

B 3733

A SZULFANILSAV BIOLÓGIAI LEBONTÁSA

Doktori disszertáció

Készítette:

Perei Katalin

**MTA Szegedi Biológiai Központ
Biofizikai Intézet**

1999



BEVEZETÉS

Az elmúlt évtizedekben a növekvő gazdasági aktivitásnak köszönhetően egyre nagyobb mennyiségű szennyező anyag került ki a természetbe, melyek nagymértékben károsíthatják az élővilágot.

Jelenleg több, mint öt millió vegyi anyagot írtak le, több ezer van kereskedelmi forgalomban. Az ipar egyre nagyobb mértékben használ olyan szintetikus vegyszereket, melyek a környezetben élő szervezetek számára ismeretlenek, így lebontásukhoz nincs meg a természetes háttér. A problémát fokozza, hogy a hulladékok általában nem csak egy, hanem számos szennyező anyagot, és azok bomlástermékeit is tartalmazzák. Ezek felhalmozódása egy-egy területen döntően befolyásolhatja a kialakult mikro- és makroflórát.

A szerves molekulák átalakítása, illetve teljes lebontása a természetes vizekben és a talajban leggyakrabban mikrobiális aktivitás eredménye. Általában az egyedi fajok a kialakult mikrobiális ökoszisztémában nem képesek az egyes szennyező anyagokat bontani, hanem egymás mellett élve, kölcsönösen együttműködve maradnak fenn a toxikus/előnytelen környezetben. Ilyen kooperatív együttlét során már képesek lehetnek a kiindulási és képződött anyagokat be tudják építeni a saját anyagcsere folyamataikba. Ezt felismerve a bioremediációs eljárásokban a fejlesztő laboratóriumok többségében olyan irányított kultúrákat alkalmaznak, melyekben különböző sejtek tiszta kultúráit keverik össze, vagy hosszabb adaptációs folyamat eredményeként nyert egyedi kultúrákat használnak a lebontó hatékonyság növelése érdekében.

A veszélyes szerves vegyületek lebontását főleg aerob mikroorganizmusok végzik, melyek a szerves vegyületek oxidatív lebontásakor felszabaduló energiát saját fenntartásukra, szaporodásukra használják fel. A folyamat során nagyrészt ártalmatlan szerves termékek (pl. szén-dioxid, víz), és szerves anyagok (pl. biomassa) képződnek.

A szulfonált aromás vegyületek egyik tipikus képviselője a szulfanilsav fontos intermediér az azofestékek, növényvédőszer és gyógyszerek gyártásában. Számos baktericid szulfonamid gyógyszer kiindulási vegyülete, és ezek hatása azon alapszik, hogy gátolni képesek a prokarióta nukleotid bioszintézist. Xenobiotikus szulfoncsoportja és erős negatív töltése miatt azonban sok baktérium sejtfalán nem vagy alig tud átmenni.

Bár a szulfon-csoportot hordozó aromás vegyületek általában mikrobiális módszerekkel nehezen bonthatóak, több baktérium törzset is sikeresen használtak ilyen típusú toxikus anyagok semlegesítésére.

A bioreaktorokban a fermentáció során a sejtek kontrollálatlan kijutását a természetbe célszerű megakadályozni. Egy viszonylag újkeletű és egyre elterjedtebb módszer a sejtek rögzítése, hordozóba zárása. Számos olyan eljárás ismeretes, amelyben az immobilizált mikroorganizmusok jó hatékonysággal alakítják át a szerves vegyületeket megfelelő szellőztetés mellett anélkül, hogy a sejtek a környezetben elszaporodnának. Kis térbe zárva nagy aktív biomassza koncentráció állítható elő. Az immobilizálás további komoly előnye, hogy a sejtek a mátrixban közel kerülnek egymáshoz, ami lehetővé teszi a sejtek közötti közvetlen anyagcsere forgalmat, mely döntően befolyásolhatja a lebontó folyamat sebességét.

CÉLKITÚZÉS

A balatonfüzfői Nitrokémia RT gyártási folyamatainak melléktermékeként viszonylag nagy mennyiségű szulfanilsav keletkezik. Ennek a vegyületnek a hatástalanítására kívántunk a gyárral közösen egy biotechnológiai módszert kidolgozni.

A dolgozatban ismeretjük

- olyan mikroorganizmus izolálását, jellemzését, amely nagy hatékonysággal képes a szulfanilsavat bontani, ártalmatlanná alakítani,
- a biodegradációs folyamat optimalizálását mind laboratóriumi mind ipari szinten,
- a rendszer hatékony működtetését immobilizált sejtekkel, laboratóriumi léptékben,
- azokat a biokémiai vizsgálatokat, amelyek a lebontási útvonal pontosabb felderítését célozzák.

EREDMÉNYEK

- Izoláltunk egy baktérium törzset, mely egyedül képes volt a szulfanilsavat, mint kizárólagos szén, nitrogén és kénforrást hasznosítani. A lebontó folyamat során káros melléktermékek nem keletkeztek.
- Izolátumunkat az API 20 NE rendszer alapján *Pseudomonas paucimobilis*-ként azonosítottuk. E baktérium jól ismert más biológiai lebontó folyamatokkal foglalkozó kutatók körében.
- Optimalizáltuk laboratóriumi körülmények között a baktérium szulfanilsav bontását. Megvizsgáltuk egyes sók, ionok a sejtek lebontó aktivitására gyakorolt hatását. Megállapítottuk, hogy a tápoldat foszfáttartalma jelentősen javítja a konverziót, de nem haladhatja meg a 10 mM koncentrációt. Kimutattuk, hogy Ca^{2+} , és Mg^{2+} ionok elengedhetetlenek a sejtek számára.
- A szulfanilsav konverziója pH függésének vizsgálata kapcsán megállapítottuk, hogy az izolált sejtvonal csak meglehetősen szűk, pH=6,5-7,0 tartományban volt aktív, és pH=5,0 alatt és pH=7,5 fölött az adott környezetben egyáltalán nem szaporodott. Az sejtek növesztése során jelentős pH változást tapasztaltunk, mely a sejtek aktivitására is visszahatott. A lehetséges lebontó út lépéseit összevetve a pH optimalizálás során kapott eredményekkel, felvetettük annak a lehetőségét, hogy egy kezdeti NH_4 képződés okozza a pH emelkedést, majd a szulfon csoport lehasadása, valamint CO_2 felszabadulása miatt indul meg a tápoldat pH-jának csökkenése.
- Kimutattuk, hogy a szulfanilsav bontáshoz vas ionok jelenléte szükséges. Izolátumunk már 0,05 mM Fe^{2+} jelenléte esetén is jó hatékonysággal bontotta a szulfanilsavat, míg vas hiányában jelentősen romlott az aktivitás, a szennyvizes kísérletekben pedig egyáltalán nem volt kimutatható a szulfanilsav bontása.
- Kimutattuk, hogy a *P. paucimobilis* hatékonyan metabolizálja a szulfanilsavat széles koncentráció tartományban. 5-20 mM szubsztrát koncentráció esetén 2-3 nap alatt

100%-os konverziót tudtunk elérni, míg 20 mM fölötti koncentrációk esetén a folyamat hosszabb időt vett igénybe (5-10 nap), és a lebontás hatékonysága még kielégítő volt, bár nem érte el a 100%-ot feltehetően a tápoldat savanyodása következtében. Érdekes módon a sejtkultúra még extrém magas, több, mint 100 mM szulfanilsavat is képes volt tolerálni, és egy nyugvó fázis után elkezdte metabolizálni a szubsztrátot. A *P. paucimobilis* e rendkívüli képessége miatt potenciálisan alkalmas lehet a erőteljesen szennyezett környezet ártalmatlanítására is.

- Bizonyítottuk, hogy a *P. paucimobilis* ipari körülmények között is alkalmas szulfanilsav eltávolítására. Szennyvíz oldatban, melyet peptonnal és vas(II)-ionokkal kiegészítettünk a sejtek öt nap alatt a szubsztrát 30%-át metabolizálták. A lebontás sebessége időben emelkedő tendenciát mutatott, és egy hónap után a szulfanilsav 67%-a elfogyott a szennyvízből. Ez az eredmény jónak mondható, mindazonáltal a paraméterek további optimalizálásával valószínűleg tovább javítható.
- A sejtek szubsztrát specificitásának vizsgálata során bemutattuk, hogy a *P. paucimobilis* jó hatékonysággal képes bontani a szulfanilsav mellett a protokatekolt (PC), a p-amino-benzoésavat (PABA), némileg gyengébben a metanilsavat, míg anilin, o-diklórbenzol, trinitro-benzolszulfonsav, szulfoszalicilsav és naftalin-diszulfonsav szubsztrátokon egyáltalán nem volt sejtnövekedés.
- Enzimatis mérések segítségével alátámasztottuk, hogy a kizárólag szulfanilsavon felnőtt sejtekben olyan enzimaktivitás indukálódik, amely az aromás gyűrű oxidatív módon felnyitja. A kísérletekben protokatekolt, mint potenciális intermediert használtunk, és spektrofotometriás méréssel kimutattuk, hogy a szulfanilsav tartalmú táptalajon felnövesztett sejtekben olyan enzim indukálódik, mely a protokatekolt képes oxidálni. Hasonló, bár némileg gyengébb aktivitást tudtunk kimutatni olyan sejtek extraktumában is, amelyek protokatekolon, mint egyedüli szénforráson nőttek fel. A komplex táptalajon tenyésztett sejtek esetén ilyen aktivitás egyáltalán nem volt detektálható. A lebontó enzimszisztémát tehát a sejt környezetében megjelenő toxikus anyag indukálja.

- Kimutattuk, hogy a különböző szerves szubsztrátok alternatív lebontási útvonalakat indukálhatnak. A különböző szubsztrátokon nőtt sejtek fehérjéinek összetételét SDS-gélelektroforézis módszerrel megvizsgálva rávilágítottunk, hogy a *P. paucimobilis* sejtekben a különböző szubsztrátok hatására eltérő molekulatömegű enzimek indukálódnak. A szulfanilsavon nőtt sejtek összfehérje összetétele nagyon hasonlít a PABA-n nőtt sejtek fehérje mintázatához. Egy 39 kDa molekulatömegű fehérje azonban csak a szulfanilsavas mintákban jelenik meg, ezért valószínű, hogy ennek az enzimnek a szulfoncsoporttal kapcsolatos reakció(k)ban van szerepe. A protokatekolon nőtt sejtek fehérje mintázata határozottan eltér ezektől, és némi eltéréstől eltekintve inkább a komplex tápoldaton nőtt sejtek fehérje összetételének felel meg. Ezekből a kísérletekből és az aktivitásmérésekből azt a következtetést vontuk le, hogy a *P. paucimobilis* több, alternatív lebontási útvonallal rendelkezik, amelyekben a különböző mono- és/vagy dioxigenázok kulcsszerepet játszanak. Ezen enzimek tulajdonságai különbözőek, de a szubsztrátspecifitásuk valószínűleg némileg átfedhet.
- Folyamatos üzemű átfolyósos reaktorban alkalmazható, a sejteket zárt térben rögzítő immobilizációs módszert fejlesztettünk ki. Több, különféle immobilizálási technikát próbáltunk ki. Az adszorpción alapuló sejtrögzítési eljárás a sejtek aktivitását nagyon kedvezően befolyásolta, azonban nem tartotta vissza a szaporodó sejteket, így olyan eljárásokban alkalmazható hatékonyan, ahol a sejtek kiszaporodása nem jelent problémát. A legjobbnak az az eljárás bizonyult, melyben a sejteket jól definiált szerkezetű és méretű alginát-gelrite kompozit gélbe zártuk. Az így előállított - sejteket tartalmazó - gyöngyök mechanikai szilárdsága megfelelt az elvárásoknak, belőle a sejtek nem szaporodtak ki, s mindemellett a sejtek megőrizték aktivitásukat. Ez a sejtrögzítési eljárás már jól felhasználható a méretnövelő kísérletekben, átfolyósos reaktorokban mivel a gyöngyök elkészítése egyszerű, a tulajdonságai kielégítik a kívánalmakat, és a bennük immobilizált sejtek hosszabb időn át képesek megőrizni metabolikus aktivitásukat.
- Méretnövelő kísérletekben igazoltuk, hogy a *P. paucimobilis* rendszer ipari méretekben is alkalmazható bioremediációs célra. A Veszprémi Egyetem egy kutató csoportjával kooperációban végzett kísérletek alapján megállapítottuk, hogy

izolatunk kiválóan alkalmazkodott a méretnövelés során némileg megváltoztatott körülményekhez. Egy kaszkád rendszerű immobilizált sejtes bioreaktorban igen jó, 90%-os bontó aktivitást értünk el a gyakorlati felhasználás során igényelt körülmények között.

- Az izolátum és az eljárás az ipari felhasználás tekintetében sok előnyös tulajdonsággal bír, széles körben alkalmazható, ezért szabadalmaztatása folyamatban van.

A DOLGOZATHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

K. Perei, B. Polyák, Cs. Bagyinka, L. Bodrossy, K. L. Kovács, Selected applications of bioremediation in hazardous waste treatment. NATO ASI Series 2. Environment- Vol. 1. "Clean-up of Former Soviet Military Installations" (Eds.: R. C. Herndon, P. I. Richter, J. E. Moerlins, J. M. Kuperberg, I. L. Biczó, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg), pp 87-95 (1995).

Perei K., Polyák B., Kovács L. K., Kiss I., Rákhely G. Eljárás szulfonált aromás vegyületek lebontására. Magyar Szabadalmi Hiv., szabadalmi ügyszám P 98 00077.

Perei K., Bihari Z., Kesserű P., Polyák B., Bodrossy L., Rákhely G., Kovács K.L., A környezetszennyező veszélyes hulladékok biológiai lebontása. Biokémia, (1998) augusztus, 61-65

Perei K.; G. Rákhely, I. Kiss, B. Polyák, K.L. Kovács, Biodegradation of sulfanilic acid by *Pseudomonas paucimobilis*. Biodegradation, (1999) publikálásra elküldve

K. Perei, L. Bodrossy, G. Rákhely, Cs. Bagyinka, Z. Bihari, P. Kesserű, P. Polyák, K. L. Kovács, Biodegradation of selected hazardous waste, in Proc. COST Action 831. (1999) publikálásra elküldve

B. Polyak, Cs. Bagyinka, K. Perei, L. Bodrossy, K. L. Kovacs, Applications of microbial biotechnology in waste bioconversion and decontamination, Proc. 2nd Conference on Environmental Contamination in Central Europe, pp. 101 (1994).

K. L. Kovacs, L. Bodrossy, Cs. Bagyinka, K. Perei, B. Polyak, On the microbiological contribution to practical solutions in bioremediation. OECD documents on Wider Application and Diffusion of Bioremediation Technologies. Amsterdam, The Netherlands. pp.381-390. (1996)

A DOLGOZATHOZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK

Perei K., Polyák B., A szulfanilsav biológiai lebontásának környezeti feltételei. Veszprémi Környezetvédelmi Kiállítás és Konferencia, Veszprém 1993. márc. 2-11.

Perei K., Polyák B., Szennyvizek szennyező komponenseinek lebontása mikroorganizmusok segítségével. I. Környezetbiokémiai Szimpózium, Szeged, 1993. ápr. 5-6.

B. Polyák, Cs. Bagyinka, K. Perei, L. Bodrossy, K. L. Kovács, Applications of microbial biotechnology in waste bioconversion and decontamination. Second International Symposium and Exhibition on Environmental Contamination in Central and Eastern Europe, September 20-23, 1994. Budapest

A DOLGOZATHOZ KÖZVETVE KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

K. L. Kovács, I. Kiss, **K. Perei**, P. Keserű, Zs. Rácz, G. Rákhely, Pál Agócs, and B. Polyák, A Combination of Chemical Removal and Biological Elimination of Nitrate from Drinking Water and Industrial Waste Water. Applied and Environmental Microbiology, publikálás alatt (1999).

K. L. Kovács, Cs. Bagyinka, L. Bodrossy, M. Hansel, I. Kiss, B. Polyák, **K. Perei**, G. Rákhely, Biotechnological exploitation of microbial activity: gas metabolism and waste decontamination. Proc. Regional Symp. on Biotechnology, Szeged, Hungary (in press) 1997

K. L. Kovács, G. Rákhely, L. Bodrossy, B. Polyák, I. Kiss, M. Hansel, **K. Perei**, Cs. Bagyinka, On the significance of microbial gas metabolism in waste degradation. ICER-TEMPUS Publications (ISBN-963 7290 13 13). Baja, Hungary, pp. 1-5. 1997