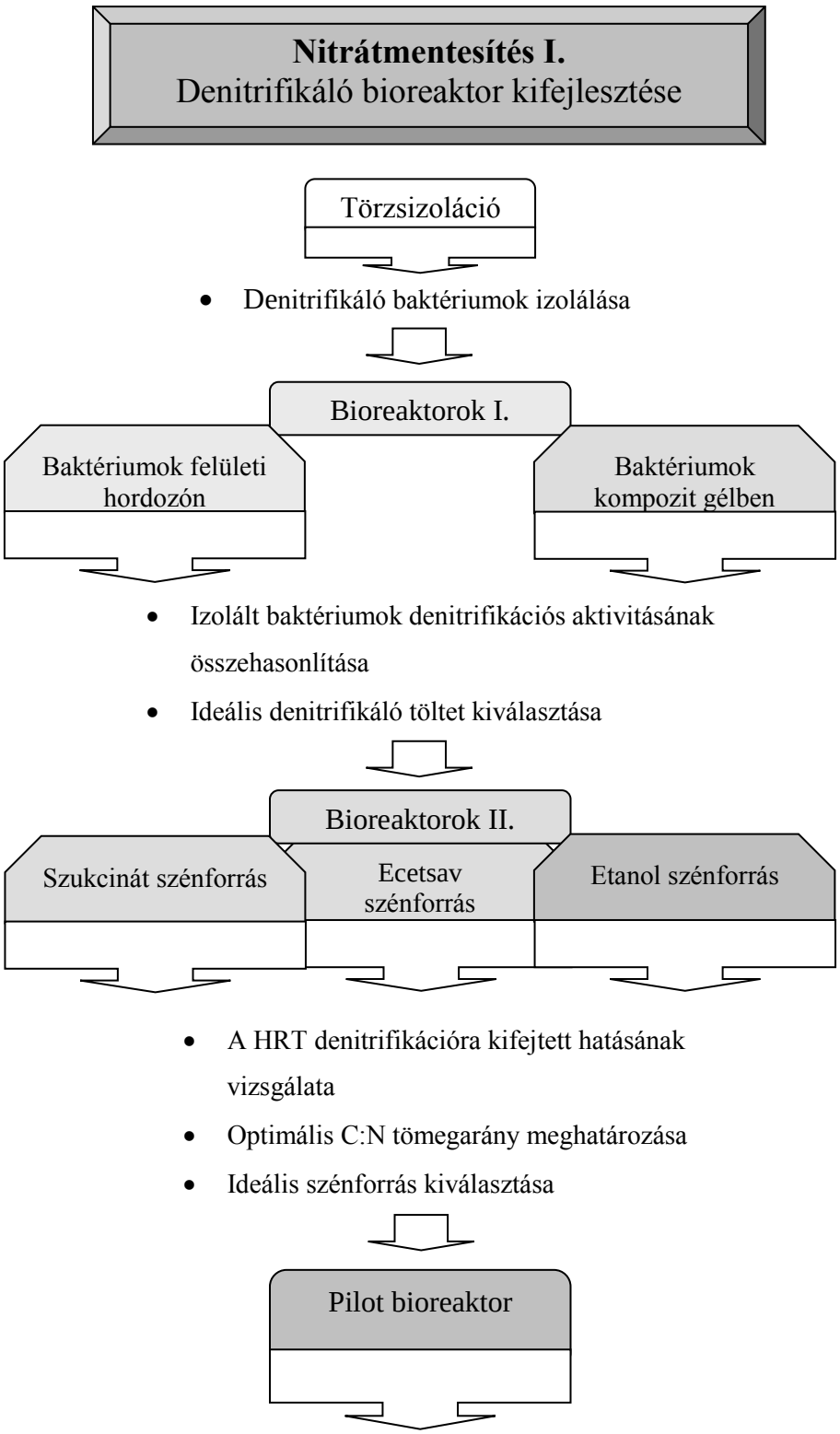
Gilson, minipuls 3 perisztaltikus pumpák

Watson Marlow 701 S perisztaltikus pumpa

7. Alkalmazott statisztikai módszerek

Az eredmények statisztikai analíziséhez Student t tesztet használtunk és szignifikánsnak tekintettük a változásokat, ha a P értéke kisebb volt, mint 0.05.

EREDMÉNYEK



18. ábra

A denitrifikáló bioreaktor kifejlesztése során elvégzett kísérleteket, illetve azok időrendi sorrendjét mutatja a 18. ábra.

1.1. Denitrifikáló baktériumok izolálása

A különböző szerves szennyező anyagokat nagy koncentrációban tartalmazó, volt katonai reptérről származó talajminta mikrobiológiai analízise során a telepmorfológiai különbségek alapján 14 féle baktériumot sikerült elkülönítenünk. Ezek mindegyike esetében elvégeztük a nitrát-, illetve nitritredukciós tesztet. Az egyes baktériumok esetében az inkubáció után kimért nitrát-, és nitritszinteket a 7. táblázatban foglaltuk össze

9. táblázat

A baktériumok nitrát-, és nitritredukciójának bemutatása

Törzsek	Nitrát koncentráció változás (mg l^{-1})	Nitrit Koncentráció (mg l^{-1})	Törzsek	Nitrát koncentráció változás (mg l^{-1})	Nitrit Koncentráció (mg $l^{-1)}$
PSH	50 → 46	*	**NNT**	50 → 20	35
AFA	50 → 45	*	**PSM**	50 → 0.7	0
ACI	50 → 46	*	**BMY**	50 → 4.8	18
BBA	50 → 46	*	**NF**	50 → 3,1	21
RHO	50 → 4.7	20	**RSZ**	50 → 45	*
NA	50 → 12	42	**RK**	50 → 45	2
FNN	50 → 50	*	**NAF**	50 → 0.6	0

* képződött nitrit nem volt kimutatható

24 órás inkubáció után a PSH, AFA, ACI, BBA, RSZ, RK jelű törzsek estében lényeges változás nem volt kimutatható: a nitrát szintje nem csökkent számottevően, nitrit akkumulációt pedig szintén nem tudtunk kimutatni. Az NNT törzs esetében csak részeleges, az RHO, BMY, NF törzsek esetében pedig majdnem teljes nitrátredukció ment végbe, de teljes nitritredukció nem zajlott le egyetlen esetben sem, annak ellenére, hogy a mérést követően további 48 órát inkubáltuk a baktériumokat tartalmazó oldatokat. Az NA 24 óra alatt részleges nitrát redukciót vitt végbe, miközben nagy mennyiségű nitrit akkumulálódott, az

FNN jelű baktérium esetében a 24 órás inkubáció után még nem indult meg a nitrátredukció, ám további 48 óra után egyik törzs tápoldatában sem volt nitrát vagy nitrit ion kimutatható. 24 óra alatt két törzs mutatott teljes nitrát- és nitritredukciót, ezek pedig a PSM és NAF jelű izolátumok. A törzsmeghatározás során a PSM jelű izolátum *Pseudomonas stutzeri*-nek, a NAF jelű izolátum pedig *Pseudomonas butanovora*-nak bizonyult. A *P. stutzeri* denitrifikációjáról számos adat áll rendelkezésre szakirodalomban, míg a *P. butanovora* esetében erre vonatkozó munka a mai napig nem készült. A szénhidrogénekkel szennyezett talajból izolált baktériumok közül ezért az utóbbit választottuk ki, hogy nitrát- és nitrit-redukcióját, illetve denitrifikációs hatékonyságát részletesebben jellemzzük.

1.2. A bioreaktorok (I.) aktivitásainak vizsgálata.

A *P. butanovora* denitrifikációs aktivitásának vizsgálata során a szintén a szennyezett talajból izolált *P. stutzeri*, a referencia törzsként szolgáló denitrifikációs etalon a *P. denitrificans* DSM 1650, és az általunk korábban izolált, de ezen tulajdonságára még nem vizsgált *O. anthropi* immobilizált sejteket tartalmazó bioreaktorok denitrifikációs hatékonyságát hasonlítottuk össze. A denitrifikáló baktériumok működésének szabadsejtes, batch rendszerben történő vizsgálata az izolátumok reaktorokban kifejtett aktivitásairól lényegi információt nem ad, ezért a sejtek hatékonyságát a kezdetektől fogva reaktorok belsejébe rögzítve határoztuk meg.

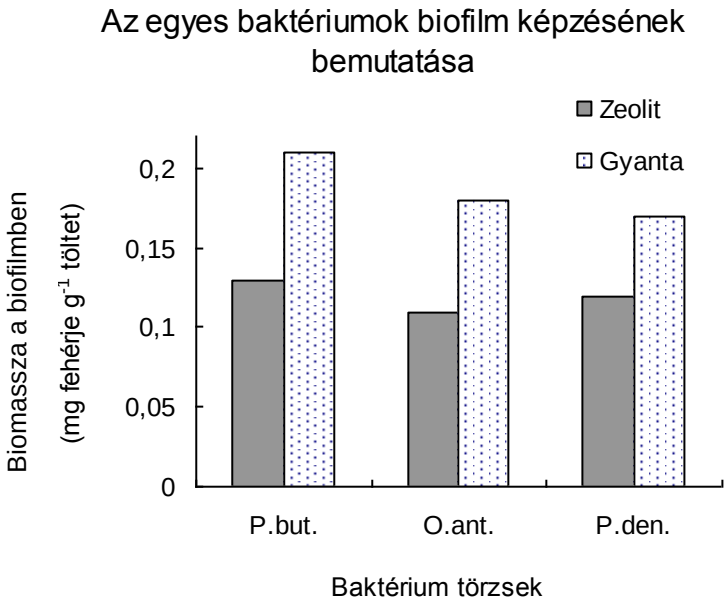
Az immobilizálás során felületi rögzítést (ásványi zeolit, inocserélő gyanta) és kompozit gélmátrix belsejébe történő rögzítést alkalmaztunk. A felületi hordozók esetében meghatároztuk azok nitrát és baktérium kötő képességét.

1.2.1. A felületi hordozók nitrát kötésének vizsgálata.

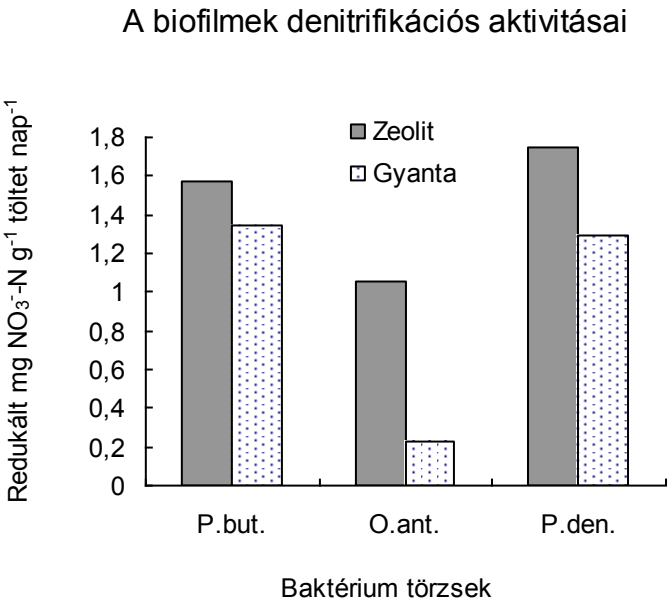
A felületi hordozóra 24 órán keresztül feljutatott influens nitráttartalmából 1 g zeolit átlagban 340 μg NO_3^--N-t kötött meg, míg 1 g gyanta átlagban csak 50 μg-ot. A kapott eredményeket csak az ásványi zeolit inhomogenitásával tudjuk magyarázni. A tiszta zeolit kémiai összetételének köszönhetően mint erős kationcserélő ismert, így a negatív töltésű nitrát ionok részleges kötése csak az ásványban található különféle szennyező anyagok hatásának tudható be.

1.2.2. A baktériumok kikötődésének vizsgálata, és a biofilmek denitirifikációs aktivitásai

A hordozók felszínén kötött biomassza mennyiségével arányosan mért fehérje mennyiségek alapján elmondható, hogy a biofilm képzés szempontjából mind három baktérium esetében a gyanta jobb felületi hordozónak bizonyult a zeolithoz képest (19. ábra).



19. ábra



20. ábra

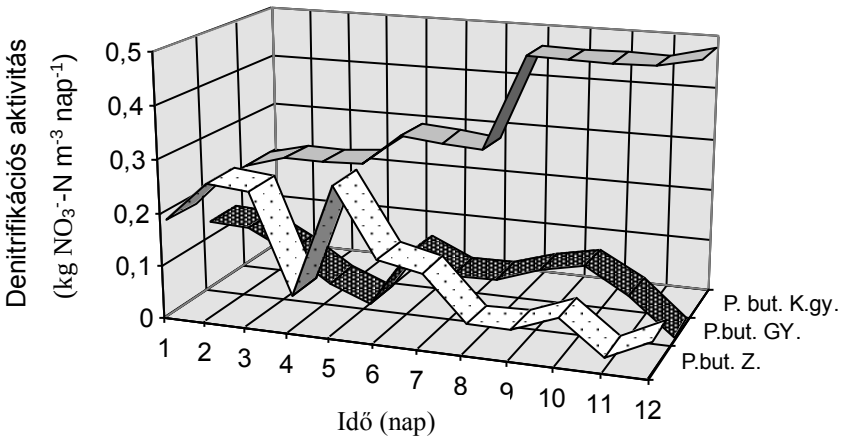
Annak ellenére, hogy az ioncserélő gyantán minden esetben nagyobb volt a kialakult biofilm mennyisége a zeolitos rendszerek rendre nagyobb denitrifikációs aktivitást mutattak (20. ábra).

A kapott eredmények azt mutatják, hogy a felületi hordozók esetén alkalmazott biofilm-telepítési módszer a bemutatott baktériumok estében hatásosnak bizonyult, és az így kapott biofilmek denitirifkációs aktivitást mutattak batch kísérleti körülmények között. A *P. stutzeri* baktérium gyors aggregátumképzése nem tette lehetővé egyenletes biofilm kialakítását, ezért ebben az esetben csak a kompozit gélbe zárt sejtek aktivitását vizsgáltuk.

1.2.3. A P. butanovora bioreaktorok (I.) aktivitásának bemutatása

A vizsgált kísérleti periódus alatt a zeolit töltetű (Z) bioreaktor nagyobb kezdeti aktivitással bírt, mint a gyanta (GY) felületére immobilizált sejteket tartalmazó, annak ellenére, hogy a kísérletek során kimutattuk, hogy az említett törzs is a gyanta felületén hozott létre nagyobb mennyiségű biofilmet (19. ábra). Mindez azonban jó egyezést mutat a batch rendszerekben kimért denitrifikációs aktivitásokkal, miszerint a zeolit és a rajta kialakult biofilm együttesen nagyobb nitráteliminációt eredményezett. A 12. napra viszont a zeolitos reaktor aktivitása is minimálisnak mutatkozott. A fokozatos aktivitásvesztés a sejtek felületről történő folyamatos leválásával magyarázható (shear stress), a 3.6 órás tartózkodási idő ellenére. Az utóbbi két reaktor-elrendezéshez képest -érthető módon- sokkal nagyobb aktivitással működött a kompozit gyöngyös (Kgy) reaktor, amely esetében a hordozók felületén kialakult biofilmek mennyiségéhez képest jóval nagyobb mennyiségű baktériumot zártunk a gél belsejébe (21. ábra). A nagy mennyiségű immobilizált biomassza ellenére jelentős sejt effluxot nem tapasztaltunk sem a kezdeti 2.5 órás, sem pedig a 1.25 órás tartózkodási idő (HRT) esetén. Mivel a Kgy reaktor az adott áramlási sebesség mellett még nem érte el maximális aktivitását, az áramlási sebességet a duplájára emeltük (HRT=1.25). A kompozit gélmátrix belsejébe immobilizált sejtek esetében a megnövelt áramlási sebesség nem lépett fel stressz hatásként (shear stress), a biokatalizátor nem mosódott ki a reaktorból.

A *P. butanovora* denitrifikácóis aktivitása
különböző reaktor típusokban

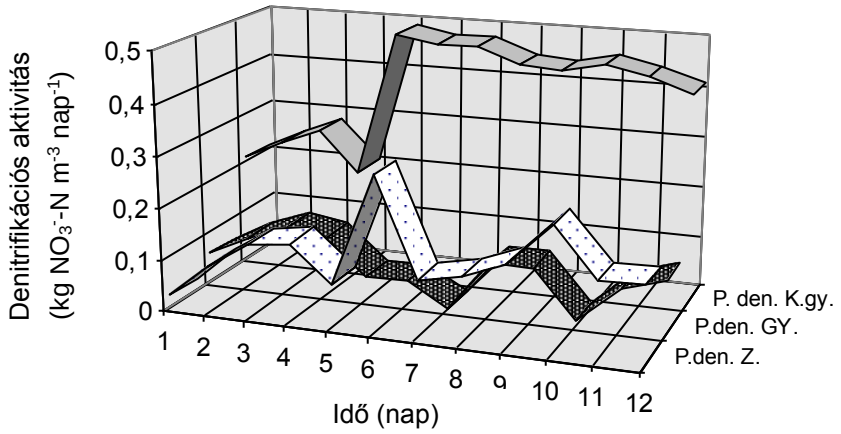


21. ábra

1.2.4. A P. denitrificans bioreaktorok (I.) aktivitásának bemutatása

A P. butanovora-hoz hasonlóan a felületen rögzített sejteket tartalmazó reaktorok közül a zeolitos reaktor működött nagyobb aktivitással, és azt kisebb-nagyobb ingadozásokkal, de a 12. napig meg is tartotta (22. ábra). A Z reaktor kiegyensúlyozottabb működése ellentmond a biofilmképzési vizsgálatoknak, miszerint a *P. denitrificans* is a gyantára kolonizált jobban. A kompozit gélbe immobilizált baktériumokat tartalmazó rendszer a kezdeti szakasz után a másik két reaktorhoz képest mintegy ötszörös aktivitást mutatott.

A *P. denitrificans* denitrifikációs aktivitása
különböző reaktor típusokban

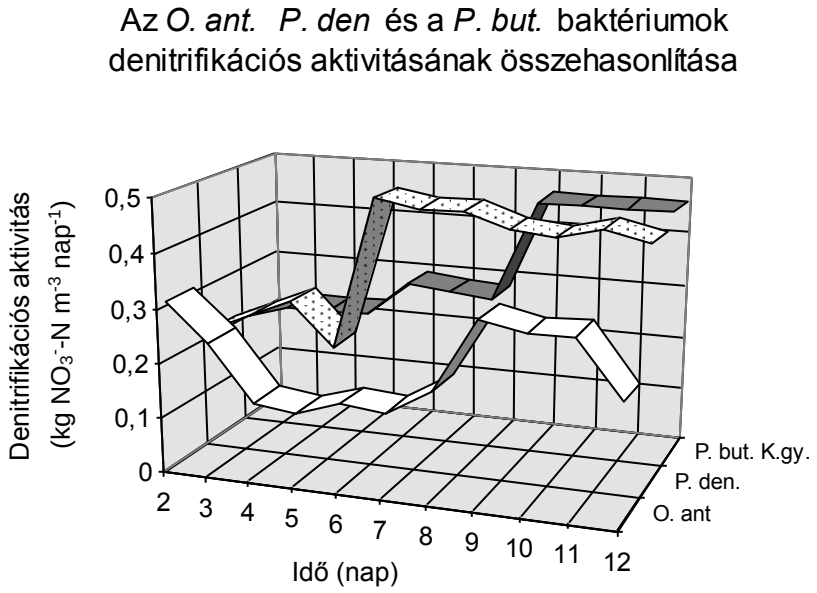


22. ábra

1.2.5. A kompozit gyöngyös bioreaktorok (I.) összehasonlítása

Az O. anthropi Kgy reaktor aktivitása a 12. napra sem érte el a másik két baktérium kompozit gyöngyös reaktorainak aktivitását, a hordozók felületére immobilizált sejteket tartalmazó reaktorinak aktivitása pedig messze alulmaradt még a Kgy reaktora esetében tapasztaltakhoz képest is. A *P. denitirificans* és a *P. butanovora* reaktorok aktivitása között a 9. naptól lényeges különbség nem volt kimutatható (23. ábra). A két reaktor működése közti egyedüli eltérés csak a kibocsátott nitritszintek alapján volt kimérhető (24. ábra).

A *P. denitirificans* reaktor esetében a NO_2^--N kibocsátás átlagosan 0.03 kg m^{-3} nap^{-1}, míg ugyanezen érték a *P. butanovora* esetében 0.003 kg NO_2^--N reaktor m^{-3} nap^{-1} volt. A nitrit-effluxban kimutatott egy nagyságrendnyi különbség alapján a *P. butanovora* jobb denitrifikálónak bizonyult.

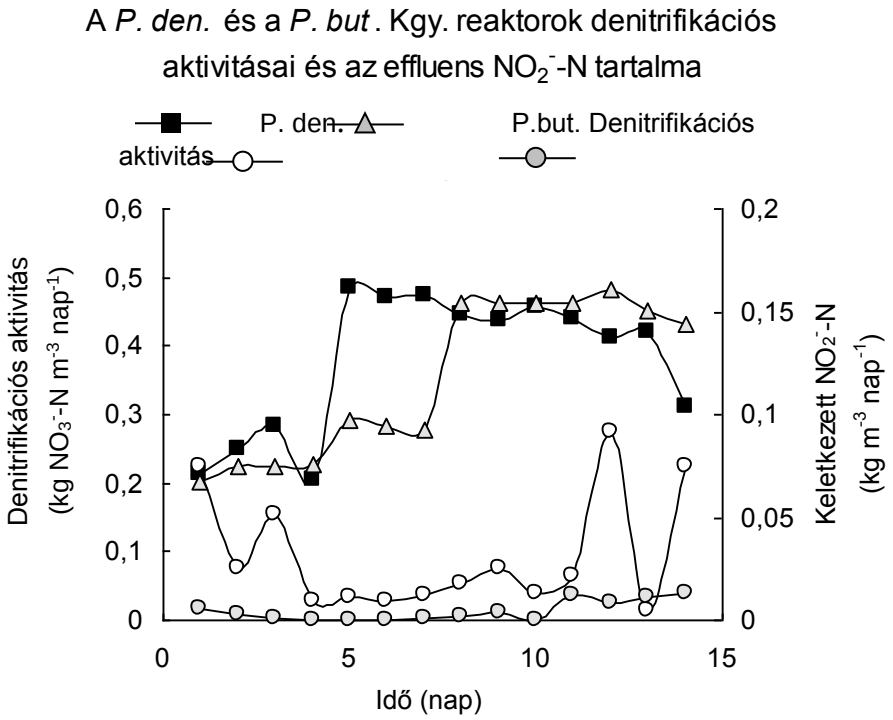


23. ábra

1.2.6. A P. butanovora és a P. stutzeri Kgy bioreaktorok (I.) összehasonlítása.

Az első 12 napos kísérleti periódusban a 2.5 órás tartózkodási idők mellett közel azonos denitrifikációs aktivitásokat mutatott a két reaktor, és a nitrátmentes effluens alacsony nitrit-szintje arra engedett következtetni, hogy a reaktorok maximális aktivitásukat még nem érték el. Ezért a felmenő tápoldat áramlási sebességét a 13. napon mindkét reaktornál az addigi 20 ml $óra^{-1}$-ról duplájára emeltük, hogy ki tudjuk mérni azok valós kapacitását. A megemelt áramlási sebesség (HRT=1.25 óra) mellett 7 napon keresztül vizsgáltuk a reaktorok viselkedését. A következő aktivitási adatokat kaptuk: *P. stutzeri* Kgy reaktor denitrifikációs

aktivitása 0.57 ± 0.07 kg NO_3^--N reaktor m^{-3} nap^{-1}, a *P. butanovora* Kgy reaktor esetében pedig 0.66 ± 0.02 kg NO_3^--N reaktor m^{-3} nap^{-1}.



24. ábra

1.2.7. A bioreaktorok (I.) részeredményeinek összefoglalása

A zeolit felületén rögzített sejteket tartalmazó reaktorok minden egyes baktérium esetében nagyobb aktivitással működtek, mint a gyantát tartalmazók. A felületi biomassza denitrifikácós aktivitása azonban egyetlen esetben sem közelítette meg a kompozit gyöngyös rendszerekben mért értéket. Az influens áramlásából adódóan a sejtlemosódás is oly mértékű volt ezekben az esetekben, hogy a reaktorok hosszú távú működtetését lehetetlenné tette.

A reaktorok effluenseinek pH-ja 7-ről 7.97-re is emelkedett függetlenül az alkalmazott baktériumtól és a reaktor típusától.

A stabilan működő kompozit gyöngyös reaktorok esetében a kimért aktivitások alapján az alábbi rangsort tudtuk felállítani. Az *O. anthropi*-t tartalmazó bioreaktor rendelkezett a legalacsonyabb aktivitással. A *P. denitrificans*-t tartalmazó reaktor esetében mért magas denitrifikációs aktivitás mellett viszonylag nagy nitrit efflux volt kimérhető. A két legaktívabb baktériumnak a *P. stutzeri* és a *P. butanovora* adódott. Az áramlási sebesség megemelése után azonban csak az utóbbi baktérium esetében növekedett a denitrifikációs aktivitás. Az

eredmények alapján a *P. butanovora* minden tekintetben hatékonyabb denitrifikálónak bizonyult, mint a többi vizsgált baktérium.

1.3. Bioreaktorok (II.) működtetése

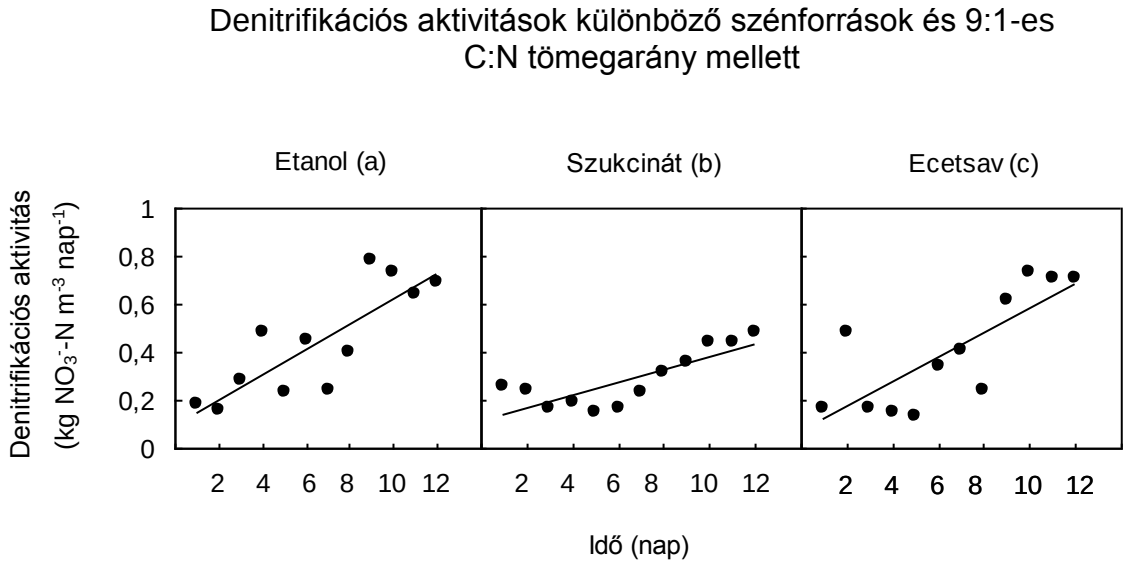
A következő munkafázis során a vizsgált baktériumok közül a denitrifikációs aktivitás szempontjából leghatékonyabbnak bizonyult, kompozit gélmátrix belsejébe immobilizált *P. butanovora*-t tartalmazó reaktorok léptéknövelését végeztük el. A reaktorméretek közel tízszeresére történő emelése mellett megvizsgáltuk, hogy az influens áramlási sebességének növelése hogyan hat a reaktorok aktivitására. A denitrifikációhoz szükséges redukáló erő biztosításához a továbbiakban szukcinátot, ecetsavat és etanolt használtuk. A szukcinát laboratóriumi méretek között működtetett denitrifikáló bioreaktorok esetében megfelelő szénforrás, figyelembe véve azonban a nitrát jelenléte mellett lejátszódó anyagcseréjét (lásd anyagok és módszerek), pilot vagy ipari méretekben történő alkalmazása már költséges lehet. Ezért célszerűnek tartottuk, hogy a denitrifikáció esetében már ipari méretekben is alkalmazott szénforrások (ecetsavnak, etanolnak) a *P. butanovora* denitrifikációjára gyakorolt hatását vizsgáljuk, illetve hogy a többlépcsős redukciós folyamat teljes lejátszódásához szükséges szénforrások optimális mennyiségét is megállapítsuk.

A bioreaktorok (II) működtetése során a fent említett paraméterek vizsgálatán túl, fontosnak tartottuk a rendszerek határértékeinek, terhelhetőségének meghatározását. Nem volt célunk azonban, mivel ez a lépés még a bioraktor-fejlesztés munkafázisához tartozott (18. ábra), hogy a reaktorok változatlan körülmények közötti, hosszú távú működtetésük során kialakuló aktivitásait meghatározzuk. Ez magyarázza a viszonylag rövid kísérleti periódusokat, és hogy a HRT és a C:N arányok együttes változtatásának hatását vizsgáltuk. Az így kapott eredményeket a későbbiekben tesztelt pilot reaktor esetében alkalmaztuk, mint vezérlési paramétereket.

1.3.1. Denitrifikációs aktivitások 9:1-es C:N arány mellett

Az első kísérleti periódus során a bioreaktorokat magas, 9:1-es C:N tömegarány mellett működtettük, hogy az immobilizált sejtek számára a szükségesnél nagyobb redukáló erőt biztosítsunk, így szerves szénforrás-limitáció nem állt fent. Ebben az esetben a bioreaktorok aktvitásai közötti különbség csak az egyes szénforrások hatékonyságának különbözőségéből eredhetett. A periódus során a reaktorok denitrifikációs aktivitása minden esetben nőtt (25. ábra). Az egyedi mérési pontokra fektetett egyenesek meredekségét figyelembe véve

elmondható, hogy a szukcinátos és az etanolos bioreaktorok, és a szukcinátos és az ecetsavas bioreaktorok aktivitása között szignifikáns különbség volt (10. táblázat). Ezzel szemben az ecetsavas és etanolos reaktorok aktivitási pontjaira fektetett egyenesek meredeksége között nem volt szignifikáns különbség. A szukcinátos reaktor esetében a periódus végén mért denitrifikációs aktivitás mintegy feleakkora volt, mint amely aktivitás-értékek a másik két szénforrással működtetett reaktor esetében volt kimérhető (10. táblázat).



25. ábra

10. táblázat

A bioreaktorok aktivitásának alakulása a HRT és a különböző szénforrások hatására 9:1 C:N tömegarány mellett.

Szénforrás	HRT (óra)	Denitrifikációs aktivitás ($kg\ NO_3^-\text{-}N\ m^{-3}\ nap^{-1}$)		Aktivitási egyenesek meredeksége
		Max.	Min.	
Szukcinát	3.14 ± 0.25	0.48	0.15	0.0263
Etanol	4.58 ± 1.59	0.73	0.16	0.0524
Ecetsav	4.81 ± 1.05	0.73	0.13	0.0513

Az egyes szubsztrátok mennyiségének százalékos csökkenése azt mutatja, hogy az alkalmazott szénforrások a szükséges mennyiséghez képest feleslegben voltak jelen (11. táblázat). Az egyes szénforrások esetében kimért C:N tömegarányokat a 11. táblázatban foglaltuk össze.

11. táblázat

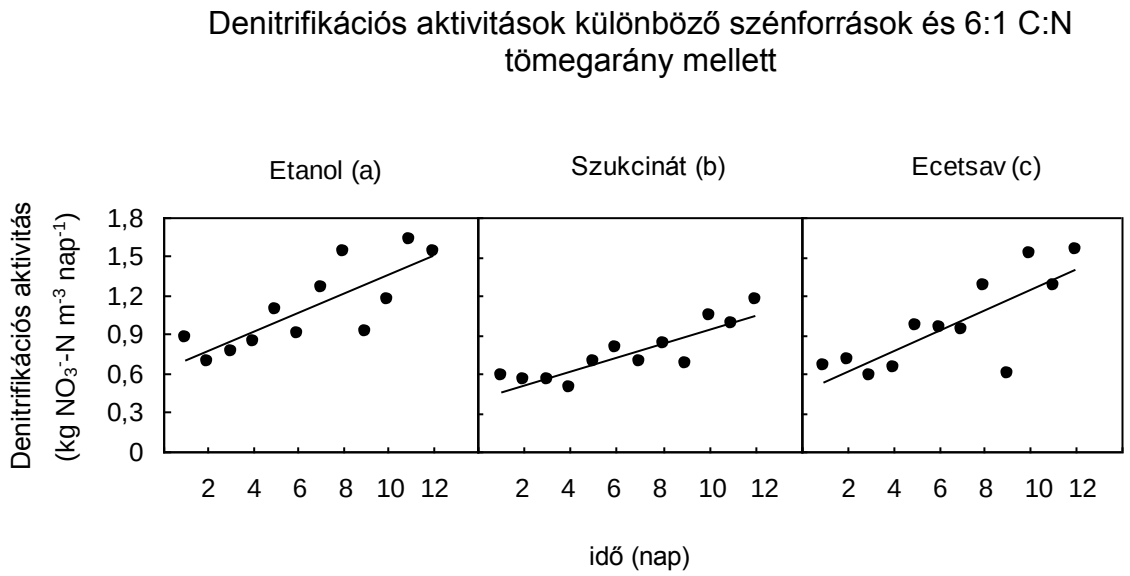
A bioreaktorokban kimért százalékos szénforrás fogyások és a kísérletesen meghatározott C:N tömegarányok.

Szénforrás	Szubsztrátfogyás %	Elbontott szénforrás (mg l^{-1})	Meghatározott C:N tömegarány
Szukcinát	12.56 ± 4.90	60.15 ± 14.80	1.78 ± 0.23
Etanol	9.53 ± 0.68	51.68 ± 4.74	0.92 ± 0.35
Ecetsav	11.28 ± 3,18	76.31 ± 4.72	1.77 ± 0.15

1.3.2. Denitrifikációs aktivitások 6:1-es C:N arány mellett

A második 12 napos periódus során a C:N tömegarányt 6:1-re csökkentettük, míg az áramlási sebességet megnöveltük. A rendelkezésre álló szerves szénforrás mennyiségének csökkentése ellenére az aktivitások minden esetben fokozatosan emelkedtek (26. ábra).

A 9:1-es C:N arány mellett mértekhez hasonlóan az etanol és az ecetsav nagyobb hatékonyságú denitrifikációt eredményezett. A szukcinátos reaktor ismét alacsonyabb szintű aktivitást mutatott. Az emelkedő denitrifikációs aktivitások szoros összefüggést mutattak az egyre rövidülő tartózkodási időkkel. Az alacsonyabb HRT-k (2.12-2.6 óra) nem okoztak aktivitásvesztést.



26. ábra

12. táblázat

A bioreaktorok aktivitásának alakulása a HRT és a különböző szénforrások hatására 6:1 C:N tömegarány mellett.

Szénforrás	HRT (óra)	Denitrifikációs aktivitás ($kg\ NO_3^-$-N m^{-3} nap^{-1})		Aktivitási egyenesek meredeksége
		Max.	Min.	
Szukcinát	2.12 ± 0.57	1.17	0.49	0.0521
Etanol	2.57 ± 0.87	1.63	0.77	0.0697
Ecetsav	2.66 ± 0.96	1.56	0.58	0.0778

A mérési adatok szerint a legmagasabb denitrifikációs aktivitás (1.63 kg NO_3^--N m^{-3} nap^{-1}) az etanol esetében volt kimutatható (12. táblázat). A szukcinátos reaktor ismét alacsonyabb aktivitási értékeket mutatott, mint a másik két bioreaktor. A második periódusban kísérletesen meghatározott C:N arányok jó egyezést mutattak a magasabb kiindulási C:N tömegarányok esetén mértekkel (13. táblázat).

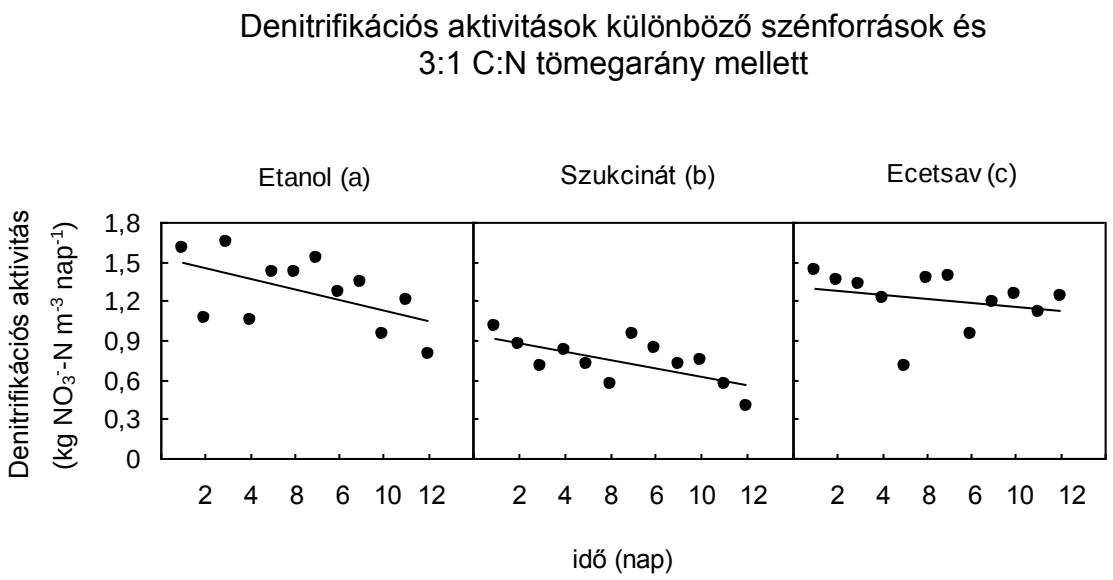
13. táblázat

A bioreaktorokban kimért százalékos szénforrás fogyások és a kísérletesen meghatározott C:N tömegarányok.

Szénforrás	Szubsztrátfogyás %	Elbontott szénforrás (mg l^{-1})	Meghatározott C:N tömegarány
Szukcinát	36.19 ± 14.54	67.6 ± 6.94	1.78 ± 0.38
Etanol	19.53 ± 11.70	58.79 ± 19.62	1.01 ± 0.21
Ecetsav	29.67 ± 10,13	72.13 ± 15.56	1.63 ± 0.65

1.3.3. Denitrifikációs aktivitások 3:1-es C:N arány mellett

Az utolsó 12 nap során a C:N arányt 3:1-re, a HRT-t pedig 1.5-1.8 órára csökkentettük. A változások denitrifikációs aktivitásokra gyakorolt együttes hatását mutatja be a 27. ábra. A periódus végére az etanolos és a szukcinátos reaktorok esetében a kezdeti aktivitásoknak kevesebb, mint a felét lehetett visszamérni. Az etanolos reaktor esetében mért legmagasabb aktivitás (1.63 kg NO_3^--N m^{-3} nap^{-1}) a kísérleti periódus 12. napjára 0.56 kg NO_3^--N m^{-3} nap^{-1} értékre esett vissza, ami 65%-os aktivitásvesztést jelent. Az ecetsavas reaktor viszont csak 26%-át vesztette el a kezdeti, és egyben legnagyobb aktivitásának (1.43 kg NO_3^--N m^{-3} nap^{-1} $\rightarrow$ 1.06 kg NO_3^--N m^{-3} nap^{-1}). Az eredményeket a 14-15. táblázatban foglaltuk össze.



27. ábra

14. táblázat

A bioreaktorok aktivitásának alakulása a HRT és a különböző szénforrások hatására 3:1 C:N tömegarány mellett.

Szénforrás	HRT (óra)	Denitrifikációs aktivitás ($kg\ NO_3^-$-N m^{-3} nap^{-1}) Max.	Min.	Aktivitási Egyenesek meredeksége
Szukcinát	1.51 ± 0.13	1.01	0.39	-0.0330
Etanol	1.59 ± 0.26	1.62	0.56	-0.0348
Ecetsav	1.82 ± 0.32	1.43	0.70	-0.0154

15. táblázat

A bioreaktorokban kimért százalékos szénforrás fogyások és a kísérletesen meghatározott C:N tömegarányok.

Szénforrás	Szubsztrátfogyás %	Elbontott szénforrás (mg l^{-1})	Meghatározott C:N tömegarány
Szukcinát	55.19 ± 13.05	55.57 ± 13.65	1.78 ± 0.31
Etanol	44.01 ± 12.74	53.87 ± 19.09	0.95 ± 0.17
Ecetsav	61.33 ± 11,32	71.28 ± 15.10	1.76 ± 0.42

Az ecetsavas bioreaktornál tapasztalt kisebb aktivitásvesztés esetlegesen magyarázható a reaktoron kimért hosszabb tartózkodási idővel, figyelembe véve az első két periódus eredményeit, miszerint az ecetsav és az etanol, mint szénforrások között hatékonyságbeli különbség a denitrifikáció szempontjából nem volt kimutatható.

1.3.4. A részeredmények összefoglalása

Az immobilizált *P. butanovora* sejtek mind a három vizsgált szerves elektrondonor mellett hatékony denitrifikációt végeztek. Azonos kiindulási C:N arány mellett azonban az etanol és az ecetsav jobb szubsztrátnak bizonyult a nitrát- és nitritredukció szempontjából, mint a szukcinát. Bár a felmenő tápoldatok szervesanyag-tartalmát fokozatosan csökkentettük, figyelembe véve az egyes kísérleti periódusok során meghatározott C:N tömegarányok jó egyezését elmondható, hogy szénforrás limitáció egyik periódus alatt sem következett be. Így a denitrifikációs aktivitások értékének alakulására az egyes szénforrások hatékonyságán túl a legnagyobb hatást az influensek áramlási sebességének növelése fejtette ki.

Az ecetsav esetében a reaktorok működtetése során kimért C:N tömegarányok jó egyezést mutattak a Croll és mtsai (1985) által fluidágyas reaktorban és Mohseni-Bandpi és Elliott (1998) által RBC (*rotating biological contactor*) rendszerben meghatározott 1.7 és 1.86 arányokkal. Az etanolra vonatkozóan mért C:N tömegarány szintén közelítette a Mohseni-Bandpi és Elliott (1998) által RBC rendszerben kimért 1.25-ös C:N arányt.

A legmagasabb aktivitásokat (1.17 kg NO_3^--N m^{-3} nap^{-1} a szukcinátos, 1.63 kg NO_3^--N m^{-3} nap^{-1} az etanolos és 1.53 kg NO_3^--N m^{-3} nap^{-1} az ecetsavas reaktor esetében) a 6:1-es C:N tömegarány mellett mértük. Az effluensek nitrát- és nitrit-koncentrációja a szukcinátos reaktor esetében 0.8 ± 0.1 kg NO_3^--N m^{-3} nap^{-1} aktivitási értékig, az etanolos és ecetsavas reaktorok esetében pedig a 1 ± 0.1 kg NO_3^--N m^{-3} nap^{-1} aktivitási értékig nem haladták meg az egészségügyi határértékeket (10 mg l^{-1} NO_3^--N, 1 mg l^{-1} NO_2^--N, EPA).

Az 1.5-1.8 órás tartózkodási idők a 3:1-es C:N tömegarány mellett már túl rövidnek bizonyultak ahhoz, hogy az immobilizált sejtek az előző periódushoz hasonló szintű denitrifikációt folytassanak annak ellenére, hogy szénforrás limitáció nem állt fent.

Az effluensek átlagos pH értékei (7.48 ± 0.13, 7.68 ± 0.22 és 7.64 ± 0.14 az etanolos, a szukcinátos és az ecetsavas rendszerek esetében) mindvégig az optimálisnak tartott 7-9 határok között maradt (Henze és mtsai 1992). Az adatok jól egyeznek azzal a megfigyeléssel, hogy az ecetsav alkalmazása egy denitrifikáló rendszerben nagyobb pH változást eredményez a kezelendő oldatban, mint az etanol (Ćsřy és mtsai 1998).

A szénforrások optimális C:N tömegaránynál nagyobb mennyiségben történő alkalmazása elősegítette a baktériumok fokozott szaporodását, így a beállított kísérleti szakaszok mindegyikében a gyöngyökből biomassza kiszaporodás volt tapasztalható. A mikrobiológia vizsgálatok szerint az effluensben megjelent sejtek minden esetben a gélmátrixba immobilizált *P. butanovora*-nak feleltek meg.

1.4. A pilot bioreaktor működtetése

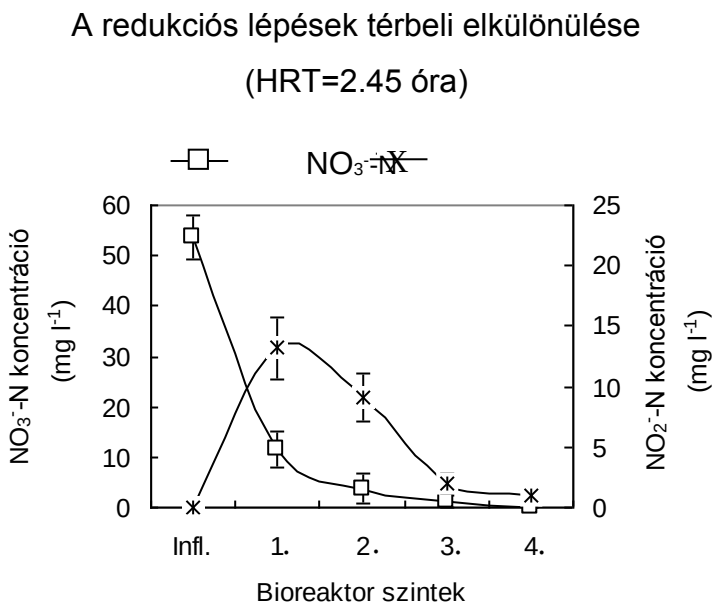
A pilot méretű bioreaktor üzemeltetése során az eddigi mérések eredményeit figyelembe véve a denitrifikáció szerves szénforrásának az etanolt választottuk. Az ecetsav az etanollal szinte azonos aktivitást eredményezett, az etanol esetében azonban az optimális C:N arány értelmében egységnyi nitrát teljes redukciójához kevesebb szénforrásra van szükség, így az gazdaságosabb szubsztrátnak tekinthető. Ezentúl az etanol az ecetsavnál jóval könnyebben kezelhető (nincs szükség az influens pH-jának állítására), és alkalmazásával a legkisebb pH változás volt elérhető. Az etanolt nem csak pilot (Fusch és mtsai 1997, Æsøy és mtsai 1998, Mohseni-Bandpi és Elliott 1998), hanem ipari méretekben is (Hallin és mtsai. 1996, Hasselblad és Hallin 1996) gyakorta alkalmazzák denitrifikáló rendszerek esetében.

A pilot reaktor tesztelése során nem a maximális denitrifikációs aktivitás, hanem az effluens nitrát-, nitrittartalmának minimalizálására törekedtünk (10 mg l^{-1} NO_3^--N, 1 mg l^{-1} NO_2^--N), a működési paramétereket ennek megfelelően választottuk meg. Így a szénforrás-limitációt még nem jelentő 3:1-es C:N arány mellett (Kesserű és mtsai 2002), az előző reaktor kísérletek során az adott C:N tömegarány esetében rövidnek bizonyuló HRT-hez (1.8 óra) képest, nagyobb HRT-t (2.45 óra) választottunk. A bioreaktor leírt körülmények közötti stabil működése során kimértük a felhasznált etanol-C, redukált nitrát-N tömegarányt, és a reaktor második működtetési szakaszában a meghatározott optimális tömegarányhoz közeli C:N tömegarány mellett vizsgáltuk a pilot reaktor aktivitását és globális viselkedését.

1.4.1. A denitrifikáció lépéseinek térbeli elkülönülése

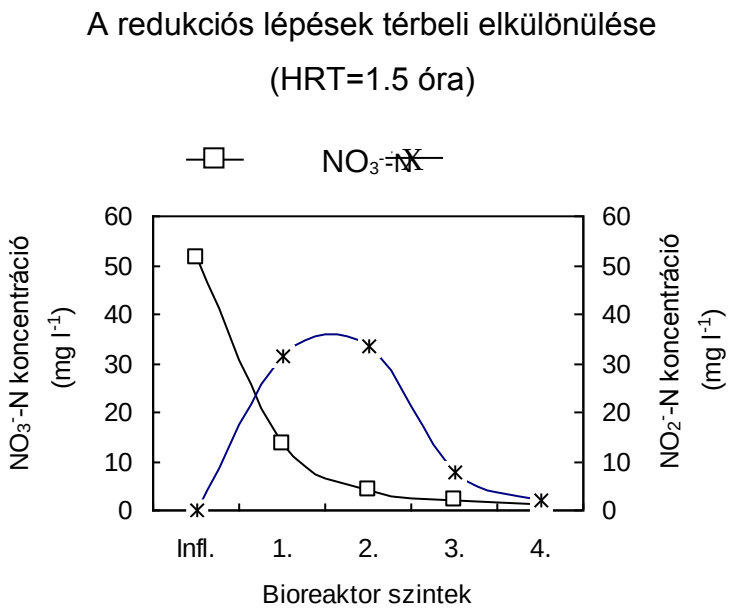
A bioreaktor létrehozása során a gyöngyök különböző magasságaiban mintavételi helyeket hoztunk létre (Anyagok és módszerek , 15. ábra), így a reaktor belsejében zajló eseményeket is nyomon tudtuk követni. Elsőként a nitrát- és nitritredukció alakulását, térbeli elkülönülését mutatjuk be az influens 2.45 órás tartózkodási ideje mellett.

Az 28. ábrán a bioreaktor egyes mintavételi helyeiről származó NO_3^--N és NO_2^--N adatok láthatók. A reaktor egyes szintjein kimért koncentrációk alakulása jól reprezentálja a bioreaktor teljes működtetése alatt megfigyelt eloszlásokat. Az influens nitráttartalmának közel 80%-a már az első szinten redukálódott, majd a harmadik szint magasságában, a nitrát-koncentráció a kimutathatósági határ alá esett. A nitrát redukcióját a nitrit részleges akkumulációja követte, amely nemcsak időbeli, de az influens folyamatos áramlásának köszönhetően térbeli elkülönülést is mutatott. Az első szinten kialakult átlagos 13 mg l^{-1} NO_2^--N koncentráció a reaktor utolsó szintjéig folyamatos csökkenést mutatott csakúgy, mint a bioreaktor egyes szintjeire számított denitrifikációs aktivitások (30. ábra). A legmagasabb denitrifikációs aktivitás a majdnem maximális nitrát redukciót biztosító első szint magasságában volt kimutatható.

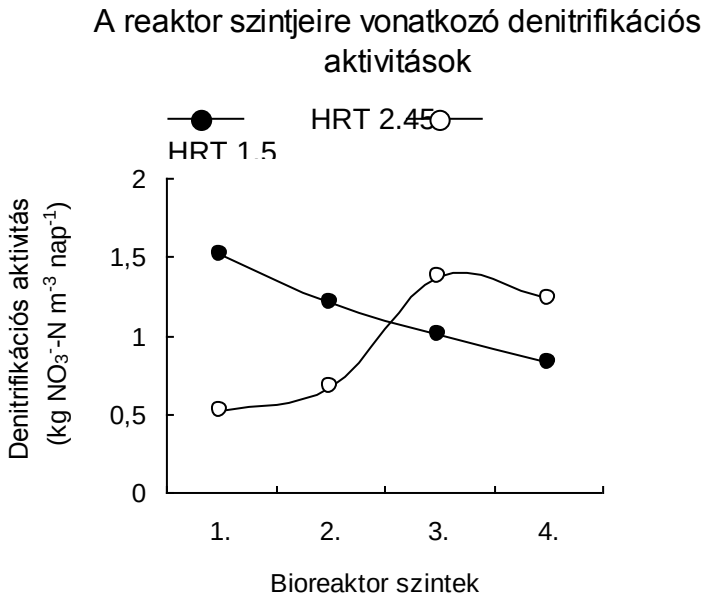


28. ábra

A rövidebb tartózkodási idő esetén (HRT 1.5 óra) az egyes szinteken mért nitrát mennyiségeket tekintve nem volt szignifikáns különbség a hosszabb tartózkodási idő mellett kapott eredményekhez képest (29. ábra). A nitrit-koncentráció maximuma azonban egy szinttel feljebb jelentkezett, és mennyisége (35 mg l^{-1}) több mint kétszerese volt az előzőekben mérteknek. A denitrifikációs aktivitás maximuma is eltolódott (30. ábra), a gyors áramlási sebesség eredményeképp a nitrát redukciója mellett nem, vagy csak igen kis mértékben történt szimultán nitritredukció. A reaktor második szintjén kimért nitrit-mennyiség megegyezett a nitrátból maximálisan keletkezhető nitrit mennyiségével, így ebben az esetben gyakorlatilag teljes nitritakkumuláció következett be.



29. ábra



30. ábra

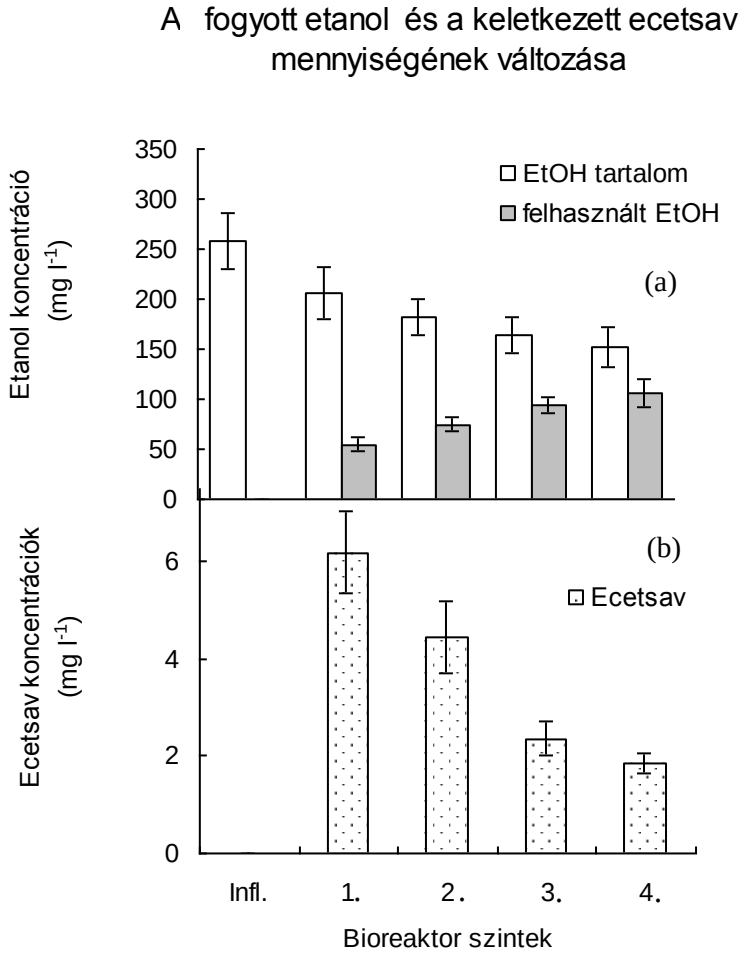
1.4.2. A szerves szénforrás hasznosítása

A mintavételi helyeknek köszönhetően az influens etanoltartalmának az egyes reaktorszintek közti csökkenését is kimérhettük. A felmenő tápoldatból és az egyes szintekről vett mintákból visszamért etanol koncentrációkat, illetve az influens és a mintavételi helyek etanol koncentrációja közti különbséget (felhasznált etanol) mutatja a 31. (a) ábra.

A 3:1 C:N tömegarány mellett kapott adatok szerint a legnagyobb etanolfogyás az első szint magasságában következett be, amely régióhoz a felmenő nitrát 80%-nak redukálása volt

kapcsolható. A továbbiakban az egymást követő szintek közötti etanolfogyás már nem volt ilyen mértékű, ami minden bizonnyal összefüggésben állt a kisebb hatékonyságú redukciós folyamatokkal. Az effluens (reaktor 4. szint) esetében mért értéket a felmenő tápoldat etanol tartalmához viszonyítva, átlagosan 42 %-os csökkenés történt.

A bioreaktor üzemeltetésének második harmadától a HPLC-s analízis segítségével ecetsav volt detektálható a reaktor különböző szintjeiről vett mintákból. Az etanol ecetsavvá történő oxidációja nem ismeretlen olyan rendszerek esetében, ahol az etanol és a tápoldat oldott oxigénkoncentrációja elég magas (Croll és mtsai 1985). Az egyes reaktorszinteken mért ecetsav-koncentrációkat mutatja a 31. (b) ábra. A legmagasabb ecetsav-koncentrációkat az első szint magasságában lehetett kimutatni, ami jól párhuzamba állítható az etanol koncentrációk alakulásával. Az influens oldott oxigén koncentrációja is a reaktor első szintjén volt a legmagasabb, majd a szinteken felfelé haladva a bakteriális anyagcserének köszönhetően egyre oxigénszegényebb állapotok alakulhattak ki. A mérések alapján az etanolból keletkezett ecetsavat az immobilizált sejtek ugyanúgy felhasználták a redukciós folyamatokhoz, mint az etanolt. A keletkezett ecetsav mennyisége a reaktor utolsó szintjéig több mint 70%-ban eliminálódott 31 (a) ábra.



31. ábra

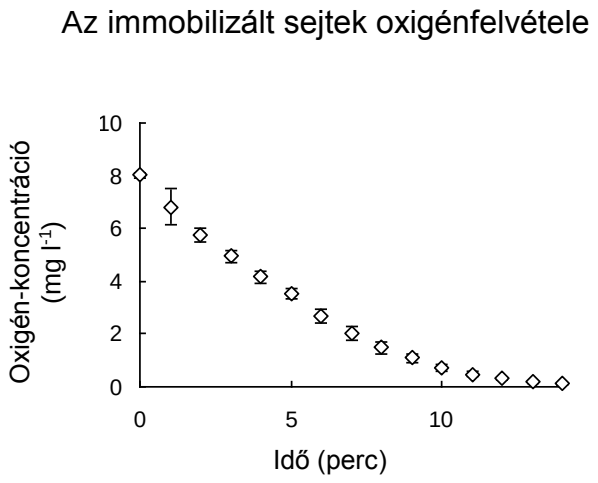
A 3:1-es C:N tömegarány mellett a bioreaktor utolsó szintjére vonatkozóan meghatároztuk a kialkult C:N arányokat. A C-fogyás számításakor figyelembe vettük az etanolnak ecetsavvá történő oxidációját is. Az így kapott érték: 1.41 ± 0.41 C:N tömegarány, ami kicsit magasabb

annál az 1.25:1 C:N aránynál, mint amit Mohseni-Bandpi és Elliott (1988) az általuk kialakított rendszerben kimértek. Viszont alacsonyabb, mint Fuchs és mtsai (1997) és McCleaf és Schroeder (1995) által membrán bioreaktorban kimért 1.9-3:1 vagy 2.2:1 tömegarányok.

A pilot bioreaktor üzemeltetésének második szakaszában, amikor az influens etanol-tartalmát felére csökkentettük, az effluensben ecetsav nem volt kimérhető. A távozó etanol mennyisége pedig átlagosan 20-30 mg l^{-1}-nak adódott, amelyet az effluens 3 órán keresztül tartó erőteljes levegőztetésével, további 30-40%-al csökkenteni lehetet.

1.4.3. Az immobilizált sejtek oxigénfogyasztása

A kompozit gyöngyök belsejébe immobilizált sejtek kevertetett batch rendszerben mintegy 15 perc alatt 100%-ban felvették a tápoldatban oldott oxigént 32. ábra. A batch rendszerben kimért gyors oxigén-fogyasztás ellenére a folyamatos influens beáramlás során a tápoldat oldott oxigén (DO) koncentrációja egyetlen esetben sem esett 1.7 mg l^{-1} alá. A pilot bioreaktor első szintjét szimuláló rendszerben az influens DO koncentrációjának átlagos értéke 2.1 ± 0.4 mg l^{-1} volt. Ez alapján elmondható, hogy a reaktor első szintjén elhelyezkedő baktériumok az influens DO tartalmának csak mintegy 80 %-át használhatták el, a maradék eliminálása az azt követő szinteken történhetett meg. Ezt a feltevést támasztja alá a reaktor második szintjétől megfigyelhető folyamatos nitritredukció, amely csak anoxikus körülmények között megy végbe.



32. ábra

1.4.4. Denitrifikációs aktivitás 3:1 C:N tömegarány mellett

Az utolsó munkaciklusban a léptéknövelt bioreaktor működésével szemben azt az elvárást támasztottuk, hogy az effluens nitrition-tartalma az adott kísérleti elrendezés mellett a lehető legkisebb, optimális esetben az egészségügyi határérték alatti koncentrációt érje el. A

reaktornak a 3:1 C:N tömegarány mellett mért denitrifikációs aktivitásait, és az effluenssel távozó NO_3^--N és NO_2^--N mennyiségeket a 33. ábra (a-b) mutatja.

A bioreaktor napi 40-50 liter kapacitás mellett a kísérleti ciklus alatt végig kiegyensúlyozott aktivitást mutatott. A 0.88 ± 0.06 kg NO_3^--N m^{-3} nap^{-1} átlagos aktivitási értékek esetén az effluens NO_3^--N tartalma mindvégig alacsonyabbnak bizonyult a WHO által meghatározott egészségügyi határértéknél (10 mg $l^{-1}NO_3^-$-N), míg a NO_2^--N tartalom alakulása sokkal nagyobb ingadozást mutatott. Mindemellett a mintavételi napok mintegy felében az effluens NO_2^--N koncentrációja az egészségügyi határérték alattinak adódott (1 mg $l^{-1}NO_2^-$-N), egyes esetekben azonban annak több mint kétszerese is kimérhető volt.

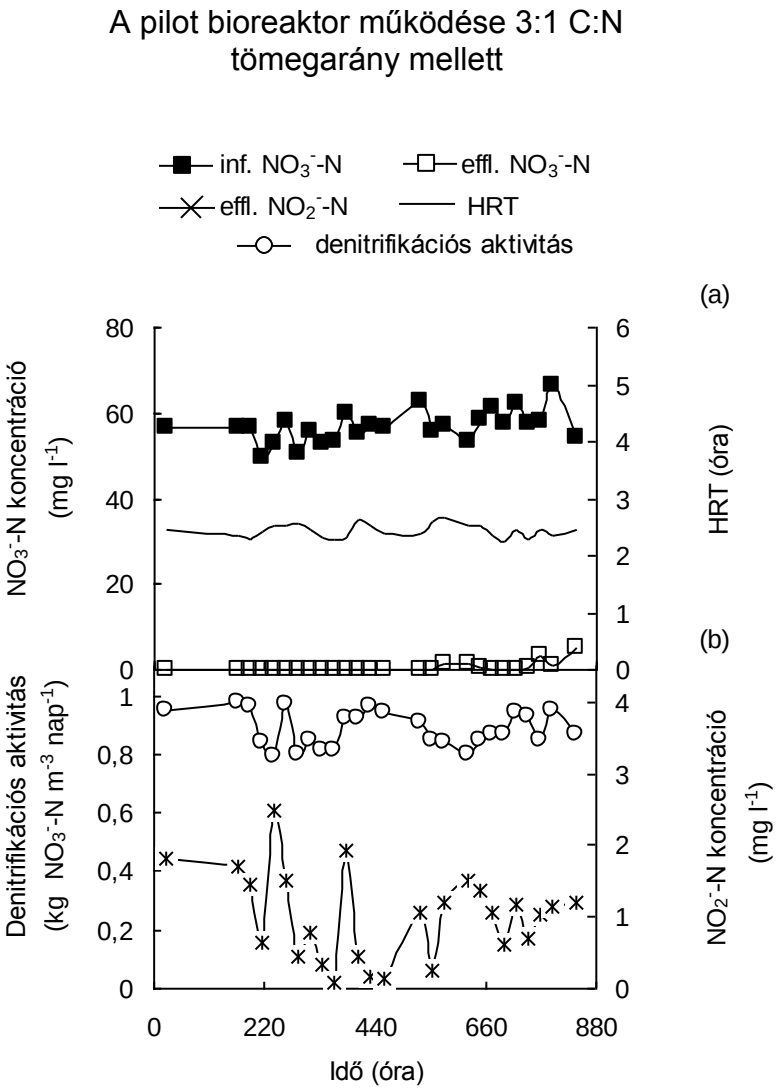
Az effluens pH-értéke mindvégig a nemzetközi standard alapján meghatározott maximum érték (pH=8.5) alatt maradt (EEC-Europan Economic Community1980), és az influens és az effluens kémhatása között kimért változás (ΔpH) átlagos értéke 0.25 ± 0.16 volt. A reaktor működésével kapcsolatos főbb paraméterek összefoglalását a 16. táblázatban adjuk meg

16. táblázat

A pilot bioreaktor működésének jellemzői 3:1 C:N tömegarány mellett

HRT (óra)	Effl. pH	Denitrifikációs aktivitás (kg NO_3^--N m^{-3} nap^{-1})	Effl. NO_3^--N (mg l^{-1})		Effl. NO_2^--N (mg l^{-1})		Effl. Élősejtszám (sejt ml^{-1})
			Min.	Max.	Min.	Max.	
2.45 ± 0.12	7.58 ± 0.14	0.88 ± 0.06	0	5.21	0.09	2.52	3 x 10^7

A feleslegben alkalmazott szerves szénforrásnak köszönhetően az influens élősejtszáma meghaladta a megengedett határértéket, azonban az összsejtszám kevesebb mint fele bizonyult csak *P. butanovora*-nak. A kompozit gélmátrixból kiszaporodott immobilizált baktérium mellett az effluensből további négy Gram-negatív baktérium is kitenyészthető volt. Bár ezek az etanolt szerves szubsztrátként elfogadták, komplett denitrifikációval nem rendelkeztek. Nitritet nem voltak képesek redukálni, továbbá a nitrátredukciójuk is elhanyagolható volt. A pilot bioreaktor belsejében megtelepedett denitrifikációra képtelen baktériumok etanol fogyasztásából adódhatott az általunk kimért, a szakirodalmi adatoknál bizonyos esetekben magasabb C: N tömegarány (1.41 ± 0.41).



33. ábra

1.4.5. Denitrifikációs aktivitás 1.5:1 C:N tömegarány mellett

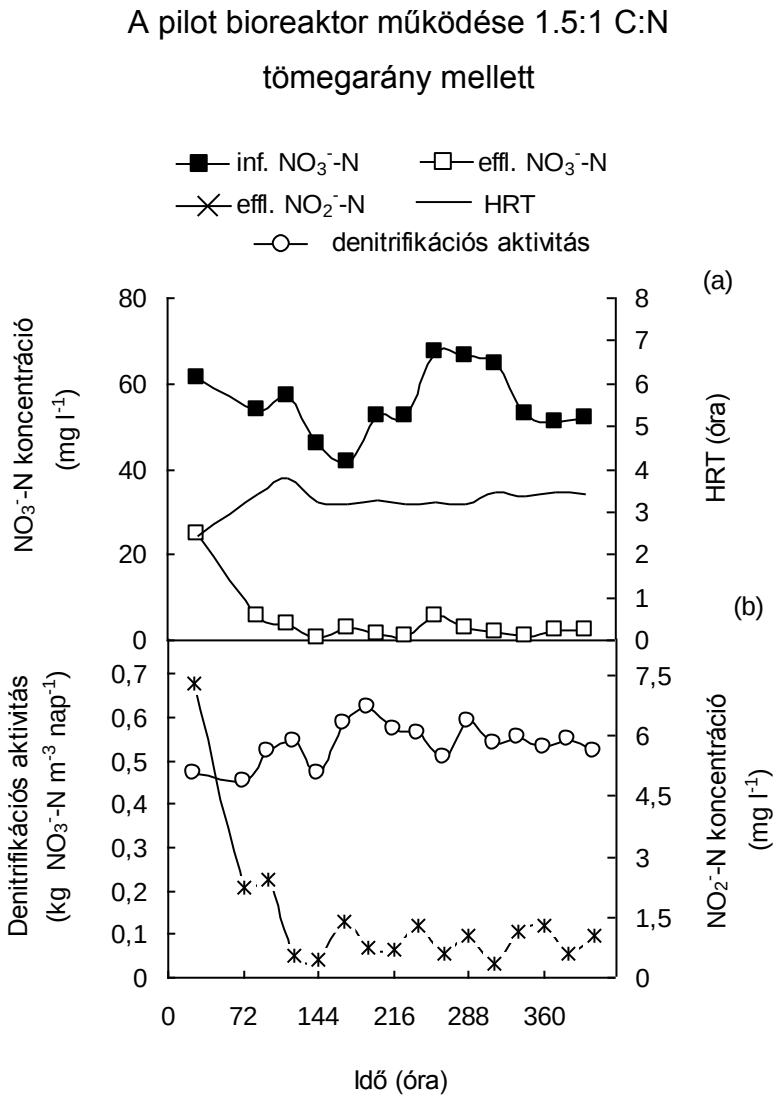
A pilot bioreaktorra felmenő tápoldat szerves szénforrás-tartalmának felére csökkentése szinte azonnal az effluens élősejtszámának két nagyságrenddel történő csökkenését vonta maga után, és ez az érték a reaktor működtetésének végéig jellemző is maradt. A kitenyésztett baktériumok minőségi eloszlása is változott: a *P. butanovora* sejtek aránya nőtt. A denitrifikációs aktivitás azonban csökkent (17. táblázat), annak ellenére, hogy a változtatást követő napot kivéve a NO_3^--redukciós aktivitás átlagosan 95.2 ± 2.1 %-os volt (34. ábra (a)).

17. táblázat

A pilot bioreaktor működésének jellemzői 1.5:1 C:N tömegarány mellett

HRT (óra)	Effl. pH	Denitrifikációs Aktivitás (kg NO_3^--N m^{-3} nap^{-1})	Effl. NO_3^--N (mg l^{-1})		Effl. NO_2^--N (mg l^{-1})		Effl. elősejtszám (sejt ml^{-1})
			Min.	Max.	Min.	Max.	
3.04 ± 0.12	7.35 ± 0.21	0.54 ± 0.05	0.7	24.73	0.37	7.29	5 x 10^5

Ennek megfelelően az effluens NO_3^--N tartalma még mindig az egészségügyi határérték alatt maradt. Bár az effluens NO_2^--N tartalma az előző periódushoz hasonlóan igen nagy ingadozásokat mutatott, az egészségügyi határértékhez közeli, átlagosan 1.1 ± 0.62 mg NO_2^--N l^{-1} koncentráció volt jellemző (34. ábra (b)).



34. ábra

Az 1.5:1 C:N tömegarány mellett üzemeltetett bioreaktor aktivitása az 500. működési órától folyamatos lecsengést mutatott. A bioreaktor szétszerelése során fény derült az aktivitásvesztés hátterére. Az egyedi kompozit gyöngyök mechanikailag nem károsultak (az immobilizált baktérium nem mosódott ki a rendszerből), a gyöngyök azonban nagy tömegben egymáshoz tapadtak, lehetővé téve ezáltal kisebb-nagyobb áramlási csatornák kialakulását. Az influens a legkisebb ellenállást követve a gyöngyök között a kialakult csatornákban közlekedett, nem érintkezve a biokatalizátor nagy részével, így nem mehetett végbe tökéletes nitrát- és nitritredukció.

1.4.6. A pilot bioreaktor eredményeinek összefoglalása

A pilot szintű bioreaktor a 0.88 ± 0.06 kg NO_3^--N m^{-3} nap^{-1} átlagos aktivitás értékkel a 3:1 C:N tömegarány mellett a kísérleti ciklus alatt végig stabil működést mutatott. A kapott aktivitás kisebb az1.0 ± 0.10 kg NO_3^--N m^{-3} nap^{-1} értéknél, amely mellett az előző munkaciklusban az etanolos reaktor effluensében a nitrát- és nitrition koncentrációk az egészségügyi határértéket nem haladták meg. A méretnövelés során azonban jól közelíthető volt az a denitrifikációs hatékonyság, mint ami a mintegy tized akkora térfogatú reaktor esetében létrejött.

A C:N tömegarány optimálizálása után a pilot bioreaktor átlagos aktivitásának csökkenése mellett, az effluenssel távozó biomasszamennyiség két nagyságrenddel, míg a szerves szénforrás mennyisége mintegy ötödére csökkent. A maradék szénforrás pedig az effluens intenzív levegőztetésével nagy részben eltávolítható volt. Az optimális szénforrásmennyiség mellett heterotróf módon üzemeltetett bioreaktor effluensének élősejtszáma nem haladta meg egyes autotróf rendszerek effluensére jellemző mennyiséget (Kiss és mtsai 2000). Az effluens NO_3^--N és NO_2^--N koncentrációja a mintavételi napok nagy részében a WHO által előírt egészségügyi határérték alatt maradt, egyes esetekben kismértékben meghaladta azt.

Egy heterotróf rendszer esetében feleslegben rendelkezésre álló szénforrás és nem steril működtetés során elkerülhetetlen egyéb baktériumok megjelenése a bioreaktor belsejében. A bioreaktorok aktív töltetét alkotó baktériumpopuláció változása autotróf rendszerek esetén is ismert (Szekeres és mtsai 2002). Jelen esetben a megtelepedett baktériumok csak “szénforrás élősködőknek” bizonyultak, mivel denitrifikációs aktivitásuk nem volt. Az immobilizált baktérium aktivitását nem csökkentették, és azt a bioreaktorból, mint “élettérből” kiszorítani nem tudták. A kompozit gélbe történő immobilizálással tehát olyan biokatalizátor hozható létre, amely ellenáll a bioreaktor hosszú távú működtetése során esetlegesen bekövetkező

populáció-dinamikai változásoknak. A szaporodó heterogén biomassza hátránya azonban, hogy a kompozitgyöngyök felületén mátrixot képezve elősegíti azok aggregációját, ezáltal áramlási csatornák kialakulását, és mindez a bioreaktor aktivitásának csökkenéséhez vezethet. Ebből adódóan a hasonló elrendezésű bioreaktorok esetében biztosítani kell a gyöngyök időnkénti lassú mozgatását, hogy a felületükön kialakult biofilm és poliszacharid mátrix leváljon.

Bár a gyöngyök felületén megfigyelhető volt az összetapadást eredményező mátrix, maguk a gyöngyök intaktak maradtak. A kompozit gél minősége nem romlott a működtetési periódus alatt. Annak ellenére, hogy a tartózkodási idő drasztikus csökkentése (HRT 1.5) változtatott a redukciós folyamatok térbeli eloszlásán és a denitrifiklációs aktivitáson, az influens áramlási sebességének ugrásszerű növekedéséből adódó destruáló hatás (shear stress) nem tudta kifejteni a hatását úgy, mint ahogy az a felületi biofilmek esetében bekövetkezett volna. A bioreaktor stressz hatást (HRT 1.5 óra) követő működése során aktivitásvesztés nem következett be.

A bioreaktor üzemletetéséből adódóan az influens oldott oxigén-koncentrációja magas volt. Az immobilizált sejtek oxigénfogyasztásának vizsgálata alapján elmondható, hogy a reaktor első szintjén még nem alakult ki teljesen anoxikus állapot. Ennek ellenére 80-90%-os nitrátredukció és szimultán nitritredukció volt kimutatható 2.45 órás tartózkodási idők mellett. Mindez azzal az előnnyel járt, hogy nem volt szükség az influens oxigén-mentesítésére a kezelés előtt, bár az minden bizonnyal tovább növelte volna a reaktor aktivitását.

A denitrifikáció során szerves szénforrás, mint elektron donor alkalmazása számos negatív és pozitív hatással bír. Az etanolt a baktériumok szinte mindegyike képes hasznosítani, így egy nem steril rendszer esetében a fertőző baktériumok nem kívánt megtelepedésének, szaporodásának nagy esélye van, azonban a megfelelő C:N tömegarány beállításával mindez kordában tartható, csökkenthető. Esetünkben egyes autotróf rendszerek effluensével megegyező biomassza terheltségű elfolyó oldatok keletkezése mellett az etanol alkalmazásával sokkal nagyobb denitrifikációs aktivitás, és sokkal kisebb, a bioreaktor eflluensében bekövetkező pH változás volt elérhető. Néhány autotróf rendszer esetében a tisztított oldat pH-ja elérheti akár 10-es értéket is (Chang és mtsai 1999, Kiss és mtsai 2000).

Míg Dahab és Lee (1988) és Mohseni-Bandpi és Elliott (1999) által összeállított BSAF (*B*ench-*S*cale *A*noxic *F*ilter) és RBC (*R*otating *B*iological *C*ontractor) rendszerekben 9 és 8.8 órás tartózkodási idők mellett 100%-os nitrátmentesítés volt kivitelezhető, az általunk immobilizált *P. butanovora* sejteket tartalmazó bioreaktorral rövidebb tartózkodási idők (2.45 és 3 óra) mellett is 100, illetve 95%-os nitrátmentesítés ment végbe. Az alkalmazott bioreaktor-elrendezés előnye, hogy gyors áramlási sebesség mellett, rövid idő alatt képes hatékony denitrifikációra.

Nitrátmentesítés II.
Denitrifikáció magas só-, és NO_3^- koncentrációk mellett

NaCl hatása a növekedésre

- Denitrifikáló baktériumok só-toleranciájának összehasonlítása

Denitrifikáció tömény sóoldatokban

$NaHCO_3$	$NaHCO_3$ NaCl	NaCl

- Az izolált baktériumok denitrifikációs aktivitásának összehasonlítása
- A pH denitrifikációra gyakorolt hatásának vizsgálata
- Az ideális szénforrás, és a legkisebb aktivitásvesztést eredményező nátriumsó kiválasztása

Bioreaktorok

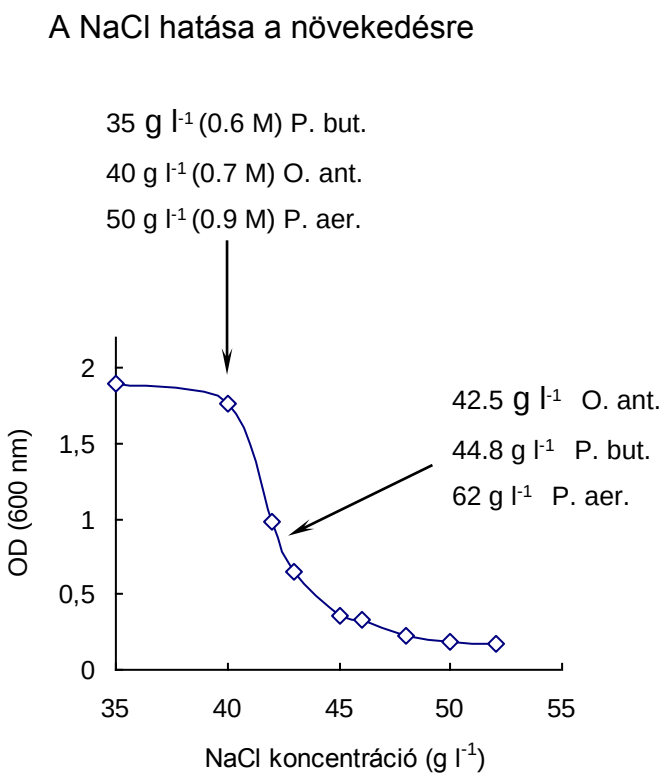
- A bioreaktorok működésének vizsgálata 4:1 és 2:1 C:N tömegarányok mellett
- Az optimális HRT meghatározása

35. ábra

Az inocserés nitrátmentesítő technológiák esetén a telített gyanta regenerálásakor keletkező magas Na^+ ion- és nitráttartalmú oldatok kezelése nagy jelentőséggel bíró probléma. Az ilyen összetételű effluens kezelésre szorul, amelynek nitráttartalma csak a biológiai denitrifkáció segítségével csökkenthető. Ehhez azonban szükségesek olyan mikroorganizmusok, amelyek az effluensben előforduló szélsőséges viszonyok mellett is képesek hatékonyan denitrifikálni. Ebben a munkafázisban megvizsgáltuk, hogy a *P. butanovora* denitrifikációja során hogyan tolerálja a magas Na^+ ion- és nitrátszinteket és aktivitásait a rendelkezésünkre álló (előzetesen erre a tulajdonságukra már vizsgált), izolátumok aktivitásaival hasonlítottuk össze. Ezt követően egy olyan denitrifikáló bioreaktor működtetését tűztük ki célul, amellyel a regeneráló oldatoknak megfelelő összetételű oldat nitrátmentesítését kívántuk elvégezni. Az elvégzett kísérletek időrendi sorrendjét mutatja a 35. ábra.

2.1. A NaCl hatása a növekedésre

Az növekedési görbén (*O. anthropi*) megadtuk (36. ábra) a vizsgált baktériumok 50%-os növekedésgátlását eredményező, illetve azt a NaCl koncentrációt (g l^{-1}), amely mellett a szaporodás még optimálisnak bizonyult. Az eredmények alapján mind a három baktérium a moderált sótűrők csoportjába tartozik a Kushner (1985) által létrehozott felosztás szerint. A moderált sótűrő baktériumok esetében a 29-144 g l^{-1} NaCl koncentráció még nincs növekedés gátló hatással. A *P. butanovora* sótoleranciájában elmaradt a *P. aeruginosa*-tól, de jobbnak bizonyult, mint az *O. anthropi*.

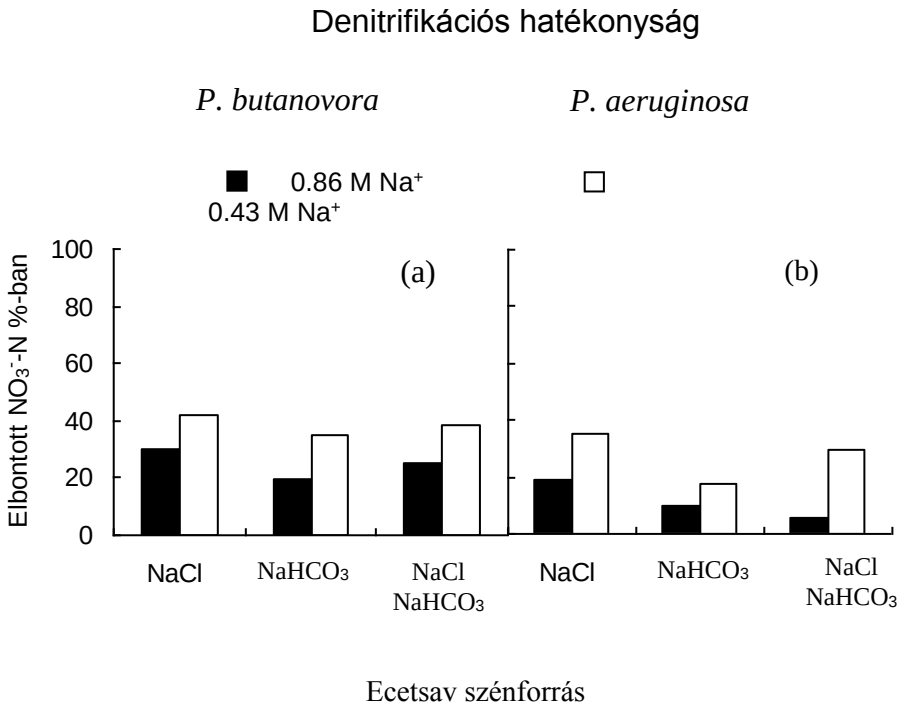


36. ábra

2.2. Denitrifikációs aktivitások magas Na+ ion koncentrációk mellett

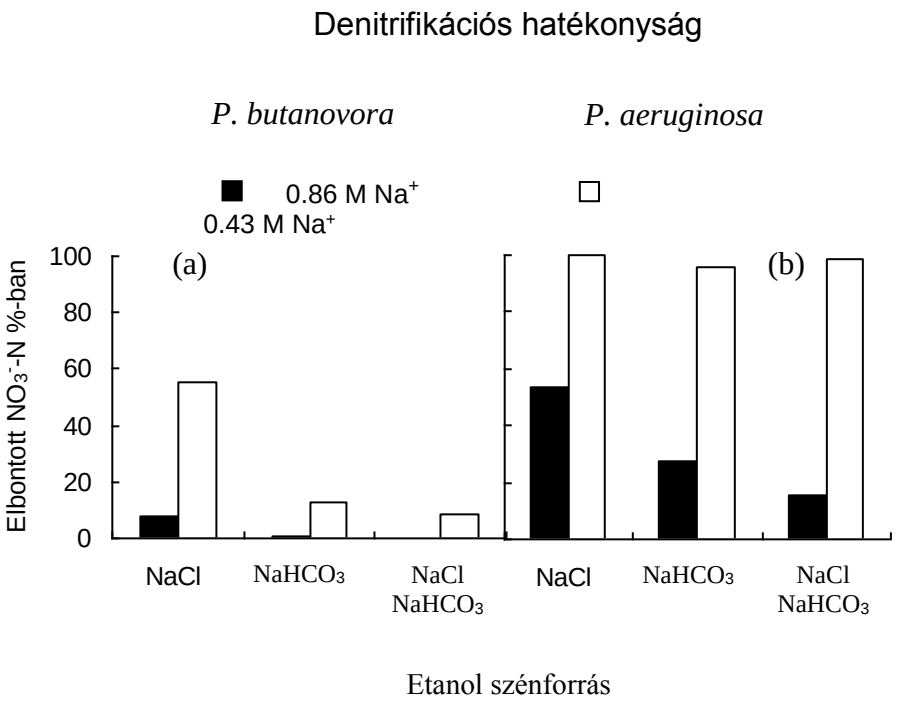
Az O. anthropi esetében a 7 napos anaerob inkubáció ellenére sem lehetett NO_3^--N fogyást kimérni sem a 0.86 M, sem pedig a 0.43 M Na^+ iont tartalmazó tesztoldatokból. Bár a kiindulási 2 g l^{-1} NO_3^- jelentős része redukálódott, a belőle keletkezett NO_2^- teljes egészében akkumulálódott, vagyis ebben az esetben komplett denitrifikáció nem játszódott le.

Az ecetsav mint szénforrás mellett a vizsgált két *Pseudomonas* törzs denitrifikációs hatékonysága között lényeges különbség nem volt kimutatható. Még a felezett Na^+ ion koncentrációk ellenére sem történt 50 %-ot meghaladó NO_3^--N fogyás a 7 napos inkubáció végére (37. ábra (a,b)). A Na^+ iont különböző formában tartalmazó tesztoldatokról elmondható, hogy a tiszta NaCl oldathoz képest a $NaHCO_3$-os rendszerekben rendre kisebb denitrifikációs aktivitást mutattak a sejtek.



37. ábra

A tesztoldatok sótartalmának felére csökkentése minden esetben az aktivitások kis mértékű növekedését vonta maga után, amely a *P. aeruginosa* NaCl + $NaHCO_3$-os tesztoldataiban eredményezte a legnagyobb változást (37. ábra (b)) Egyedül az említett összetételű (0.86 M Na^+) oldat esetében bizonyult a *P. butanovora* hatékonyabbnak a *P. aeruginosa*-nál ecetsav szénforráson (37. ábra (a)).

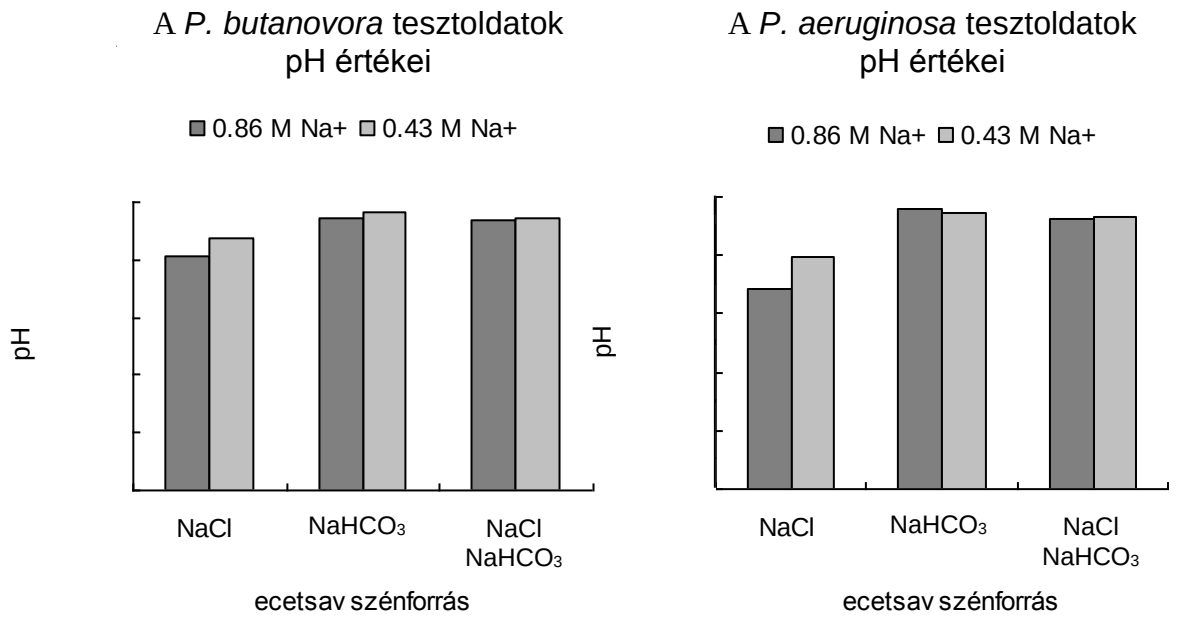


38. ábra

Az etanol, mint szénforrás alkalmazása a két törzs aktivitásában jelentős különbséget eredményezett. A *P. aeruginosa* sejtek minden esetben nagyobb denitrifikációs aktivitással bírtak nemcsak a *P. butanovora* hasonló rendszereiben mértekhez, hanem az ecetsav szénforrás mellett kimért eredményekhez képest is (38 ábra (b)). A tömény NaCl-os oldatban 50% feletti, míg a Na^+ iont 0.43 M koncentrációban tartalmazóban 100%-os NO_3^--N elimináció következett be, csakúgy mint a kevert (NaCl + $NaHCO_3$-os) tesztoldatban. A *P. butanovora* aktivitásai elmaradtak a *P. aeruginosa*-éitól (38. ábra (a)), a tömény oldatokban pedig még az ecetsav mellett mért aktivitásainál is alacsonyabb értékek adódtak.

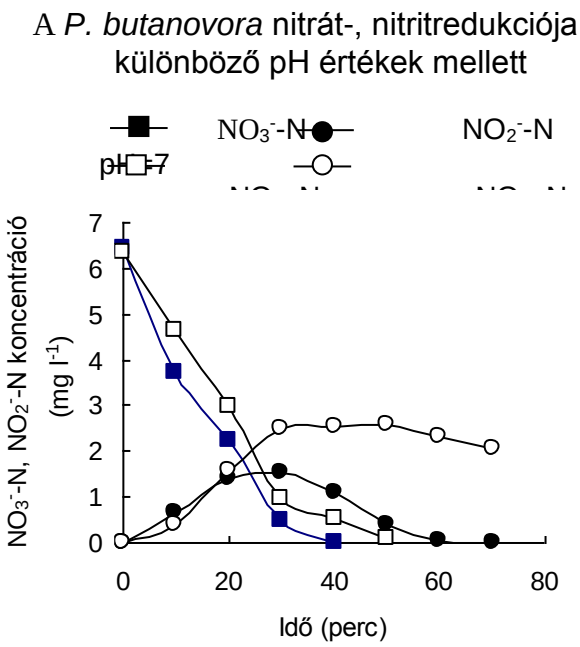
2.3. A tesztoldatok pH-jának változása a denitrifikáció során

Az alkalmazott szénforrás típusától és a sóoldatok összetételétől függetlenül az inkubáció végére általában a tesztoldatok kémhatása pH 8 fölöttinek bizonyult. A két aktív denitrifikációt végző *Pseudomonas* esetében a kialakult pH-viszonyok között nem volt számottevő különbség (39. ábra). A NaCl-os tesztoldatokban általában alacsonyabb volt a pH-változás, mivel ezekben a rendszerekben csak a nitritredukciót követő lúgosodás okozhatta a pH növekedését.



39. ábra

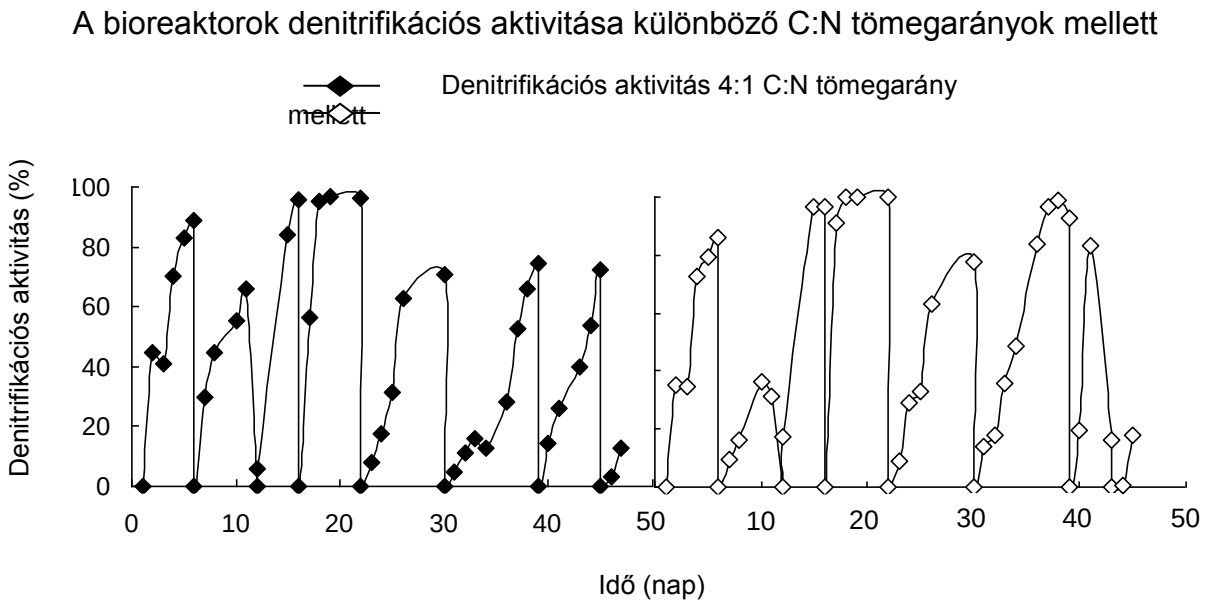
A nitritredukció kísérő jelensége a tápközeg lúgosodása. A pH túlzott emelkedése gátló hatást gyakorol magára a nitritredukcióra, így pl. a *P. butanovora* esetében a nitritredukció lassulásából adódóan egy adott nitrátmennyiség denitrifikációja a kontrollált rendszerben mértkehez képest kétszer-háromszor annyi időbe is telhet, ha a kémhatás értékét 9-re növeljük (41. ábra). A $NaHCO_3$ spontán disszociációja sajnálatos módon a denitrifikációtól függetlenül is emeli az oldatok pH-ját, akár 9.2-9.4 értéket is kialakítva. A nitritredukció 50%-os gátlása a *P. aeruginosa* esetében 9.5-ös pH értéknél, míg *P. butanovora* esetében már 8.8-nál bekövetkezik. Mindez magyarázhatja a két baktérium batch rendszerben mutatott eltérő aktivitását, továbbá hogy a $NaHCO_3$-ot is tartalmazó tesztoldatokban miért volt általában alacsonyabb aktivitás kimérhető.



41. ábra

2.4. Bioreaktorok működése magas só- és nitrát-koncentrációk mellett

Az ioncserés nitrátmentesítés során keletkező magas nitrát- és sókoncentrációjú szennyvíz kezelésének modellezését immobilizált *P. butanovora* sejteket tartalmazó bioreaktorokkal végeztük el. A batch kísérletek eredményei bizonyították, hogy a $NaHCO_3$ a pH emelésével a denitrifikáció folyamatát gátolja, ezért NaCl-ot adtunk a kezelendő oldatokhoz, úgy hogy annak Na^+ ion koncentrációja 0.86 M legyen. A denitrifikációhoz szükséges elektronforrást ecetsav fomájában biztosítottuk, 4:1 és 2:1 C:N tömegarányok beállításával, mivel a batch rendszerekben a tömény Na^+ ion oldatokban (0.86 M) az ecetsav mellett fejtettek ki a sejtek nagyobb aktivitást. A magas nitráttartalmú (0.45 g l^{-1} NO_3^--N) oldatok *fed batch* módon történő kezelésének eredményeit mutatja be a 42. ábra.



42. ábra

A különböző C:N tömegarányok mellett működtetett bioreaktorok aktivitásában szignifikáns különbség nem volt. A 2:1 C:N tömegarány esetében ugyanúgy létrejött 100 %-os denitrifikációs aktivitás, mint a kétszer annyi szénforrást tartalmazó oldat esetében. Annak ellenére, hogy a kezelendő tápoldatok több napon keresztül inkubálódtak a bioreaktorok belsejében és nagyfokú sejtszaporodás volt kimutatható, a baktériumok nem használták el teljes mértékben a rendelkezésre álló szénforrás, így szénforrás-limitáció egyik esetben sem következett be. A 2:1 C:N tömegarány mellett kimért optimális C:N arány 1.2 ± 0.24 volt, amely jól közelíti az irodalmi értékeket 1.2:1 Cervantes és mtsai (2001) és 1.7:1 Croll és mtsai (1985). A reaktorok periódusonkénti aktivitásában megfigyelt nagy fokú ingadozás a kevertetés során a tápoldatokba bejutó oxigén gátló hatásával magyarázható. A rendszerek

anaerob működtetésével ez nagy valószínűséggel kiküszöbölhető. A tápoldatok pH-ja minden esetben emelkedett és periódusok végén átlagosan 8.73 ± 0.13 és 8.76 ± 0.16-os értékek voltak kimérhetőek a 4:1 és 2:1 C:N tömegarány mellett. Az inkubáció végére kialakult kémhatás megegyezett azzal a pH értékkel (8.8), amely a *P. butanovora* nitrit-redukciójának 50%-os gátlását eredményezi.

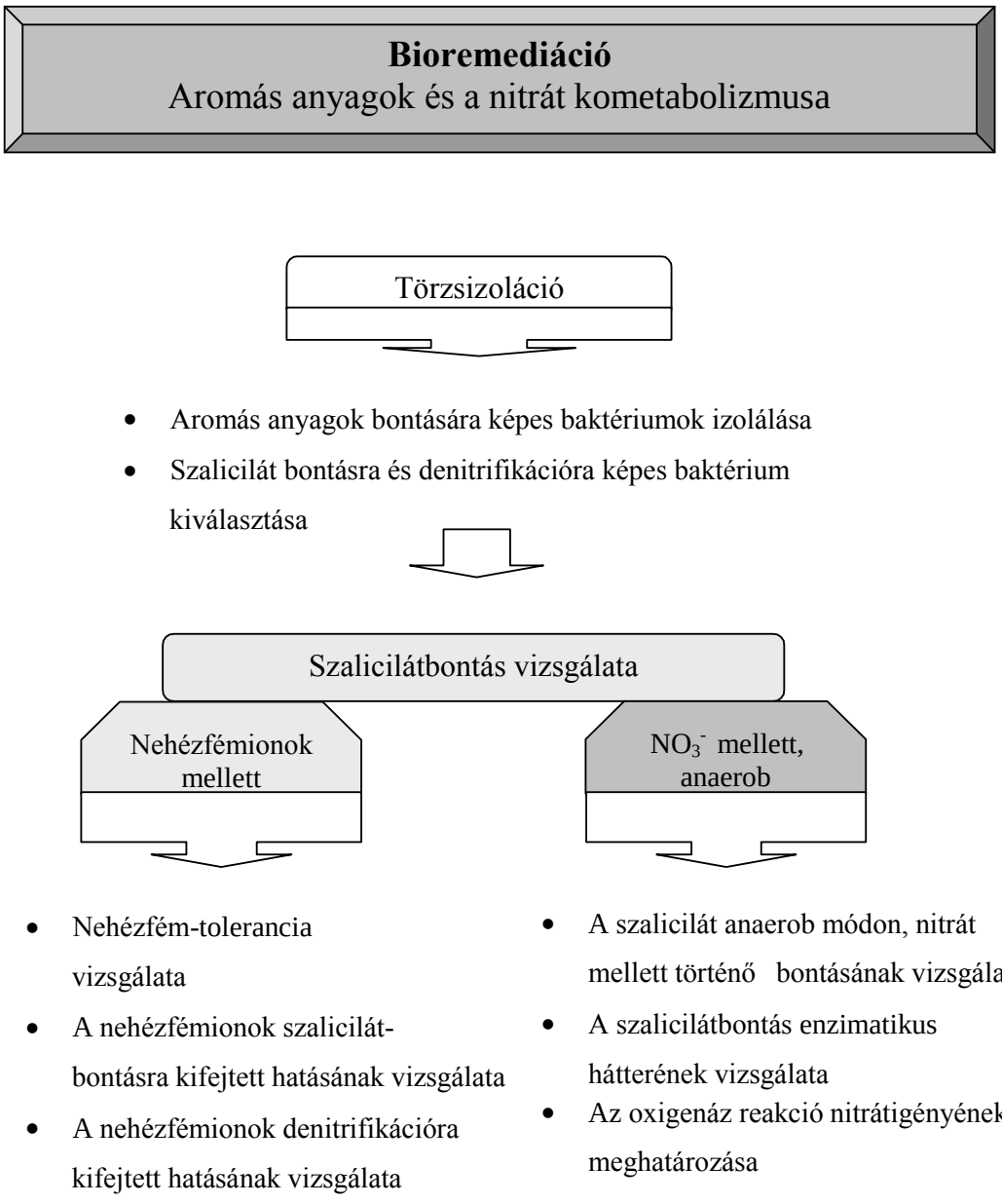
A kísérleti eredményekből meghatározható volt a 100 %-os denitrifikációhoz szükséges tartózkodási idő (43. ábra), amely az adatok alapján 8 napnak bizonyult.

2.5. Részeredmények összefoglalása

Bár a vizsgált három baktérium sótűrő képességében lényeges különbség nem mutatkozott az *O. anthropi* sejtek denitrifikációja szempontjából nem voltak kedvezőek a magas sókoncentrációk. A másik két baktérium esetében a különböző nátriumsóknak szintén erőteljes hatása volt a redukciós folyamatokra. A $NaHCO_3$ a denitrifikáció folyamatát a nitritredukció szintjén, magas pH értékek kialakításával, gátolja. Így ezt a nátriumsót egy tényleges technológia során az ioncserés töltetek regenerálására nem ajánljuk, mivel a keletkező szennyvíz biológiai rendszerrel történő kezelhetősége így lényegesen csökken.

Az ecetsav szénforrás mellett a *Pseudomonas* törzsek közel azonos aktivitással bírtak, míg az etanol a *P. butanovora*-val ellentétben nagyban kedvezett a *P. aeruginosa*-nak. A *P. butanovora* a 0.43 M Na^+ iont tartalmazó NaCl-os tesztoldatban etanol felhasználásával nagyobb aktivitást mutatott, mint az ugyanolyan összetételű, de ecetsavat tartalmazó oldatokban. Ennek ellenére egy bioreaktor elrendezésben az ecetsav alkalmazása ajánlott, mert annak segítségével a töményebb sóoldatokban is végbemehet a denitrifikáció.

A bioreaktorokban kapott eredmények azt mutatják, hogy az általunk összeállított rendszerrel egy magas só- és nitrát-koncentrációjú oldat biológiai kezelése eredményesen megoldható, és egy hasonló technológia folyamatosan üzemeltethető, ahol 8-10 napos tartózkodási idők esetében garantálható a 100%-os denitrifikációs hatékonyság.



44. ábra

Az aromás anyagok és nitrát kometabolizmusának vizsgálata során elvégzett kísérletek időrendi sorrendjét mutatja a 44. ábra.

3.1. Aromás anyagok bontására képes baktériumok izolálása

Az izolált baktériumok aromás anyag bontó képességének vizsgálata során a két aromás gyűrűt tartalmazó naftalinon, mint egyedüli szénforráson növesztettük a sejteket. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az adott tenyészetek a naftalin és számos más aromás vegyület lebontási intermedierjét jelentő szalicilátot képesek-e bontani (18. táblázat). Három törzs esetében kaptunk pozitív eredményt (NA, FNN és NAF), míg az ACI jelű izolátum csak a szalicilátot volt képes hasznosítani. Az aktivitást mutató baktériumok közül azonban csak a NAF jelű (*P. butanovora*) bizonyult az előző kísérletsorozatok eredményeképp egyben denitrifikációra is képesnek. Az adott munkafázisban olyan baktériumokat kerestünk, amelyek az aromás anyagok (jelen esetben a szalicilát) oxidációját végző és a nitrátredukció enzimeivel egyszerre rendelkeznek, lehetővé téve, hogy a kapcsolt anyagcserét részleteiben is megvizsgáljuk. Ezeknek a feltételeknek egyedül a *P. butanovora* felelt meg, mely a naftalinos tápoldat aerob, rázatott tenyészetében 10^8 db sejt ml^{-1}-es sejtkoncentrációt ért el. A sejtszaporodás során sárga intermedier megjelenését detektáltuk.

18. táblázat

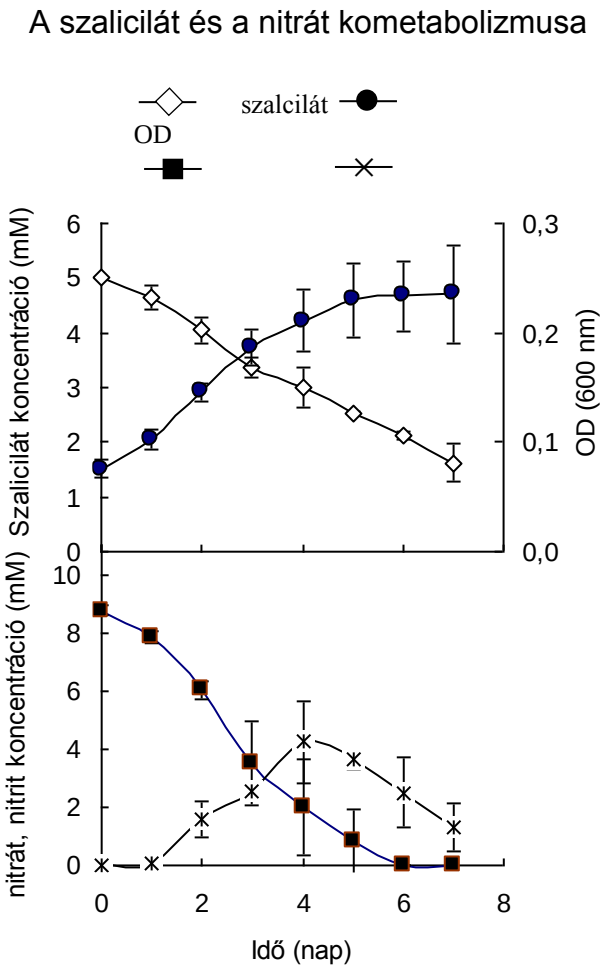
Az izolátumok aromás szubsztrát hasznosítása

Törzsek	Növekedése naftalinon	Növekedése Szaliciláton	Törzsek	Növekedése naftalinon	Növekedése Szaliciláton
PSH	-	-	**NNT**	-	-
AFA	-	-	**PSM**	-	-
ACI*	-	+	**BMY**	-	-
BBA	-	-	**NF**	-	-
RHO	-	-	**RSZ**	-	-
NA*	+	+	**RK**	-	-
FNN*	+	+	**NAF**	+++	+++

* denitrifikációra nem képes

3.2. A szalicilát és nitrát kometabolizmusa

A kemosztátban az egy hetes inkubáció során bekövetkezett szalicilát-, nitrát-koncentrációjának csökkenése és a sejtek szaporodását követő OD-növekedés a 45. ábrán látható. A 7. napra a tápoldatban a szalicilát mennyiségének mintegy 70%-a oxidálódott, míg a nitrát teljes mennyisége a denitrifikáció útján tovább alakult. A sejtek a 4. napra elérték exponenciális növekedésük végét, és azt követően beállt a stacioner fázis, ahol a sejtek $6x10^7$ sejt ml^{-1} koncentrációt értek el. Az exponenciális növekedési fázis vége egybeesett a nitrit-akkumuláció maximumával.

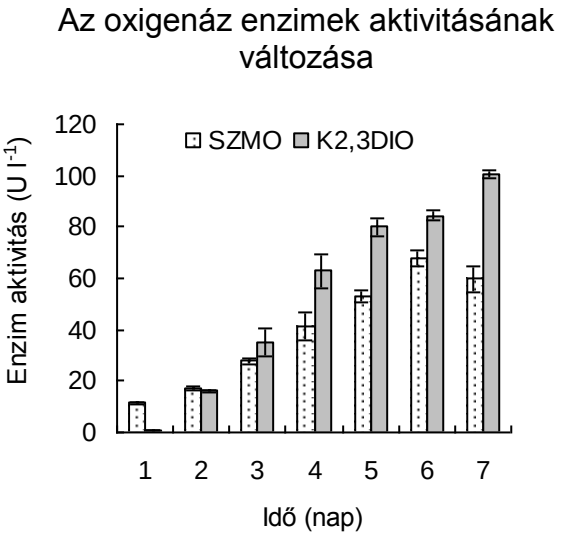


45. ábra

A 2. naptól a tápoldatban sárga intermedier jelent meg, ami a szalicilát teljes, katekol intermedieren keresztül történő lebontására utal, amelyet megerősít az is, hogy a 2. napon a katekol-2,3-dioxigenáz (K2,3DIO; SZMO=szalicilát monooxigenáz) aktivitása már jól mérhető volt a tápoldatban (46. ábra). Az enzimek aktivitása mindvégig növekvő tendenciát mutatott.

A tápoldat kezdeti oxigéntartalma az inokulálást követően 6-8 óra alatt nullára csökkent. Az anoxikus körülményt jelzi, hogy az összes nitrát átalakulásából számított maximális mennyiségű nitrit mennyiségének csak a fele akkumulálódott (teljes denitrifikáció), majd az azt követő napokban tovább redukálódott. A szalicilát oxidációja közben a 6. napig szimultán nitrát- és nitritredukció, ezt követően pedig már csak nitritredukció zajlott. Mindez arra enged következtetni, hogy a nitritredukciót is követi oxigéngyök felszabadulás, mert az anaerob körülmények között, amely a nitritredukció elsődleges feltétele, az oxigenázok máshonnan nem juthattak volna oxigénhez.

A kimért enzimaktivitásokból és a sárgaszínű intermedier megjelenéséből következik, hogy a szalicilátbontás terméke a katekol is továbbalakult, ám annak koncentráció-változásait lévén ez a sejtek citoplazmájában zajló, gyors folyamat nem tudtuk nyomon követni. A szalicilát mennyiségi változásai, továbbá a SZMO és a K2,3DIO enzimek specifikus aktivitásai azonban jól mérhetőek voltak. Az irodalmi adatok szerint a K2,3DIO enzim specifikus aktivitása minden vizsgált baktérium esetében nagyobbnak bizonyult, mint a SZMO enzimé és a kísérlet során mi is ezt az eredményt kaptuk. Az exponenciális növekedési fázis végén meghatározott specifikus aktivitások a *P. butanovora* esetében a következők voltak: 0.4 ± 0.09 a SZMO enzim és 0.65 ± 0.14 a K2,3DIO enzim esetében. Mindebből arra lehet következtetni, hogy a szalicilát lebontásakor katekol-akkumuláció nem alakulhatott ki, vagyis a szalicilát oxidációját egyidejű katekolbontás kísérte. Így egységnyi szalicilát bontásakor egységnyi monooxigenáz és dioxigenáz reakció játszódott le egymás után. Ebből következik, hogy ha megadjuk a szalicilát és nitrát fogyás arányát, akkor tulajdonképpen az egymást követő monooxigenáz-dioxigenáz reakció nitrátigényét határozzuk meg.



46. ábra

A kísérlet során az egyes mintavételi napokra számított NO_3^--N: szalicilát arányok értéke kis mértékű növekedést mutatott (19. táblázat).

19. táblázat
A kísérlet során meghatározott NO_3^--N:szalicilát arányok

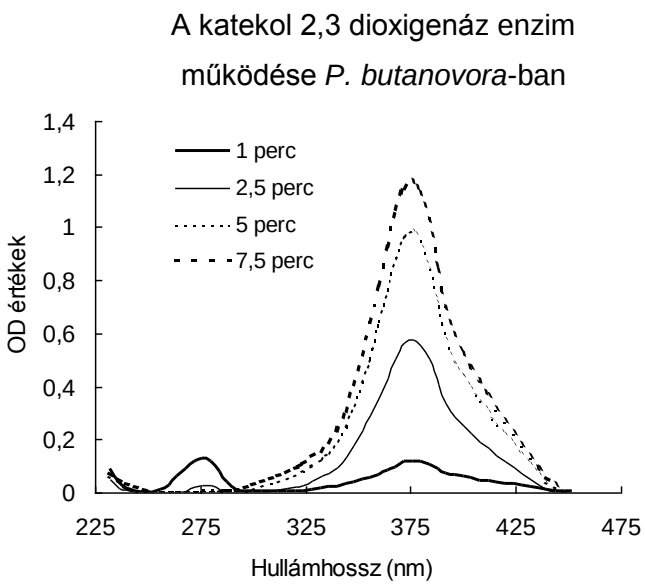
Mintavételi napok	2. nap	3. nap	4. nap	5. nap	6. nap
NO_3^--N:szalicilát arány	0.98 ± 0.31	1.18 ± 0.51	1.01 ± 0.06	1.32 ± 0.41	1.64 ± 0.51

A szaliciláttartalmú DSM 457 tápoldat a sejtek növekedéséhez szükséges foszfátokat és szulfát ionokat is tartalmazta a nitrátionok mellett. Annak érdekében, hogy eldöntsük, hogy valóban csak a nitrátból származó oxigén hatásának volt-e köszönhető az oxigenázok működése, stacioner állapotú sejtekkel, anaerob körülmények között, a szalicilát mennyiség teljes eloxidálásához elegendő moláris oxigénmennyiség kétszeresét tartalmazó szulfát,

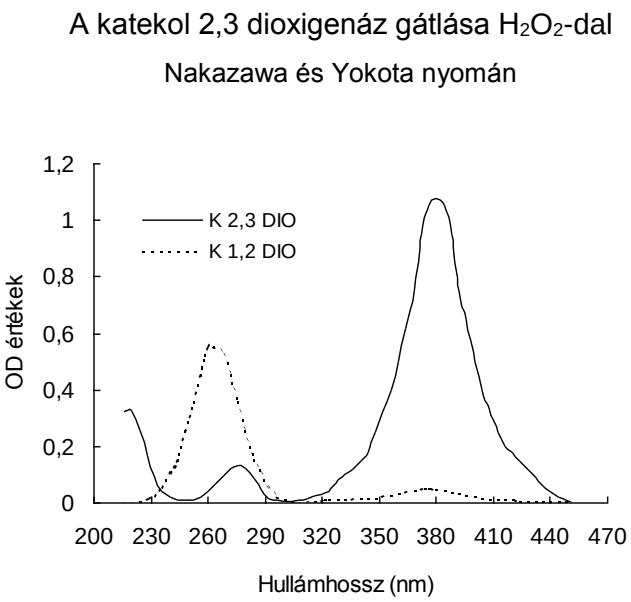
foszfát és nitrát tartalmú oldatokban vizsgáltuk a szalicilát koncentrációjának változását. A 7 napos inkubáció után csak a nitrátot tartalmazó oldatokban volt kimutatható a szalicilát mennyiségének csökkenése. Így a foszfátokban és a szulfátokban lévő, illetve az esetlegesen onnan felszabaduló oxigén gyökök méréseink alapján nem játszottak szerepet a kapcsolt anyagcserében.

3.3. A katekol gyűrűnyitásának vizsgálata

Célul kitűzött feladataink közé tartozott, hogy jellemezzük az általunk izolált baktérium szalicilátbontásának biokémiai útvonalát. Elsősorban arra kerestük a választ, hogy a szalicilátból kialakuló katekol a lebomlás során a katekol-1,2-dioxigenáz által katalizált orto-, vagy a katekol-2,3-dioxigenáz által katalizált meta-helyzetű hasításon megy-e keresztül. A baktérium szaliciláton, mint egyedüli szénforráson történő növekedésekor a sárgaszínű intermedier megjelenése az utóbbi, vagyis az α-ketosav utat feltételezte. A 47. ábrán a feltárt sejtekből származó enzimekkel elvégzett kísérlet eredményeit mutatjuk be.



47. ábra



48. ábra

Az UV tartományban 275 nm-nél elnyelési maximumot mutató katekol mennyiségének folyamatos fogyása mellett 375 nm-nél fokozatos abszorbancia-növekedést detektáltunk. Irodalmi adatok szerint a 375 nm-nél elnyelési maximumot mutató termék megfelel a katekolból meta-helyzetű hasítással kialakuló 2-hidroxi-mukon-

sav-szemialdehidnek, amely sárga színű. A kapott eredmény alapján elmondható, hogy a *P. butanovora* sejtek katekol-2,3-dioxigenázzal rendelkeznek.

Bár a *Pseudomonas* genus tagjaira általában ez a lebontási út jellemző, nem ritka, hogy a másik útvonal enzimével is rendelkeznek (Nakazawa és mtsai 1973). Ennek megvizsgálásához az enzimpreparátumokat H_2O_2-dal kezeltük, majd az inkubációs idő lejárta után a rendszerben maradt peroxidot kataláz enzimmel elbontottuk. A katekol 2,3-dioxigenáz, szemben a katekol-1,2-dioxigenázzal, H_2O_2-os kezelés után nem nyeri vissza az aktivitását, így ezzel a módszerrel szelektíven gátolható (Nakazawa és mtsai 1973). Ha az enzimek között van katekol-1,2-dioxigenáz is, akkor a peroxidos kezelés után a katekol bomlásából 260 nm-en elnyelési maximumot mutató cisz,cisz-mukonát keletkezik (48. ábra) (Nakazawa és mtsai 1973). A H_2O_2-os kezelés után még a 10 perces inkubációs idő elteltével sem volt 260 nm-en kimérhető abszorbancia növekedés. Mindez arra utal, hogy ez a sejtvonal nem rendelkezik katekol-1,2-dioxigenázzal. Méréseink azt támasztják alá, hogy a *P. butanovora* a katekol gyűrűnyitását meta-helyzetben, a katekol-2,3-dioxigenáz enzim segítségével viszi véghez.

3.4. Nehézfém ionok hatása a növekedésére, a szalicilát bontásra és a denitrifikációra

A Nieto és mtsai (1989) meghatározása szerint, ha 1 mM Zn^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+} és 0.1 mM Hg^{2+}, vagy ennél nagyobb ion koncentrációk nem gátolják az adott baktérium növekedését, akkor azokkal az ionokkal szemben a vizsgált sejtvonal toleranciát mutat. Az adatok alapján a *P. butanovora* két fémionnal szemben bizonyult toleránsnak, ezek pedig a Cu^{2+} és Pb^{2+} ionok voltak (1 mM). A vizsgált nehézfémionok közül a legerősebb növekedésgátló hatással a Hg^{2+} rendelkezett (20. táblázat).

A szaliciláton történő növekedés során a fémionok általában erősebb gátlóhatást fejtettek ki, így még a vizsgált legkisebb koncentrációban nehézfém iont tartalmazó rendszerekben sem haladta meg a szalicilát bontás mértéke a kontrollhoz (nehézfémsót nem tartalmazó szalicilátos tápoldat) viszonyított 20-24 %-os hatékonyságot.

A sejtek denitrifikációs enzimrendszere is érzékeny volt a nehézfémionokra. Egyedül a Pb^{2+} ion esetében volt N_2-gáz-képződéssel járó teljes denitrifikáció a maximális koncentráció (tolerancia határkoncentráció) mellett, ahol még a sejtek szaporodni voltak képesek.

20. táblázat

A néhézfémionok *P. butanovora* vizsgált tulajdonságaira kifejtett hatásai

Nehézfémion	Növekedés DSM 1 táptalajon	Növekedés Szalicilát tápoldatban	Denitrifikáció (N_2 képzés)	Katekol bontás (2-hidroxi-mukonsav-szemialdehid megjelenése)
	mM			
Zn^{2+}	0.10	0.10	0.05	0.01
Hg^{2+}	0.01	0.01	0.01	0.01
Pb^{2+}	1.00	0.10	1.00	0.10
Cu^{2+}	1.00	0.10	0.50	0.10
Ni^{2+}	0.50	0.10	0.10	0.01
Cd^{2+}	0.10	0.05	0.01	0.01

A táblázatban feltüntetett értékek az adott nehézfémionnak azt a maximális koncentrációját mutatják (mM-ban), amely mellett még növekedés, szalicilátbontás vagy komplett denitrifikáció ment végbe.

Ahogy azt 2-hidroxi-mukonsav-szemialdehid megjelenése mutatta a szalicilát katekolon keresztül történő teljes lebontása több esetben is csak a kevesebb nehézfém sót tartalmazó oldatokban ment végbe, mint ami mellett még aktív szalicilát felvétel és bontás történt. Mindez arra hívja fel a figyelmet, hogy az aromás anyagokat kísérő nehézfém szennyezések egy biodegradációs folyamat több szintjén képesek gátlóhatást kifejteni. Az intermediereket bontó enzimek érzékenyebbek lehetnek, mint maga a lebontandó célszubsztrát elsődleges oxidáza, ami az intermedier akkumulációjához vezethet. Ezért egy komplex környezetszennyezés felszámolása során sosem elegendő csak az elsődleges szubsztrát mennyiségének csökkenését nyomon követni, hanem figyelemmel kell lenni a keletkező, sokszor ugyanolyan mérgező vagy még toxikusabb lebontási köztitermékek minőségére és mennyiségére.

3.5. A részeredmények összefoglalása

Kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy a *P. butanovora* képes anaerob körülmények között a szalicilát és nitrát kometabolizmusára, amelyet különböző nehézfémionok nagymértékben gátoltak. A szalicilát teljes lebontásában közreműködő monooxigenáz és dioxigenáz enzimek nehézfémion érzékenységében kimutatott elétérés felhívja figyelmet arra, hogy egy biodegradációs folyamat monitorozása során figyelemmel kell kísérni a lebontandó

vegyületekből keletkező intermedierek sorsának alakulását is, mivel az intermediereket bontó enzimek sok esetben érzékenyebbek lehetnek a kísérő szennyezésekre.

Kimutattuk, hogy a faj katekol-2,3-dioxigenáz enzimmel rendelkezik, az enzim plazmidon történő kódoltságát azonban nem sikerült bizonyítani.

A szalicilát anaerob módon, nitrát mellett zajló bontása során meghatároztuk az egymást követő monooxigenáz és dioxigenáz enzimreakció nitrátigényét, amelyet NO_3^--N: szalicilát arány értékeként adtunk meg. Ez az arány pl. 1.01 ± 0.06, jó egyezést mutatott az általunk vázolt reakcióút során feltételezett 1:1 aránnyal. A kísérletek során a kemosztát rendszerben kialakult NO_3^--N: szalicilát arány segítségével egy tényleges bioremediációs eljárás során a kezelendő területre kijuttatandó szükséges nitrát mennyisége a szennyező vegyületek minőségének és mennyiségének ismeretében jó közelítéssel megadható. A nitrát nagy mennyiségben, feleslegben történő alkalmazása feltételezhetően nem növelné meg az oxigenáz reakciók sebességét, így magát a lebontást sem, viszont az elfolyó nitrát- és az akkumulálódott nitritionok tovább fokoznák a környezetszennyezés mértékét. Természetesen egy összetett élő rendszerben (talaj mikroflóra) a nitrát nem csak az aromás vegyületek kometabolizmusára fordítódhat, így azonos mennyiségű szennyezőanyag elbontásához szükséges nitrát aránya nagyobb lehet ilyen esetekben, mint a kísérleti rendszerekben. A szükséges nitrát mennyiségének kialakításban jelentő szerepe van továbbá annak is, hogy a kometabolizmus során a baktériumok aktívan szaporodnak vagy stacioner állapotukban viszik végbe a lebontó folyamatokat.

Egy anaerob *in situ* bioremediációs eljárás során a szennyező anyagok ismeretében a meghatározott, azok lebontásához elegendő nitrátmennyiséggel megegyező vagy annál kevesebb nitrát alkalmazását tartjuk célravezetőnek, mivel így nagy valószínűséggel elkerülhető a talajvíz nitrát- és nitrittartalmának további emelése.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az elvégzett kísérletek során a *Pseudomonas butanovora* nitrátmentesítő eljárásokban, illetve a nitrát-kometabolizmusán alapuló anaerob talajremediációs eljárásokban való alkalmazhatóságát vizsgáltuk meg. A környezetvédelmi biotechnológia két egymástól teljesen eltérő területe között a baktérium sajátos anyagcseréje jelentette a kapcsolatot, mivel mindkét esetben a baktérium denitrifikációs képességét használtuk fel, miközben számos új információt nyertünk működésének részleteiről.

A P. butanovora denitrifikációjának vizsgálata során kapott eredmények:

- A batch és reaktor kísérletek eredményei azt bizonyították, hogy a *P. butanovora* a Martienssen és Schöps féle rendszer szerint a C típusú denitrifikálók csoportjába tartozik, vagyis denitrifikációja során nitrit-akkumuláció történik.
- Függetlenül az alkalmazott szerves elektrondonor típusától a nitritredukciót a tápközeg kémhatásának emelkedése kísérte, amely negatív hatással volt a nitrit-reduktáz aktivitására. A nitrit-reduktáz 50%-os aktivitásvesztést szenvedett, amint a tápoldat kémhatása elérte a pH 8.8-as értéket.
- A szukcinát, az etanol és az ecetsav mind hatékony elektrondonornak bizonyultak a baktérium denitrifikációjának szempontjából. Az etanol és az ecetsav mellett kimért denitrifikációs aktivitások minden esetben nagyobbnak bizonyultak, mint a szukcinát mellett mért értékek. A szerves elektrondonorok denitrifikációra fordított mennyiségének kimérése során az egyes szénforrások esetében meghatározott optimális C:N tömegarányok minden esetben jól közelítették a nemzetközi irodalomban közölt értékeket. Az etanol alkalmazása során a meghatározott C:N tömegarányok értelmében egységnyi nitrát teljes redukciójához kevesebb szénforrásra van szükség, mint az ecetsav esetében, továbbá egyszerű kezelhetősége (nincs szükség az influens pH-jának állítására) és a kezelendő oldatban az általa kialakított legkisebb pH változás miatt az etanol használata bizonyulna legkedvezőbbnek egy ipari denitrifikációs technológiában.
- A *P. butanovora* moderált sótűrő baktériumnak bizonyult, és az ioncserélő nitrátmentesítő technológiák során a töltet regenerálásához alkalmazott magas sókoncentrációjú oldatban aktív denitrifikációra volt képes.
- A *P. butanovora* növekedését erőteljesen gátolták a különböző vizsgált nehézfémionok. A baktérium növekedése során a Nieto féle rendszer szerint a Pb^{2+} és Cu^{2+} ionokkal szemben toleranciát mutatott, a denitrifikációja pedig az Pb^{2+} kivételével minden nehézfémion

esetében már alacsonyabb koncentráció-tartományokban gátlást szenvedett, mint amelyek a növekedést még nem befolyásolták.

- A *P. butanovora* minden általunk vizsgált denitrifikáló baktériumnál hatékonyabb denitrifikálónak bizonyult.

A nitrátmentesítés (I) során kapott eredmények:

- A *P. butanovora* mindkét felületi hordozó, a zeolit és az ioncserélő gyanta felszínére kikötődött, azonban az így kialakult biofilm segítségével, annak nagyfokú sérülékenysége miatt, hatékony denitrifikáció nem volt kivitelezhető.
- A baktériumok kompozit gélmátrixba történő immobilizálásával olyan bioaktív töltet volt létrehozható, amelyek különböző reaktor elrendezésekben, különböző működtetési feltételek mellett is magas denitrifikációs aktivitást biztosítottak. A töltet mechanikailag ellenállt az áramlási sebesség hírtelen változásainak (shear stress) és aktivitását nem vesztette el az alkalmazott szénforrásmennyiség csökkentésének, illetve a reaktor belsejében felszaporodott fertőző baktériumok hatásának köszönhetően sem.
- A kompozit gyöngyöket bioaktív töltetként tartalmazó bioreaktorok térfogatának egy nagyságrenddel történő méretnövelését követően kialakult denitrifikációs aktivitások jól közelítették azokat az aktivitásokat, mint amelyek az azt megelőző kisebb reaktorokra jellemzőek voltak.
- A léptéknövelési kísérletek utolsó lépésében egy napi 40-50 liter kapacitással rendelkező pilot méretű denitrifikáló bioreaktor működését teszteltük, amely során elértük, sőt több szempontból meghaladtuk hasonló rendszerek hatékonyságát. A bioreaktor az inffluens magas oxigén-koncetrációjának ellenére, rövid tartózkodási idők mellett is közel 100 %-os nitrátmentesítésre volt képes úgy, hogy az effluens nitrittartalma a működési napok nagy részében az egészségügyi határérték (1 mg l^{-1} NO_2^--N) alattinak bizonyult.

A nitrátmentesítés (II) során kapott eredmények:

- Kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy a *P. butanovora* alkalmas magas só- és nitrát-koncentrációjú oldatok kezelésére. Az ilyen összetételű oldatokban kialakult denitrifikációs aktivitás értéke nagymértékben függött az alkalmazott szerves elektrondonor és nitrátos szennyvízben lévő nátriumsó típusától. Az ecetsav ez esetben jobb szubsztrátnak bizonyult, mint az etanol. Kimutattuk, hogy a $NaHCO_3$ a denitrifikáció

folyamatát a nitritredukció szintjén, magas pH értékek kialakításával, gátolja. Így ezt a nátriumsót egy tényleges technológia során az ioncserés töltetek regenerálására nem ajánljuk, mivel a keletkező szennyvíz biológiai rendszerrel történő kezelhetősége így lényegesen csökken.

- A bioreaktorokban kapott eredmények azt mutatták, hogy az általunk összeállított rendszerrel egy magas só-és nitrát-koncentrációjú oldat kezelése eredményesen megoldható, és egy hasonló technológia folyamatosan üzemeltethető, ahol 8-10 napos tartózkodási idők esetében garantálható a 100%-os denitrifikációs aktivitás. Ipari technológia esetében azonban mindenképpen ajánlott a pH szabályozás megoldása, mivel a reaktorokban minden esetben a denitrifikációt követő pH emelkedés elérte azt az értéket (8.8), ami már a nitrit-reduktáz 50%-os aktivitásvesztését okozza. A kezelendő oldatok kémhatásának kontrollálása és a rendszerek teljesen anaerob módon történő működtetése napokkal rövidítheti le a szennyvíz kezeléséhez szükséges időt.

A bioremediációs kísérletek során elért eredmények:

- A vizsgált denitrifikáló baktériumok közül egyedül a *P. butanovora* volt képes a sejtek szaporodásához a naftalint és a szalicilátot szerves szénforrásként felhasználni.
- Anaerob kísérleti rendszerben bizonyítottuk, hogy a baktérium képes a szalicilát és a nitrát kometabolizmusára, amely reakció során az aromás gyűrűt nyitó oxigenázok működéséhez szükséges oxigén a nitrát redukciója során felszabaduló oxigéngyökök formájában állt rendelkezésre. A kísérletek során meghatároztuk az anaerob körülmények között lejátszódó, egymást követő monooxigenáz, dioxigenáz enzimreakciók nitrátigényét, és az így kapott arány jó egyezést mutatott az általunk feltételezett 1:1-es moláris aránnyal. A meghatározott arány segítségével egy tényleges bioremediációs eljárás során szükségesen alkalmazandó nitrát mennyisége a szennyező vegyületek ismeretében tervezhető, ezáltal elkerülhető az esetlegesen túlzott mennyiségben alkalmazott nitrát által kialakuló addícionális környezetszennyezés.
- A szalicilát teljes lebontásában közreműködő monooxigenáz és dioxigenáz enzimek nehézfémion érzékenységében kimutatott elétérés felhívja figyelmet arra, hogy egy biodegradációs folyamat monitorozása során figyelemmel kell kísérni a lebontandó vegyületekből keletkező intermedierek sorsának alakulását is, mivel az intermediereket bontó enzimek sok esetben érzékenyebbek lehetnek a kísérő szennyezésekre.

A *Pseudomoans butanovora* különböző körülmények között kifejtett magas denitrifikációs aktivitása, moderált sótűrő képessége, egyes fémionokkal szembeni toleranciája, rövid szénláncú szénhidrogének, klórozott szénhidrogének, aromás vegyületek és a nitrát anaerob módon történő kometabolizmusa, valamint az a tény, hogy mind a mai napig a baktérium által okozott humán megbetegedést még nem írtak le, mind elősegíthetik a baktérium további környezetvédelmi biotechnológiai eljárásokban történő alkalmazását.

IRODALOMJEGYZÉK

Æsøy A, Ødegaard H, Bach K, Pujol R, Hamon M. Denitrification in a packed bed biofilm reactor (BIOFOR)-experiments with different carbon sources. *Water Res*. 1998. 32, 1463-1470.

Alisa S, Vagnai, Daniel J, Arp. An inducible 1-butanol dehydrogenase, a quinohaemoprotein, is involved in the oxidation of butane by *Pseudomonas butanovora. Microbiology* 2001. 147:745-756.

Alves C.F, Melo L.F, Vieira M.J. Influence of medium composition on the characteristics of a denitrifying biofilm formed by *Alcaligenes denitrificans* in fluidised bed reactor. 2002. *Process Biochemistry* 37:837-845.

Anquela JM, Rodriguez Ms, Ruiz LJM, Gimero EE, Sanz MM, Almendral LML. Correlacion del riesgo de cancer gastrico en laprovincia de soria con el contenido de nitratos en las aquas de bebida. Rev. Esp. Enf. AP. Digest. 1989. 75:561-65.

Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. 4:1563-1589.

Aravinthan V, Takizawa S, Fujita K, Komatsu K. Factors affecting nitrogen removal from domestic wastewater using immobilized bacteria. 1998. Wat. Sci. Tech. 38:193-202.

Barreiros A.M, Rodrigues C.M.J, Crespo P.S.G, Reis M.A.M. Membran bioreactor for drinking water denitrification. 1988. Bioprocess Eng 18:297-302.

Baumann B, Snozzi M, Zehnder A.J.B, Meer J.R.. Dynamics of denitrification activity of Paracoccus denitrificans in continuos culture during aerobic-anaerobic changes. 1996. Journal of Bacterology 4367-4374.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition 1994.

Bleakley B.H and Tiedje J.M. Nitrous oxide production by organisms other than nitrifiers or denitrifiers. 1982. Appl. Environ. Microbiol. 44:1342-1348.

Boeing G, Schlehofer B, Blettner M, Wahrendorf J. Dietary carcinogens and risk for glioma and meningioma in Germany. Int. J. Cancer. 1993. 53:561-5.

Bontig C.F.C, Schenider S, Schmidtberg G, Fuchs G. Anaerobic degradation of m-cresol via mathyl oxidation to 3-hydroxybenzoate by a denitrifying bacterium. Arch. Microbiol. 1995. 164:63-69.

Bosander J, Westlund L.D. Operation of full-scale fluidized bed for denitrification. 2000 Wat. Sci. Tech. 41:115-121.

Braker G, Zhou J, Wu L, Devol AH, Tiedje JM. Nitrite reductase genes (nirK and nirS) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities. Appl Environ Microbiol 2000 ;66(5):2096-104

Brooks MH, Smith RL, Macalady DL. Inhibition of existing denitrification enzyme activity by chloramphenicol. Appl Environ Microbiol 1992 (5):1746-53

Bulatti E, Palli D, Decarli A, Amadori D, Avellini C, Bianchi S, Bonaguri C, Cipriani F, Cocco P, Giacosa A. A case-control study of gastric cancer and diet in Italy. II. Association with nutrients. Int. J. Cancer. 1990. 45:896-901.

Carrol VV, Miles M.J, Morris V.J. Fibre-diffraction studies on the extracellular polysaccharide from Pseudomonas elodea. 1982. International Journal of Biological Macromolecules 4:432-433.

Carucci A, Kühni M, Brun R, Carucci G, Koch G, Majone M, Siegrist H. Microbial competition for the organic substrates and its impact on EBPR systems under conditions of changing carbon feed. 1999. Water Science and Technology 39(1):75-85.

Cervantes F.J, De la Rosa D. A, Gómez J. Nitrogen removal from wastewater at low C/N ratios with ammonium and acetate as electron donors. 2001. Bioresource Technology 79(2):165-170.

Chakrabarty A. M. Plasmids in Pseudomonads. Ann. Rev. Genet. 1976. 10:7-30.

Chang C C, Tseng Ssz K, Huang H K. Hydrogenotrophic denitrification with immobilized Alceligenes eutrophus for drinking water treatment. Bioresource Technol. 1999. 69:53-58.

Cidaria D, Deidda F, Bosetti T. A rapid method for naphtalene dioxygenase assay in whole cells of naphtalene cis-dihydrodiol dehydrogenase blocked Pseudomonas fluorescens: screening of potential inducers of dioxygenase activity. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1994. 41:689-693.

Connors A.M, Barnsley E.A. Naphtalene plasmids in Pseudomonads. Journal of Bacteriology. 1982. 149:1096-1101.

Cornelus F, Bontig C, Georg F. Anaerobic metabolism of 2-hydroxbenzoic acid (salicylic acid) ba a denitrifying bacterium. Arch. Microbiol. 1996. 165:402-408.

Croll BT, Green LA, Hall T, Whitford CJ, Zabel TF. Biological fluidisied bed denitrification for potable water. Paper presented at the International Conference on Advance in Water Engineering, Birmingham University, 15-19 July 1985.

Ćsřy A, Řdeggard H, Bach K, Pujol R, Hamon M. Denitrification in a packed bed biofilm reactor (BIOFOR)-experiments with different carbon sources. Water Res. 1998. 32:1463-70.

Daniel J, Arp. Butane metabolism by butane-grown Pseudomonas butanovora. Mycrobiology 1999. 145:1173-1180.

Davis JM. Stomach cancer mortality in Workshop and other Nottinghamshire mining towns. Br. J. Cancer. 1980.41:438-45.

Dennis Hernandez, John I. Rowe. Oxygen regulation of nitrate uptake in denitrifying Pseudomonas aerugionsa. Appl. Env. Microbiol. 1987.745-750.

Dimotsis G.L, McGarvey F.X. A comparison of a selective resin with a convetional resin for nitrate removal

Dominique Chéneby, Laurent Philippot, Alain Hartmann, Cahterine Hénault, Jean-Claude Germon. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. FEMS Microbiol. Ecol. 2000. 34: 121-128.

Drtil M, Németh P, Kucman K, Bodik, I Kasparek V. Acidobasic balances in the course of heterotrophic denitrification. 1995. Wat. Res. 29:1353-1360.

Dunn N.W, Gunsalus I.C. Transmissible plasmid coding early enzymes of naphtalene oxidation in Pseudomonas putida Journal of Bacteriology 1973. 114:974-979.

ECETOC (European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre). Nitrate and drinking water. Technical Report nr. 1988. 27. Brussels: ECETOC

EEC-Europan Economic Community 1980. Council directive on the quality of water for human consumption. No. 80/778,Off J EEC 229,11-29

Eisenbrand G, Spiegelhalder B, Preussman R. Analysis of human biological specimens for nitrosamine content. In: Bruce WR, Correa P, Lipkin M, Tannenbaum SR, Wilkins TD, editors, Gastrointestinal cancer: endogenous factor. Banbury Report nr. 7. 1981.:New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

EPA (Environmental Protection Agency). Criteria and Standards Division, Office of Drinking Water. 1990a. Drinking water criteria document on nitrate/nitrite. Washington. DC.

Ensley B, D, Gibson D, T. Naphtalene dioxygenase: purification and properties of a terminal oxygenase component . Journal of Bacteriology 1983. 505-511.

Franzmann P.D, Burton H. R, McMeekin T.A. Halomonas subglaciescola, a new species of halotolerant bacteria isolated from Antarctica. 1987. Int. J. Sys. Bacter. 37:27-34.

Fuchs W, Schatzmayr G, Braun R. Nitrate removal from drinking water using a membrane-fixed biofilm reactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. 199748: 267-274.

Fülöp V, Moir J.W.B, Ferguson S.J, Hajdu J. the anatomy of a bifunctional enzyme: structural basis for reduction of oxygen to water and synthesis of nitric oxide by cytochrome cd1. 1995. Cell. 369-377.

Haag D, Kaupenjohann M. Landscape fate of nitrate fluxes and emissions in Central Europe A critical review of concepts, data, and models for transport and retention. Agriculture Ecosystems & Environment 2001. 1-21.

Hallin S, Lindberg CF, Pell M, Plaza E, Carlsson B. Microbial adaptation, process performance and a suggested control strategy in a pre-denitrifying system with ethanol dosage. Wat. Sci. Tech. 1996..34, 91-99.

Hasselblad S, Hallin S. Intermittent dosage of ethanol in a pre-denitrifying activated sludge process. Wat. Sci. Tech. 1996. 34, 387-389.

Hansson LE, Nyren O, Bergstrom R, Wolk A, Lindgren A, Baron J, Adami HO. Nutrients and gastric cancer risk: a population-based case-control study in Sweden. Int J. Cancer. 1994. 57:638-44.

Hartig E, Zumft WG. Kinetics of nirS expression (cytochrome cd1 nitrite reductase) in Pseudomonas stutzeri during the transition from aerobic respiration to denitrification: evidence for a denitrification-specific nitrate- and nitrite-responsive regulatory system. J Bacteriol 1999 181(1):161-6

Häggblom M.M, Young L.Y. Anaerobic degradation of 3-halobenzoates by a denitrifying bacterium. Arch Microbiol. 1999. 171:230-236.

Heinz Körner, Walter G. Zumft. Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of Pseudomonas stutzeri. Appl. Env. Microbiol. 1989. 1670-1676.

Herrick J.B, Stuart-Keil K.G, Ghiorse W.C, Madsen E. L. Natural horizontal transfer of a naphtalene dioxygenase gene between bacteria native to a coal tar-contaminated field site. Appl. Environ. Microbiol. 1997. 6:2330-2337.

Henze M, Harremoës P, Jansen J, Arvin E. Wastewater treatement. Biological and Chemical. Polyteknisk Forlag, Lyngby, Denmark, 1992 [in Danish]

Hirata A, Meutia A.A. Denitrification of nitrite in a two-phase fluidized bed bioreactor. 1996. Wat. Sci. Tech. 34:339-346.

Hiroyuki Arai, Tohru Kodama, Yasuo Igarashi. Effect of nitrogen oxides on expression of the nir and nor genes for denitrification in Pseudomonas aeruginosa FEMS Microbiology Letters. 1999.170:. 19-24

Hoek J.P, Klapwijk A. The use of a nitrate selective resin in the combined ion exchange/biological denitrification process for nitrate removal from ground water 1988. Wat Supply 57-62.

Gilli G, Corrao G, Favilli S. Concentrations of nitrates in drinking water and incidence of gastric carcinomas: first descriptive study of the Piemonte region, Italy. Sci. Tot. Environ. 1984. 34:35-48.

Gómez M.A, González-Lópeza J, Hontoria-Garciab E. Influence of carbon source on nitrate removal of contaminated groundwater in a denitrifying submerged filter. 2000. Journal of Hazardous Materials 80(1-3):69-80.

González CA, Riboli E, Badosa J, Batiste E, Cardona T, Pita S, Sanz JM, Torrent M, Agudo A. Nutritional factors and gastric cancer in Spain. AM. J. Epid. 1994. 139:466-73.

Goretski T, Hollocher C. Trapping of nitric oxide produced during denitrification by extracellular hemoglobin. 1988. J. Biol. Chem. 263:2316-2323.

Gouw M, Bozic R, Koopman B, Svoronos SA. Effect of nitrate exposure history on the oxygen/nitrate diauxic growth of Pseudomonas denitrificans. Water Res 2001. 35(11):2794-8

Gross H, Treutler K. Biological denitrification process with hydrogen-oxidizing bacteria for drinking water treatment. 1986. Aqua 5:288-290.

Jones GM.. Food Safety. St. Paul: Eagan Press. 1992. Food additives.

Jong-Ok Ka, John Urbance, Rick W. Ye, Tae-Young Ahn, James M. Tiedje. Diversity of oxygen and N-oxide regulation of nitrite reductases in denitrifying bacteria, FEMS Microbiology Letters. 1997. 156:55-60

Juhasz L, Hill MJ, Nagy G. Possible relationship between nitrate in drinking water and incidence of stomach cancer. International Agency for Research on Cancer Publication nr. 31. 1980. Lyon. France: International Agency for Research on Cancer.

Katie L. Thomas, David Lloyd, Lynne Boddy. Effects of oxygen, pH and nitrate concentration on denitirification by Pseudomonas species. FEMS Microbiology Letters 1994. 181-186.

Kesserű P, Kiss I, Bihari Z, Polyák B. The effects of NaCl and some heavy metals on the denitrification activity of Ochrobactrum anthropi. 2002. J. Basic Microbiol. 42:270-278.

Kesserű P, Kiss I, Bihari Z, Polyák B. Investigation of the denitrification activity of immobilized Pseudomonas butanovora cells in the presence of different organic substrates. Water Res. 2002. 36, 1565-1571.

Kesserű P, Kiss I, Bihari Z, Polyák B. Biological denitrification in a continuos-flow pilot bioreactor contaning immobilized Pseudomonas butanovora cells. Bioresource. Technol.

Kiss I, Szekeres Sz, Bejerano TT, Soares MIM. Hydrogen-dependent denitrification: preliminary assessment of two bio-electrochemical systems. Water Sci. Technol. 2000. 42:373-379.

Knowles Rg, Palacios M, Palmer RJM, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. Proc. Natl. Acad. Sci. 1989. 86:5159-62.

Kluyver A.J. and Donker H.J.L. Die Einheit der Biochemie. 1926. Chem. Zelle. Gewebe 13:134-190.

Koike I, Hattori A. Growth yield of a denitrifying bacterium, Pseudomonas denitrificans, under aerobic and denitrifying conditions. J Gen Microbiol 1975 88(1):1-10

Koike I, Hattori A. Energy yield of denitrification: an estimate from growth yield in continuous cultures of Pseudomonas denitrificans under nitrate-, nitrite- and oxide-limited conditions. J Gen Microbiol 1975 88(1):11-9

Kornaros M, Lyberatos G. Kinetic modelling of Pseudomonas denitirifcans growth and denitrification aerobic, anoxic and transient operating conditions. Water Res.1998. 32:1912-1922.

Kovács K, Polyák B. Hydrogenase reactions and utilisation of hydrogen in biogas production and microbiological denitrification systems. Proceedings of the Fourth IGT Symposium, Colorado Springs. 1991. P. 1-16. [Chapter 5].

Körner H. Zumft W.G. Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of Pseudomonas stutzeri. 1989. Appl Env. Microbiol. 1670-1676.

Kuhn E.P, Zeyer J, Eicher P, Shwarzenbach R. P. Anaerobic degradation of alkylated benzenes in denitrifying laboratory aquifer columns. Appl. Env. Microbiol. 1988. 490-496.

Kushner D.J, The Halobacteriacea. 1985. 171-214. In C.R. Woese and R.S. Wolfe (ed.), The bacteria, vol. 8. Academic Press, Inc. (London), Ltd., London.

Lauch R.P. and Guter G.A. Ion exchange for the removal of nitrate form well water . J. Am. Water Works Assoc. 1986.78:83-88.

Lee D, Lee I, Choi Y, Bae J. Effects of external carbon source and empty bed contact time on simultaneous heterotrophic and sulfur-utilizing autotrophic denitrification. 2001. Process Biochemistry 36(12):1215-1224.

Lee K.C, Rittman B.E. A novel hollow-fibre membrane biofilm reactor for autohydrogenotropic denitrification of drinking water. 2000. Wat. Sci. Tech. 41:219-226.

Lesley A. Robertson, Tage Dalsgaard, Niels-Peter Revsbech, J. Gip Kuenen. Confirmation of aerobic denitrification in batch cultures, using gas chromatography and 15N mass spectrometry. FEMS Microbiology Ecology 1995 18:113-120.

Lowry O.H, Rosebrough N.J, Farr A. L, Randall R. Protein mesaurement with the Folin phenol reagent. 1951. J. Biol. Chem. 193:265-275.

Mansell B.O, Schroeder E.D. Biological denitrification in a continuous flow membrane reactor. 1998. Wat Sci. Tech. 38:9-14.

Martienssen M, Schöps R. Population dynamics of denitrifying bacteria in a model biocommunity. 1998. Wat. Res. 33:639-646.

Martinsen A, Skjak-Braek G. Smidsr∅d O. Alginate as Immobilization Material: I. Correlation Between Chemical and Physical Properities of Alginate Gel Beads. 1989. Biotechnol. Bioeng. 33:79-89.

Mcmahon P.B, Dennehy K.F. N2O emission from nitrogen-enriched river. 1999. Environ. Sci. Technol. 33:21-25.

Mohseni-Bandpi A, Elliot DJ. Groundwater denitrification with alternative carbon sources. Water Sci. Technol. 1998. 38:237-243.

Moir J.W.B, Richardson D.J, Ferguson S.J. The expression of redox proteins of denitrification in Thiosphaera pantotropha grown with oxygen, nitrate, and nitrous oxide as electron acceptors. 1995. Arch. Microbiol. 164:43-49.

Nagadomi H, Hiromitsu T, Takeno K, Watanabe M, Sasaki K. Treatment of aquarium water by denitrifying photosynthetic bacteria using immobilized polyvinil alcohol beads. 1998. J. Bioscience. Bioeng. 87:189-193.

Nakazawa T, Yokota T. Benzoate metabolism in Pseudomonas putida (arvilla) mt-2:demonstration two benzoate pathways. Journal of Bacteriology 1973. 115:262-267.

Natsuko Hamamura, Cynthia Page, Tulley Long, Lewis Semprini, Daniel J. Arp. Chloroform cometabolism by butane-grown CF8, Pseudomonas butanovora, and Mycobacterium vaccae JOB5 and methane-grown Methylosinus trichsporium OB3b. Appl. Env. Microbiol. 1997. 3607-3613.

Natsuko Hamamura, Ryan T. Strofa, Lewis Semprini, Daniel J. Arp. Diversity in butane monooxygenases among butane-grown bacteria. Appl. Env. Microbiol. 1999. 4586-4593.

Neil M.A.O′ Structure of the acidic extracellular gelling polysaccharide produced by Pseudomonas elodea. 1983. Carbohydrate Research 124:123-133.

Nieto J.J, Fernandez-Castillo R, Márquez M.C, Ventosa A, Quesada E, Ruiz-Berraquero F. Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. Appl. Env. Microbiol. 1989. 2385-2390.

Nilson I, Ohlson S, Haggstrom L, Molin N, Mosbach K. Denitrificans of water using immobilized Pseudomonas denitrificans cells Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1980. 10:261-274.

Nuhoglu A, Pekdemir T, Yildiz E, Keskinler B, Akay G. Drinking water denitrification by a membrane bio-reactor. 2002. Wat. Res. 36:1155-1166.

Norio Hasegawa, Hiroyuki Arai, Yasuo Igarashi. Two c-Type Cytochromes, NirM and NirC, Encoded in the nir Gene Cluster of Pseudomonas aeruginosa Act as Electron Donors for Nitrite Reductase, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. 5:1223-1230

Nozaki M, Kagamiyama H, Hayasi O. 1963. Biochem. Z. 338, 582

NRC (National Research Council). The health effects of nitrate, nitrite, and N-nitroso compounds. 1981. Washington, Dc. National Academy Press.

Page G.W. Contaminated sites and cleanup. Academic Press 525 B Street, Suit 1900, San Diego, California 92101-4495, USA; http://www.apnet.com

Parke D. Supraoperonic clustering of pca genes for catabolism of the phenolic compound protochatechuate in Agrobacterium tumefaciens. 1995. Journal of Bacteriology 177: 3808-3817.

Rademacher J.J, Young TB, Kanarek MS. Gastric cancer mortality and nitrate levels in Wisconsin drinking water. Arch Environ Health 1992. 47:292-4.

Radcliffe BC, Nicholas DJ. Some properties of a nitrate reductase from Pseudomonas denitrificans. Biochim Biophys Acta 1970;205 (2):273-87

Radcliffe BC, Nicholas DJ. Some properties of a nitrite reductase from Pseudomonas denitrificans. Biochim Biophys Acta 1968153 (3):545-54

Robertson L.A, Kuenen J.G. Aerobic denitrification: controversy revived . 1984. Arch.Microbiol. 139:351-354.

Rodric H, Stevens W, Kamin H. Studies of a falvoprotein, salicylate hydroxilase. Preparation, properties, and the uncoupling of oxygen reduction from hydroxylation. The Journal of Biological Chemistry Vvol. 247, NO.8, 1972, Issue of April 25, pp. 2358-2370.

Rusten B, Hem L.J, Ødegaard H. Nitrogen removal from dilute wastewater in cold climate using moving-bed biofilm reactors. 1995 Wat. Env.Res. 67:65-74.

Samanta SK, Chakraborti A.K, Jain R.K. Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphtol. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. 53:98-107.

Santos VA, Bruijse M, Tramper J, Wijffels RH. The magic-bead concept: an integrated approach to nitrogen removal with co-immobilized microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1996. 45:447-453.

Santos VA, Tramper J, Wijffels RH. Simultaneous nitrification and denitrification using immobilized microorganisms. Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol 1993;21(3):317-22

Shanmugasundram R, Lee CM, Sublette KL. Reduction of nitric oxide by denitrifying bacteria. Appl Biochem Biotechnol 1993 39-40:727-37

Shoun H, Kim D.H, Uchiyama H, Sugiyama J. Denitrification by fungi 1992. FEMS Microbiol. Lett. 94:277-281.

Smith Rp, Wilcox De. Toxicology of selected nitric oxide donating xenobiotics, with particular reference to azide. Crit. Rev. Toxicol. 1994. 24:355-77.

Sollman T. A manual of pharmacology and its applications to therapeutics and toxicology. 8th ed. 1957. Philadelphia: W.B.Saunders.

Spiro S, Roberts R:E, Guest J.R: FNR-dependent repression of the ndh gene of Escherichia coli and metal ion requirement for FNR-regulated gene expression. 1989. Mol. Microbiol. 3(5):601-8.

Stephany RW, Schuller PL. Daily dietary intakes of nitrate, nitrite and volatile N-nitrosamines in Netherland during duplicate portion sampling technique. Oncology. 1980.73:203-10.

Stewart V, Berg B.L. Infulence of nar (nitrate rductase) genes on nitrate inhibition of formate-hydrogen lyase and fumarate reductase gene expression in Escerichia coli K-12. 1988. J. Bacteriol. 170(10):4437-44.

Stouthamer A. : Metabolic regulation including anaerobic metabolism in Paracoccus denitirifcans 1990. J. Bionerg. Biomembr. 23:163-185.

Su JJ, Liu BY, Liu CY. Comparison of aerobic denitrification under high oxygen atmosphere by Thiosphaera pantotropha ATCC 35512 and Pseudomonas stutzeri SU2 newly isolated from the activated sludge of a piggery wastewater treatment system. J Appl Microbiol 2001 Mar;90(3):457-62

Takahashi J. Production of intracellular and extracellular protein from n-butane by Pseudomonas butanovora sp. Nov. Adv. Appl. Microbiol. 1980. 26:117-127.

Takahashi J, Ichikawa Y, Sagae H, Komura I, Kanou H and Yamada K. Isolation and identification of n-butane-assimilating bacterium. Agric. Biol. Chem. 1980. 44:1835-1840.

Tatsuno Y, Saeki Y, Nozaki M, Otsuka S, maeda Y. Mössbauer spectra of metapyrocatechase. FEBS Letters 1980. Vol 120 number 1, March

Thomas N. Gamble, Michael R. Betlach, James M. Tiedje. Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. Appl. Env. Microbiol. 1976. 33:926-939.

Trageser M. Unden G. Role of cystein residues and of metal ions in the regulatory function of FNR, the transcriptional regulator of anaerobic respiration in Escherichia coli. Mol. Microbiol. 3(5):596-9.

Vollack KU, Zumft WG. Nitric oxide signaling and transcriptional control of denitrification genes in Pseudomonas stutzeri. J Bacteriol 2001 183(8):2516-26

Walker R. Nitrates, nitrites and N-nitroso compounds: a review of the occurence in food and diet and the toxicological implications. Fd. Add. Contam. 1990. 7:717-68.

Walters Cl, Smith PLR. The effect of water-borne nitrate on salivary nitrate. Fd. Chem. Toxicol. 1981. 19:297-302.

Welander U, Henrysson T, Welander T. Biological nitrogen removal from munipical landfill leachate in a pilot scale suspended carrier biofilm process. 1998. Wat. Res. 32:1564-1570.

Werner M, Kayser R. Denitrification with biogas as external carbon source. 1991. Wat. Sci. Tech. 23:701-708.

Xu G, Song P, Reed PI. The relationship between gastric mucosalchanges and nitrate intake via drinking water in a high-risk population for gastric cancer in Moping County, China. Eur. J. Cancer. Prev. 1992. 1:437-43.

You I.S, Murray R.I, Jollie D, Gunsalus I. C. Purification and characterisation of salicylate hydroxylase from Pseudomonas putida PpG7. Biochem. Biophys. Res. Com. 1990. 169:1049-1054.

Zafiriou O.C, Hanley Q.S, Snyder G. Nitric oxide and nitrous oxide production and cycling during dissimilatory nitrite reduction by Pseudomonas perfectomarina. 1989. J. Biol.Chem. 264:5694-5699.

Zuniga M.C, Durham D. R, Welch R.A. Plasmid- and chromosome-mediated dissimilation of naphtalene and salicylate in Pseudomonas putida PMD-1. Journal of Bacteriology 1981. 147:836-843.

Zumft W.G. Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiology and Molecular Biology Review. 1997. 533-616.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani

szüleimnek, amiért tanulmányaim során mindvégig támogattak és biztattak;

témavezetőmnek, Dr. Kovács Kornélnak, hogy irányította és hasznos tanácsaival elősegítette kutatásaimat;

Dr. Kiss Istvánnak, Bihari Zoltán Ph.D. hallgatónak és Dr. Hatvani Nórának a lelkesítő támogatásért és a kiváló ötletekért;

Tóth Máriának és Gárgyán Anikónak, akiknek a mindennapi segítsége, tanácsai és áldozatos munkája nélkül ez a munka nem készülhetett volna el;

David Durham-nek a publikációk kéziratának angol nyelvi lektorálásáért;

Prof. Pungor Ernőnek és Prof. Biacs Péternek, a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány volt főigazgatóinak, hogy tanulmányaimhoz ösztöndíjat biztosítottak;

Dr. Kálmán Miklósnak és Dr. Polyák Bélának, hogy a kutatásaim elvégzéséhez a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány Biotechnológiai Intézetében, a Biotranszformációs laboratóriumban a körülményeket biztosította, és munkámat szakmailag figyelemmel kísérte;

a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány Biotechnológiai Intézete és a Szegedi Tudományegyetem valamennyi munkatársának, aki munkám sikeréhez bármilyen formában is hozzájárult.

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények

Kesserű P., Kiss I. Bihari Z. Polyák B. Investigation of the denitrification activity of immobilized Pseudomonas butanovora cells in the presence of different organic substrates Water Research 2002. 36: 1565-1571. Impact faktor (2000) 1.285

Kesserű P., Kiss I. Bihari Z. Polyák B. The effects of NaCl and some heavy metals on the denitrification activity of Ochrobactrum anthropi Journal of Basic Microbiology. 2002. 42:268-276. Impact faktor (2000) 0.753

Kesserű P., Kiss I. Bihari Z. Polyák B. Biological denitrification in a continious-flow pilot bioreactor containing immobilized Pseudomonas butanovora cells. Bioresource Technology 2002. Elfogadva Impact faktor (2000) 0.881

Előadások, poszterek

Hansel M., **Kesserű P.,** Tatar-Kis T., Szemes M., Kiss I., Polyak B.: New prospects in aerobic water denitrification. Third International Symposium and Exhibition on Enviromental Contamination in Central and Eastern Europe, Warsaw, Poland 1996.

Tatár-K.T., **Kesserű P**. Mató T., Hansel M., Kiss I., Dr. Polyák B.,: Biológiai nitrátmentesítés alkalmazása az ivóvizek tisztításában Magyar Hidrológiai Társaság XV. Országos Vándorgyűlés Kaposvár 1997. (előadás)

Kesserű P. Ivóvizek nitrátmentesítése. Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány Biotechnológiai Intézet, Szakmai Nap, 1998. Szeged

Perei K., Bodrossy L., Rákhely G., Kovács L. K. Bihari Z., **Kesserű P.,** Kiss I., Polyák B., Bioremedációs eljárások alkalmazása jelentős környezetszennyezést okozó vegyületek eltávolítására ivó- és szennyvizekből, Mezőgazdaság - Környezetvédelem - Biotechnológia 1999 szimpózium, Veszprém 1999.

Kesserű P. Anaerobic biodegradation of aromatic compounds by denitrifying bacteria Hungarian Science Days, Minisymposium on Hungarian, Finnish (Estonian Biotechnology, 2001. Helsinki

Egyéb publikációk és előadások

Tatár-K.T., **Kesserű P.** Mató T., Hansel M., Kiss I., Dr. Polyák B.,: Biológiai nitrátmentesítés alkalmazása az ivóvizek tisztításában Magyar Hidrológiai Társaság XV. Országos Vándorgyűlés Kaposvár Magyar Hidrológiai Társaság XV. Országos Vándorgyűlésének Kiadványa 1997 I Kötet 91-102 oldal

Dr. Polyák B, Perei K., Bihari Z, Eördegh G., Gárgyán A., Hansel M., **Kesserű P.,** Kiss I., Tatár-K. T., Tóth M.: "Sárkány ellen sárkányfű" Technika Műszaki Szemle, XL. évf. 1997. 4, 19-21,

Perei K., Bihari Z., **Kesserű P.**,Dr. Polyák Béla, Dr. Bodrossy L., Dr. Rákhely G., Dr. Kovács K.: A környezetszennyező veszélyes hulladékok biológiai lebontása *Biokémia* XXII.évf. 1998. 3:61-65,

K. Perei, L. Bodrossy, G. Rákhely, Cs. Bagyinka, Z. Bihari, **P. Kesserű,** I. Kiss, P. Polyák, K. L. Kovács: Biodegradation of selected hazardous waste. Proc. COST Action 831 1999.

Kesserű P., Kiss I. Bihari Z. Polyák B. Nitrátionok kettős szerepben, az ártalmas néha hasznos lehet? Technika Műszaki szemle 44. Évfolyam, 9. Szám, 37-39. 2001.

Kiss I., **Kesserű P.,** Fehér B., Bihari Z. és Polyák B. Co-immobilization of symbiotic green algae and Saccharomyces unispora. Symbiosis 2002. 32:247-256. Impact faktor (2000) 0.895

Hatvani N., **Kesserű P.,** Mécs I. Effects o f different inorganic salts and organic nutrient components on the growth of *Lentinula edodes* (Shiitake) mycelium on solid medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (elbírálás alatt)

SUMMARY

The objective of this work was to investigate the application of *Pseudomonas butanovora* cells in nitrate-elimination technologies and in anaerobic bioremedation technology based on the nitrate and aromatic substrate cometabolism of the bacterium. The denitrification ability of the bacterium provided the connection between the two different environmental biotechnological processes and our experiments allowed the detailed characterisation of the denitrification process of the *P. butanovora*.

The results of the P. butanovora denitrification are as follows:

- The nitrite accumulation of the cells in batch and reactor experiments revealed that *P. butanovora* is a group C denitrifying bacteria according to the classification of Martienssen and Schöps.
- The nitrite reduction of the bacterium was followed by the increase of the pH independently from the applied organic electron donor that negatively influenced the nitrite reduction. The ratio of the inhibition of the nitrite reduction in the cell turned 50% as soon as the pH of the medium had attained 8.8.
- Succinic acid, ethanol and acetic acid served as sufficient electron donor for the bacterium denitrification, but the measured denitrification activity was always higher in the presence of ethanol and acetic acid. The determined optimum C:N ratios for the different substrates were in great accordance with the previous results.
- *P. butanovora* proved to be a moderately halophilic bacterium capable of denitrifying under high salt concentration.
- The growth of the *P. butanovora* was seriously inhibited by most of the examined heavy metal ions; the cells tolerated the presence of Pb^{2+} and Cu^{2+} ions up to the tolerance level determined by Nieto et al. The heavy metal ions had severe effects on the denitrification of *P. butanovora*. Complete denitrification at the maximum concentration of the tolerance was achieved in media containing Pb (1 mM).
- *P. butanovora* proved to be a more effective denitrifying bacterium than the other investigated ones.

Results of the nitrate elimination (I) are as follows:

- *P. butanovora* developed biofilm on the surface of both carriers (zeolite and the ion exchange resin) but reactor filled with the carriers had not effective denitrification because of the instability of the biofilm (loss of cells due to the shear stress).
- The bacterium immobilized into composite gel matrix exhibited high denitrification activities independently from the bioreactors set up and the operation parameters. The composite beads showed great mechanical resistance against shear stress and contributed to the amount of concentrated denitrifying biomass available in the reactor despite the high flow rate and the appearance of other strains.
- The increase in the size of the bioreactor did not affect dramatically the denitrification activity, which was close to the activity measured in smaller bioreactor.
- At the end of the scaling up process the function of a pilot scale denitrification bioreactor with loading rate of 40-50 l^{-1} influent day^{-1} was tested. The bioreactor had 100-90% nitrate removal efficiency and the average concentration of the nitrite in the effluent was always near the prescribed level throughout the experiment in spite of the high oxygen concentration and excessive flow rate of the influent.

Results of the nitrate elimination (II) are as follows:

- The denitrification activity of the *P. butanovora* as a moderately halophilic bacterium was dependent on the type of the applied organic electron donor in the presence of high salt concentration. In this systems acetic acid proved to be the best stimulant of the bacterial denitrification. The nitrite reduction of the cells was affected by the applied sodium salt as well. $NaHCO_3$ inhibited the nitrite reduction by increasing pH.
- The results of the bioreactors loaded with media containing nitrate and sodium salt of high concentration showed that the biotreatment of such media can be solved effectively and a similar technology can be run in the long run where 100% nitrate removal efficiency is obtainable during 8-10 day retention time.

Results of the bioremedation experiments are as follows:

- In an anaerobic chemostat system we showed that the *P. butanovora* was able to utilise a simple aromatic substrate, salicylic acid as a growth substrate, and reduce nitrate simultaneously. Under the anaerobic circumstances the oxygen necessary for the enzymatic ring cleavage originated from the nitrate ions. During the experiments we determined the nitrate requirement of a consecutive monooxygenase and dioxygenase enzyme reaction and it was in great accordance with the amount of the theoretical ratio of 1:1. This ratio allowing the enumeration of the amount of the nitrate ions will be applied during an in situ bioremedation process; being aware of the type and the concentration of the contaminants the additional environmental contamination can be avoided by the usage of nitrate ion in excess.

The application of the *Pseudomonas butanovora* in further environmental biotechnology processes is promoted by its high denitrification capacity, degradation ability of short chain hydrocarbons, chlorinated aromatic compounds, aromatic compounds under anaerobic circumstance, tolerance of some heavy metal ions and being moderately halophilic bacterium.