

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

KÖRNYEZETTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

KÖRNYEZETI BIOKÉMIA ÉS BIOTECHNOLÓGIA PROGRAM

**A *PSEUDOMONAS BUTANOVORA* BIOTECHNOLÓGIAI
ALKALMAZÁSAINAK VIZSGÁLATA**

KÉSZÍTETTE:

KESSERŰ PÉTER

TÉMAVEZETŐ:

Dr. KOVÁCS KORNÉL

BAY ZOLTÁN ALKALMAZOTT KUTATÁSI ALAPÍTVÁNY

BIOTECHNOLÓGIAI INTÉZETE

SZEGED, 2002.

- **BEVEZETÉSA** huszonegyedik század elejére remélhetően felismerjük, hogy egyik legfőbb feladatunk környezetünk megfelelő állapotban történő megőrzése, megfontolt művelése, mivel csak így biztosíthatjuk az elkövetkező generációk számára is az élet alapvető feltételeit. Az elmúlt évszázad során az átgondolatlan, csak a termelés fokozására koncentráló mezőgazdasági és ipari tevékenységnek köszönhetően a talajok és talajvizek szennyezettsége évről-évre nőtt. Így többek között a nitrát vagy a policiklusos aromás anyagok környezetünkben kimérhető koncentrációja sok esetben többszörösen meghaladja a még elfogadható egészségügyi határértékeket. A talajvizek nitrát-szennyezettségének köszönhetően Magyarországon a mai napig több kisebb településen tiltott a fűrt kutak vizét ivásra használni, sőt sok esetben a kinyert víz még öntözésre is alkalmatlan. A túlzott mennyiségű nitrát az emberi szervezetbe kerülve anemiás tüneteket idéz elő, amely csecsemők esetében halálos kimenetelű methemoglobinaemiát is okozhat. A policiklikus aromás anyagok szintén súlyos egészségkárosító hatással bírnak minden élő szervezet esetében. Elsősorban különböző rákos folyamatok indukciójáért tehetők felelőssé. A szennyezett talajvíz, talajok kezelése, a szennyezőanyag eltávolítása költséges és időigényes feladat. Az környezeti károk felszámolására számos kémiai és fizikai módszer született, amelyek nagy hatásfokuk ellenére azonban többnyire nem jelentenek tökéletes megoldást, mivel csak a szennyezőanyag kivonását, raktározását és nem végleges eliminációját végzik el. A környezetvédelmi biotechnológia a baktériumok sajátos tulajdonságait felhasználva, miszerint különböző környezetre ártalmas vegyületek a baktériumok számára energiaforrásként vagy szénforrásként szerepelhetnek, valóban hatékony eljárások kidolgozását tette lehetővé. Denitrifikáló baktériumok alkalmazásával elérhető a talajvíz továbbá a nitrátionokat nagy koncentrációban tartalmazó szennyvíz nitráttartalmának csökkentése úgy, hogy a rendszerből inert nitrogéngáz lép ki. Az aromás anyagokkal

szennyezett területek kezelésére kidolgozott remediációs technológiák legolcsóbb és egyik leghatékonyabb módját jelentik az ún. biodegradációs eljárások, amelyek esetében baktériumok segítségével távolítják el az aromás anyagokat. A biodegradáció hatékonysága azonban nagyban függ kémiai és biológiai paramétereiktől. Egészen az utóbbi évekig a szennyezett területek oxigén ellátottsága jelentette a legfontosabb kritériumot, ugyanis a baktériumok az ún. oxigenáz enzimeik segítségével képesek csak bontani, majd tápanyagként hasznosítani az aromás vegyületeket. Az elmúlt években azonban fény derült arra, hogy anaerob körülmények között is biztosítható az oxigenáz enzimek működése. Mindezek háttérében az áll, hogy egyes denitrifikáló baktériumok a nitrát redukcióból részlegesen felszabaduló oxigént hasznosítani tudják oxigenáz enzimeik működtetéséhez, ezáltal anaerob módon nitrát mellett aromás anyagok bontását is véghez tudják vinni. A környezetvédelmi biotechnológia alkalmazásának lehetőségei nagymértékben függ a technológiai eljárásokban felhasznált biokatalizátorok, baktériumok jellemzőitől. Így az újabb és újabb baktériumok különböző remediációs eljárásokban történő felhasználhatóságának, valamint sajátos tulajdonságainak vizsgálata során szerzett információk mind hozzájárulhatnak a környezetvédelem ezen ágának további fejlődéséhez.

CÉLKITŰZÉSCélunk a *Pseudomonas butanovora* nevű baktérium víztisztítási és talajremediációs eljárásokban történő alkalmazhatóságának komplex vizsgálata volt.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 (a talajvíz nitrát- és nitrittartalmának emelése).

MÓDSZEREK

A *P. butanovora* denitrifikációs aktivitásának vizsgálatához a sejteket kompozit gélmátrix belsejébe immobilizáltuk és az így létrehozott bioaktív töltettel reaktor kísérleteket végeztünk. A bioreaktorok effluenseinek jellemzőit klasszikus mikrobiológiai módszerek, HPLC és fotometriás mérések segítségével határoztuk meg.

A baktérium anaerob körülmények között zajló nitrát redukcióját és az azt követő aromás vegyület degradációját New Brunswick fermentorokban, mint kemosztát rendszerekben vizsgáltuk. A kapcsolt anyagcsereút vizsgálata során lebontandó aromás szubsztrátnak a szalicilátot választottuk. A szalicilát számos bonyolultabb, kettő vagy három gyűrűből álló aromás vegyület lebontási intermediere.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Az elvégzett kísérletek során a *P. 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 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 *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 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 hirtelen változásainak (shear stress) és aktivitását nem veszítette 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 influens magas oxigén-koncentrációjának 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 ($1 \text{ mg l}^{-1} \text{ NO}_2^{-}\text{-N}$) alattinak bizonyult.
- A *P. butanovora* moderált sótűrő baktériumnak bizonyult, és az ioncserélő nitrátmentesítő technológiák során a töltet regenerálásához alkalmazott magas sókoncentrációjú oldatban aktív denitrifikációra volt képes. Az ilyen összetételű oldatokban kialakult denitrifikációs aktivitás értéke nagymértékben függött az alkalmazott szerves elektrondonor és nitrátos szennyvízben lévő nátriumsó típusától. Kimutattuk, hogy a NaHCO_3 a denitrifikáció folyamatát a nitritredukció szintjén, magas pH értékek kialakításával, gátolja.

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.

- 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 enzimek reakciók 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 szükséges alkalmazandó nitrát mennyisége a szennyező vegyületek ismeretében tervezhető, ezáltal elkerülhető az esetlegesen túlzott mennyiségben alkalmazott nitrát által kialakuló addicionális környezetszennyezés.
- A szalicilát teljes lebontásában közreműködő monooxigenáz és dioxigenáz enzimek nehézfémion érzékenységében kimutatott eltérés 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.

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 continuous-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., Kiss I. Bakteriális Vízisztító rendszerek, Mesterséges szimbiózisok Budapesti BEST Bizottság, Budapesti Műszaki Egyetem Nemzetközi Tanfolyama 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 of 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)

Impakt faktorok (2000) összege: 3.814

TÁRSSZERZŐI NYILATKOZAT

Alulírottak elismerjük, hogy Kesserű Péternek az alábbi közlemény eredményienek elérésében meghatározó fontosságú szerepe volt, így a közlemény anyagát Ph.D. értekezésében felhasználhatja. Egyben nyilatkozunk, hogy tudományos fokozat megszerzéséhez az alábbi cikk anyagát nem használtuk fel, és a jövőben sem fogjuk felhasználni.

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.

.....
Kiss István

.....
Bihari Zoltán

.....
Polyák Béla

Szeged, 2002. október 10.

TÁRSSZERZŐI NYILATKOZAT

Alulírottak elismerjük, hogy Kesserű Péternek az alábbi közlemény eredményienek elérésében meghatározó fontosságú szerepe volt, így a közlemény anyagát Ph.D. értekezésében felhasználhatja. Egyben nyilatkozunk, hogy tudományos fokozat megszerzéséhez az alábbi cikk anyagát nem használtuk fel, és a jövőben sem fogjuk felhasználni.

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) Vol. 42, No.

.....
Kiss István

.....
Bihari Zoltán

.....
Polyák Béla

Szeged, 2002. október 10.

TÁRSSZERZŐI NYILATKOZAT

Alulírottak elismerjük, hogy Kesserű Péternek az alábbi közlemény eredményienek elérésében meghatározó fontosságú szerepe volt, így a közlemény anyagát Ph.D. értekezésében felhasználhatja. Egyben nyilatkozunk, hogy tudományos fokozat megszerzéséhez az alábbi cikk anyagát nem használtuk fel, és a jövőben sem fogjuk felhasználni.

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

.....
Kiss István

.....
Bihari Zoltán

.....
Polyák Béla

Szeged, 2002. október 10.