

KÖRNYEZETVÉDELMI BIOTECHNOLÓGIA II.

Szerző lista:

Bagi Zoltán

Füle Gabriella

Horváth Lenke

Dr. Kesserű Péter

Dr. Kovács L. Kornél

Magony Mónika

Dr. Perei Katalin

Dr. Rákhely Gábor

Szerkesztette:

Dr. Perei Katalin



2006

Fejezetek

I.	KÖRNYEZETI BIOTECHNOLÓGIA	3
	A BIOREMEDIÁCIÓ	6
	SZERVESANYAG CSOPORTOK	8
	MIKROORGANIZMUS CSOPORTOK	9
	MIKROBIÁLIS ENZIMCSALÁDOK	16
II.	XENOBIOTIKUMOK ÉS	
	MIKROBIÁLIS BONTÁSUK	30
	OXIGENÁZOK	38
	PAH-OK	46
	HALOGÉNTARTALMÚ VEGYÜLETEK	69
	BTEX VEGYÜLETEK	98
	NITRO-VEGYÜLETEK	117
	INDOL ÉS KÉNHIDROGÉN	130
III.	KŐOLAJ SZÁRMAZÉKOK	
	BIOREMEDIÁCIÓJA	141
IV.	POLIMEREK	183
V.	KÖRNYEZETI MONITOROZÁS	217
VI.	IMMOBILIZÁLÁS	243
VII.	NITRÁTMENTESÍTÉS	275
VIII.	BIOGÁZTERMELÉS	287

I. Mi az a környezet(védelm)i biotechnológia?

Tartalomjegyzék

I. MI AZ A KÖRNYEZET(VÉDELMI) BIOTECHNOLÓGIA?	3
I.1. MIÉRT VAN SZÜKSÉG A KÖRNYEZETVÉDELEMRE, A KÖRNYEZETI BIOTECHNOLÓGIÁRA?	6
I.2. A BIOREMEDIÁCIÓ	6
I.3. TERMÉSZETBEN (NEM/ELŐFORDULÓ SZERVESANYAGOK – FONTOSABB FUNKCIÓS CSOPORTOK.....	8
I.4. A BIOREMEDIÁCIÓS ELJÁRÁSOKBAN ÉLENTJÁRÓ MIKROORGANIZMUS CSOPORTOK 9	
I.4.1. <i>Pseudomonas</i> fajok jellemzése, jelentősége.....	9
I.4.2. <i>Sphingomonas</i> ok.....	10
I.4.3. <i>Bacillus</i> ok	11
I.4.4. <i>Rhodococcus</i> fajok.....	12
I.4.5. <i>Streptomyces</i> ek	14
I.4.6. <i>Metilotróf - „CI” baktériumok</i>	14
I.4.7. <i>Metanogének</i>	16
I.5. MIKROBIÁLIS ENZIMCSALÁDOK.....	16
I.6. A BIOREMEDIÁCIÓ KÖRÜLMÉNYEI	18
I.6.1. <i>A bioremediáció előnyei, korlátai</i>	21
I.6.2. <i>Mikrobiológiai tényezők</i>	22
I.6.3. <i>Környezeti faktorok hatása a mikroorganizmusokra</i>	26
I.7. IRODALOMJEGYZÉK	29

Bevezető

A környezeti biotechnológia egy új, fejlődő tudományág. Ha boncolgatjuk a szóösszetételt, a környezet szó azt sugallja, hogy a tanulmányok, kísérletek közvetlen a környezetben, vagy környezetből származó mintákkal folynak, illetve a környezetben való alkalmazhatóságra koncentrálnak, valamint olyan kutatások, melyek ki/felhasználják a környezeti információkat más nagyobb dologhoz. A biotechnológia szó két részre bontható, a bio- előtag jelzi, hogy hangsúlyozottan a biológia tudományágon van a hangsúly (tehát nem kémia, vagy fizika), a kutatók/fejlesztők kutatásaikat közvetlenül a környezetből származó élő szervezetekkel végzik. A technológia szó pedig arra utal, hogy ez esetben a biológiai alapkutatások eltolódnak kicsit az alkalmazott vagy technológiai irányba. Ez lehet egy újonnan fejlesztett technológiai eszköz (pl. PCR) vagy információ (pl. genom

szekvencia) alkalmazása a környezetben lejátszódó biológiai folyamatok analíziséhez. Például lehet a környezeti biotechnológia információ befogadó is más tudományágaktól. Másrészt technológiai szempontból olyan hasznosítható biológiai információ nyerhető a környezetből, melyet a környezetben lejátszódó folyamatok megértéséhez fel tudunk használni (pl. szén ciklus, fém transzformáció). Harmadrészt a kézzel fogható biológiai anyagok és a környezetben lejátszódó biológiai folyamatok ismerete is átvihető, használható más tudomány területén is.

A környezetben nehezen bomló vegyszerek mindig nagyon érdekelték a környezeti biotechnológia területén aktív kutatókat. A vegyszer-mikroba kapcsolat a mikrobiális közösségen belül is változást idéz elő, új katabolikus utak alakulnak ki, és eddig ismeretlen fajok megjelennek, érvényesülhetnek. Ezek tesztelése gyakran új környezeti monitorozási technológiákat alapoz meg, és lehetőség nyílik arra, hogy többet megtudjunk a mikroorganizmusok kölcsönhatásairól illetve adaptációjukról a környezeti viszonyokhoz.

A vegyületek különösen nagy kihívást jelentő osztálya a környezetben a nehézfémek. Míg a szervesanyagok szén-, és/vagy energiaforrást szolgáltatva a mikrobák szaporodásához metabolizálódnak, miközben CO₂ keletkezik, addig a nehézfémek csak redukálódnak vagy oxidálódnak. A radioaktív fémeknek különleges környezeti vonatkozásuk van, hiszen kutatások bizonyítják, hogy vannak olyan mikroorganizmusok, melyek képesek ezeket átalakítani. Uránium bányák környékén *Desulfovibrio* és *Geobacter* fajokat azonosítottak, melyek esetében bizonyítható volt a radionuklid transzformáció. Nehézfém transzformációra képes fajok genom szekvenciáját vizsgálták – *Shewanella oneidensis*, *Geobacter sulfurreducens* -, ezek ismeretében megjósolható, mely gének játszanak szerepet a fémredukcióban.

Nagyon sok szervesanyag van, melyet nehéz lebontani. Ennek ellenére (vagy éppen ezért) a mikroorganizmusok folyamatosan fejlődnek és új lebontási utakat találnak, hogy képesek legyenek életterüket kihasználni a környezetben. Kifejlesztik vagy szerzik a képességet, hogy a bontásnak ellenálló vegyületeket átalakítsák, így egyéni/különös elkülönült mikroba szigeteket kapunk, addig amíg képességeiket szét nem szórják a körülöttük élő mikroba közösségben laterális géntranszfer segítségével.

Több mikroorganizmus csoportot ismerünk, melyek a bontásnak ellenálló vegyületek lebontásának mesterei. Pl. a *Rhodococcus* fajok közismert, hogy nagyon sokféle szerves vegyületet képesek lebontani. Larkin és mtsai szerint képességeiket 3 tényező eredményezi: 1. különböző mono-, és dioxigenázokat kódoló gének megléte, 2. a toxikus vegyületekkel szembeni tolerancia, 3. vannak nagy lineáris plazmidjaik. Valószínűleg a *Rhodococcus*-oknak nagy mennyiségben vannak degradatív génjeik, és a talajban széles körben elterjedtek, és nagy lineáris konjugatív katabolikus plazmidjaik vannak, ezen tulajdonságok teszik lehetővé, hogy ez a család gyorsan reagáljon egy új kémiai változásra/kihívásra, és kifejlesszen megfelelő katabolikus utakat, mely által könnyebben jut új potenciális szén-, és energiaforráshoz.

A bakteriális katabolikus utak kialakulásában/fejlődésében a fő tényező a fenti elmélet és megfigyelés szerint a széles gazdaspektrumú konjugatív plazmidok léte/hiánya. Az egyik legismertebb és talán legfontosabb ilyen plazmid az IncP, mely képes számos baktériumba átjutni. Biodegradatív kazettái miatt nagy jelentőségű a metabolikus degradációs utakban és szerzett génjeit képes összekombinálni a meglévőkkel, ezáltal új tulajdonságra tesz szert a hordozó baktérium.

A plazmidok mellett a baktériumok közötti géntaszferben a fágok is szerepet játszanak. (A tengeri vírusok a legelterjedtebb biológiai lények a földön.) A vírusok egészen biztos, hogy lényeges szerepet töltenek be azon baktériumok fejlődésében, melyekben élősködnek. Tény, hogy több megszekvenált (ismert) tengeri fág genomot megtaláltak bakteriális gének között, ami igazolja az előbbi feltevést.

Megjelenik egy biodegradatív funkció, mely az idő során számos különböző baktériumba bejutva képessé teszi azokat a funkcióra, pl. alkánok bontására. A különböző baktériumokban ezek a funkciók átalakulnak, módosulnak, így számos eltérő tulajdonságot mutatva megmarad az alapfunkció sokféle megjelenésben. Pl. Számos enzimet ismerünk, melyek képesek az alkánokat oxidálni: P450 hidroxilázoktól a nem-hem vas-vas hidroxilázokon át a réztartalmú monooxigenázokig. Míg ezen enzimek elsődleges feladata a baktériumokban az alkán metabolizmus megkezdése, komoly az érdeklődés irántuk a kémiai szintézis ipar részéről, mivel ezek az enzimek képesek katalizálni sztereo-, régio- és enantioszelektív reakciókat is.

A környezeti biotechnológia feladata bioszenzorok létrehozása is. A bioszenzorok rendkívül fontos szerepet játszanak bizonyos a környezetben megjelenő szennyezések, toxikus vegyületek korai kimutatásában. Módosított vagy specifikus enzimeket, sőt teljes, genetikailag módosított katabolikus utakat fel lehet e célra használni. Ezeket a genetikailag módosított rendszereket környezeti alkalmazásokban is lehet használni pl. hasznos végtermékek állíthatók elő velük.

1.1. Miért van szükség a környezetvédelemre, a környezeti biotechnológiára?

„A környezet alkotó elemei egymással szoros összefüggésben léteznek, az egyes elemekre ható ártalmak a környezet egészére kihatnak. Ha a fennálló egyensúlyt megbontjuk, beláthatatlan környezetvédelmi problémákkal találhatjuk szembe magunkat.”

A baj akkor kezdődött, amikor az ember többet termelt, mint amennyire szüksége volt, és az iparosodással rohamosan romlott a helyzet

Fejlődő ipar → felhalmozódó hulladék → veszélyes anyagok

Két fő probléma: - hogyan és hova helyezzük

- hogyan távolítsuk el

A Föld mikroflórájának válasza az újonnan megjelenő anyagokra: **adaptáció**

1.2. A bioremediáció

A **remediáció** (latin eredetű szó, gyógyítást jelent) a szennyezőanyagok környezetet károsító hatásának csökkentése, vagy megszüntetése, a szennyezett talaj, víz vagy üledék „meggyógyítása”.

A **remediációs technológiák** közül költségét tekintve legelőnyösebb a bioremediáció. A biotechnológia alkalmazhatóságát a szennyezett terület és a szennyező ismeretében dönthetjük el, kémiai és biológiai vizsgálatok és technológiai kísérletek alapján.

A **bioremediáció** olyan technológiai eljárás, mely biológiai rendszereket használ a környezet megtisztítására a (toxikus) szennyezőanyagoktól.

A bioremediációhoz kapcsolódó alapvető fogalmak:

- **biodegradáció:** szerves anyagok biológiai úton történő elbontása, mely során CO_2 , víz és biomassa keletkezik
- **biotranszformáció:** szerves vegyületek biológiai úton történő átalakítása, mely során a kiindulási vegyülettől minőségileg eltérő vegyület keletkezik
- **biostimuláció:** a „bennszülött” mikroflóra életfeltételeinek javítása azáltal, hogy ásványi anyagokat adunk a környezetükbe. Elsősorban *in situ* eljárásokban alkalmazzák
- **bioaugmentáció:** a célvegyület bontására képes mikroorganizmust nagy mennyiségben juttatják ki a szennyezett területre. Lehet bennszülött faj, de más eredetű (máshonnan származhat) is
- **biológiai hozzáférés:** egy adott vegyületet mennyire tud megtámadni egy mikroorganizmus. Ebben meghatározó paraméterek a vegyület kémiai tulajdonságai, a környezeti feltételek
- **biodegradációs potenciál:** a mikroorganizmus számára mennyire elfogadható, bontható egy vegyület, függ a biológiai hozzáféréstől, és a mikroorganizmus egyedi tulajdonságaitól
- Talajok remediációja *in situ* vagy *ex situ* történhet.

Ex situ talajtisztításnál a szennyezés helyéről eltávolított, kiásott talajt kezeljük prizmákba rakva, vagy reaktorokban, gyakran iszapállagban.

In situ talajtisztítási technológia esetében a kezelendő talajtérfogatot minden irányban nyitott reaktorként kell kezelnünk, s a technológiai paramétereket a talaj belsejében biztosítanunk. Az álló szilárd fázisból adódó gradienseket és a természetes inhomogenitásokat a tervezés során kell figyelembe vennünk.

A bioremediáció **hatékonyságát** számos tényező befolyásolja (későbbiekben bővebben kifejthetjük) - környezeti tényezők

- mikroba populációk

1.3. Természetben (nem)/előforduló szervesanyagok – fontosabb funkciós csoportok

Környezetünkben a kémiai elemek, vegyületek legváltozatosabb formáit megtaláljuk, a legegyszerűbbtől a legbonyolultabb szerkezetig. Több mint 10 millió vegyületet ismerünk

- Alifás, ciklusos, aromás
- Alkohol, aldehid, amin, azo, karboxil, klór, ciano, epoxid, észter, éter, nitro, foszfát, szulfonát, thiol,...
- Heterociklusos vegyületek (N, O, S, kevert)

Környezeti problémát akkor jelentenek, ha nincs, vagy nagyon lassú a természetes lebontási, átalakítási folyamatuk (recalcitrant = lebontásnak ellenálló vegyületek, xenobiotikumok = természetidegen vegyületek). Kutató-laboratóriumokban nagy erőfeszítéseket tesznek a természetidegen vegyületek lebontására, de keveset hallunk azokról a vegyületekről, melyek a természetben előfordulnak, mégsem bontják könnyedén a mikroorganizmusok. Manapság már a xenobiotikum szó jelentését nem azonosítják a nem bontható kifejezéssel, ugyanis számos példa bizonyítja, hogy emberalkotta vegyületek biológiai úton történő lebontása is több esetben (könnyen) megoldható mikrobák segítségével, csak a megfelelő körülményeket kell biztosítani. Mindemellett találunk több olyan természetes úton képződő vegyületet, melynek mikrobiális bontására szinte alig találunk példát, és ezekben az esetekben is lassú, vagy részleges a biodegradáció. Két példát említünk meg, az egyik a klórmétán, mely a természetben kb 5×10^9 kg/év mennyiségben keletkezik, ipari előállításból pedig csak 2×10^7 kg/év. Illetve a ma ismert legtoxikusabbnak tartott vegyület a fluoracetát, melyet legalább 34 növényi faj termel (pl. *Gastrolobium*, *Oxylobium*, ...). Ezek biológiai lebontásáról még igen kevés az információnk.

A fentiek alapján megállapíthatjuk, hogy nem azt kell figyelembe venni, hogy milyen eredetű vegyülettel állunk szembe, hanem sokkal fontosabb információ, ha tudjuk, pl. milyen funkciós csoportokat hordoz a molekula, és az sem mindegy, hogy hány-, és hányféle funkciós csoportot találunk egy molekulán.

A **bioinformatika szerepe** ma már elvitathatlan. Segítségével olyan lehetőségekhez jutunk, mely a kísérletes munkát nagymértékben megkönnyítheti, lerövidítheti: az ismert enzimatis reakciók csoportosítása, hipotetikus lebontási útvonalak felállítása a funkciós csoportok alapján, egy/több mikroba kiválasztása adatbázisokból. Egyik ismert és hasznos internetes honlap a Minnesota Egyetemen keresztül érhető el:

<http://umbbd.ahc.umn.edu/index.html>Welcome to MetaRouter

1.4. A bioremediációs eljárásokban élenjáró mikroorganizmus csoportok

Környezetünkben rendkívül sok és sokféle mikroorganizmus él. Ezek nagyrészt még nem is ismerjük. Az ismertek között akadnak kevésbé jelentős, és/vagy nehezen szaporítható fajok, de találunk számos fajt, mely ipari, biotechnológiai szempontból számunkra nagyon fontos. Ezek közül említünk meg néhányat az alábbiakban.

1.4.1. Pseudomonas fajok jellemzése, jelentősége

- ***Proteobacteria*** – törzs
 - Gammaproteobacteria - osztály
 - *Pseudomonadales* – rend
 - ❖ *Pseudomonadaceae* – család
 - ✓ *Pseudomonas* – nemzettség

Gram negatív, aerob pálcák, kemoorganotrófok. Többségük poláris flagellummal mozog. Pigmentjeik jellegzetesek, ezek alapján is csoportosítják őket: fluoreszcens és nem fluoreszcens pigmentet hordozók (először 1894-ben írták le a fluoreszcens csoport tagjait). Felületaktív anyagokat (rhamnolipidek), fitohormonokat (pl. pioverdin), hidrolitikus enzimeket, oxigenázokat termelnek, melyeknek köszönhetik jelentőségüket a biotechnológiai vizsgálatokban, eljárásokban. Plazmidokat hordoznak, ezek felelősek számos fenotipikus tulajdonságért (pl. antibiotikum rezisztencia, metabolikus utakat katalizáló enzimeket kódoló gének). Aerob mikroorganizmusok, így általában a molekuláris oxigént használják végső elektronakceptorként, de néhány faj képes alternatív e- akceptorként a nitrát (esetleg

szulfát, foszfát) oxigénjét használni oxigénlimitált környezetben. A legdominánsabb csoportja a talajmikroorganizmusoknak. Sok faj közülük képes xenobiotikumok biodegradációjára (több, mint 100 vegyület bontásában leírták szerepüket), sőt egy törzs sokszor képes több különböző vegyületet is, mint szénforrást hasznosítani.

Jellemző képviselőik: *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. cepacia*

P. aeruginosa, *P. mallei* – ember-, állatpatogén

P. syringae – növénypatogén

Plazmidok

Kettős szálú cirkuláris DNS molekulák, nem eszenciálisak. Önálló replikációra képesek, de a gazdaszervet fehérjéire, enzimeire szükségük van. Jellemző méretük 1-200 kb (legkisebb 874 bp - hipertermofil mikroorganizmusból), de ismerünk megaplazmidokat, melyek mérete elérheti az 500-1000 kb-t. Alacsony v. magas kopiaszámban vannak jelen. (vannak konjugatív, és mobilizáló plazmidok, melyek elsősorban a tulajdonságok örökítésében, a plazmidok egyedek közötti vándorlásában/átadásában játszanak szerepet). Az eltérő tulajdonságokat hordozó plazmidok lehetnek egymással kompatibilisek vagy inkompatibilisek, ettől függően, vagy fennmaradnak egymás mellett vagy nem egy mikróban belül.

A biodegradációs utak enzimeit kódoló gének lehetnek kromoszómán, vagy (gyakrabban) plazmidon kódoltak A legismertebb katabolikus plazmidokat a

*Pseudomonas*okban találjuk: TOL (pWWO), NAH, SAL, CAM, ...

Lineáris plazmidok is léteznek, pl. *Streptomyces*ekben

I.4.2. *Sphingomonas*ok

- ***Proteobacteria*** – törzs
 - Alphaproteobacteria - osztály
 - *Sphingomonadales* – rend
 - ❖ *Sphingomonadaceae* – család
 - ✓ *Sphingomonas* – nemzettség

Előfordulnak folyóvizekben, vízvezetékekben, talajban, tengeri üledékekben, rizoszférában, kórházi készülékek felületén, különböző betegségekben szenvedő emberekből izolálhatóak, ill. növényi patogének is akadnak közöttük.

Gram negatív, aerob pálcák, kemoorganotrófok. Többségüknek van egy poláris flagelluma. Nem fluoreszcens, karotinoid pigmentjük a nostoxantin jellegzetes sárga színt ad a sejteknek. Egyedi membrán struktúrájuk van, a Gram negatív baktériumokra jellemző lipopoliszaharidok helyett glikoszfingolipideket tartalmaz (a savas szénhidrát felszín az eukariótákra jellemző), ez fajmeghatározó bélyeg is. (Csak 15-20 éve ismerték fel, hogy a *pseudomonas*októl eltérő tulajdonságokkal bírnak, addig nem is alkottak külön családot.). Exopoliszacharidjuk a gellán, fontos élelmiszer és ipari alapanyag. Viszkózus és rendkívül stabil (pH=2-10-ig terjedő tartományban) polimer, mely 90°C-on olvad csak meg.

Szintén jelentős szerepet játszanak a biodegradációs folyamatokban – xenobiotikumok bontása

Jellemző képviselők: *S. paucimobilis*, *S. capsulata*, *S. elodea*, *S. subarctica*,
S. diminuta, *S. adhesiva*

1.4.3. *Bacillus*ok

- ***Firmicutes*** – törzs
 - Bacilli - osztály
 - *Bacillales* - rend
 - ❖ *Bacillaceae* – család
 - ✓ *Bacillus* – nemzettség

Gram pozitív, aerob (fakultatív anaerob) pálcák igen elterjedtek a környezetben. Hőstabil endospórájuknak köszönhetően az extrém körülményeket is képesek túlélni. Extracelluláris enzimeik miatt ipari jelentőségük nagy, de a bioremediációs eljárásokban is előszeretettel alkalmazzák őket pl. alifás vegyületek, fehérje-, cukor polimerek bontására. Egyik legjelentősebb ipari enzimünk a subtilisin, alkalikus proteáz, melyet a *B. subtilis* termel, és a mosószeripar hasznosítja. A keményítő bontásában jelentős szerepe van az α -amiláznak, melyet többek között a *B. licheniformis* termel. Ez a faj emellett keratináz enzimet is termel, mely a stabil toll, és szőr szerkezetét képes megtámadni. Felületaktív anyagok termelésére képesek egyes fajok. Több képviselőjük termel toxint pl. baktériumok ellen a *B. polymyxa* – a polymyxin B-t *pseudomonas*ok ellen, a *B. thuringiensis* δ -endotoxinja szúnyog lárvák

ellen hatásos. A *Brevibacillus brevis* a gombák ellen hatékony gramicidin S-t termeli. Sajnos vannak közöttük olyan toxinokat termelők, melyek növényekre illetve állatra, emberre mérgező hatású. A *B. cereus* peptid típusú toxinja növényekre, *B. anthracis* antrax toxinja állatra, emberre veszélyes. Érdekes, hogy ezek a vegyületek gyakran több funkciót is ellátnak, egyrészt felületaktív anyagként, másrészt pedig bizonyos szervezetek számára toxikus anyagként is viselkedhetnek.

Az ipar nemcsak a subtilisin termelő fajt használja nagyüzemi szinten. A *B. macerans* glukanotranszferáz enzimének segítségével a keményítőből ciklodextrint lehet előállítani, melyet a gyógyszeripar hasznosít bizonyos vegyületek „csomagolására”, emellett a környezetvédelemben is egyre nagyobb szerepet kap.

Ismertebb képviselői: *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. cereus*

I.4.4. *Rhodococcus* fajok

- ***Actinobacteria*** – törzs
 - *Actinobacteria* - osztály
 - *Actinomycetales* - rend
 - ❖ *Nocardiaceae* – család
 - ✓ *Rhodococcus* – nemzettség

Elterjedtek, megtalálhatók talajban, üledékekben, talajvízben, sőt állatokban, rovarokban is. Gram-pozitív, aerob baktériumok. Nem mozognak. Rövid, elágazó hifákat képeznek, melyek pálca- és gömb formájú elemekre fragmentálódnak. Pigmentáltak. Nagy lineáris plazmidokat találunk e fajokban. Sajátos sejtfallal rendelkeznek, mely mikolátot (hidrofób jelleg) tartalmaz. Felületaktív anyagokat (celluláris, extracelluláris), flokkulánsokat (polipeptid és lipid rész) termelnek. Ezek szerepe a szennyezőanyagok biodegradációjában nagy: 1. a celluláris felületaktívanyagok – mikolsavak- segítik a sejteket a hidrofób fázishoz tapadni két fázisú rendszerekben, 2. a két fázis között csökkentik a határfelületi feszültséget, 3. az extracelluláris felületaktívanyagok diszpergálják a hidrofób komponenseket, így növelve a felszínt a mikrobiális támadás számára. Egyes fajok bioflokkulánsokat termelnek, melyek polipeptid és lipid (főleg mikolát tartalmú glikolipidek) részből állnak, szuszpendát szilárd anyagokat képesek flokkulálni pl. szennyvizekben.

Környezetvédelmi biotechnológiai jelentőségük nagy, részben felületaktív anyagtermelésüknek köszönhetően. A *Rhodococcus* sejtek hidrofób tulajdonsággal bírnak a sejtfalban található mikolsavak alifás láncai következtében, melyek segítségével a sejtek a hidrofób felszínhez tudnak kapcsolódni. E kapcsolat révén képesek a sejtek a hidrofób természetű szennyeződések 'könnyedén' bontani. Olajos szennyeződések komponenseinek bontásáról híresek, azonban ismerünk PCB bontó törzseket is (ebben az esetben is központi szerepet játszik a felületaktív anyag termelés). A kőolaj származékok tartalmazznak kéntartalmú vegyületeket is, melyek elégetése során a levegő szennyeződik, és savas esők formájában jut vissza környezetünkbe. Egyes *Rhodococcus* fajok képesek e vegyületeket úgy átalakítani, kénmentesíteni, hogy a C-S kötést bontják csak meg, miközben bifetil molekulák keletkeznek, melyek nem rontják, sőt javíthatják az üzemanyagok, egyéb finomított kőolaj származékok minőségét.

Ipari hasznosításuk is jelentős, nitriláz enzimük fontos transzformációkat katalizál, pl. akrilamid, nikotinamid (vitamin), izonikotinsav-hidrazid (antimikobakteriális szer) előállításában.

A biotechnológiában nemcsak biodegradatív képességükért, hanem bioszenzorokként is használják őket. Szennyezett területeken előfordulásuk általános, főleg szénhidrogén szennyezések esetén, felületaktív anyagaik révén gyorsan hozzáférnek a célvegyülethez, így a specifikus enzimek termelődése is gyorsan beindul. Ennek köszönhető, hogy bioszenzorként alkalmazzák szennyezések kimutatására azáltal, hogy a specifikus enzimek jelenlétét detektálják. Egy *Rhodococcus* törzsből heroin észteráz enzimet mutattak ki, mely heroin kimutatására alkalmas. Orvosi gyakorlatban is találkozunk velük, a fenilketonuria betegség *Rhodococcus*ok által termelt fenilalanin dehidrogenáz enzim segítségével kimutatható.

Egyes fajok patogének: *R. equi*, a légző rendszert támadja meg.

Jelentősebb/ismertebb fajok: *R. rhodochrous*, *R. erythropolis*, *R. globerulus*, *R. roseus*, *R. ruber*

I.4.5. Streptomycesek

- **Actinobacteria** – törzs
 - Actinobacteria - osztály
 - Actinomycetales - rend
 - ❖ Streptomycetaceae – család
 - ✓ Streptomyces – nemzetség

Gram-pozitív, aerob, kemoorganotróf baktériumok. Gombaszerű hifákat képeznek. Extracelluláris enzimeik, antibiotikus anyagtermelésük következtében figyelték fel ezekre a fajokra. Eddig mintegy 10 000 féle streptomycesekből származó antibiotikus tulajdonsággal bíró vegyületet írtak le, pl. streptomycin, puromycin, carbomycin, oxytetracycline. Bioremediációban főleg proteolitikus-, ill. szénhidrát polimer bontó enzimeik miatt használják, olajbontásban is nagy a jelentőségük.

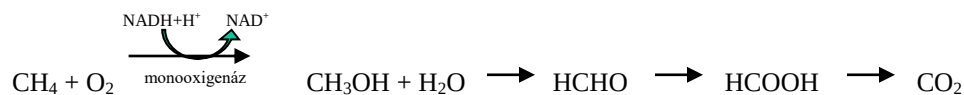
Képviselők: *S. fradiae*, *S. griseus*, *S. albidoflavus*, *S. pactum*, *S. coelicolor*

I.4.6. Metilotróf - „C1” baktériumok

A metán anaerob körülmények között termelődik, a metanotrófoknak a metán lebontásához pedig szükségük van oxigénre - mikraaerofilok. Ezért a metanotróf baktériumok az aerob és anaerob határfelületeken fordulnak elő, ahol a metán az anaerob rétegből az aerob rétegbe kerül pl. földgázmezőkön, metánnal átjárt mocsarakban, állóvizekben, iszapban, talajban.

Heterogén társaság, közös jellemzőjük, hogy a 'C1-C3' szénforrásokat hasznosítják, formaldehiddé alakítják. E folyamat első lépését katalizálják monooxygenáz enzimeik: sMMO, pMMO:

Az aerob anyagcserét folytató metanotrófokban a metánhasznosítás első lépésében a metán metanollá oxidálódik a metán monooxygenáz enzimkomplex segítségével. A MMO egy klasszikus monooxygenáz, amely egy mol redukáló ekvivalenst használ fel az O₂ molekula kötéseinek felszakításához.



A metanotróf baktériumokra általánosan jellemző, hogy növekedésük során tartalék tápanyagokat halmoznak fel, különösen, ha valamely tápanyagból (pl. nitrogén, oxigén) korlátozott mennyiség áll rendelkezésükre. A legáltalánosabban szintetizált tartalék tápanyag a polihidroxivajsav, illetve egyéb polihidroxialkánsavak.

A metanotróf baktériumok alanyai lehetnek a metánból kiinduló metanol termelésnek is. A Föld fosszilis metán készletei a kőolaj készletekkel összemérhető nagyságúak. A metanol a belső égésű motorok fontos alternatív üzemanyaga. Előnyei, hogy a benzinnél kevésbé környezetszennyező és kedvezőbb égési tulajdonságokkal rendelkezik, a benzinhoz keverve pedig növeli az oktánszámot. Ezen kívül a metanol számos kémiai szintézis kiindulási vegyülete, a vegyipar egyik legfontosabb alapanyaga.

Bioremediációban betöltött szerepük: Metanotrófok tiszta kultúrái metánnal és levegővel átjárt talajban, talajvízben katalizálják a szennyező triklóretilén, diklóretilén, vinilklorid, kloroform és a legtöbb alacsony molekulású halogénezett szénhidrogén lebontását. A metanotrófok felhasználhatóságát elősegíti, hogy extrém magas halogénezett szénhidrogén koncentráció mellett (pl. 50 mg TCE/liter, ami az ivóvízben megengedett érték 10000-szerese) is megőrzik aktivitásukat. A metanotrófok által termelt TCE oxidációs termékeket már számos baktérium képes továbboxidálni.

Végül, de nem utolsó sorban, a metanotrófokat sikeresen alkalmazzák nagyüzemi méretekben egysejtfehérje termelésre is. Az egysejtfehérje termelésnél egyik legfontosabb tényező a fermentációs költségek számbavétele. A metanotrófok alkalmazásának egyik nagy előnye, hogy növesztésük egyszerű, biogázon vagy földgázon növeszthetők, a tápoldat olcsó, kizárólag szervesetlen sókat tartalmaz. A 45°C-on való növesztés pedig kizárja a patogén mikróbak elszaporodását, ezáltal a biomassza biztonságosan használható állati takarmányozásra.

Képviselők: metanotrófok, metilotróf baktériumok (főleg G-negatív)

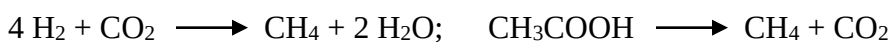
pl. *Methylosinus*, *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*

I.4.7. Metanogének

- *Euryarchaeota* – törzs
 - *Methanobacteria*, *Methanococci*, *Methanopyri*- osztály

Archaea, obligát anaerob, kemolitotróf, heterotróf szervezetek. Sokféle megjelenés – pálcá, kokkus, egyesével vagy aggregátumokként. Pseudomurein tartalmú sejtfaluk van (kivétel a *Methanococcales* rend). Membrán szerkezetük is egyedi, a lipidek glicerinnél hiányában caldarcheol és mioinositol tartalmaznak, mint a lipid poláris csoportja. Előfordulnak metanogén környezetben pl. anaerob emésztők, üledékek, élő szervezetekben is. A környezeti feltételek változásaira nagyon érzékenyek.

Közös ismertető jegyük, hogy a CO₂-ot (esetleg metil csoport tartalmú vegyületeket) redukálják, ahol az e⁻ donor H₂, formiát lehet. Ebből adódóan nem csoda, hogy nagyon kedvelik a hidrogén termelő fajokat közvetlen környezetükben.



Biotechnológiai, ipari jelentőségük a biogáz előállításban nyilvánul meg.

(megjegyzés: a teljes metán kibocsátás 430 x 10¹² gallon, ebből biogén eredetű 280 x 10¹² gallon!)

I.5. Mikrobiális enzimcsaládok

Az enzimek olyan fehérjék, melyek különböző biotranszformációs folyamatokat katalizálnak megfelelő körülmények között (enzim adatbázis: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>). Csaknem minden a sejtben végbemenő reakciót enzimek katalizálnak. A termodinamika törvényei természetesen az enzimek által katalizált reakciókra is érvényesek, tehát az enzimek termodinamikailag *előnyös* reakciók végbemenetelét segítik elő azáltal, hogy az *aktiválási energiát csökkentik*. A biológiai rendszerekben azért van szükség enzimekre, mert az élethez szükséges reakciók egyébként nem következnek be elég gyorsan. A katalitikus hatékonyság mellett az enzimek fontos jellemzője a specifitás. Minden enzim csak egy bizonyos típusú reakció végbemenetelét és csak bizonyos vegyületek átalakulását serkenti. Az enzim

specifitása lehet abszolút vagy részleges. Míg az első esetben az enzim egyetlen szubsztráttal reagál, a részleges specifitást mutató enzimek több, szerkezetileg hasonló vegyület átalakulását katalizálják.

Az enzimcsaládok (EC kategóriák):

1. Oxidoreduktázok

dehidrogenázok, oxidázok, reduktázok, peroxidázok, katalázok,
oxigenázok, hidroxilázok

2. Transzferázok

transzaldoláz és transzketoláz, acil-, metil-, glükózil-, és
foszforiltranszferázok, kinázok, foszfomutázok

3. Hidrolázok

észterázok, glikozidázok, peptidázok, foszfatázok, tiolázok,
foszfolipázok, amidázok, deaminázok, ribonukleázok

4. Liázok

dekarboxilázok, aldolázok, hidratázok, dehidratázok, szintázok, liázok

5. Izomerázok

racemázok, epimerázok, izomerázok, egyes mutázok

6. Ligázok

szintetázok, karboxilázok

Az enzimcsaládok számos tagja katalizál biodegradációs, biotranszformációs folyamatokat:

- Oxidáció: aromás gyűrűk oxidatív hasítása pl. oxigenázok
hidroxilálás pl. hidroxilázok
hidroxilcsoportok oxidálása
alkil oldalláncok oxidatív lebontása
szubsztituensek oxidatív lehasítása, vagy oxidálása
- Redukció: karboxil csoportok redukciója, pl. dekarboxilázok
heterocsoportok redukciója
kettős kötés redukció

- Hidrolízis (depolimerizáció): hidrolázok, fehérje, cukor polimerek hasítása pl. proteázok, amilázok, cellulázok, lipid bontás: lipázok, észterázok
- Izomerizáció- izomerázok pl. glükóz izomeráz

Későbbi fejezetekben részletesen foglalkozunk egyes enzimfajtákkal, pl. oxigenázok, proteázok, stb.

1.6. A bioremediáció körülményei

A bioremediációs technológiák esetében, a mikroorganizmusoknak központi szerepük van, elsősorban a vízben, a talajban, vagy az üledékben élő és működő szervezeteké a főszerep. A működésükhöz szükséges optimális körülményeket (amelyek általában nem adottak) nekünk kell biztosítanunk a maximális hatékonyság érdekében.

A környezetet szennyező szerves anyagok többsége aerob körülmények között biodegradálható hatékonyan, ezért az oxigénellátottság alapvető fontosságú a bioremediáció során. Emellett a nedvességtartalom, a környezet kémhatása, tápanyagok jelenléte/hiánya szintén fontos paraméterek a bioremediáció kivitelezésében.

A szennyezett környezetben előbb-utóbb kialakul egy sajátos mikroflóra, mely képes elviselni, sőt bontani is a szennyezőanyagokat. A hatékonyság növelése érdekében azonban egyre gyakrabban alkalmaznak mikrobiális oltóanyagokat a környezetvédelmi technológiákban, elsősorban a talajtisztításban, szennyvíz kezelésben.

Egyetlen kémiai vegyület, vagy elem kockázatát sem egyszerű megbecsülni, de tovább nehezíti a helyzetet, hogy az esetek többségében nem egyetlen vegyület, vagy elem jelent kockázatot a környezetre, hanem veszélyes kemikáliák tucatjait tartalmazó vegyes hulladékok, szennyvíziszapok, technológiai maradékok, illegális lerakatok. A szennyező anyagok kölcsönhatásai egymással és a mátrixszal egyre bonyolítják a helyzetet és a megítélhetőséget. A vegyi anyagok ökotoxikológiai

hatása kevésbé ismert, adatbázisokban alig találunk ökotoxikológiai adatot (Gruiz Katalin jegyzet).

Ha egy toxikus szennyező a környezetbe kerül, az messzemenő következményekkel jár. Az ott élő ökológiai közösség egyes tagjait, egyes fajait háttérbe szorítja, kipusztulásukat is okozhatja, másokat előnyhöz juttat, tehát felborítja az ökoszisztéma egyensúlyát. Az ökoszisztémák kisebb-nagyobb mértékben képesek alkalmazkodni a környezet változásaihoz, néha extrém környezeti tényezőkhez is képesek idomulni, meg tudnak felelni a klimatikus változásoknak és a legkülönbözőbb stresszeknek. Az ökológiai közösség egyes tagjai érzékenyebben reagálnak a környezeti hatásokra, mások rezisztensebbek. Egyes környezeti hatások csak a közösség tagjainak arányát tolják el, mely bármikor visszaalakulhat, de történhet irreverzibilis károsítás is (Gruiz K. jegyzet).

- A bioindikáció a vizsgált ökológiai rendszer legérzékenyebb tagjának meglétét, vagy hiányát vizsgálja,
- A biomonitoring a monitor-szervezetekben lejátszódó változásokat, pl. akkumulációt,
- A bioteszt olyan laboratóriumban végzett vizsgálat, melyben a tesztorganizmus válaszát méri a toxikus anyag, vagy toxikus környezeti minta hatására.
- A populáció, ill. az ökoszisztéma szintjén megjelenő hatásokat méri a mikrokozmosz, vagy mezokozmosz kísérletek.

A talajok esetében a talajhoz való kötődés, a talaj szervesanyag-, és agyagtartalma, valamint pH-ja és nedvességtartalma nagyban befolyásolja a hozzáférhetőséget, így a toxikus hatás megjelenését és mértékét.

A szennyező típusa, fizikai állapota és koncentrációja nagymértékben különbözhet. A szennyező típusán és koncentrációján kívül fontos tényező a szennyező-anyag fizikai állapota. Eszerint megkülönböztetünk:

- a talajrészecskékkel azonos, annál kisebb, vagy annál nagyobb szennyező részecskéket,
- a talajszemcsék felületéhez, folyékony filmként kötődő szennyezőket,
- a talajrészecskék felületéhez adszorpcióval kötött szennyezőket,

- a szerves talajalkotókhoz abszorbeálódott szennyezőket,
- a talajszerkezet pórusaiban szilárd, vagy folyadék állapotban jelenlévőket, és
- a talajrészecskékhez, kötött, vagy a mikropillárásokban lévő vizes fázisban oldott szennyezőket.

A szennyezett terület történetével kapcsolatban három tényezőt kell elsősorban figyelembe vennünk, amikor a talajtisztítás módjait fontolgatjuk, ezek:

- a talajszennyezés módja,
- a terület szennyezés előtti használata és
- a szennyeződés megtörténte és a tisztítás megkezdése között eltelt idő, vagyis a szennyeződés kora.

A megtisztítás, vagy ártalmatlanítás gyakran több módszer együttes alkalmazásával oldható meg. A tisztítási módok a talaj összetevők és a szennyeződések, ill. a szennyeződést hordozó részecskék eltérő tulajdonságain alapulnak. A szennyező-tulajdonságai, melyeket a tisztítási technológia kiválasztásánál figyelembe kell venni:

- a szennyező illékonysága,
- a szennyező oldhatósága vízben, vagy szerves oldószerekben,
- a szennyező kémiai- ill. hőhatásra történő bonthatósága, vagy stabilitása,
- biodegradálhatósága.

A fenti paraméterek figyelembe vételével lehet/kell megtervezni a tisztítást. A bioremediációt fizikai és/vagy kémiai módszerekkel lehet kapcsolni. Olyan módszeregyüttesre van szükség, mely a lehető legjobb eredmény biztosítása mellett a legkevésbé károsítja az ökoszisztémát. Hiába tökéletes módszer szerves szennyezőkre a magas hőfokú égetés, ha az tönkreteszi a talajt, annak szerves anyagait, teljes biológiai rendszerét. Az eredményül kapott tiszta anyag már nem is tekinthető talajnak. Ráadásul az eljárás igen költséges.

A bioremediáció alkalmazása messzemenően figyelembe veszi a természeti körülményeket, azokra minimális/vagy nincs káros befolyása. A megfelelő

technológia kiválasztása előtt először előkísérletekkel fel kell mérni a szennyezett talaj fizikai, kémiai és biológiai állapotát és a talajban folyó biodegradációt, majd az ismeretek alapján olyan technológiát kell tervezni és alkalmazni, amely a talajban működő, illetve utólagosan hozzáadott mikroorganizmusoknak optimális körülményeket biztosít (nedvességtartalom, hőmérséklet, tápanyagellátottság, levegőztetés). Rendkívül nagy jelentőségű az alkalmazható módszerek között az apoláros szerves szennyezők hozzáférhetőségét növelő körülmények biztosítása vagy adalékok alkalmazása.

A szennyezett környezetben nem jelenlévő mikroorganizmus adagolására pl. friss szennyezés esetében kerülhet sor, amikor a talaj saját mikroflórájának még nem volt ideje adaptálódni a szennyezőhöz, illetve toxikus xenobiotikumok esetében, melyek gyors bontására a benszült mikroflórának kicsi az esélye. Ez utóbbi esetben adaptált, sőt esetleg génmanipulált törzseket kell alkalmaznunk. Talajoltóanyagot alkalmazhatunk még nagyon rossz minőségű, alacsony sejtszámú, leépült talajok esetében is.

I.6.1. A bioremediáció előnyei, korlátai

A bioremediáció biztonságos, mert a természetes mikroflóra egyedeit használja fel, veszélyes vegyszert nem használnak, a kiegészítő tápanyagok sem veszélyesek (ásványi anyagok, nyomelemek, vitaminok), a folyamat során a veszélyes anyagok semleges (nem toxikus) vegyületté alakulnak.

A bioremediáció előnye, hogy természetes folyamatokon alapszik, a szennyezett terület, talajvíz az eredeti helyen (in/on site) tisztítható, kevés hulladék keletkezik, más módszerekhez képest nem igényel annyi felszereltséget, ezért olcsóbb, mint a legtöbb fizikai-kémiai eljárás.

A bioremediáció hátránya, hogy rossz hatékonyságú lehet pl.összetett szennyezések esetén, nehezen hozzáférhető szennyezések esetén, illetve ha a talaj humuszanyagait is bontják az alkalmazott mikroorganizmusok.

I.6.2. Mikrobiológiai tényezők

A szennyezett környezetben egy bizonyos idő után olyan mikroorganizmusok jelennek meg, melyek képesek hasznosítani a szennyezőanyagot. Ezek a mikróbák lehetnek eleve ott élő-, esetleg talajvíz, esővíz, szél (stb) segítségével odajutó egyedek, melyek hatására a természetes populáció összetétele megváltozik.

A legtöbb ellentmondást és vitát a talajtisztítási technológiákkal kapcsolatban az oltóanyagok alkalmazása váltja ki, bár egyre nagyobb teret hódít a költségkímélő és hatékony módszerek között.

Bioremediáció alkalmazása során az alábbi szempontokat figyelembe kell venni:

- környezetünkben, a szennyezett területeken is találkozunk természetes mikróba populációval. Még erősen szennyezett, toxikus körülmények között is sok-sok mikroorganizmussal találkozunk, ezek fiziológiai körülményeit figyelembe kell vennünk.
- A fent említett mikroorganizmusok biofilmet hozhatnak létre, mely előnyös lehet az azt alkotó mikroorganizmusok szempontjából, azonban hátrányos is lehet pl. oxigéndiffúziót gátolhatja
- A bioremediáció céljára létrehozott konzorciumok, és a bennszülött mikroflóra esetén az összeférhetőséget vizsgálni kell egymással és az alkalmazás helyével, meg kell vizsgálni az élettani, biokémiai tulajdonságaikat
- Meg kell határozni a mikrobiális aktivitás valós hatásfokát
- A felhasználás előtt ellenőrizni kell, hogy a laboratóriumi kísérletek az adott területen felhasználhatóak –e
- A lebontás során keletkező metabolitok hatását az enzimekre, mikrobákra figyelembe kell venni. Előfordul, hogy a mikroorganizmusok a vegyületek nitrogén, foszfor, vagy kén tartalmát hasznosítják, azonban a szubsztrát többi elemét/részét érintetlenül hagyják.
- oxigén hiányában alkalmazhatók-e alternatív elektronakceptorok (nitrát, szulfát, karbonát, klorid, Fe(III)...)
- a szennyezés összetettségét szintén meg kell határoznunk, hiszen csak rendkívül ritkán fordul elő, hogy csak egy komponensű a szennyezés

- a szennyezés kora angyon fontos paraméter a lebonthatóság szempontjából. Az idősebb szennyezőanyagok a talajmátrix polimer komponenseihez kötődnek, és így már nehezen hozzáférhetők a lebontó szervezetek számára

Amennyiben törzsgyűjteményekből származó az adott szennyezés bontására alkalmasnak leírt mikroorganizmusokat szeretnénk használni a bioremediációban, gyakran csalódunk, sokszor azzal szembesülünk, hogy az adott körülményeket, illetve eleve jelenlévő mikoflórát nem képesek tolerálni. Ha meg mégis versenyképesek, előfordulhat, hogy több kárt okoznak, mint hasznot. Ezen tapasztalatok alapján legtöbb kutató-fejlesztő laboratóriumban környezeti mintákból, szennyezőkhöz adaptálódott szennyvíziszapból, talajból, üledékből izolálnak baktériumokat melyeket felszaporítanak és esetleg összekevernek ("irányított" konzorcium), hogy megfelelő összetételű oltóanyagot nyerjenek. Az izolálást követő tisztítás és szaporítás során fennmaradó mikroorganizmusok száma rendszeresen és törvényszerűen drasztikus csökkenést mutatott. Nyomonkövethető volt, hogy egy-két-három, egymástól nehezen szétválasztható mikroba tökéletes megtisztítás után már nem tudott szaporodni, egymagában életképtelen volt. Ezeket amennyiben a szelekció után, felszaporítva rögtön visszahelyezzük a szennyezett környezetbe, gyakran csalódnunk kell, nem képesek jó hatásfokkal bontani a célvegyületeket.

Adaptációs-mutációs kísérletekkel azonban a bontó hatékonyság nagyságrendekkel növelhető, a lebontási idő jelentősen csökkenthető. Az eljárás akkor volt igazán sikeres, ha az oltóanyag céljára előkezelt talaj azonos típusú és azonos szennyezőt tartalmazott, mint az oltandó (Gruiz K. jegyzet). Ennek magyarázata, hogy a mikroorganizmusok természetes élőhelyén minden fajnak és törzsnek megvan a megfelelő szerepe, az izolálhatatlan minor komponensek is igen fontosak lehetnek a láncolatban, abban a szorosan egymásra épülő együttműködésben, mely a keverék szennyezők kiegyensúlyozott biodegradációját képes biztosítani a fajok és törzsek eloszlásának, egymáshoz viszonyított arányának finom változtatásával.

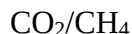
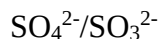
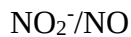
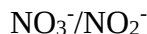
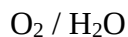
Tiszta kultúrákat, vagy tiszta baktériumok keverékét olyan xenobiotikumok esetében érdemes alkalmazni, melyek a szennyezett területen nem vagy rendkívül lassan biodegradálhatóak. Ha a bontó mikroflóra működéséhez nem alkalmasak a

körülmények, például limitált a levegőellátás, célszerű indokolt lehet mikroaerofil törzsek alkalmazása, vagy levegőutánpótlás, illetve alternatív elektronakceptorok bevetése. Klórozott szénhidrogén szennyezők esetén főleg anaerob bontó mikroorganizmusokat és ex-situ, reaktoros technológiát alkalmazhatunk.

Policiklikus aromás szénhidrogénnel szennyezett talajban jelentkező gyenge biodegradáció bizonyított oka lehet a szennyező apoláros volta és ezzel összefüggésben a mikroorganizmusok számára hozzáférhetetlen állapota (Gruiz K. jegyzet). A hozzáférhetőséget maguk a mikroorganizmusok is képesek megnövelni felületaktív anyagok szintézise révén. Ezzel függ össze az a - minden laboratóriumi és szabadföldi bioremediációs kísérletünk során megjelenő és sokáig magyarázat nélkül maradt - jelenség, hogy a talajok extrahálható anyagainak mennyiségében a bioremediáció adaptációs periódusát, lag-szakaszát követően egy óriási növekedés jelentkezett, amely aztán viszonylag rövid idő után lecsengett. Ez a megnövekedett extraktumtartalom néha sokszorosát is elérte az eredeti szennyeződésnek. Ez akkor volt különösen meglepő, amikor mesterségesen szennyeztünk. A kontrolláltan hozzáadott olajmennyiségnél nagyobb kivonat mennyiség - természetesen a kontrollal korrigált értékekről van szó - annak a biotechnológus által megnövelt mikrobiológiai tevékenységnek tulajdonítható, mely felületaktív- és más hozzáférhetőséget növelő anyagok szintézise következményeképpen nem csak a szennyezőt, de a talaj addig hozzá nem férhető szerves anyagainak egy részét is mobilizálja.

A metabolizmus oxidációs és redukciós folyamatok összessége (Gruiz K. jegyzet). A mikroorganizmus energiát nyer a szerves vegyületek oxidációjával. Mivel a lejátszódó oxidációs és redukciós folyamatok eredője 0, szükség van olyan vegyületre, amely redukálódik, azaz „elektront vesz fel”. Ez a vegyület az ún. terminális elektronakceptor. Aerob esetben ez a vegyület az oxigén. Amennyiben oxigén nincs jelen a rendszerben, más vegyületek szolgálhatnak elektronakceptorként. A különböző elektronakceptoroknak különbözik az oxidáló ereje (standard redoxpotenciálja), ennek megfelelően változik a metabolizmus során kinyerhető energia mennyisége.

Elektronakceptor redoxpár



Kinyerhető
energiamennyiség
csökken



Anoxikus körülményekről beszélünk, amennyiben oxigén nincs jelen a rendszerben, nitrát azonban igen, így ez szolgál elektronakceptorként. Az ún. denitrifikáló mikroorganizmusok a nitrátot nitritté, majd elemi nitrogénné redukálják, ez a folyamat a denitrifikáció.

Anaerob körülmények esetén sem oxigén, sem nitrát nincs jelen a rendszerben. Amennyiben szulfát jelen van a rendszerben elektronakceptorként szulfittá (SO_3^{2-}) és később kénhidrogénné (H_2S) redukálódik szulfátredukáló mikroorganizmusok hatására. Amennyiben szulfát sincs jelen a rendszerben a széndioxid szolgálhat elektronakceptorként, és metán keletkezik (metanogén baktériumok). Az anaerob folyamatok során melléktermékként illósavak (pl. ecetsav, vajsav) keletkeznek.

Fontos!!! Mivel az energiagazdálkodás szempontjából előnyösebb helyzetben vannak, az aerob organizmusok metabolikus előnyt élveznek a denitrifikálókkal szemben, a denitrifikálók előnyt élveznek a szulfátredukálókkal szemben, szulfátredukálók előnyt élveznek a metanogénekkal szemben (lásd később BTEX bontása).

1.6.3. Környezeti faktorok hatása a mikroorganizmusokra

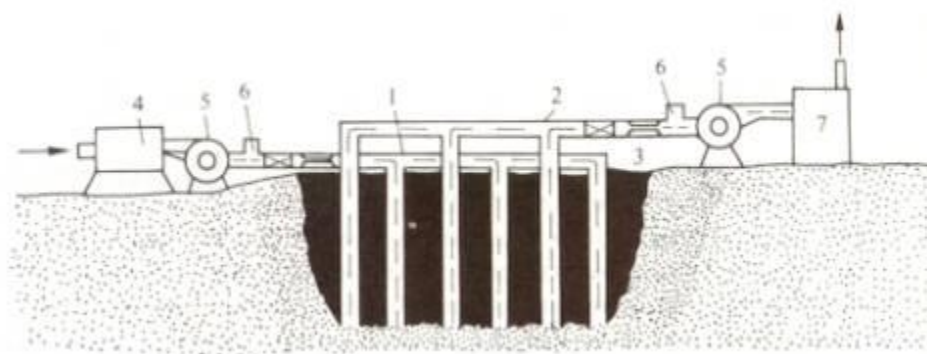
A különböző környezeti tényezőkre (ökológiai faktorok) az élő szervezetek eltérő módon reagálnak

- **Oxigén és a redoxpotenciál (rH):**

Oxigénnel megfelelően ellátot területek redoxpotenciálja magas, oxigénhiányos környezetben viszont alacsony. Az oxigén létfontosságú számos mikroszervezet számára, azonban az anaerob főleg az obligát anaerob szervezetek számára toxikus (de 21% felett már az aerobok számára sem előnyös). A redoxpotenciál érték mérésével információt nyerhetünk a terület oxigénellátottságáról.

Jól biodegradálható szennyező esetében természetesen bioremediációt célszerű alkalmazni. Legolcsóbb és leghatékonyabb eljárás a bioventilláció, mely a biodegradációhoz szükséges oxigént a talaj szellőztetése útján biztosítja.

(Minden 100 kg átlagos olaj-szénhidrogén aerob degradációjához mintegy 160 kg oxigénre van szükség. A szénhidrogének biodegradációjához szükséges nagymennyiségű oxigén biztosítására a talaj kismértékű szellőztetésére van szükség, hogy a hézagterfogatokban kialakuló megnövekedett oxigén-koncentráció, a biofilmben történő diffúziót megnövelje. A szükséges levegőmennyiség számítható, vagy technológiai kísérletekkel meghatározható).



Illékony szénhidrogén-szennyezések visszanyerése talajból átlegezőtetéssel 1-injektáló csőhálózat, 2-elszívó csőhálózat, 3-szennyezett talaj, 4-levegőhevíítő, 5-ventillátor, 6-mintavétel és szabályozás, 7-aktív szénese adszorber

Az oxigénnek a talaj belsejébe juttatása levegővel telített víz, vagy más oxigénforrás, pl. hidrogénperoxid, nitrát tartalmú víz recirkuláltatásával is

megoldható. Összehasonlítva a bioventilláció és a talajvíz recirkuláltatással járó módszereket előbbi határozottan hatékonyabb az olajbiodegradáció szempontjából. Ehhez járul még, hogy a bioventilláció nem teszi tönkre, nem lúgozza ki a talajt a vizes kezeléssel ellentétben.

A levegőztetés optimális mértékét is érdemes kísérletesen meghatározni, hiszen a bioventilláció fő költsége a ventillátorok energiafogyasztása. Kísérleti eredményeink szerint folyamatos 24 órás levegőátszívatással nem érünk el jobb eredményt, mint napi 2-szer egy órás szellőztetéssel.

- **H₂O:**

Szállítóközeg, mely a létfontosságú tápanyagokat, elektronakceptorokat, és vízdékony szerves- és szervetlen anyagokat juttat el a mikrobákhoz. Túl magas víztartalom gátolja az oxigén talajba jutását, túl alacsony nedvességtartalom viszont a mikrobák aktivitását, túlélését korlátozza.

- **Tápanyagok:**

A mikroorganizmusok tápanyagigénye rendkívül változatos. A sejtek életciklusaihoz szükséges tápanyagok a nitrogén és foszfor mellett egyéb nélkülözhetetlen elemeket, ásványi anyagokat: kén, kálium, magnézium, kalcium, mikroelemek, esetleg vitaminokat is biztosítani kell.

- **pH:**

Az egyes fajoknak nagyon eltérő pH optimumuk lehet, ezért a környezet (talaj, talajvíz, felszíni vizek) kémhatása meghatározza mely típusú mikroba fajok tudnak fennmaradni, szaporodni és emellett befolyásolja a szervesanyagok hozzáférhetőségét is. A talajok pH-ja széles határok között változhat, de a szerves szennyezőanyagok biodegradációja szempontjából a legkedvezőbb a semleges érték körüli pH.

- **Hőmérséklet:**

A hőmérsékletnek azon túl, hogy a mikrobiális szaporodást, illetve a szervesanyag bontás mértékét meghatározza, befolyással van a szennyező szénhidrogén fizikai állapotára, összetételére. Talajban folyó biodegradációhoz szükséges hőmérséklet

optimuma 20-30 °C, de létezik lebontás igen szélsőséges körülmények között is. Alacsony hőmérséklet esetén megnő az olaj viszkozitása, vízoldatósága, csökken az illékony frakciók párolgása. A hőmérséklet emelkedésével nemcsak a szennyezőanyag mobilitása növekszik meg, de a mikroorganizmusok aktivitása is legtöbb esetben nő.

Biodegradálható szennyezők esetében legelőnyösebbek az *in situ* biológiai módszerek, melyekkel nagyobb szennyezett területek megtisztítására is van esély, köbméterenként 100-200 dollár költséggel. Kisebb szennyezett területek és különlegesen veszélyes szennyezők esetében gazdaságosnak minősülhet a legtöbb, 500-1000 dollár költséget is elérő *ex situ*, nagy energiaigényű technológia is, ha ezt a költséget a veszélyes hulladék elhelyezési költségével vetjük össze. A nagyon költséges módszereket kompenzálhatja a terület jövőbeni használata, vagy a telek ára.

A remediálási technológiákat célszerű összekapcsolni, például biológiai kezelés a hőmérséklet kismértékű megemelésével. Kémiai, fizikai előkezelés utáni biotechnológia alkalmazása főleg az *ex situ* módszereknél terjed, leggyakoribb példaként a talaj vizes mosása és frakcionálása utáni biotechnológia a legszennyezettebb, biológiailag bontható szennyezőt tartalmazó frakcióra, mely általában az agyag- és humusztartalmú frakció.

A szennyezett területek remediálását gazdasági szempontok szerint is értékelnünk kell. Az ökológiai károk becslése, főleg pénzben kifejezhető értékének meghatározása nem könnyű, de a gazdasági szakemberek nem is ebből indulnak ki, hanem a terület hasznosításával nyerhető haszonból és a büntetés nagyságából. A remediálási technológiáknak ilyen szempontból is meg kell állniuk a saját lábukon.

1.7. Irodalomjegyzék

- Alexander, M. (1981) Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science* 211(9): 132-138
- Dagley, S. (1987) Lessons from biodegradation. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 1-23
- Dua, M., A. Singh, N. Sethunathan, A.K. Johri (2002) Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 143-152
- Ghisalba, O. (1983) Microbial degradation of chemical waste, an alternative to physical methods of waste disposal. *Experientia* 39: 1247-1257
- Gibson, D.T., R.E. Parales (2000) Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Curr. Op. Biotechnol.* 11: 236-243
- Harayama, S., M. Kok, E.L. Neidle (1992) Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 565-601
- Harwood, C.S., R.E. Parales (1996) The β -ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 553-590
- Head, I.M. (1998) Bioremediation: towards a credible technology. *Microbiology* 144: 599-608
- Mason, J.R., R. Cammack (1992) The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 277-305
- Van der Meer, J.R., W.M. de Vos, S. Harayama, A.J.B. Zehnder (1992) Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* 56: 677-694
- Parales, R.E., N.C. Bruce, A. Schmidt, L.P. Wackett (2002) Biodegradation, Biotransformation, and Biocatalysis (B3). *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4699-4709
- Whitman, W.B., D.C. Coleman, W.J. Wiebe (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 6578-6583
- Zylstra, G.J., J.J. Kukor (2005) What is environmental biotechnology? *Curr. Op. Biotechnol.* 16: 243-245

Ajánlott könyvek:

- Atlas, R.M., J.Philp (2005) Bioremediation: Applied Microbial Solutions for Real-World Environmental Cleanup. ASM Press. ISBN 1-55581-239-2
- Scragg, A. (2005) Environmental Biotechnology. Oxford Univerity Press. ISBN 0-19-926867-3
- Wackett, L.P., C.D. Hershberger (2001) Biocatalysis and Biodegradation. ASM Press. ISBN 1-55581-179-5

II. XENOBIOKUMOK, ÉS EGYÉB, NEHEZEN BONTHATÓ SZERVES VEGYÜLETEK MIKROBIÁLIS LEBONTÁSA

Dr. Perei Katalin, Dr. Rákhely Gábor, Magony Mónika

Tartalomjegyzék

<u>II. XENOBIOKUMOK, ÉS EGYÉB, NEHEZEN BONTHATÓ SZERVES VEGYÜLETEK MIKROBIÁLIS LEBONTÁSA</u>	30
<u>II.1. Xenobiotikus karakter és bonthatóság</u>	32
<u>II.2. Oxigenázok</u>	38
<u>II.2.1. Monooxigenázok</u>	39
<u>II.2.2. Dioxigenázok</u>	42
<u>II.2.2.1 A multikomponensű oxigenázok elektron-transzport komponensei</u>	45
<u>II.3. PAH szakirodalom feldolgozása a biotechnológiai megoldások szemszögéből</u>	46
<u>II.3.1 A policiklusos aromás szénhidrogének</u>	46
<u>II.3.2 PAH-ok mikrobiális bontása</u>	51
<u>II.3.3. Metabolikus utak</u>	54
<u>II.3.3.1. Naftalin</u>	54
<u>II.3.3.2. Fenantrén</u>	55
<u>II.3.3.3. Fluorén</u>	60
<u>II.3.3.4. Pirén</u>	62
<u>II.3.3.5. Nagy molekulású PAH-ok (HMW PAH) biodegradációja</u>	65
<u>II.3.4. A bontási körülmények vizsgálata</u>	66
<u>II.3.5. Irodalomjegyzék</u>	67
<u>II.4. Halogénezett alifás és aromás szénhidrogének biodegradációja</u>	69
<u>II.4.1. Klórozott szénhidrogénekről általánosan, enzimikus lebontásuk</u>	70
<u>II.4.1.1. Reduktív halogén eltávolítás</u>	72
<u>II.4.1.2. Oxigenolitikus dehalogénezés</u>	72
<u>II.4.1.3. Hidrolitikus dehalogénezés</u>	73
<u>II.4.1.4. Tiolitikus dehalogénezés</u>	73
<u>II.4.1.5. Halogénmentesítés intramolekuláris szubsztitúcióval</u>	73
<u>II.4.1.6. Dehidrodehalogénezés</u>	73
<u>II.4.1.7. Hidrodehalogénezés</u>	74
<u>II.4.2. Halogénezett szénhidrogének biodegradációja</u>	74
<u>II.4.2.1. Halogénezett alifás szénhidrogének</u>	74
<u>II.4.2.2. Klórozott aromás szénhidrogének</u>	85
<u>II.4.2.2.1. Klórbenzolok mikrobiális bontása</u>	87
<u>II.4.2.3. Policiklusos klórozott szénhidrogének</u>	90
<u>II.4.2.4. A biodegradáció gén szintű szabályozása</u>	92
<u>II.4.3. IRODALOMJEGYZÉK</u>	94
<u>II.5. BTEX vegyületek bontása</u>	98
<u>II.5.1. BTEX biodegradáció</u>	100

II.5.1.1. Benzol	101
II.5.1.2. Toluol	104
II.5.1.3. Etilbenzol	106
II.5.1.4. Xilolok	107
II.5.2. A bioremediáció körülményei	109
II.5.3. A BTEX bontás genetikai háttere	114
II.5.4. Irodalomjegyzék	116
II.6. Nitro- funkciós csoportot hordozó vegyületek mikrobiális bontása	117
II.6.1. Alifás nitro funkciós csoportot hordozó vegyületek mikrobiális bontása	118
II.6.1.1. Nitroalkánok	118
II.6.1.2. Nitrát észterek (C-O-NO₂)	119
II.6.2. Nitroaromás vegyületek biodegradációja	119
II.6.2.1. Nitroaromások aerob bontása	119
II.6.2.1.1. A nitrobenzolok	120
II.6.2.1.2. A nitrofenolok	120
II.6.2.1.3. A nitrotoluolok	122
II.6.2.2. Nitroaromás vegyületek anaerob bontása	124
II.6.3. Nitro csoportot hordozó egyéb szénhidrogének, pl. policiklikus aromások, herbicidek, nitrodifenilaminok biodegradációja	125
II.6.4. Bioremediációs eljárások bemutatása nitro csoportot hordozó szennyezők esetén	126
II.6.5. Irodalomjegyzék	127
II.7. Indol származékok biodegradációja	130
II.7.1. Kénhidrogén eltávolítás mikrobiológiai módszerekkel	136
II.7.2. Irodalomjegyzék	139

II.1. Xenobiotikus karakter és bonthatóság

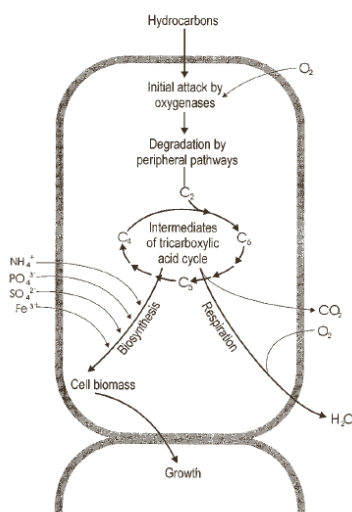
Xenobiotikumoknak olyan anyagokat nevezünk, melyek a környezet számára idegenek, antropogén eredetűek. E vegyületek olyan szerkezeti elemeket tartalmaz(hat)nak, melyek természetes módon nem jönnek létre, így a mikroorganizmusok az evolúció során nem alakítottak ki megfelelő enzimrendszert bontásukra, nem hasznosítják ezen anyagokat szén- és energiaforrásként. Bár pl. a -CH₃ csoport jól ismert természetes vegyületekben, bizonyos szerkezeti összetételben idegen szerkezetté “álltak össze”, ezáltal biológiai lebonthatóságuk korlátozott. Ezért tágabb értelemben azok a szintetikus vegyületek számítanak xenobiotikumnak, melyek bizonyos csoportok számában és orientációjában eltérnek a természetesen előforduló anyagoktól.

Az 1960-as évek elején felfedezték, hogy számos talajlakó mikroorganizmus képes a xenobiotikumok bontására. Mivel a mikroorganizmusok katabolikus potenciálja rendkívüli, ezért ez a felfedezés nem is olyan meglepő. Számos tanulmány bizonyítja, hogy a mikroorganizmusok alkalmazkodó képessége egy-egy xenobiotikus, vagy toxikus anyaghoz nagyon gyors, ami annak köszönhető, hogy reprodukciós idejük rövid, így gyorsan tudnak adaptálódni a megváltozott körülményekhez.

A fentiek ismeretében a xenobiotikumok főleg azért jelentenek veszélyt, mert nem ismerjük kellőképpen hatásukat a környezetre, és ha egy új vegyületről van szó, kicsi az esély arra, hogy biodegradációja rövid időn belül megindul. A helyzetet egy-egy szennyezés esetén tovább rontja, hogy egyféle komponensből álló szennyezés ritkán fordul elő, általában összetett hulladékkal találkozunk, így sokféle enzim, mikroorganizmus szükséges lebontásukhoz. A szennyezés helyén sokszor nem tapasztalunk változást még hónapok, akár évek múlva sem, így azt gondoljuk, hogy nem is él ebben a környezetben olyan szervezet, mely képes egyik vagy másik szennyező komponens bontani. A szennyezett területről begyűjtött minta alaposabb vizsgálatával azonban, néha sikerül kitenyésztünk olyan mikroorganizmusokat, melyek valamelyik jelenlévő vegyület bontására képesek, de egy másik alkotó gátló hatású a lebontási folyamatra.

Ahhoz, hogy megértsük a *mikrobiális lebontási útvonalakat*, szükséges a mikroorganizmusok alapl működésének ismerete (mikrobiológia kurzus).

A *metabolizmus* reakciók együttese, mely során a sejtek energiát és kémiai építőelemeket nyernek (biokémia kurzus).



II.1 ábra

Szénhidrogének (szaporodáshoz kapcsolódó) aerob lebontásának elve

Előfordul azonban olyan eset is, hogy a sejtek nem nyernek közvetlenül energiát ez vegyület lebontásából/átalakításából. Ez esetben *kometabolikus folyamatok* állnak a háttérben, amikor egy sejt szubsztrátként hasznosít egy vegyületet, miközben a specifikus degradatív enzimeik intenzíven szintetizálódnak, és ezzel az enzimszisztemmel egy, szubsztrátként nem elfogadott, de a sejtek környezetében jelenlévő vegyületet is átalakítanak. Ennek a folyamatnak abban lehet/van jelentősége, hogy ezek a szubsztrátként nem elfogadott vegyületek toxikusak a sejtek számára, ezért arra törekcszenek, hogy ezt a számukra hátrányos környezetet maguk körül megszüntessék. A mikroorganizmusok e meglepő képességüket annak köszönhetik, hogy enzimeik többsége nem szigorúan egy szubsztrátra specifikus, hanem képesek több, sokszor igen sok vegyületet is bontani. Bár vannak nagyon szűk spektrumú enzimek is, de pl. az oxigenázok többsége sok-sok vegyületet képes támadni, átalakítani.

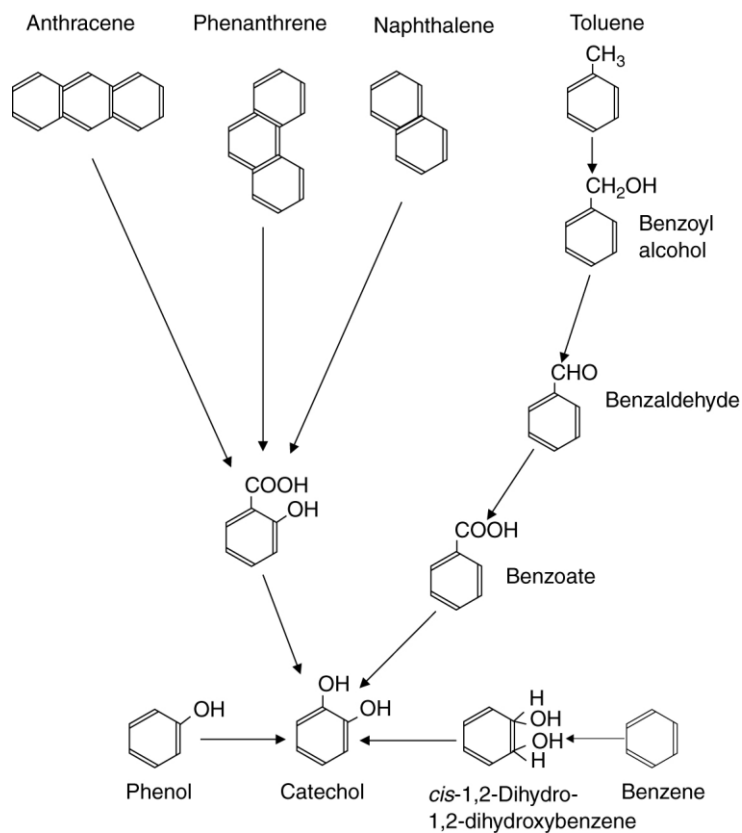
Mivel a kometabolikus folyamat a sejtek számára nem előnyös, a biomassza mennyiségét azáltal tudjuk növelni, illetve az enzimszintézist fenntartani, ha szén- és energiaforrást juttatunk a sejtek környezetébe. Ezáltal a xenobiotikus vegyület átalakítását is fenn tudjuk tartani, sőt növelni a hatékonyságát.

Vannak azonban olyan vegyületek, melyek elektron elszívó szubsztituenseket tartalmaznak pl. halo-, nitro-, azocsoportok, viszonylag magas redoxpotenciállal bírnak, így kevésbé hatásos ellenük egy oxigenolitikus folyamat. Ezekben az esetekben redukzív, vagy nukleofil mechanizmusokkal jobb eredményt érhetünk el. E folyamatoknak a hatékonysága elektrondonorok adagolásával fokozható.

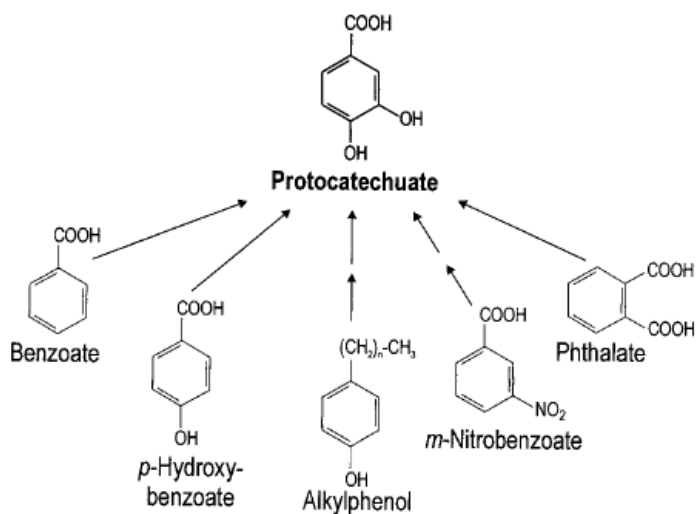
Ha megfigyeljük a természetben a szennyező anyagok lebomlását azt látjuk, hogy összetett mikroba közösségek alakulnak ki, és szervezett/összehangolt munkával távolítják el a toxikus vegyületeket környezetükből. Az egyes fajok adottságai/képességei összehangolódnak, és egy egységes rendszerben hatékonyan fejeződnek ki. Ha ezt az egységet megbontjuk, az egyedi fajok tulajdonságai nem feltétlen jelennek meg a tiszta rendszerekben.

A xenobiotikumok közül a legproblémásabb vegyületek az aromás, valamint halogén elem tartalmú vegyületek, lebontásukra többek között az oxigenáz, dehalogenáz enzimek, illetve az azokat szintetizáló mikroorganizmusok alkalmasak. Számos aerob és anaerob mikroorganizmus képes az aromás vegyületek lebontására. Attól függően, hogy aerob vagy anaerob szervezet végzi a lebontást eltérő metabolitokkal találkozunk. Az *anaerob metabolizmus* során keletkező ún. *központi intermedier* a *benzoil koenzimA* (II.1. ábra), mely továbbalakul, és *acetyl koenzimA* intermedieren keresztül hasznosul a sejtekben (II.2. ábra).

Az *aerob folyamatokban* *katekol* (II.3. ábra), *protokatekol* (II.4. ábra) (illetve ezek származékai) keletkeznek, mint *központi intermedierek*, majd az oxigenáz enzimek aktivitásának köszönhetően felhasad az aromás gyűrű, és szukcinát vagy piruvát keletkezik.



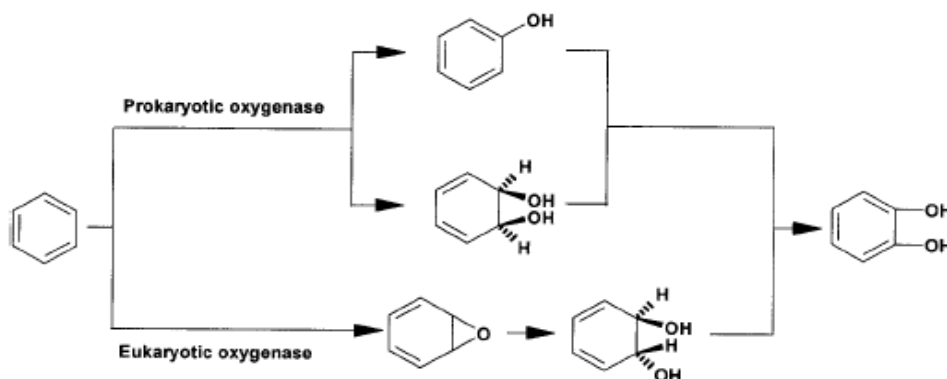
II.3. ábra Mono- és policiklusos aromás szénhidrogének lebontása **katekol központi intermedieren** keresztül aerob körülmények között



II.4. ábra Aromás szénhidrogének lebontása **protokatekol központi intermedieren** keresztül aerob körülmények között

II.2. Oxigenázok

Az oxigenázok központi szerepet játszanak a mikrobiális katabolikus utakban (II.5. ábra). Alkánok és más, többek között aromás vegyületek kemo-, régio-, és sztereoszelektív oxidációját katalizálják alkoholok, aldehidek, epoxidok, karboxilasavak képződése közben. Alaposan tanulmányozták működésüket, szerepüket, többek között ennek köszönhető, hogy egyre nagyobb a jelentőségük a környezeti, ipari biotechnológiában. A mikrobiális oxigenázok mellett meg kell említenünk az emlősökben jelenlévő oxigenázokat is, melyek komoly szerepe van a szteroidok hidroxilációjában, neurotranszmitterek szintézisében, a mérgező vegyületek detoxifikációjában.



II.5. ábra Az aromás gyűrű szerkezet lebontási útvonalában a Prokarióta és Eukarióta oxigenázok első lépcsője

Működésükhöz **molekuláris oxigénre**, illetve **kofaktorokra** is szükségük van. A különböző oxigenázok eltérnek szerkezetükben, működésükben és kofaktor igényükben. Kétféle oxigenázt ismerünk, 1. a **monooxigenáz**, mely az oxigén molekula egyik oxigénjét a szubsztrátba építi be, a másik vízzé redukálódik egy NAD(P)H oxidációja által 2. **dioxigenáz**, mely az oxigén molekula mindkét atomját a szubsztrátba (esetleg szubsztrátokba) építi.

Az enzimek általában több alegységből állnak, egy kofaktor, egy átmeneti fém (vas), flavin vagy pteridin szintén részét képezi a komplexnek. Az átmeneti fémek és/vagy a flavin/pteridin szerepe a dioxigén aktiválása, mely alapállapotban nem reaktív. Az általuk katalizált reakció energianyerő, de a reakcióban felszabaduló

energiát nem tárolják ATP formájában, hanem a szubsztrát szerkezetét destabilizálják.

Az oxigenázokban található fém fontos ismertetőjegye az enzimeknek, lehet nem-hem és nem-vas-kén Fe(II) vagy Fe(III), és vannak hem-enzimek is. Ritkán előfordul, hogy vas helyett mangánt, rezet esetleg kobaltot találunk, mely a dioxigént köti. A flavinok szemikinon formája és a pteridinek képesek reakcióba lépni a dioxigénnel, kovalensen kötött peroxidot, mint intermediert, eredményezve.

Történeti áttekintés röviden:

- 1955 Osamuri Hayaishi - felfedezi az oxigenáz enzimeket(dioxigenázok)
H. S. Mason - felfedezi a fenoláz enzimet (monooxigenáz)
1965- Irwin Gunsalus - citokróm P450 bakteriális monooxigenáz
1970 David Gibson - aromás szénhidrogén dioxigenázok
- lebontó útvonalak tanulmányozása
1980- sok kutatócsoport - lebontási útvonalak feltérképezése
A. Chakrabarty - katabolikus plazmid transzfer *Pseudomonas* törzsek között

II.2.1. Monooxigenázok

Azokat az oxigenázokat, melyek a dioxigén egy atomjának beépülését katalizálják a szubsztrátba (Sz), monooxigenázoknak nevezzük (II.6. ábra). A másik oxigénatom vízzé redukálódik, melyhez elektron donorként NAD(P)H-t (D), vagy magát a szubsztrátot használja. Az O₂ molekula egyik atomját építik be a célmolekulába.

$SzH_2 + O_2 = SzO + H_2O$ ('belső'-monooxigenáz, a szubsztrátról (Sz) jön az elektron)

$Sz + O_2 + H_2D = SzO + H_2O + D$ ('külső'-monooxigenáz, egy külső molekula biztosítja az elektront)

A reakciósor a szubsztrát enzimhez kötődésével kezdődik, mely konformáció változást idéz elő, ez megnöveli a NAD(P)H oxidációját, miközben FADH₂ keletkezik. A dioxigén ekkor kötődik a FADH₂-hoz, és redukálódik két egymást

követő elektron transzferen át. Először egy szuperoxid anion képződik, majd a második e-transzfer során egy reaktív hidroperoxi-flavin, mely támadja az aromás gyűrűt. A következő lépésben egy átmeneti intermedier képződik, és a szubsztrát hidroxilálódik.

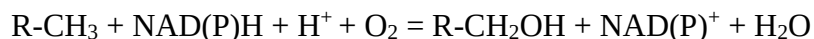
A monooxygenázok többsége egy komponensű enzim, de találkozunk multikomponensűekkel is, pl. fenol és toluol-4 monooxygenáz.

Csoportosításuk:

1. aromás gyűrű monooxygenázok, ezen belül több családot különböztetünk meg:

- p-hidroxibenzoát hidroxilázok
- phenol 2-hidroxilázok
- flavoprotein monooxygenázok
- multikomponensű fenol 2-hidroxilázok

2. alkil csoport hidroxilázok



- alkán hidroxilázok (ALK, TOL plazmidokon)

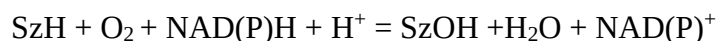
Az alkánok terminális szénatomjának hidroxilációját, illetve a zsírsavak omega-hidroxilációját katalizálják, a legismertebb a *Pseudomonas putida*-ban található. (Ez az enzim három különböző polipeptidből áll össze: egy membrán kötött hidroxiláz komponens (az *alkB* gén kódolja), és két másik polipeptid, melyek az elektrontranszport láncot alkotják)

- metán monooxygenáz (MMO)

A szolubilis MMO két obligát metilotrófból ismert, a metán metanollá alakítását katalizálják NADH jelenlétében. Arról híresek, hogy széles szubsztrát specifitásúak, azaz képesek hidroxilálni számos alkán, haloalkán, alkén, aromás és heterociklusos vegyületet

- vanillát demetiláz

3. Citokróm P-450 család

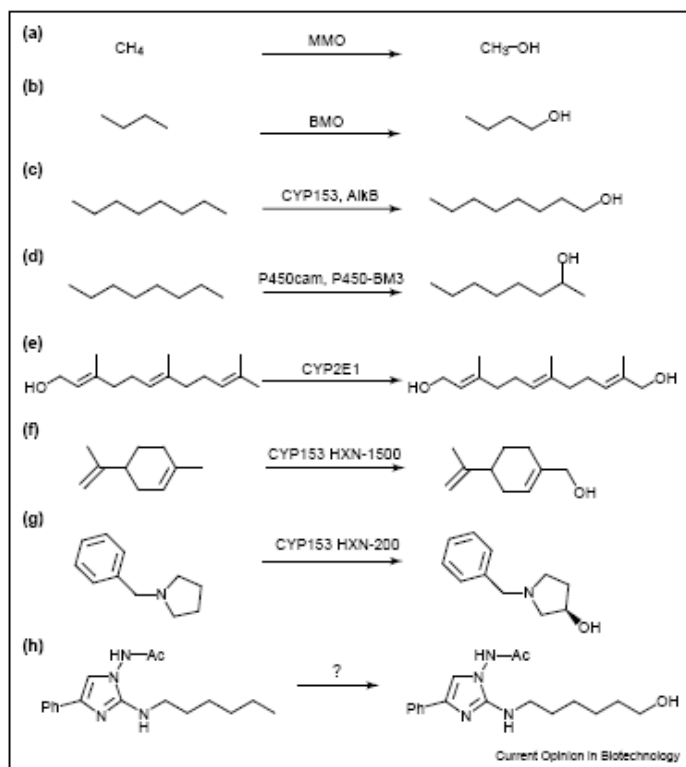


Multikomponensű enzimrendszer, egy terminális hidroxiláz hem fehérjéből és egy vagy két elektrontranszport komponensből állnak. Nevüket onnan kapták, hogy az enzim, mely szénmonoxidhoz kötődik karakterisztikus fényelnyelési maximumot mutat 450 nm-en. Sok citokróm P-450 enzimet azonosítottak prokariótákban, élesztőkben, gombákban, növényekben, rovarokban, de legtöbbet emlősökben. Az eukarióta enzimek az endoplazmatikus retikulumban és mitokondriumokban membrán kötötten találhatók, míg a bakteriális enzimek szolubilisek.

- kámfor 5-monooxygenáz (CAM pl.)
- mitokondriális P-450 (Eukarióta)
- mikroszómális P-450 (Eukarióta)

4. Aromás aminosav hidroxiláz család (Eukariótákban)

- fenilalanin 4-hidroxiláz
- tirozin 3- hidroxiláz
- triptofán hidroxiláz



MMO=metán monooxygenáz, BMO=bután monooxygenáz, AlkB= alkán hidroxiláz

II.6. ábra

II.2.2. Dioxigenázok

Azok az oxigenázok, melyek a dioxigén mindkét atomját a szubsztrát(ok)ba építik a dioxigenázok (II.7. ábra). A reakcióban az aromás gyűrűn hidroxil csoportokként épül be a dioxigén két atomja.

Csoportosításuk:

1. Az aromás gyűrűre oxigént/hidroxil csoportot építő

Funkcionálisan két részre oszthatók, *a*, hidroxiláz komponensek- egy vagy két (α , β) különböző, szorosan kapcsolódó alegységekből felépülő oligomerek, és *b*, elektron transzport komponensek. A hidroxiláz komponenseknek van két kofaktora az α alegységéhez kapcsolatan, egy vas-kén [2Fe-2S] centrum és egy mononukleáris nem-hem vas.

A reakcióhoz ez esetben is szükség van NAD(P)H-ra. Az enzimreakció során a NAD(P)H-t az enzimen levő FAD oxidálja, a FADH₂ kofaktorhoz kapcsolódik

az O₂, és egy reaktív hidroperoxiflavin tartalmú fehérje képződik. Ez egy reaktív köztiterméken keresztül hidroxilálja az aromás gyűrűt.

Enzim családok:

- Benzol 1,2-dioxigenázok (pl. benzol 1,2-dioxigenáz, toluol 2,3- dioxigenáz, naftalin 1,2- dioxigenáz)
- Nem meghatározott aromás gyűrű dioxigenázok (pl. ftalát dioxigenáz, 4-klórphenilacetát 3,4-dioxigenáz)

2. Az aromás gyűrű hasításában résztvevő

A gyűrűt hasító dioxigenázoknak a kettő vagy több hidroxil csoportot tartalmazó aromás gyűrűk szubsztrátjaik. A gyűrű felnyitásához külső redukánsra nincs szükségük.

Amennyiben a két hidroxil csoport egymáshoz viszonyítva *orto* pozícióban van a dioxigenázok több pozícióban is hasíthatják (II.8. ábra) az aromás gyűrűt (β -ketoacidat lebontási útvonalaként is ismert az alábbi két mechanizmusból kiinduló gyűrűbontás):

a, orto/intradiol hasító dioxigenázok a két hidroxil csoport között nyitják a gyűrűt

A hasítási termék mukonát, amely több lépcsőn keresztül végül szukcinátként lép a Szent-Györgyi-Krebs ciklusba.

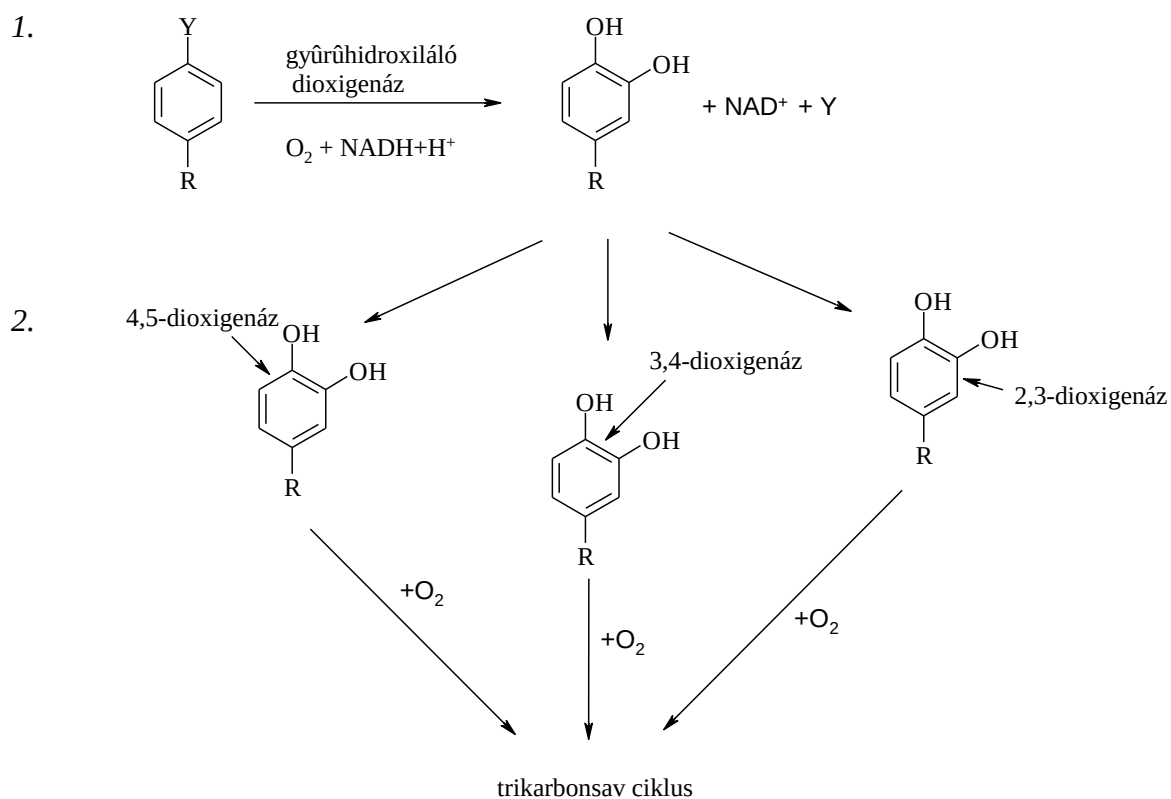
- 3,4-dioxigenázok

b, meta/extradiol hasító dioxigenázok a két hidroxil csoport mellett hasítanak

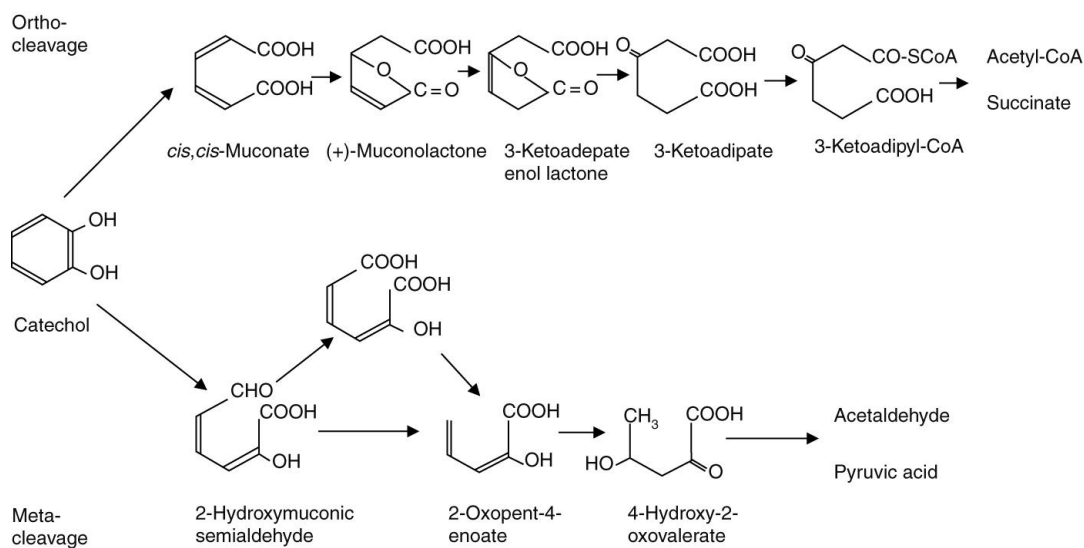
A hasítási termék hidroxi-mukonsav- szemialdehid, amely több lépcsőn keresztül végül piruvátként lép a Szent-Györgyi-Krebs ciklusba.

- 2,3- dioxigenázok
- 4,5- dioxigenázok

Ha a két hidroxil csoport *para* helyzetben van egymáshoz viszonyítva pl. gentizát, a karboxil csoport és a mellette lévő hidroxil csoport között hasítják a dioxigenázok a gyűrűt.



II. 7. ábra Hatásmechanizmusuk szerint többféle dioxigenázt különböztetünk meg



II.8. ábra A hasító helytől függően eltérő intermedierek keletkeznek a lebontás során

II.2.2.1 A multikomponensű oxigenázok elektron-transzport komponensei

A NAD(P)H oxidációjából két elektron keletkezik, de a hidroxiláz komponens redukciójához 2 önálló elektron-transzfer lépés szükséges. Ezt megoldja a hidroxiláz rész elektron-transzfer komponense, ebben a rendszerben az elektronok a NAD(P)H-ról a FAD-ra érkeznek, ezek a flavinok az elektron tárolók és innen megy tovább két lépésben a két elektron a vas-kén centrumhoz.

Összefoglalóan elmondhatjuk, hogy az oxigenázok egymástól nagyon eltérő szervezetekből származnak, szerkezetükben, reakció mechanizmusukban mégis számos közös tulajdonságot fedezhetünk fel. A szerkezeti tanulmányok azt mutatják, hogy a NAD(P)H, és FAD kötő régiók, valamint a vas-kén centrumok nagyon konzervált szekvenciák/szakaszok.

Baktériumokban a katabolikus gének, különösen a xenobiotikumok bontásáért felelős gének plazmidon kódoltak, néha transzpozon szekvenciák közé integráltak. A kromoszómán kódolt katabolikus gének pedig gyakran szupraoperon struktúrába szerveződtek. A környezetben megfigyeltek információ/talajdonság átadást különböző szervezetek között, melyek plazmidok segítségével, vagy kromoszómális gén mobilizációval, transzdukcióval, transzformációval és transzpozícióval lehetséges. Ezek a mechanizmusok generálhatnak genetikai változásokat a prokarióta és eukarióta sejtek között (mutációk léphetnek fel, melyek nem föltétlen járnak funkció vesztéssel/változással).

Érdekes, hogy a *P. putida* alkán hidroxiláza és xilol monooxigenáza szerkezettel hasonló, funkciójukban mégis eltérnek. Bár mindkét enzim ugyanazt a típusú reakciót katalizálja, de nincs közös szubsztrátjuk, melyet mindkét enzim bontana.

Megfigyelték, hogy gyakran összefüggés van a szubsztrát spektrum nagysága és a hatékonyság között. Sok szubsztrátot elfogadó enzimek hatékonysága gyakran gyengébb, mint a szűk spektrumú enzimeké.

A környezetvédelmi-bioremediációs eljárásokban, illetve ipari biotechnológiai célokra molekuláris biológiai módszereket bevetve módosítják az oxigenázokat a jobb hatékonyság és nagyobb szubsztrát spektrum elérése érdekében.

II.3. PAH szakirodalom feldolgozása a biotechnológiai megoldások szemszögéből

Bevezető

A PAH-ok elsősorban a fosszilis energiahordozók tökéletlen égésének termékei, mindenütt előfordulnak a természetben (a levegőben, talajban, üledékekben, felszíni-, és talajvizekben). Többségük komoly gondokat okoz genotoxikus, karcinogén hatásuk miatt és tartós jelenlétükkel a környezetben. A talajokban főleg lokális szennyezést okoznak, de pl. füstgázokkal nagy területre szétterjedhetnek. Mikrobiális lebontásuk gátolt a gyenge biohosszaférhetőség miatt, ami elsősorban gyenge vízdékonyságuknak köszönhető.

II.3.1 A policiklusos aromás szénhidrogének

A policiklikus aromás szénhidrogének (PAHs) nagy molekulatömegű (2-7 benzolgyűrűs) vegyületek (II.9. ábra). Általában (UMBBD adatbázis) jellemző rájuk szilárd halmazállapotúak, magas olvadás- és forráspont, alacsony gőznyomás, nagyon csekély mértékű vízdékonyság, ami a molekulatömeg növekedésével tovább csökken. A molekulák oxidációval, redukcióval szembeni ellenállóképessége és illékonyaságuk a molekulatömeg növekedésével együtt nő. A PAH-ok lipofil vegyületek, jól oldódnak szerves oldószerekben. A 2-3 gyűrűs molekulák toxikusak, ami a molekulatömeg növekedésével csökken. A 4-5 gyűrűs PAH-ok sokkal rezisztensebbek, mint a 2-3 gyűrűsek. Többségük komoly gondokat okoz genotoxikus, karcinogén hatásuk miatt és tartós jelenlétükkel a környezetben (II.10. ábra). A talajokban főleg lokális szennyezést okoznak, de pl. füstgázokkal nagy területre szétterjedhetnek. A talajban akár 10-15 évig is tartósan jelen lehetnek a talajszemcsékhez/humuszanyagokhoz kötötten (II.11. ábra).

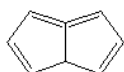
PAH-okat nem szintetizálnak kémiaiilag, hanem kőszénkátrány feldolgozás során a koncentrátumból izolálják őket egy tisztítási és kristályosítási lépést beiktatva, vagy a nyers kőolaj finomítási folyamatból származó olajmaradékból nyerik.

A PAH-okat főleg intermediér vegyületekként hasznosítják a gyógyszeriparban, mezőgazdaságban, fotográfiában, hőre keményedő műanyagok, kenőanyagok előállításában, a vegyiparban.

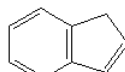
Nem biológiai jellegű eltávolításuk: volatilizáció, fotooxidáció, kémiai oxidáció, adszorpció-, adhézio a talaj mátrixhoz (II.12. ábra). A bioremediáció alkalmas alternatív remediációs eljárás a veszélyes anyagok bontására. Hatékony bioremediációs eljárás kidolgozásához először fel kell térképeznünk, és megértenünk a PAH-bontó szervezetek enzimikus folyamatait, metabolikus útjaikat. A biodegradáció, bioremediáció hatékonysága nagymértékben függ a környezeti és mikrobiális faktoroktól: a talaj típus, nedvesség tartalom, redox körülmények, elektronakceptorok, hőmérséklet, pH, szezonális faktorok, inorganikus tápanyagok jelenléte/hiánya, diffúziós- és fizikokémiai tulajdonságok, valamint a szennyezőanyag koncentrációjától, kémiai szerkezetétől. Mikrobiális lebontásuk gátolt a gyenge biohosszaférhetőség miatt, ami elsősorban gyenge vízdékonyságuknak köszönhető.

Több mikroorganizmus csoport is mutat PAH biodegradációs, biotranszformációs aktivitást (II.13. ábra):

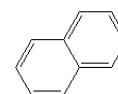
- **baktériumok:** *Pseudomonas*-ok, *Sphingomonas*-ok, *Acinetobacter*-ek, *Rhodococcus*-ok, *Mycobacterium*-ok...;
- **gombák:** *Phanerochaete chrysosporium*, *Cunninghamella elegans*...;
- **algák:** cianobaktériumok



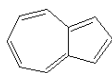
PENTALENE



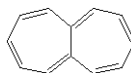
INDENE (CAS RN: 95-13-6)



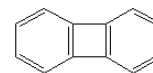
NAPHTHALENE (CAS RN: 91-20-3)



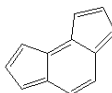
AZULENE (CAS RN: 275-51-4)



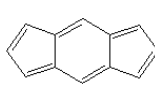
HEPTALENE



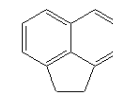
BIPHENYLENE (CAS RN: 259-79-0)



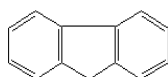
α -INDACENE



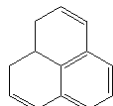
s-INDACENE



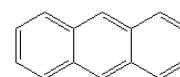
ACENAPHTHALENE (CAS RN: 83-32-9)



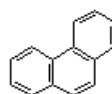
FLUORENE (CAS RN: 86-73-7)



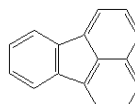
PHENALENE (CAS RN: 203-80-5)



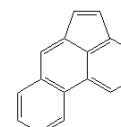
ANTHRACENE (CAS RN:120-12-7)



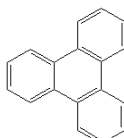
PHENANTHRENE



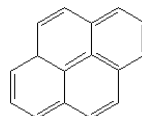
FLUORANTHENE (CAS RN: 206-44-0)



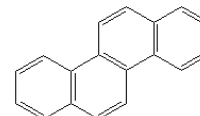
ACEPHENANTHRYLENE



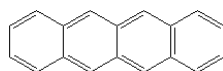
TRIPHENYLENE (CAS RN: 217-59-4)



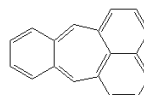
PYRENE (CAS RN: 129-00-0)



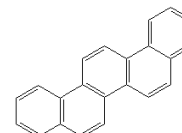
CHRYSENE (CAS RN: 218-01-9)



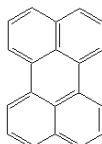
NAPHTHACENE (CAS RN: 92-24-0)



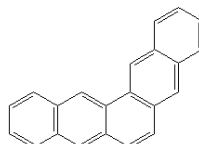
PLEIADENE (CAS RN:)



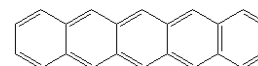
PICENE (CAS RN: 213-46-7)



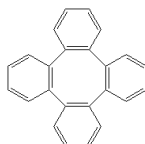
PERYLENE (CAS RN: 198-55-0)



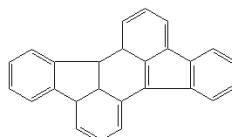
PENTAPHENE (CAS RN: 222-93-5)



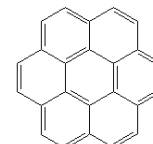
PENTACENE (CAS RN: 135-48-8)



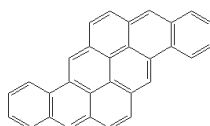
TETRAPHENYLENE (CAS RN: 212-74-8)



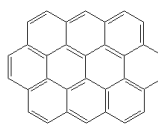
RUBICENE (CAS RN: 197-61-5)



CORONENE (CAS RN: 191-07-1)

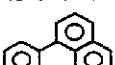
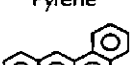
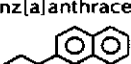


PYRANTHRENE (CAS RN: 191-13-9)



OVALENE (CAS RN:190-26-1)

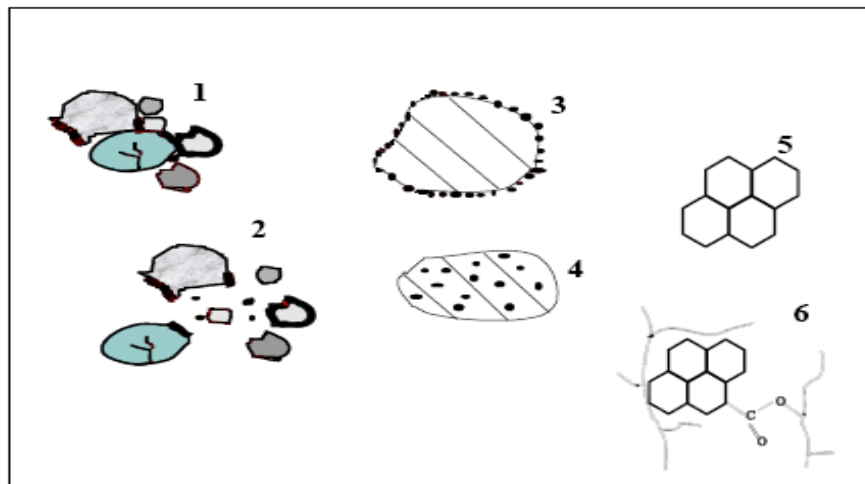
II.9. ábra
A PAH-ok alapvegyületei

	PAH	oldékonyság mg/l	karcinogenitás
Recalcitrance ↓	 Naphthalene	31.7	Nem karcinogén
	 Acenaphthene	3.9	Nem karcinogén
	 Anthracene	0.07	Nem karcinogén
	 Phenanthrene	1.3	Nem karcinogén
	 Fluoranthene	0.26	Gyengén karcinogén
	 Pyrene	0.14	Nem karcinogén
	 Benz[a]anthracene	0.002	karcinogén
	 Benzo[a]pyrene	0.003	karcinogén

II.10. ábra

A PAH-ok gyűrűszáma és vízoldékonysága, karcinogenitása közötti összefüggés

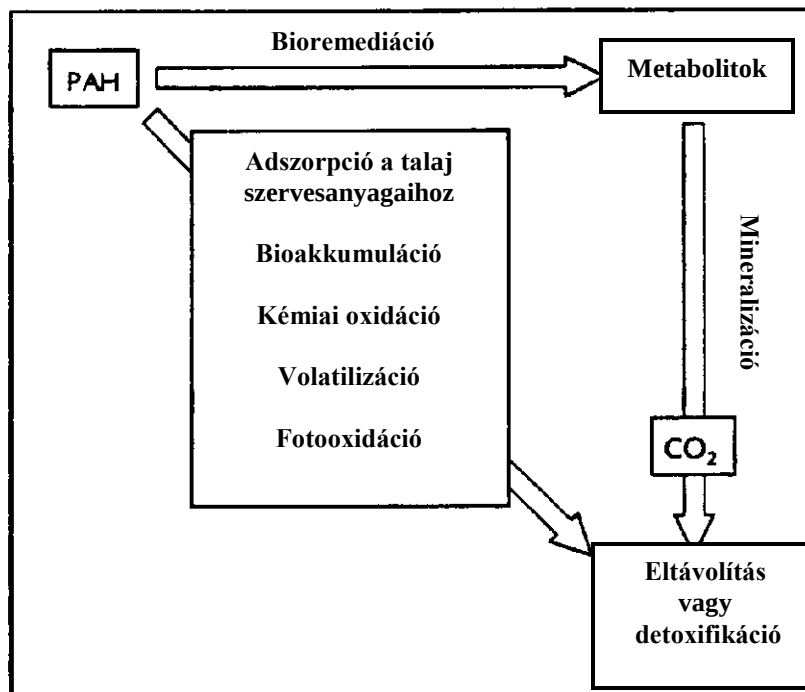
Az ábrán jól látszik, hogy minél több gyűrűs a molekula annál kevésbé oldódik vízben, ezzel egyenesen arányos ellenállása a környezeti tényezőkkel szemben. Meglepő, hogy az igen veszélyes anyagnak tartott antracén, fenantrén és pirén vegyületek nem tartoznak a karcinogén molekulák csapatába.



II.11. ábra

A szennyezés fizikai/kémiai állapotának sematikus ábrázolása talaj-víz rendszerben
(vastag fekete vonallal jelezve a szennyeződés)

1. talaj agglomerátum, 2. szuszpendált talajrészecskék, 3. adszorbeált állapot, 4. abszorbeált állapot, 5. oldatban lévő szennyezés, 6. kémiai kötással a talajmátrixhoz kapcsolódó szennyezés



II.12. ábra

A PAH-ok sorsa a környezetben

II.3.2 PAH-ok mikrobiális bontása

Számos **baktérium** képes a policklusos szerkezetet támadni (II.13. ábra) elsősorban oxigenáz enzimekkel [Cerniglia 1993]. A legjelentősebb baktérium család, a *Pseudomonas* család, melynek számos képviselője részt vesz aromás vegyületek bontásában pl.: *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. cepacia*, de találunk bontó szervezeteket az *Alcaligenes*-ek, *Acinetobacter*-ek, *Arhtrobacter*-ek között is.

A bakteriális PAH bontás során először egy dioxigenáz enzim katalizálta reakció a gyűrű hidroxilálása történik, miközben *cis*-dihidrodiool keletkezik. Monooxigenáz katalizálta oxidáció is lehetséges, ekkor egy arénoxidon keresztül *transz*-dihidrodioolok képződnek. A dihidrodiool molekulák szubsztrátjai a gyűrűhasító oxigenázoknak, a további katabolikus lépések során a folyamat a Szentgyörgyi-Krebs ciklusba lép.

A PAH-ok mikrobiális bontását általában a naftalinnal modellezzik, e vegyület biodegradációja a legjobban tanulmányozott. A reakciót multikomponensű enzimrendszer katalizálja, melyet naftalin dioxigenázként jelölnek. A *Pseudomonas putida* PpG7 törzs hordoz egy NAH7 plazmidot, mely azokat a géneket tartalmazza, melyek a naftalinlebontásért felelős enzimeket kódolják [Park 2002]. A gének a *nah* és *sal* operonokban találhatók. A *nah* operon a naftalin szaliciláttá alakításáért felelős enzimeket kódoló géneket tartalmazza, a *sal* operon pedig a szalicilát oxidálókat, és a “meta” típusú gyűrűhasító enzimeket kódoló géneket. A metán-oxidáló baktériumok monooxigenáz enzimeik segítségével számos xenobiotikumot képesek oxidálni. A *Methylococcus trichosporium* kometabolizálja a naftalint, 1- és 2-naftol keletkezik [Brusseau 1990].

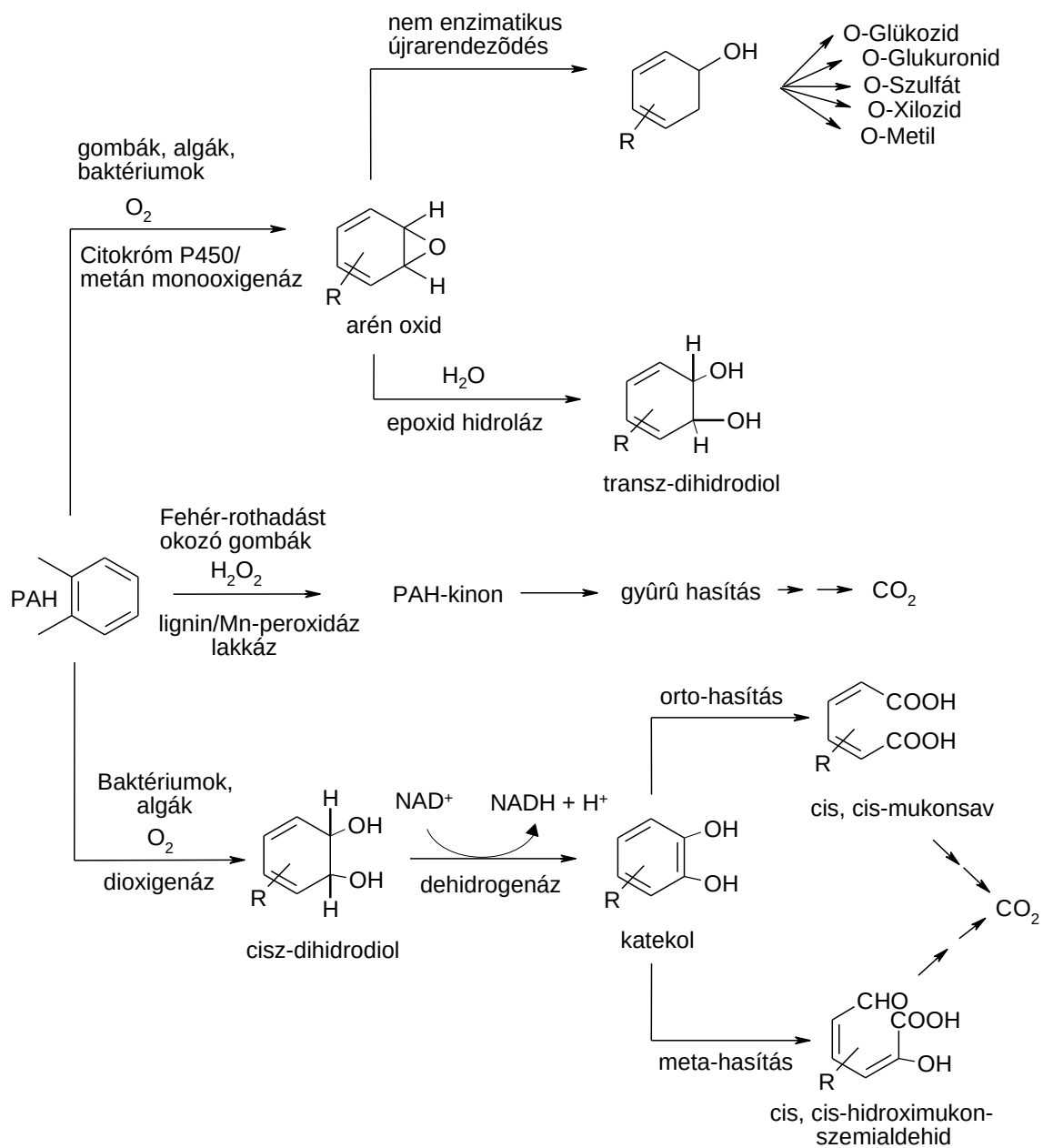
A **gombák** szintén fontos szerepet játszanak a PAH-ok bontásában (II.13. ábra), de nem hasznosítják azokat egyedüli szén-, és energiaforrásként, hanem kometabolizálják nem toxikus termékké [Cerniglia 1993].

A gombáknak biodegradáció szempontjából két fő csoportjuk van, a lignolitikus és nem lignolitikus gombák, mindkét csoportban találunk olyan törzseket, melyek képesek oxidálni a PAH vegyületeket. A reakcióban citokróm P450 monooxigenázok és lignin peroxidázok vesznek részt. A citokróm P450 monooxigenázok a molekuláris oxigén egyik atomját építik a gyűrűre, miközben arén oxid keletkezik, mely spontán

továbbalakul fenollá (pl. *Cunninghamella elegans*). A ligninperoxidázok azokat a PAH-okat oxidálják, melyeknek alacsonyabb az ionizációs potenciáljuk, mint 7,6 eV, a reakció során először kinon keletkezik. Az egyik legismertebb képviselőjük a *Phanerochaete chrysosporium*, mely az antracént antrakinonon át ftaláttá oxidálja, a fenantrént oxidálása során pedig difénsav keletkezik [Hammel 1991]. Ugyanezen faj nem-lignolitikus körülmények között is képes bontani a fenantrént, ekkor fenol és transz-dihidrodol keletkezik, mely citokrom P450 aktivitást sejtet [Sutherland 1991]. A harmadik PAH degradáló csoport a **cianobaktériumok és eukarióta algák** (II.13. ábra), melyek fotoautotróf körülmények között oxidálják pl. a naftalint 1-naftollá. Az *Oscillatoria* sp. JCM cianobaktérium törzsben ez az átalakítás arénoxid intermedieren keresztül megy végbe [Narro 1992], ami a gombák esetén látott monooxygenáz katalizálta reakcióra utal.

A *Selenastrum capricornutum* zöld alga fotoautotróf körülmények között metabolizálni képes a benzo[a]pirént miközben *cis*-11,12-dihidroxi-11,12-dihidrobenzo[a]pirén képződik [Warshawsky 1990]. A *cis*-dihidrodol képződése a heterotróf baktériumokra jellemző dioxigenáz katalizálta reakcióra utal.

Az aerob folyamatokban az O₂ esszenciális, nemcsak mint elektron akceptor, de be is épül az aromás gyűrűbe. Azonban gyakran előfordul, hogy a szennyezett területen az oxigén mennyisége korlátozott, így az aerob folyamatok gátlódnak, ezért nagyon fontos, hogy anaerob lebontási útvonalakat is vizsgáljunk. Denitrifikáló körülmények között bizonyították pl. a naftalin, acenaftén lebontását. Mikrobiális konzorcium segítségével [Chang 2002] eltérő mértékben bonthatók a PAH vegyületek: fenantrén > pirén > antracén > fluorén > acenaftén. Kevert PAH szubsztrátok esetén a biodegradáció mértéke jobb, mint egyedi szubsztrátok esetén. Az optimális körülmények enyhén lúgos (pH=8,0) környezetben 30°C-on voltak. A biodegradáció hatásfoka javítható egyéb szervesanyagok: acetát, laktát, piruvát adagolásával. A különböző redukáló körülményeket összehasonlítva, a legnagyobb mértékű degradáció szulfátredukáló körülmények között figyelhető meg, majd metanogén környezetben, és végül nitrát redukáló feltételek mellett.

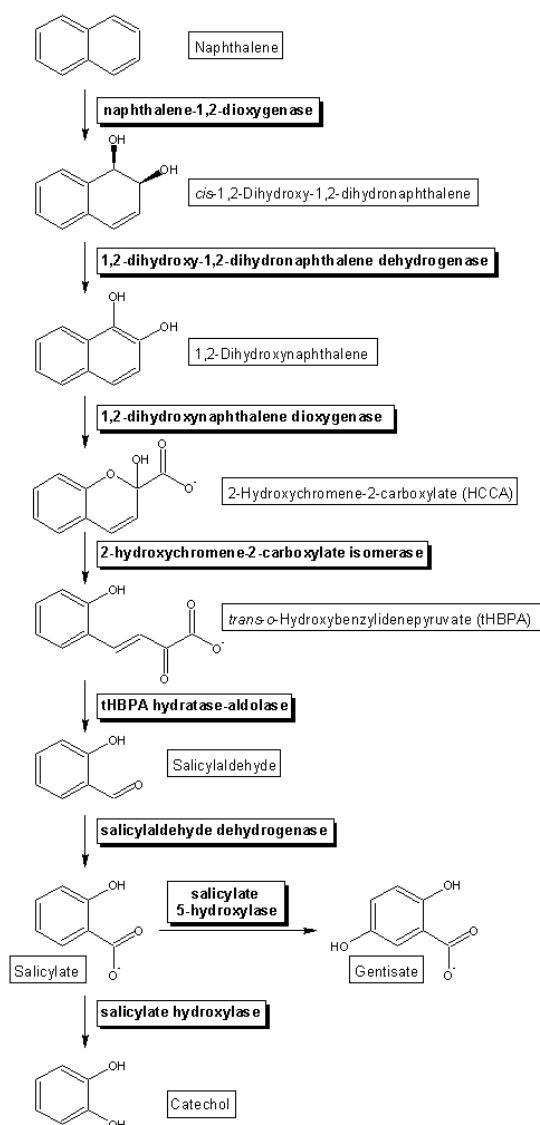


II.13. ábra
A PAH-ok mikrobiális lebontásának kezdeti oxidációs lépései
(összefoglaló ábra)

II.3.3. Metabolikus utak

II.3.3.1. Naftalin

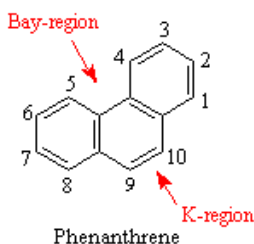
Biciklusos aromás szénhidrogén, modell vegyület a PAH-ok tulajdonságainak vizsgálatában. A naftalin és származékai nyers kőolajban és kőolajtermékekben fordulnak elő. Metabolizmusa a naftalin-dioxigenáz enzim katalizálta reakcióval indul aerob baktériumokban (II.14. ábra). Érdekes megemlíteni, hogy ez az enzim számos más reakciót is katalizál, pl. a kék “jean” festék, az indigó szintetizálásában felhasználják.



II.14. ábra

II.3.3.2. Fenantrén

A PAH-ok általában, így a fenantrén is, megtalálható/gyakori szennyezők talajban, vízben, vízi üledékekben. Bár a fenantrén nem mutagén vagy karcinogén, de toxikus, főleg a vízi élőlényekre. Triciklusos aromás szénhidrogén, mely rendelkezik “bay-régió”-val és “K-régió”-val (II.15. ábra), ezért gyakran használják modell szubsztrátként a karcinogén PAH vegyületek metabolizmusának tanulmányozására.

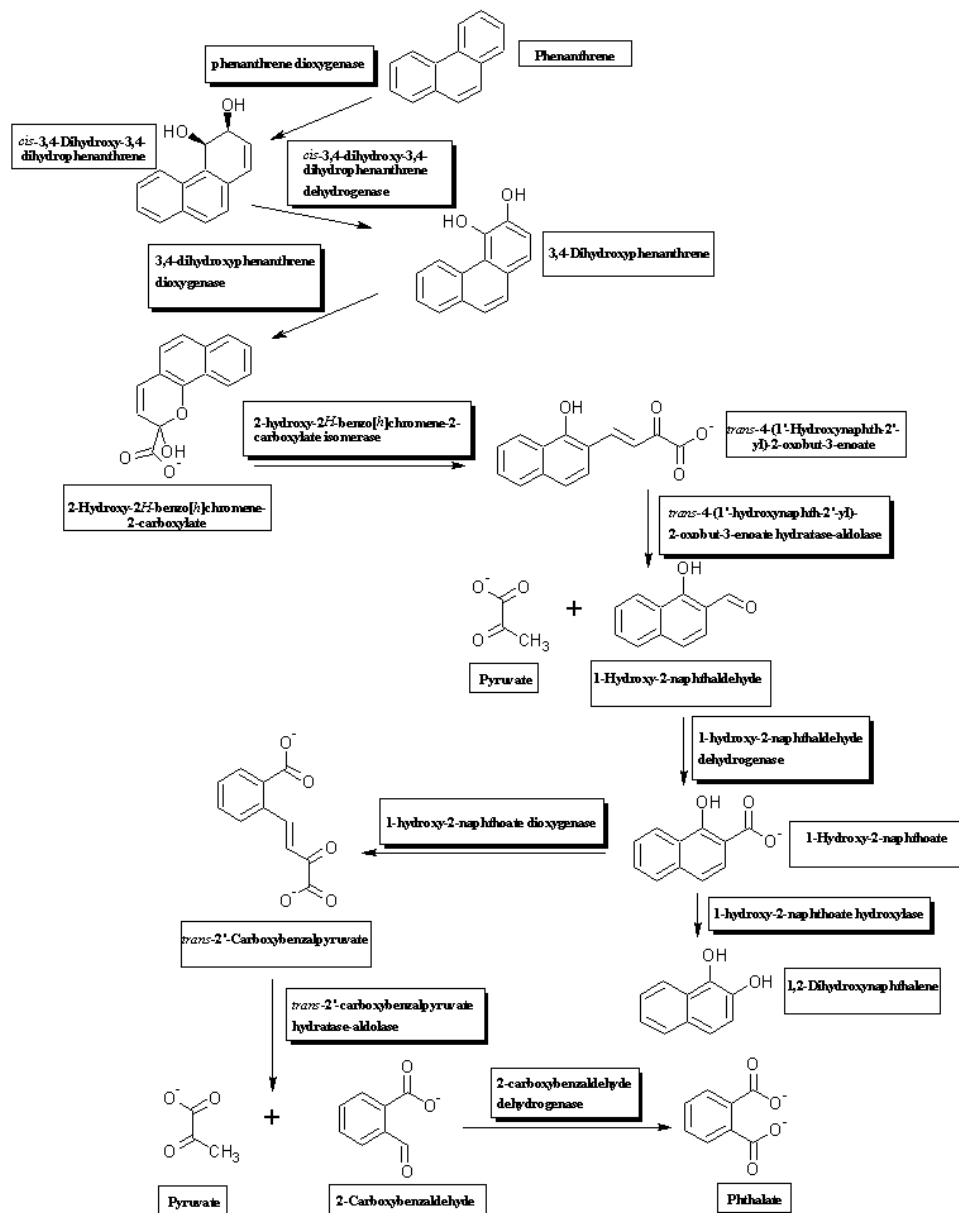


II.15. ábra

A fenantrént a talajlakó baktériumok kétféle úton képesek bontani. Az egyik út a ‘naftalin lebontási útvonal’-ba torkollik, a másik pedig a ‘ftalát út’-ba. Általában a baktériumok a fenantrént képesek egyedüli szén-, és energiaforrásként hasznosítani azáltal, hogy dioxigenáz enzimük elsősorban a “bay-régió”-ban támadva a molekulát fenantrén *cis*-dihidrodlióllá alakítják, majd további lépéseken keresztül hasítják a gyűrűt (II.16. ábra). Ellenben néhány cianobaktérium, és sugárgomba (II.17a., II.17b. ábra) ettől eltérően, inkább az emlősök, illetve gombák metabolizmusát követve a “K-régió”-ban támadják a molekulát monooxygenáz enzimet használva, így *trans*-dihidrodliol keletkezik.

A baktériumok mellett a gombák is képesek enzimeikkel átalakítani a fenantrén molekulát (II.18., II.19. ábra). Azonban a baktériumoktól eltérően nem képesek egyedüli szén-, és energiaforrásként hasznosítani, hanem kometabolizálják, miközben hidroxilált termék keletkezik. Számos nem-lignolitikus gomba a fenantrént erősen régió-, és szteroszelektív módon metabolizálja citokróm P-450 monooxygenáz és epoxid hidroláz enzimek segítségével, így fenantrén *trans*-1,2 ill. *trans*-3,4 és *trans*-9,10-dihidrodliolok, illetve 1-, 2-, 3-, 4-, és 9-fenantrolok képződnek, továbbá az

elsődleges metabolitok szulfát-, glükozid-, és glükuronid konjugátjai. Bár a fő enzimatisz támadási pont gombák esetén az 1,2- és 3,4-pozíciók (bay-régió), mégis előfordul itt is a 9,10-pozíció (K-régió) támadása (hasonlóan az emlős enzimatisz folyamatához).

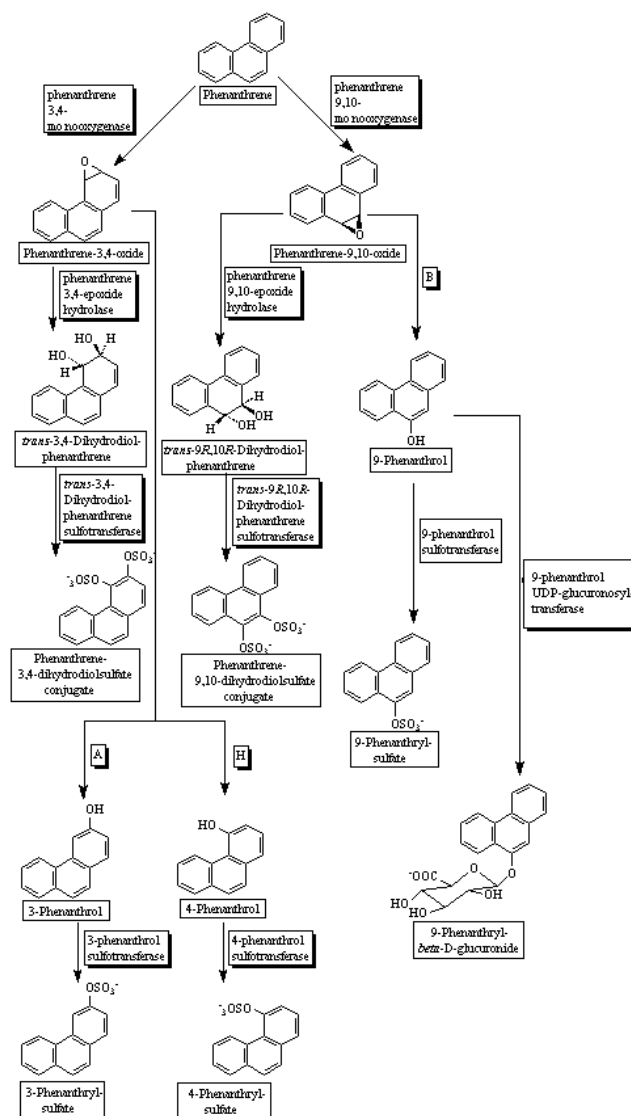


II.16. ábra

Aeromonas sp. S45p1, ill. *Pseudomonas* sp. S47p1 baktérium törzsekben megfigyelt lebontási út vonal

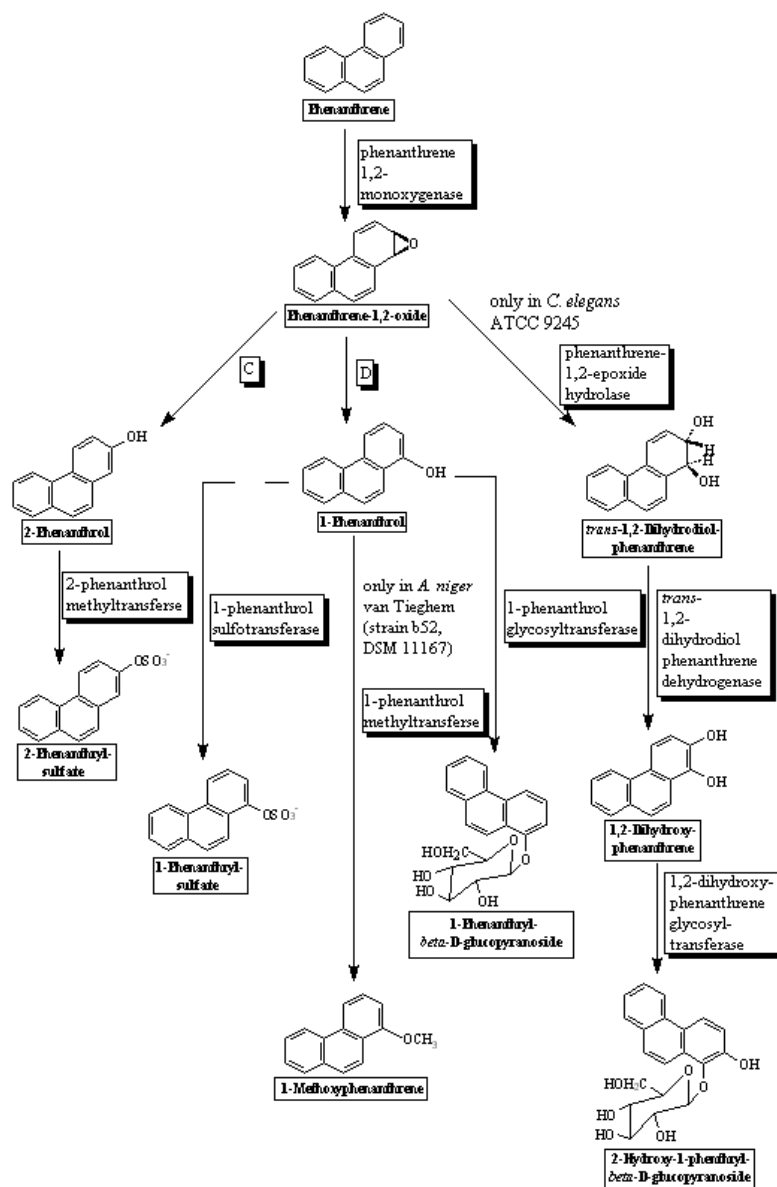


Érdekessége a két lebontó folyamatnak (II.17. ábra), hogy jobban hasonlít az emlősökben ill gombákban leírt enzim rendszerekhez, mint a baktériumok által katalizált folyamatokhoz. Mindkét esetben az első lépés a fenantrén oxidációja egy monooxygenáz-epoxid hidroláz katalizálta reakcióban trans-9,10-dihidrodiol molekulává (és nem dioxigenáz támadás történik!). Egy gyors nem enzim-katalizálta izomerizációval fenantrol képződik. E vegyületet a *Synechococcus* metiltranszferáza 1-metoxifenantrénné alakítja.



II.18. ábra

Pleurotus ostreatus lignolitikus gomba (a lignolitikus *Phanerochaete chrysosporium* is hasonlóan bontja, csak első metabolikus lépésben keletkezik eltérő enantiomer), *Synecephalastrum racemosum* nem lignolitikus gomba fenantrén bontása



II.19. ábra
Cunninghamella elegans gombában feltérképezett metabolikus út

II.3.3.3. Fluorén

Tricklusos aromás szénhidrogén, mely tartalmaz két hattagú-, és egy öttagú aromás gyűrűt. A fosszilis energiahordozók, és származékaik fő komponense, de melléktermékként megjelenik a kőszénfeldolgozó-, és energia iparban is. Gyakran találkozunk vele kipufogó gázokban, nyers-, motorolajban, szén- és olaj égéstermékekben. Alapanyaga festékek, pigmentek, peszticidek, hőálló műanyagok, és gyógyszerek előállításának. A fluorén szerepel az EPA Elsődleges Szennyezők listáján, tehát környezetbarát eltávolítása a környezetből különösen fontos.

Mivel szerkezeti hasonlóságot mutat más toxikus vegyületekkel (pl. karbazol, dibenzotiofén, dibenzofurán, dibenzodioxin), ezért mint modell vegyületet felhasználják a biodegradációs folyamataik vizsgálatában.

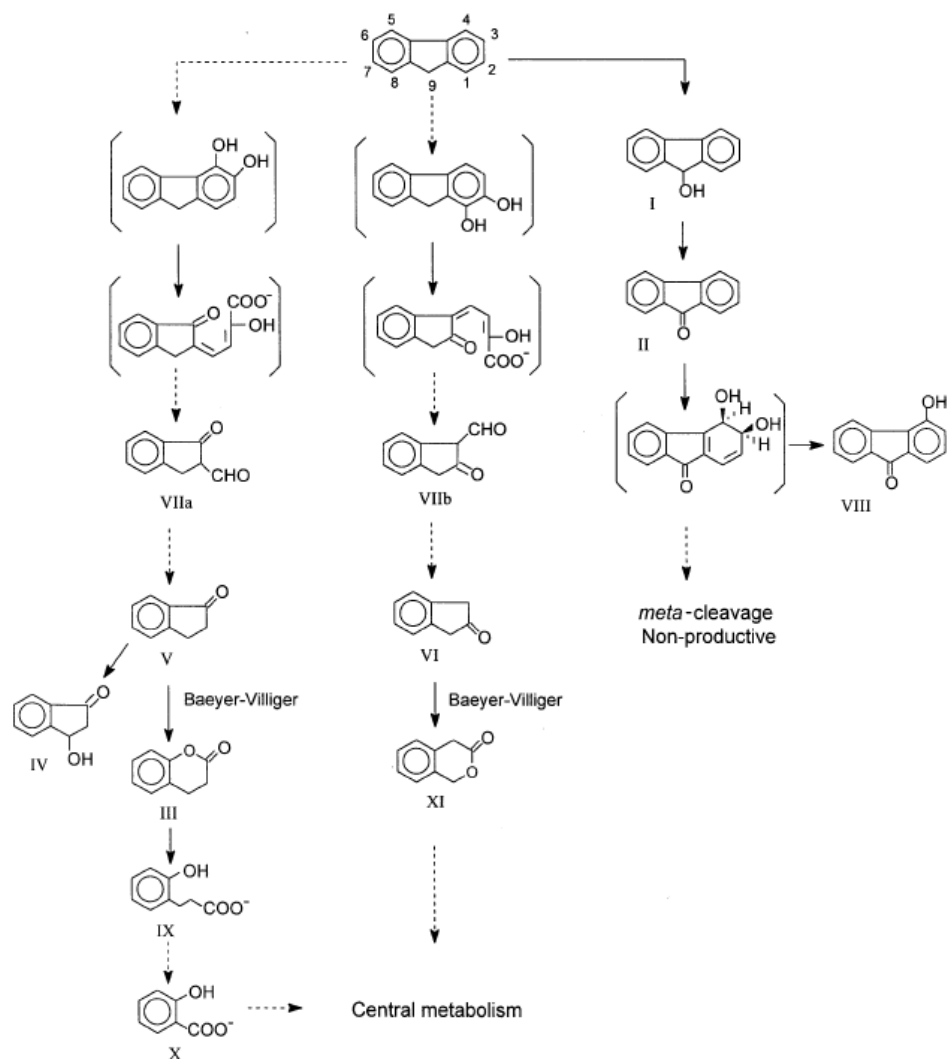
Szerkezete, mely tartalmaz aromás és aliciklusos részeket is lehetővé teszi a biokémiai támadások több variációját is.

Casellas 1997-ben két lehetséges lebontási utat is leírt egy *Arthrobacter* törzsben (II.20. ábra). A C-9 pozícióban monooxygenáz enzim támadás eredményeként 9-fluorenon keletkezik, de nem alakult tovább, akkumulálódott. Az alternatív út dioxigenációval kezdődik a C-1, C-2, C-3 és C-4 pozícióban, *cis*-dihidrodiolekt keletkezése közben, melyek további oxidációs lépésen át, egy extradiol dioxigenáz támadásának kitéve meta-hasítással bomlanak. Egy további aldoláz reakció és a gyűrűhasítás utáni dekarboxiláció eredménye indanon molekulák keletkezése, melyek szubsztrátjai a biológiai Baeyer-Villiger reakciónak.

Egy másik lebontó útvonalat *Sphingomonas* sp. LB126, *Brevibacterium* sp. DPO1361, és *Pseudomonas* sp. F274 törzsekben figyelt meg Wattiau [Wattiau 2001]. Ebben az esetben a fluorén ftálsavvá és 2-hidroxipenta-2,4-dienoáttá alakul 9-fluorenon és egy bifenil intermediereken keresztül.

Herwijnen és mtsai [Herwijnen 2003] megfigyelték, hogy a *Sphingomonas* sp. LB126 törzs a fluorént képes metabolizálni, egyedüli szén-, és energiaforrásként hasznosítani (II.21. ábra). A fenantrént, antracént, fluorantént, dibenzotiofént „csak” kometabolizálni képes, azaz szénforrásként egyéb szubsztrátot hasznosít, pl. glükózt. A fluorén metabolizmusára bizonyíték volt GC-MS készülékükkel kimutatott intermedierek jelenléte: 9-fluorenot, 9-fluorenon, és protokatekol. Előzetes

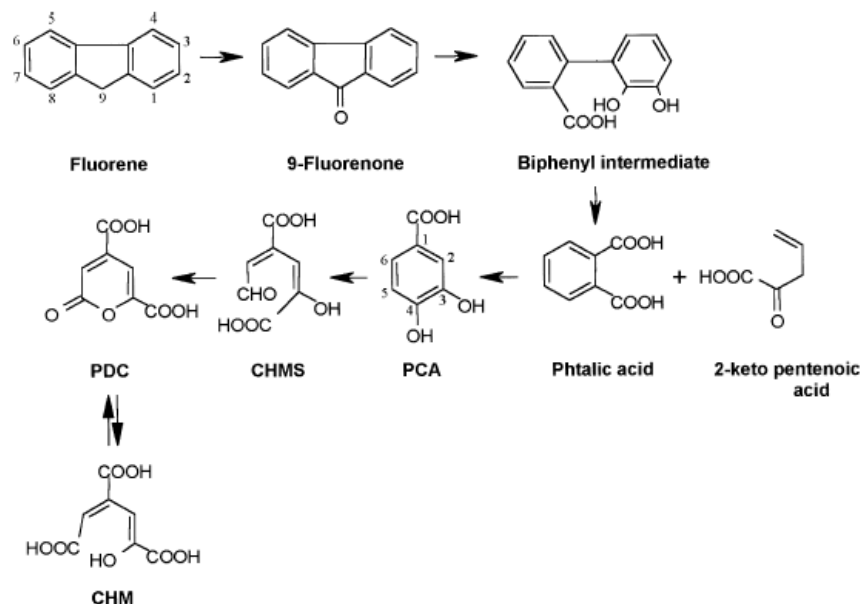
kísérletekben a fluorén bontás első lépésének termékeit már kimutatták *Brevibacterium*-ban és *Pseudomonas*-ban [Trenz 1994, Grifol 1994].



II.20. ábra

Fluorén bontása *Arthrobacter sp.*-vel

A zárójeles intermediereket nem tudták kimutatni, csak feltételezik létezésüket a folyamatban. A római számoknak megfelelő kémiai nevek: I. 9-fluorenol, II. 9-fluorenon, III. 3,4-dihidrookumarin, IV. 3-hidroxi-1-indanon, V. 1-indanon, VI. 2-indanon, VIIa és VIIb 2-formil-1-indanon és 1-formil-2-indanon, VIII. 4-hidroxi-9-fluorenon, IX. 3-(2-hidroxiifenil) propionát, X. szalicilát, XI. 3-izokromanon



II.21. ábra

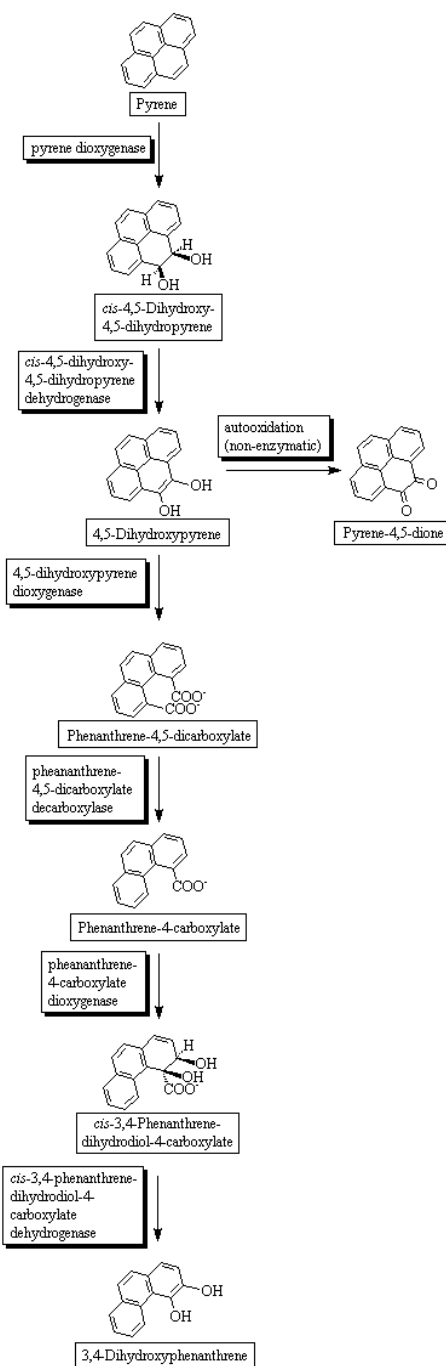
Fluorén bontása *Sphingomonas* sp. LB126 törzsben

II.3.3.4. Pirén

Négy gyűrűs PAH, nem karcinogén, de számos üzemi folyamat, és nem tökéletes égetési műveletek melléktermékeként megjelenik a környezetben. Bakteriális biodegradációjára láthatunk példát a benzo[a]pirén kometabolizmusa során. E lebontást azért is érdemes alaposan feltérképezni, mert a benzo[a]pirén egyike a CERCLA Veszélyes Anyagok Top20-as listáján szereplő vegyületeknek.

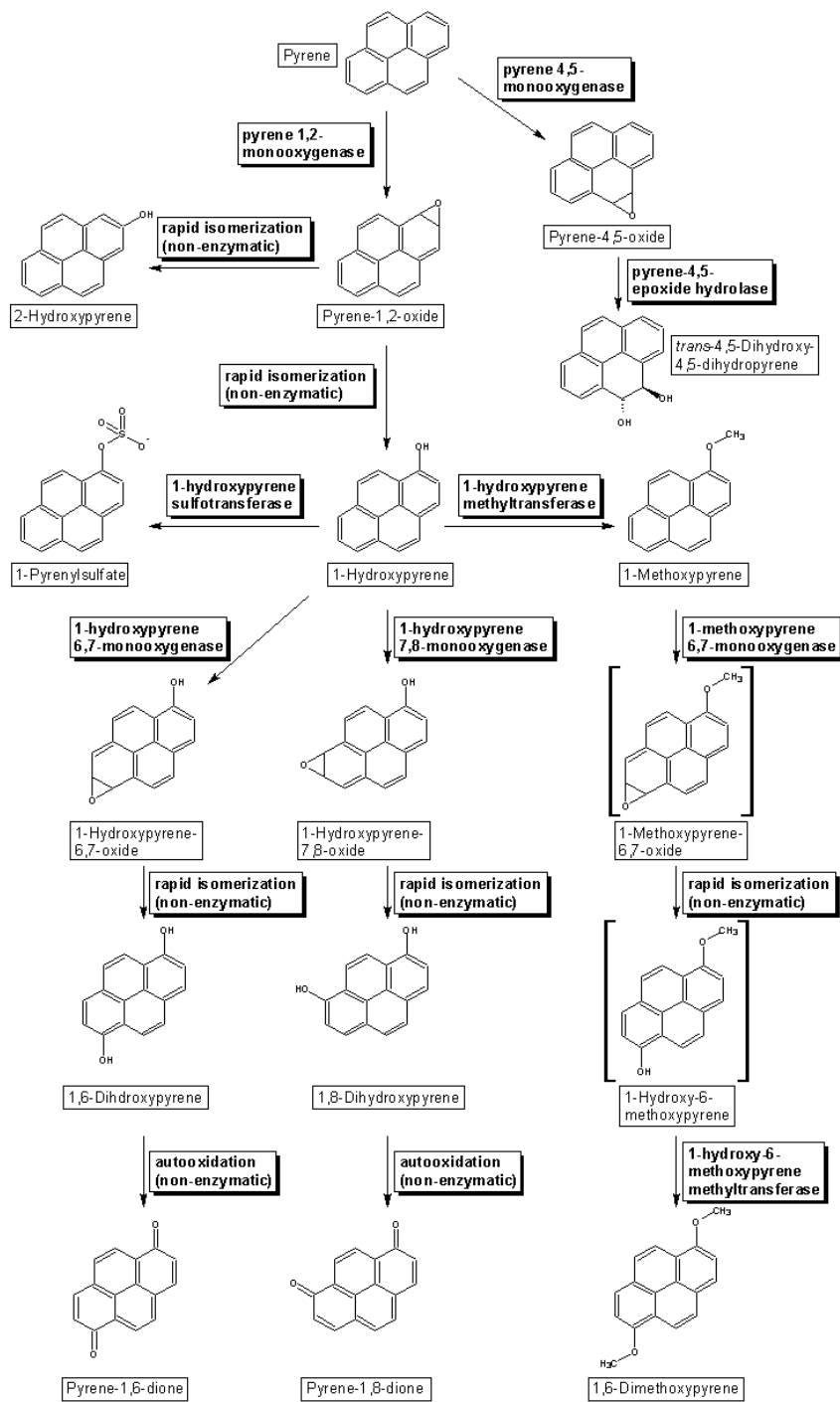
A pirént bontják baktériumok, és gombák is. Kezdeti lépésként baktériumokban találkozunk mono-, és dioxigenáz támadással is, míg a gombákra csak monooxygenáz katalizálta reakció jellemző. A II.22. ábrán a dioxigenázzal indított biodegradáció folyamata látható, melyet *Mycobacterium flavescens* [Deanross 1996], és több másik *Mycobacterium* fajban is kimutattak [Churchill 1999, Cheung 2001], valamint jellemző még ez a reakció *Pseudomonas stutzeri*-ben, sőt *Bacillus cereus*-ban is leírták [Kazunga 2000]. A II.23. ábrán monooxygenáz támadással kezdődő biodegradációs folyamatokat látunk. A pirén 4,5-monooxygenáz reakció jellemző baktériumokra, pl. *Mycobacterium* fajokban, illetve *Pleurotus ostreatus* gombában, a

másik útvonalban pirén-1,2-monooxigenáz támadja a molekulát, ami *Aspergillus niger* SK9317, *Penicillium glabrum* TW9424, *Cunninghamella elegans*, *Trametes versicolor* gombákban bizonyított.



II.22. ábra

Baktériumokban megfigyelt dioxigenáz támadással indított pirén metabolizmus



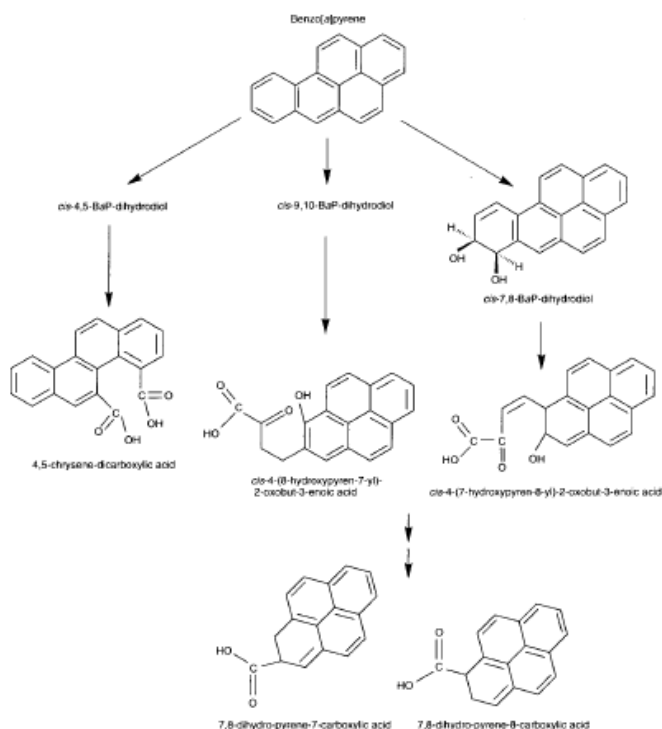
II.23. ábra
Monooxigenáz enzimekkel indított pirén metabolizmus

II.3.3.5. Nagy molekulású PAH-ok (HMW PAH) biodegradációja

A PAH-ok nagy és diverz csoportja a szerves vegyületeknek. Kémiai tulajdonságaikat nagymértékben meghatározza a gyűrűk száma, kapcsolódása, stb. Általában a molekula méretének növekedése, és szögletessége növeli a hidrofóbicitásukat és elektrokémiai stabilitásukat. Ez a két fő faktor, melyek meghatározzák perzisztenciájukat a környezetben, pl. a 3 gyűrűs fenantrén féléletideje talajban, üledékben 16-126 nap, míg az 5 gyűrűs benzo[a]pirén (BaP) féléletideje 229-1400 nap is lehet. A HMW PAH-ok karcinogének, mutagének, toxikusak. Kanaly és mtsai 2000-ben írtak összefoglalót e molekulák biodegradációjáról. Az 1990-es évek előtt nem volt ismert metabolizmus ezekre a vegyületekre (egy kivétellel lásd lentebb). A legkorábbi hivatkozás 1988-ban volt, Heitkamp és Cerniglia írt le Gram-pozitív baktériumokat, melyek kometabolizáltak egyes HMW PAH-okat pl. fluorantén, pirén, 1-nitropirén, 3-metilcolantrén, 6-nitrokrizén, és benzo[a]pirén. A négy gyűrűs PAH-ok bontására a pirén bemutatásával már láttunk példát, ebben a részben az 5, vagy több gyűrűs PAH-ok biodegradációjával foglalkozunk. Jelenleg nagyon limitált információ áll rendelkezésünkre, és a megjelent publikációk főleg a BaP lebontását boncolgatják. Már 1975-ben Gibson és mtsai foglalkoztak e vegyület tartós jelenlétével a környezetben, illetve biodegradációjával üledékek mikroorganizmusaival. Sikerült izolálniuk egy *Beijerinckia* törzset, melynek mutáns változatával szukcinát és bifetil szubsztrátokon növesztve képesek voltak kometabolizálni a BaP-t. A *Mycobacterium* sp. PYR-1 törzs, mely bontja a pirént, bizonyos feltételek mellett bontotta a 0,5 mg/l koncentrációban jelenlévő BaP-t (II.24. ábra) bizonyos mértékig [Heitkamp 1988]. Üledékkel kevert tóvízben ez a törzs képes volt bontani 25 ppb BaP-t, bár csak 3,6%-át 28 nap alatt. E *Mycobacterium* törzsről leírták, hogy hatgyűrűs PAH keverékben is bontja némileg a BaP-t [Kelly 1995]. Kometabolikus biodegradációját leírták a dibenzo[a,h]antracénnek és BaP-nek (50 mg/l konc-ban) *Burkholderia cepacia* törzsben 100 mg/l fenantrén jelenlétében [Juhász 1997]. A két vegyület 41 és 52 %-ban bomlott el 56 nap alatt.

Mostanában jelentek meg olyan cikkek, mely anaerob oxidációját mutatják be a HMW PAH-oknak miközben szén-dioxid keletkezik szulfát redukáló körülmények

között óceáni üledékekben [Coates 1997]. Ez az új irány azt jelzi, hogy korántsem ismerünk még mindent a PAH-ok bontásáról.



II.24. ábra

Benzo[a]pirén biodegradációja Mycobacterium törzsben

II.3.4. A bontási körülmények vizsgálata

A megfigyelések azt mutatják, hogy számos esetben a PAH degradáló törzs bejuttatása a szennyezett talajba nem járt együtt a PAH koncentráció jelentős csökkenésével. Ennek természetesen több magyarázata van, pl. a „benszülött” mikroflórával szemben nem ellenálló a bejuttatott törzs, vagy a talaj minősége, a környezeti feltételek nem megfelelőek [Kastner 1998]. Immobilizációval javítható a mikrobák túlélése [Wiesel 1993], de ez sem mindig vezet eredményre. További a bontó szervezet számára szerves szénforrás, valamint egyéb ásványi tápanyagok adagolása [Weir 1995] javíthatja a bontás hatékonyságát (azonban további szervesanyag bejuttatása a szennyezett területre általában nagy ellenállásba ütközik, mégha ez a szennyezés csak átmeneti). A sókoncentráció és a pH szintén komoly

befolyással bír a bontó szervezetekre [Leahy 1990], pl. savanyú környezetben a baktériumok aktivitása általában gátolt.

Felületaktív anyagok alkalmazása a biodegradációban jelentősen javíthatja a lebontást, hiszen hidrofób anyagokról lévén szó, azok nem oldódnak vízben. Felületnöveléssel azonban, hozzáférésüket tudjuk javítani, valamint permeabilisabbá válik a sejtfal is, ha felületaktív anyagokat alkalmazunk [Willumsen 1998].

Összefoglalóan elmondhatjuk, hogy számos mikroorganizmus képes a PAH vegyületeket bontani, ha megfelelő körülményeket biztosítunk számukra.

II.3.5. Irodalomjegyzék

- UMBBD Biodegradation database: <http://umbbd.ahc.umn.edu/index.html>
- Brusseau G.A., T. Hsien-Chyang, R.S. Hanson, L.P. Wackett.** 1990. Optimization of trichloroethylene oxidation by *Methanotrophs* and the use of a colorimetric assay to detect soluble methane monooxygenase activity. *Biodegr.* **1**: 19-29.
- Cerniglia C.E.** 1993. biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Curr. Op. Biotech.* **4**: 331-338
- Casellas M., Grifoll M., Bayona J.M., Solanas A.M.** 1997. New metabolites in the degradation of fluorene by *Arthrobacter* sp. strain F101, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 819–826.
- Chang B.V., L.C. Shiung, S.Y. Yuan.** 2002. Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. *Chemosphere* **48**: 717-724
- Cheung Pui-Yi and B.K. Kinkle.** 2001. *Mycobacterium* Diversity and Pyrene Mineralization in Petroleum-Contaminated Soils. *Appl. Environm. Microbiol.* **67**(5): 2222–2229
- Churchill S.A., J.P. Harper, P.F. Churchill.** 1999. Isolation and characterisation of a *Mycobacterium* species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons. *Appl. Environm. Microbiol.* **65**(2): 549-552
- Coates, J. D., J. Woodward, J. Allen, P. Philp, and D. R. Lovley.** 1997. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3589–3593.
- Deanross, D., and C. E. Cerniglia.** 1996. Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**:307–312.
- Gibson, D. T., M. Venkatanayarana, D. M. Jerina, H. Yagi, and H. Yeh.** 1975. Oxidation of the carcinogens benzo[a]pyrene and benzo[a]anthracene to dihydrodiols by a bacterium. *Science* **189**:295–297.
- M. Grifoll, S.A. Selifonov, P.J. Chapman.** 1994. Evidence for a novel pathway in the degradation of fluorene by *Pseudomonas* sp. strain F274, *Appl. Env. Microbiol.* **60**: 2438–2449.

- Hammel K.E., B. Green, W.Z. Gai.** 1991. Ring fission of anthracene by a Eukaryote. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**:10605-10608.
- Hammel K.E., W.Z. Gai, B. Green, M.A. Moen.** 1992. Oxidative degradation of phenanthrene by the ligninolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1831-1838.
- Heitkamp, M. A., and C. E. Cerniglia.** 1988. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1612–1614.
- R. van Herwijnen, P. Wattiau, L. Bastiaens, L. Daal, L. Jonker, D. Springael, H.A.J. Govers, J.R. Parsons.** 2003. Elucidation of the metabolic pathway of fluorene and cometabolic pathways of phenanthrene, fluoranthene, anthracene and dibenzothiophene by *Sphingomonas* sp. LB126. *Res. Microbiol.* **154**: 199–206
- Juhasz, A. L., M. L. Britz, and G. A. Stanley.** 1997. Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene and dibenz[a,h]anthracene by *Burkholderia cepacia*. *J. Appl. Microbiol.* **83**:189–198.
- R.A. Kanaly and S.I Harayama.** 2000. Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *J. Bacteriol.* **182** (8): 2059–2067
- Kastner M., M. Breuer-Jammali, B. Mahro.** 1998. Impact of Inoculation Protocols, Salinity, and pH on the Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Survival of PAH-Degrading Bacteria Introduced into Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(1): 359–362
- Kazunga C., M.D. Aitken.** 2000. Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(5): 1917-1922
- Kelley, I., J. P. Freeman, F. E. Evans, and C. E. Cerniglia.** 1991. Identification of a carboxylic acid metabolite from the catabolism of fluoranthene by a *Mycobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:636–641.
- Leahy, J. G., and R. R. Colwell.** 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* **54**:305–315.
- S.P. Trenz, K.-H. Engesser, P. Fischer, H.-J. Knackmuss.** 1994. Degradation of fluorene by *Brevibacterium* sp. strain DPO 1361: A novel C–C bond cleavage mechanism via 1,10-dihydro-1,10-dihydroxyfluoren-9-one. *J. Bacteriol.* **176**: 789–795.
- P. Wattiau, L. Bastiaens, R. van Herwijnen, L. Daal, J.R. Parsons, M.-E. Renard, D. Springael, G.R. Cornelis.** 2001. Fluorene degradation by *Sphingomonas* sp. LB126 proceeds through protocatechuic acid: A genetic analysis. *Res. Microbiol.* **152**: 861–872.
- Weir, S. C., S. P. Dupuis, M. A. Providenti, H. Lee, and J. T. Trevors.** 1995. Nutrient-enhanced survival of and phenanthrene mineralization by alginate-encapsulated and free *Pseudomonas* sp. UG14Lr cells in creosote-contaminated soil slurries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**:964–951.
- Wiesel, I., S. M. Wußker, and H.-J. Rehm.** 1993. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by an immobilized mixed bacterial culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**:110–116.
- Willumsen P.A., U. Karlson, P.H. Pitchard.** 1998. Response of fluoranthene-degrading bacteria to surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**: 475-483.

II.4. Halogénezett alifás és aromás szénhidrogének biodegradációja

Bevezető

A huszadik század második felében a fejlődő ipari vállalatok versenyképességük, piaci részesedésük megőrzése érdekében vegyszerek egész sorát bocsátották kereskedelmi forgalomba. Tették mindezt úgy, hogy a megfelelő hatástanulmány (termékeiknek a természeti környezetre, élővilágra gyakorolt hatásának vizsgálata) elkészítésére csak jóval ezután került sor, amikor az alkalmazási területen már jelentős egészségügyi, környezeti problémák jelentkeztek és a beavatkozás elkerülhetetlen volt. A nemzetközi szabványok fokozatos felülbírálásának, szigorításának eredményeként, a gyarapodó környezetvédő csoportok és politikai „zöld” pártok, mozgalmak nyomására, ill. a környezetünkhöz fűződő szemlélet megváltozásával a hetvenes évektől már tudományosan is helytálló felmérések, vizsgálatok kezdődtek a súlyos környezeti károk helyreállítására. A környezet rekonstrukciójának költségigénye sem elhanyagolandó; mára már elfogadottá vált, hogy épp a vegyiparban vagy olajiparban érdekelt cégek forgatják vissza a keletkezett haszon egy részét a környezetvédelembe. Manapság a fogyasztók is előnyben részesítik azokat a termékeket, melyek környezetbarát technológiák-, vagy akár vegyszerek mérsékelt felhasználásával, esetleg teljes mellőzésével („bio”-termékek) készültek, még ha ezek drágábbak is.

Az általánosan elterjedt fizikai, kémiai technológiákkal már nem megoldható a kis koncentrációban jelenlévő szennyeződések eltávolítása. Erre a feladatra a legalkalmasabb módszerek a biológiai eljárások, melyek során a mikroorganizmusok nyomnyi mennyiségű szerves anyagot is képesek felhasználni, átalakítani ártalmatlan vegyületté.

A klórozott aromás szénhidrogén család tagjait pl. oldószerként, peszticidként alkalmazták korábban, napjainkra azonban felhasználásuk jelentősen csökkent. Az évekkel ezelőtt nagy mennyiségben alkalmazott nehezen lebomló peszticidek sok helyen megbontották az ökológiai egyensúlyt, melynek következményei egyre inkább megmutatkoznak. A talajba jutott szerves szennyeződések egy része megkötődött a talajszemcséken. Ezzel egyrészt gátlődik kimosódásuk a talajvizekbe, másrészt

mikrobiális lebontásuk gátolt. Megfelelő bioremediációs módszer alkalmazásával és a fizikai-kémiai eljárások kombinálásával a lebontó folyamat gyorsítható.

Élő szervezetek segítségével megtisztítani a környezetet előnyös, mivel viszonylag alacsony a költségigénye és a lebontás eredménye nagy mennyiségű biomassza. További előnye, hogy a mikroorganizmusok képesek a környezetből nyomnyi mennyiségű szervesanyagot is hasznosítani, melyet egyéb módszerekkel lehetetlen, illetve nem gazdaságos eltávolítani. Toxikus vegyületekkel szennyezett környezetben egyes mikroorganizmusok együttműködve képesek fennmaradni, és átalakítják vagy saját anyagcsere folyamataikba beépítik a jelenlévő szerves anyagokat. A klórozott szénhidrogének bontásáért felelős enzimek génjei gyakran plazmidon kódoltak, gondoljunk például a 3CBA bontásában résztvevő *Pseudomonas putida* pAC27 [Chatterjee és Chakrabarty 1981] - és *Flavobacterium sp.* pRC10 plazmidjaira [Chaudry és Huang 1988].

II.4.1. Klórozott szénhidrogénekről általánosan, enzimatisuk lebontásuk

A klórozott szénhidrogének hasznos, nagyrészt emberalkotta vegyületek. Felhasználásuk szempontjából előnyös, hogy nem oldódnak vízben, így ellenállnak pl. a biológiai támadásnak. Központi szerepet játszanak az iparban, mint oldószerek, vegytisztító szerek, és mezőgazdasági felhasználásuk is sokáig figyeleme méltó volt, mint herbicidek, tartósítószer, stb. Sajnos ipari jelentőségükkel ellentétes környezeti hatásuk. Kémiai tulajdonságuk miatt toxikusak, s mivel tartósan megmaradnak a környezetben eltávolításukra megoldást kellett kidolgozni. De vajon hogyan kerülnek ki a környezetünkbe? Sok más szervesanyaghoz hasonlóan: az ipari folyamatok során keletkeznek melléktermékek, hulladékok, melyek tárolása nem mindig megfelelő (gondoljunk csak Garé történetére, ahol a nem megfelelően tárolt hordók elkorrodáltak, és a bennük tárolt klórozott benzol vegyületek elszennyezték a talajt, mentesítése még ma is folyik, holott több éves történetről van szó), ezek beszivárognak a talajba, folyó- és álló vizeinkbe, bejutnak a talajvízbe. A mezőgazdaság pedig a megművelt területekre kiszórt növényvédő szerekkel szennyezte környezetünket. Számottevő részük hozzáférhetetlen a

mikroorganizmusok számára, mert a talajrészecskékhez kötődnek, vagy bezáródnak a talajásványok pórusaiba.

Halogén szubsztituált aromás szénhidrogének nemcsak emberi tevékenység következményeként juthatnak a környezetbe. A bioszférában eddig kb 1500 különböző halogén tartalmú anyagot detektáltak [Rehm-Reed 2000]. Ezeket általában egyes növények, állatok, mikroorganizmusok termelik, de keletkezhetnek természetes égési folyamatok során pl. vulkánkitörés, erdőtüzek. A teljes klórmétán emisszió döntő részét tengeri szervezetek bocsátják ki (5 mt/év, míg a humán eredetű emisszió csak 26et/év). Bár a fluoracetát nagyon toxikus, mert gátolja a Krebs ciklus körforgását, fluor-zsírsavak mégis előfordulnak egyes magasabb rendű szárazföldi növényben. A tengeri üledékben fellelhető *Hemicordaták* 2,4-dibrómfenolt szintetizálnak, aerob baktériumok növekedését gátolandó. Az üledékből izolált anaerob baktériumok kevert kultúrában pedig képesek e vegyület redukív debrominálására [King 1986]. További érdekesség, hogy pl. szöcskék termelnek klórozott aromás vegyületeket, pl. a 2,5-diklórfenolt és a 2,6-diklórfenolt, szekretálják e vegyületeket hangyariasztóként, illetve a nőstény atka/kullancs pedig szex feromonként termeli. Emberi szervezetben is termelődnek halogén tartalmú vegyületek: a pajzsmirigy tiroxin hormanja egy tetrajód-tirozin származék.

A halogén tartalmú vegyületek bomlása lehet abiotikus vagy biotikus.

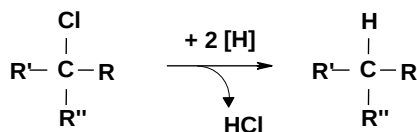
Abiotikus bomlásuk megtörténik hidrolizissal víz jelenlétében bárhol (talaj, víz, levegő). A hidroxid ion nukleofil támadásával a Cl^- lecserélődik megfelelő ionerősség, pH, és felszíni feltételek mellett. A fotohidrolizist napsugarak aktiválják. A többi abiotikus reakcióval szemben a hidrolízis a domináns. Lehetséges abiotikus redukció is fémionik jelenlétében, de ezt a folyamatot természetben nem igen tudták megfigyelni, csak laborban. UV sugárzás hatására a szén-halogén kötés hasad, a gyökök pedig reagálnak a környezetben található oxigén tartalmú molekulákkal, főleg O_2 , O_3 , NO_x . E reakció illékony halogéntartalmú szénhidrogénekre jellemző a felső atmoszférában.

Klórozott szénhidrogének biotikus bontására irányuló eredményes kísérleteket a '90-es évek elejéig túlnyomó többségben anaerob, a szennyeződés helyéről izolált mikroorganizmusok kevert kultúráival végeztek ún. **reduktív dehalogénezés** során:

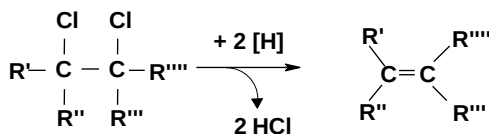
néha jelentősen szennyező (DDT, Lindane, Mirex, többségük a '60-as évektől használt peszticid hatású készítmény), aerob körülmények között nem, vagy igen lassan lebontható (többszörösen) klórozott vegyületek degradációs folyamata, mely a szubsztituens halogénatom lehasításával jár.

II.4.1.1. Reduktív halogén eltávolítás

1. *típus*: hidrogenolízis: a molekulán lévő klorid hidrogénatommal helyettesítődik hidrogén-klorid képződése közben. Így alakulhat a 2-klór-benzoészav benzoészavvá (aril hidrogenolízis), vagy az 1,2-diklóretán klóretánná (alkil-hidrogenolízis):



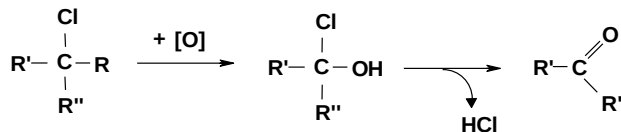
2. *típus*: „szomszédos” redukció/dihaloelimináció: két szomszédos szénatomon lévő egy-egy halogén szubsztituens hasítódik le, a szénatomok között kettős kötés alakul ki, elektrondonor jelenlétében, például az 1,2-diklóretán eténné történő átalakulása [Mohn és Tiedje 1992]:



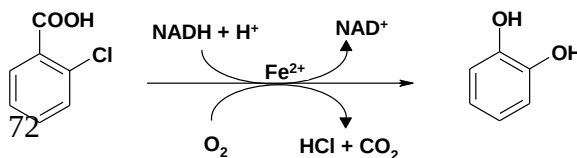
II.4.1.2. Oxigenolitikus dehalogenezés

Mono-, vagy dioxigenázok katalizálják ezeket a reakciókat, aerob folyamatok. Klórozott aromás vegyületeket, és főleg hosszúláncú haloalkánokat lehet így klórmentesíteni, sőt a további lépésekben az aromás vegyületek esetében gyűrűhasítási lépés is követi a szubsztitúciót.

a) monooxigenáz katalizálta reakció:

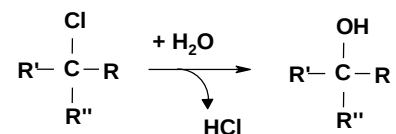


b) dioxigenáz katalizálta reakció:



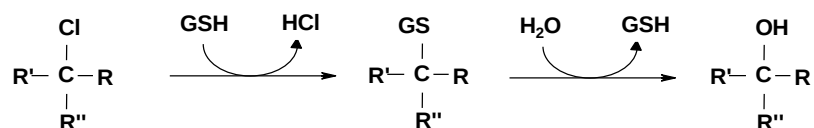
II.4.1.3. Hidrolitikus dehalogénezés

A kloridot vízből nyert hidroxil csoportra cseréli a katalizáló enzim:
halohidrolázok, főleg alifás vegyületeket (2-8 szénatomos) támadnak:



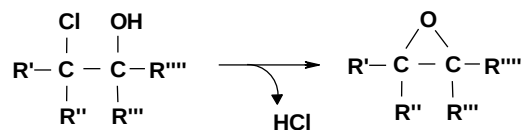
II.4.1.4. Tiolitikus dehalogénezés

A reakcióban glutation vesz részt, melynek kén atomja cseréli le a klór atomot, a keletkező tioéter hidroxilálódik:



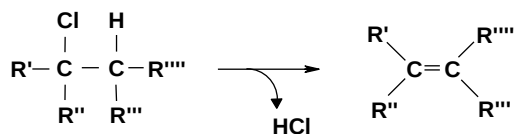
II.4.1.5. Halogénmentesítés intramolekuláris szubsztitúcióval

haloalkoholok esetén:



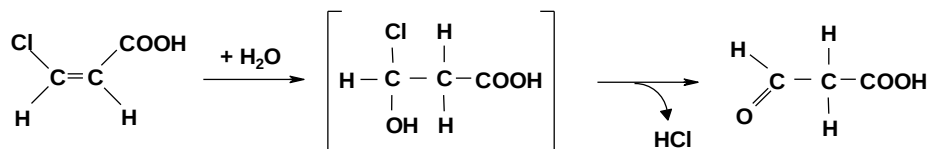
II.4.1.6. Dehidrodehalogénezés

Csak olyan vegyület esetén lehetséges, ahol a halogén atomot hordozó szénatom melletti szénatomon hidrogén van:



II.4.1.7. Hidrodehalogénezés

3-klórákrilsav-hidratáz enzim katalizálta reakció víz jelenlétében:



A fenti hét csoport a klórozottak biológiai lebontására jól tükrözi azt a feltevést, hogy minden lebontható, csak a körülmények nem mindig adóttak.

II.4.2. Halogénezett szénhidrogének biodegradációja

II.4.2.1. Halogénezett alifás szénhidrogének

A legismertebbek az 1-3 szénatomszámú, klórozott vagy brómozott alkánok és alkének: klórmétán, diklórmétán, kloroform, széntetraklorid, diklóretán, triklóretén (vagy –etilén =TCE), tetraklóretén (vagy perklóretilén=PCE), di-, triklórpropánok, de a hosszúlancú klóralkánok, hexaklórciklohexán, alkánsavak-ról sem szabad megfeledkeznünk, mert nagyon komoly környezetszennyezők.

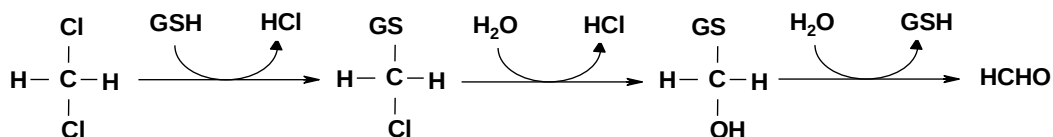
Megtalálhatók peszticid készítményekben, vegytisztítás során, elektronikai ipar hulladékaiként, zsíroldóként. Viszonylag jól oldódnak vízben, következésképp jelentős talaj(víz), ivóvíz szennyezők, karcinogén hatásúak. A halometánok illékonyak, ózonrombolók. Bontásukra aerob talajbaktériumok – pl. *Methylosinus* sp., *Methylococcus* sp. fajok képesek metán monooxygenáz, ammónium monooxygenáz enzimeik, valamint hidrolázok segítségével.

A kutatások csak részleges dehalogénezésről számolnak be, a teljes folyamat - mindegyik halogén szubsztituens lehasítása – elsőként a PCE esetében bizonyított a $\text{PCE} \Rightarrow \text{TCE} \Rightarrow \text{cis/trans DCE} \Rightarrow \text{vinil-klorid} \Rightarrow \text{etén}$ útvonalon [Freedman és mts. 1989]. Néhány év múlva már beszámoltak a *Pseudomonas putida* [Nelson és mts. 1988] és *Pseudomonas fluorescens* [Vandenbergh és Kunka 1988] szerepéről a TCE bontásában; emellett a *Pseudomonas fluorescens* ugyanezen szerzőknél az 1,2-diklórpropán biodegradációs folyamataiban is alkalmasnak bizonyult. A kísérletek jórésze azonban anaerob mikroorganizmusok felhasználásával történt.

A halometánok illékonyak (alacsony a forráspontjuk kb. 40°C) ezáltal jelentős szerepük van a sztratoszférikus ózon destrukcióban. A halogénezett C1-C2 vegyületek bontásában a metanotrófoknak van nagy szerepe, melyek a metánt, mint egyedüli szén- és energiaforrás hasznosítják oxigén jelenlétében [Lontoh 1998].

A **klórmetán** klorid tartalmú műanyagok hőbomlása közben, illetve a hínárok termelte metil-jodid klórozódása által képződik. Bontása lehetséges egy hidroláz, vagy monooxygenáz katalizálta deklórozással, mely során először formaldehid, majd további oxidációval hangyasav, végül CO₂ keletkezik [Vanelli 1998]. Szigorúan anaerob körülmények között egy homoacetogén baktérium metiltranszferáz és dehidrogenáz enzimeit által katalizált reakcióban bomlik [Messmer 1996].

A **diklórmetán** (DCM) átalakul formaldehid keletkezése közben aerob metilotrófokkal, pl. *Methylobacterium*, *Methylophilus* – glutation függő dehalogenázával:



A diklórmetán anaerob módon acetogén mikroorganizmussal, egy *Dehalobacterium formicoaceticum*-mal bontható, metilén-tetrahydrofolát intermedieren keresztül formát és acetát keletkezik, melyhez CO₂ jelenlétére szükség van [Magli 1998].

A **kloroform** hasonlóan a TCE-hez széles körben alkalmazott klór tartalmú oldószer. Helytelen kezelésének, tárolásának következtében, valamint a széntetraklorid anaerob dehalogénezéséből származó, akkumulálódó intermedierként megjelenik a környezetben, gyakori szennyezője a talajvíznek [Rui 2004]. Valószínűleg karcinogén. Bontására a következő reakció írható le:



Dichloromethane

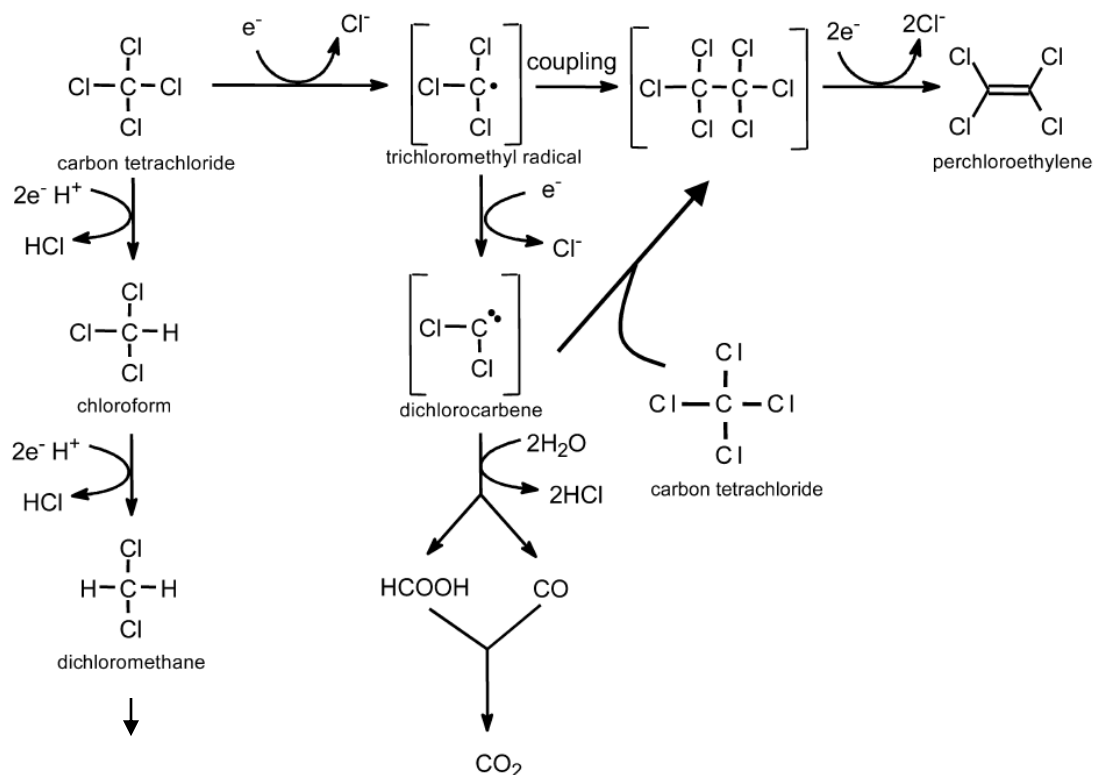
A **tetraklórmetán** (széntetraklorid=CT) toxikus, karcinogén vegyület, az

Biológiai lebontására két folyamat is lehetséges: redukciós lépések során a

76

acetát. Egli és mtsai [1990] megfigyelték, hogy *Acetobacterium woodii* törzsben mindkét útvonal előfordul szimultán.

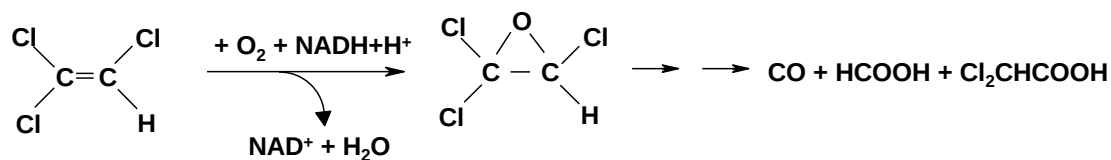
Cervantes és mtsai 2004-ben arról számoltak be, hogy jelentősen befolyásolja/javítja a biológiai redukció hatékonyságát, ha a környezetben huminsavak is jelen vannak. A lebontás kometabolizmussal, azaz egyéb szénforrásként alkalmazott szubsztrátokkal, illetve különböző redukált kofaktorok jelenlétében zajlik. Redukált kofaktorok lehetnek: citokrómok, kobalaminok, porfirinek, piridinek, vagy biogén szervesetlen redukáló ágensek pl. pirit, Fe(II), és szulfid. Különböző fiziológiai körülmények között a CT-t bontani képesek oxigén mentes környezetben metanogének (pl. *Methanobacterium thermoautotrophicum*) [Egli 1987], acetogének (pl. *Acetobacterium woodii*) [Egli 1990, Hashsam 1999], nitrát redukálók (pl. *Pseudomonas stutzeri*) [Lee 1999] és vas-redukálók (pl. *Shewanella putrefaciens*) [Picardal 1993, McCormick 2002]. Kevert kultúrában metanogén és szulfát-redukáló körülmények között is figyeltek meg CT bontást [De Best 1998]. A legtöbb esetben tiszta, vagy kevert anaerob inokulummal a CT redukálva átalakul kloroformmá, ha megfelelő redukáló kapacitás van a környezetben, akkor az összes klór eltávozik a molekuláról, miközben CO₂ és szervesetlen klorid keletkezik. A következő, II.25. ábrán a lehetséges metabolikus lépéseket mutatjuk be Cervantes és mtsai 2004-ben megjelent publikációjából:



II.25. ábra
Széntetraklorid hipotetikus lebontási útvonala

A **diklóretánt** a *Xanthobacter autotrophicus* tudja bontani dehalogenáz enzime segítségével [Janssen 1989] klóretanol, klórecetsav, glikolsav intermediereken keresztül kapcsolódik a lebontó út a központi metabolikus útvonalba.

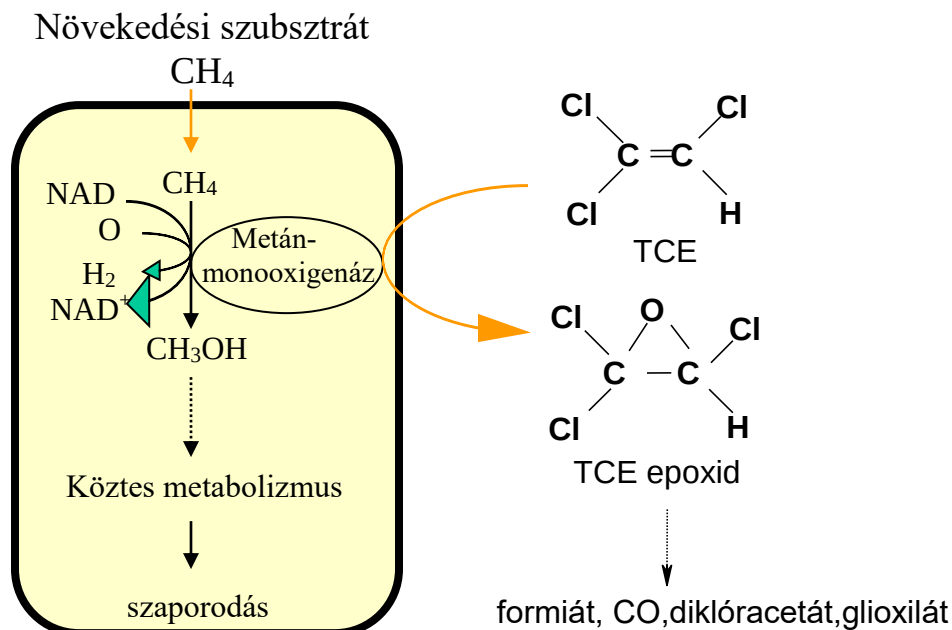
A **triklóretilén** (TCE) az egyik legintenzívebben vizsgált klórozott alifás vegyület. Nem ismert jelenleg olyan baktérium, mely egyedüli szén-, és energiaforrásként hasznosítani tudja, viszont kometabolizmusára több példa is van. Aerob lebontására sok példát fel tudunk sorolni: methanotrófok (*Methylosinus trichosporium* OB3b, *Methylococcus capsulatus* (Bath), *Pseudomonas*-ok (*P. mendonica* KR1, *P. putida* F1, *P. cepacia* G4, valamint rekombináns *E. coli* törzsek, melyek toluol dioxigenáz, vagy toluol monooxigenáz enzimeket kódoló géneket hordoznak. A TCE lebontása során először epoxid keletkezik oxigenáz enzim katalizálta reakcióban (II.26. ábra), ez nagyon reaktív, de instabil molekula, ezért egyrészt gátló hatással van a bontó mikroorganizmusra, ugyanakkor instabilitása miatt spontán továbbalakul [Hanson 1996]:



II.26. ábra
TCE biodegradáció

A kometabolizmusban résztvevő, szénforrásként szereplő szubsztrátok lehetnek alkánok, alkének, de akár aromás vegyületek is. Anaerob körülmények között a TCE és PCE metanogenezis során bomlik acetát szubsztráton szaporodó mikroorganizmus segítségével. Reduktív klóreltávolítással a TCE-ből 1,2-diklóretilén keletkezik.

Aerob körülmények között a talajmikroflóra metanotróf mikroorganizmusai [Little és mtsai. 1988] alakítják át/ bontják el a TCE molekulát (II.27. ábra).

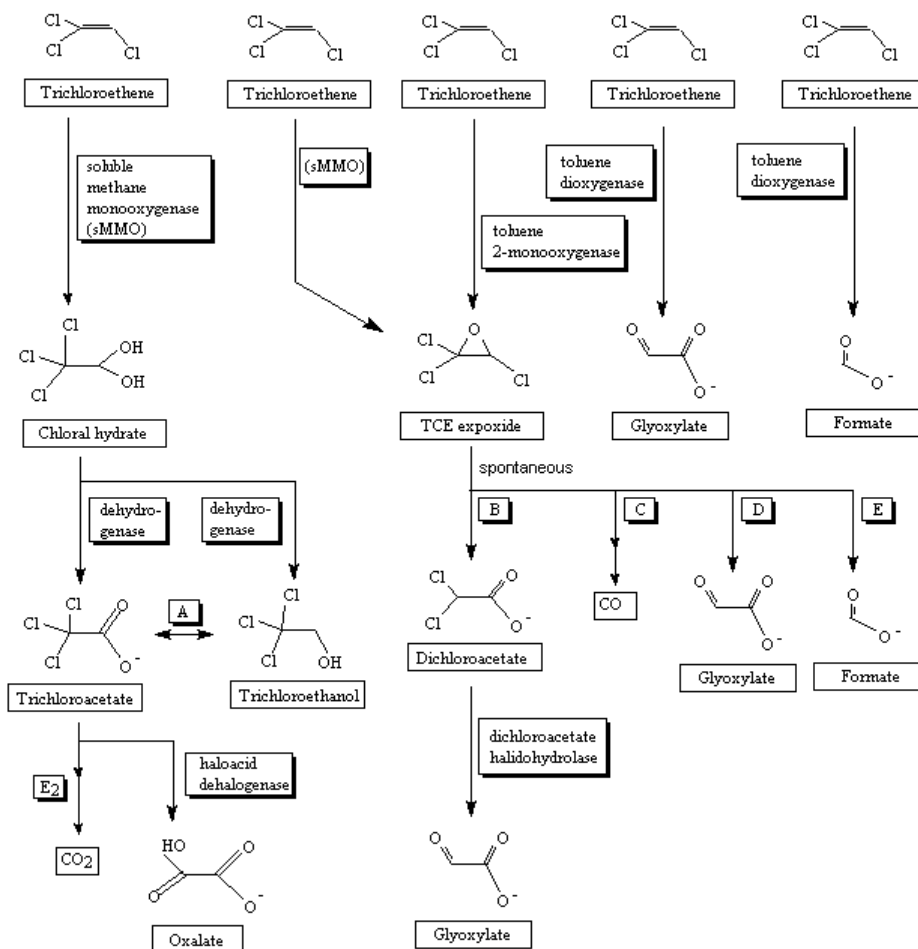


II.27. ábra

TCE átalakulása kometabolikus folyamatok eredményeként

A *Methylosinus trichosporium* OB3b szolubilis metán-monooxygenáza (sMMO) képes sok halogénezett alifás vegyület bontására, melyeket szennyezett talajban, talajvízben megtalálhatunk [Jahng 1994]. Az enzim 50-szer gyorsabban oxidálja a TCE-t, mint más enzimek! Hátránya azonban, hogy a mikroorganizmus nagyon lassan szaporodik, és erős a kompetíció a TCE és a metán között az sMMO kötőhelyéért, ráadásul a *smmo* lokusz gátolt, ha a rézionok alacsony koncentrációban vannak jelen. Ezeket a hátrányokat tudták kiküszöbölni azzal, hogy az *smmo* lokuszt széles gazda-specifitású vektorba klónozták, melyet elektroporációval *Pseudomonas* törzsekbe juttattak. Bár a TCE bontási hatékonyság elmaradt a *Methylosinus trichosporium* OB3b törzsétől, de jobb, mint más mikroorganizmusok, és a *Pseudomonas*-ok sokkal gyorsabban szaporodnak és nincs szubsztrát-TCE kompetíció. Sőt megfigyelték, hogy a rekombináns törzs a kloroformot is tudta bontani.

A II.28. ábrán több oxigenáz katalizálta reakciót mutatunk be, metanotrófok sMMO metánmonooxygenáza, aerob baktériumok pl. *Pseudomonas* fajok, toluol monooxygenáza, dioxigenáza jelenlétében.

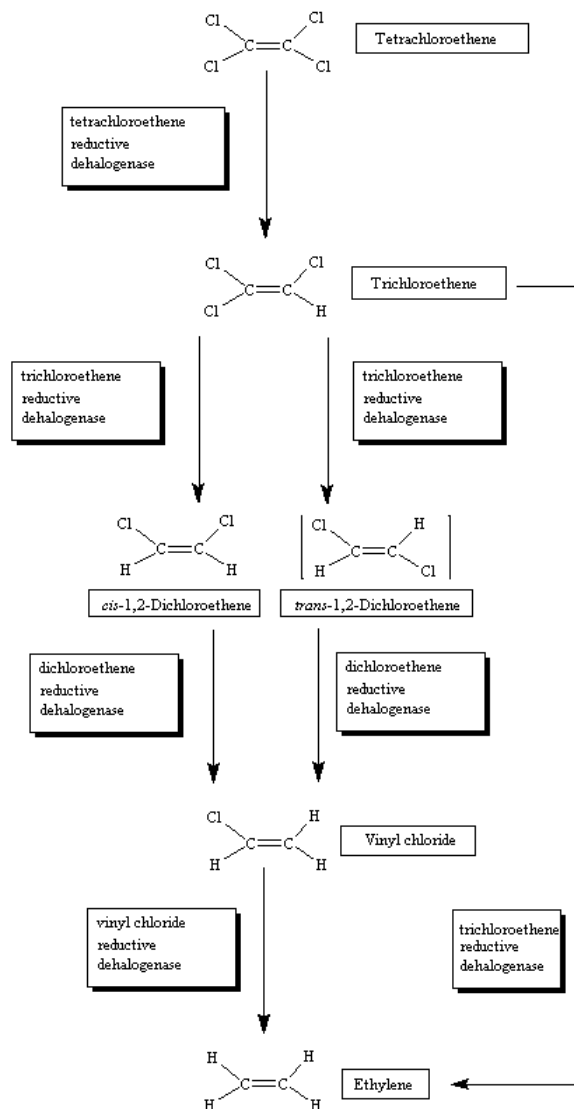


II.28. ábra

TCE tranzformáció oxigenáz enzimekkel

Az eredmény minden esetben a sejtek számára hasznosítható intermedier, mint pl. oxalát, formát, glioxilát (és CO₂) keletkezik.

A **tertralkóretén** (PCE) aerob biodegradációjáról eddig az irodalom nem közölt adatokat, de anaerob lebontása redukzív dehalogénezéssel ismert (elektronodonorként metanol, vagy hidrogén, szaporodási szubsztrátként aromás vegyületek, cukor, acetát szükséges) (II.29. ábra).



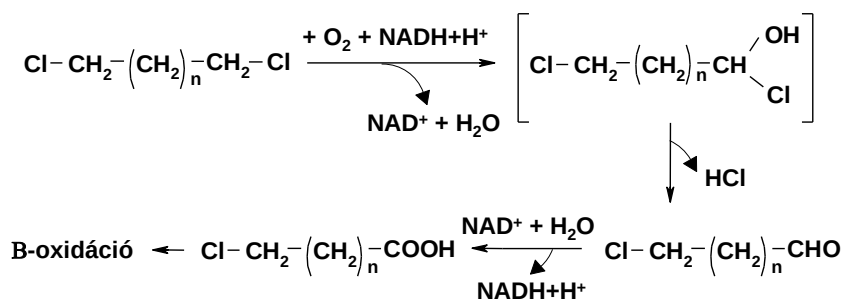
II.29. ábra

PCE anaerob lebontása

Újabb eredmény a *Pseudomonas stutzeri* OX1 törzsénél a toluol-o-xilén-monooxygenáz (ToMo) enzim szerepének felderítése a DCE, TCE, PCE, VC bontási folyamataiban [Shim és mts. 2001]. A baktériumot szennyezett vízzel öntözött terület talajából izolálták, majd a növesztési, adaptációs kísérletek során toluolt, o-xilént, 2,3-dimetilfenolt, 3,4-dimetilfenolt hozzáadva képes volt azokat egyenként is szén- és energiaforrásként hasznosítani: a metabolizmus során a toluol orto-, meta- és para helyzetben is hidroxilálódik, az o-xilén pedig a hármas és négyes pozícióban

egyaránt. A ToMo enzimet konstitutívan termelő, rekombináns *Escherichia coli* JM109/pBZ1260 törzs toluollal történő adaptálás után együttesen PCE és TCE/ 1,1-DCE/ cis-DCE/ trans-DCE/ VC bontásakor jelentős aktivitást mutatott.

A **hosszúlancú klóralkánokat** plaszticizálóként használják festékekben, gumiban, műanyagokban. Alacsony vízzoldékonyságuk ellenére megjelennek pl. folyóüledékekben. Oxidatív halogén eltávolítással átalakíthatók. Egy átmeneti molekula képződik, melynek klórozott szénatomjához kapcsolódik egy hidroxil csoport, mivel ez a molekula instabil, a klór magától távozik, és egy aldehid keletkezik, mely további oxidációs lépéseken át zsírsavvá alakul, és belép a központi metabolikus útba (II.30. ábra).



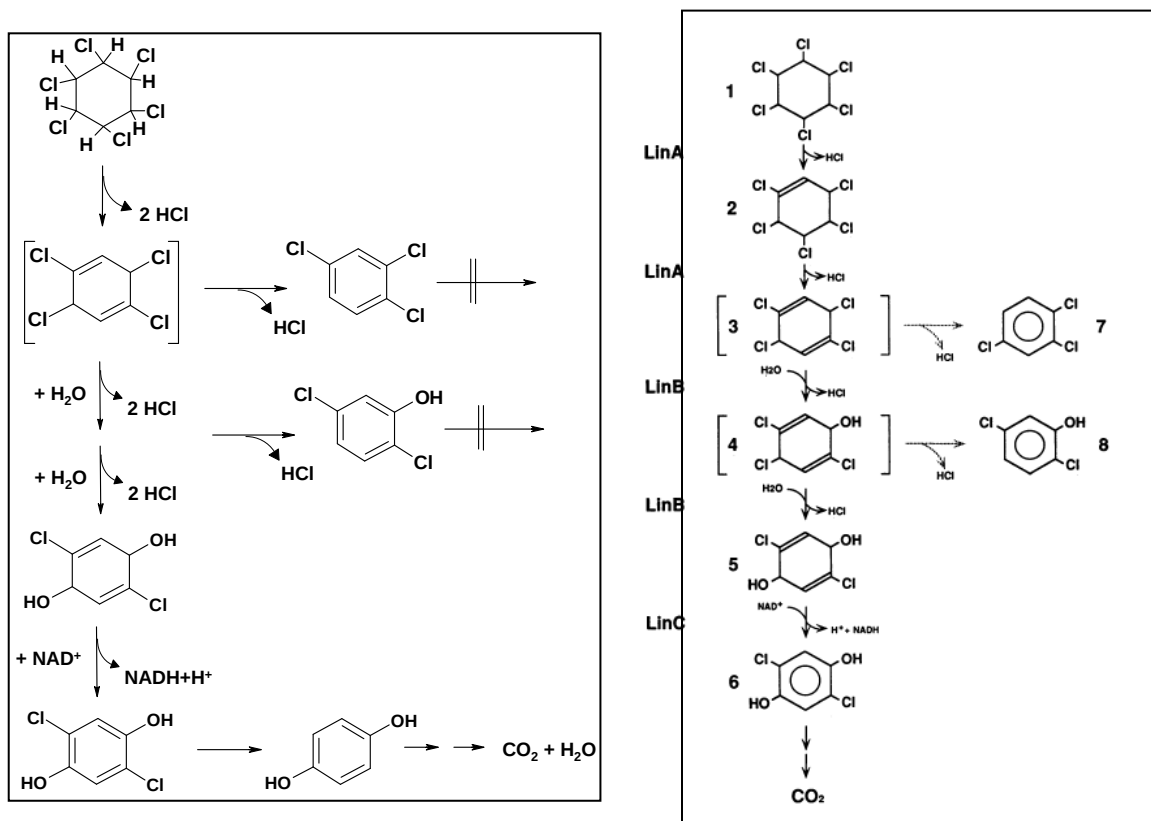
II.30. ábra

Hosszúlancú klóralkánok aerob lebontása

A **hexaklórciklohexánt** (HCH) inszekticidként alkalmazták (főleg a DDT betiltása után). Három sztereoizomerjét különböztethetjük meg: α -, β -, γ -HCH, melyek közül a γ -HCH a leghatékonyabb (lindán). Komoly hátránya, hogy nemcsak a rovarokra hat, hanem magasabbrendűek központi idegrendszerére is, mivel hatására felszabadulnak a szinaptikus neurotranszmitterek. A legtöbb országban az 1940-es években be is tiltották használatát. Azonban nem megfelelő kezelése során a környezetbe jutva tartósan ott maradt, ezért nagyon fontos biodegradációját. Számos aerob mikroorganizmust izoláltak, mely szaporodott HCH szubsztráton pl. *Pseudomonas*-ok [Deo 1994], *Sphingomonas paucimobilis* [Nagata 1994, Hynková 1999]. Az első degradációs lépést egy dehidroklorináz enzim katalizálja. Hynková és

mtsai 1999-ben részletesen jellemezték a HCH bontásban kulcsszerepet játszó haloalkán dehalogenázt (LinB).

Miyauchi és mtsai 1998-ban számoltak be arról, hogy egy *Pseudomonas putida* fajban feltérképezték a γ -HCH lebontási útvonalat (II.31A. ábra), mely meglepően hasonló Nagata és munkatársai által 1994-ben közölt *P. paucimobilis* UT26 (ma *Sphingomonas paucimobilis*ként ismert) törzsben feltételezett lebontási úttal (II.31B. ábra).



ban

II.31. ábra

Kétféle baktériumban feltérképezett γ -HCH degradációs út összehasonlítása

II.4.2.2. Klórozott aromás szénhidrogének

A legtöbb klórozott benzolvegyületet, mint intermediert használják finomvegyszerek szintéziséhez. A felhasználás során a nyersanyag 1-2%-a szennyezésként megjelenik a környezetben.

Biológiai lebontásukra nagyon sok irodalmi adat áll rendelkezésünkre, ennek ellenére bioremediációjuk sikere kérdéses, amit azzal magyaráznak, hogy a környezeti feltételekre nagyon érzékenyek a kifejlesztett folyamatok.

A halogénezett aromás vegyületek biodegradációja akkor tekinthető teljesnek, ha a szénváz is átalakul, és a szerves kötésben lévő halogén atom lehasadva só formájában jelenik meg. A lebontási folyamat több úton is végbemehet: először a halogénelem távozik, utána hasad a gyűrű, illetve először hasad a gyűrű, és utána spontán vagy enzimátikus támadás révén távozik a halogénelem a vegyületről. E folyamathoz molekuláris oxigénre van szüksége a sejteknek részben, mint végső elektronakceptor, illetve a további enzimátikus lépésekben, a gyűrű oxidatív hasítása során.

1. A halogénelem hidrogénre cserélődik:

Tény, hogy egyes esetekben oxigén hiányában is lehetséges a lebontás pl. anaerob fotometabolizmussal, nitrát redukáló-, szulfát-redukáló-, vagy metanogén körülmények között. Az első bizonyítékot az anaerob degradációra Horowitz [1982] illetve Sulfita [1982] és munkatársaik szolgáltatták. Szennyvíziszapból izolált mikrobiális közösséggel bontottak különböző klór-szubsztituált benzolokat. Megfigyelték, hogy a gyűrű hasítása csak azután következett be, amikor az összes halogénelem eltávozott a gyűrűről, és a gyűrűhasítás metán és széndioxid képződésbe torkollott.

Shelton és Tiedje 1984-ben karakterizált egy 3-klórbenzoát bontó mikrobiális közösséget. A metanogén konzorcium állt egy deklórozó-, egy benzoát oxidáló-, két butirát oxidáló-, két hidrogén felhasználó metanogén-, és egy szulfát redukáló baktériumból. A lebontás folyamatát azonban még nem tudták meghatározni. Később 1986-ban feltérképezték a folyamatot [Dolfing 1986], meghatározták a főszereplő baktériumokat, melyek a deklórozó baktérium, egy benzoát degradáló és egy litotróf metanogén volt a konzorcium tagjaiból. A reduktív halogénmentesítéshez redukáló

erőre van szükség, melyet a benzoát acetogén oxidációja során keletkező hidrogénből nyerhető, melynek egyharmada fordítódik a deklórozásra, kétharmad marad a metanogének számára.

1984-ben egy másik kutató csoport – Tsuchiya és mtsai- egy *Staphylococcus epidermidis* törzset izolált, mely képes volt a 1,2,4-triklórbenzolt átalakítani diklór-, majd monoklórbenzollá. A folyamat azonban csak hidrogén atmoszférában működött. Feltárt sejtekkel is mutattak ki klórbenzol bontó aktivitást, mely NADPH hozzáadásával stimulálható volt.

2. A halogénelem hidroxil csoportra cserélődik:

Az első bizonyítékot Johnston és mtsai 1972-ben ismertették. Egy 3-klórbenzoátot egyedüli szénforrásként hasznosító *Pseudomonas* törzset írtak le, a metabolizmus során a tápoldatból 3-OH, illetve 2,5-diOH-benzoátot mutattak ki, mely azt bizonyítja, hogy először a klór távozott a molekuláról, aztán hasadt a gyűrű. E folyamatot más törzsek esetében is megfigyelték pl. 4-klórbenzoát szubsztráton: *Micrococcus* sp., *Arthrobacter globiformis*, *Nocardia* sp., *Pseudomonas* sp., különbség az enzimek indukálhatóságában, illetve szubsztrátspecifitásban van, illetve a bontási feltételek is eltérőek.

Vizsgálták a dehalogénázok működési feltételeit, és $^{18}\text{O}_2$ és H_2^{18}O jelenlétében bizonyították [Marks 1984, Müller 1984], hogy a deklórozási reakcióban a sejtek vizet használnak hidroxil-donorként, nem molekuláris oxigént.

3. Oxigenolitikus halogén-szén kötés hasítás:

Dioxigenáz enzim katalizálta dehalogénezés, melyet 2-fluorbenzoáton modelleztek Goldman és mtsai 1967-ben egy *Pseudomonas* törzset használva. Megfigyelték, hogy két útvonal is működik mivel a nem szelektív benzoát 1,2-dioxigenáz aktivitásának következtében kétféle intermediér is megjelenik a tápoldatban, az egyik esetében a 2-s pozícióban, a másik intermediér esetében pedig az 5-s pozícióban történt hidroxiláció. Az enzim vizsgálata során a legnagyobb aktivitást akkor kapták, ha Fe^{2+} és NADH kofaktorok is jelen voltak.

Az 5-klórvanillát lebontása során egy másik enzimet, egy indukálható protokatekol 4,5-dioxigenázt azonosítottak [Kersten 1985], mely az első intermediért, az 5-klórprotokatekuátot támadja.

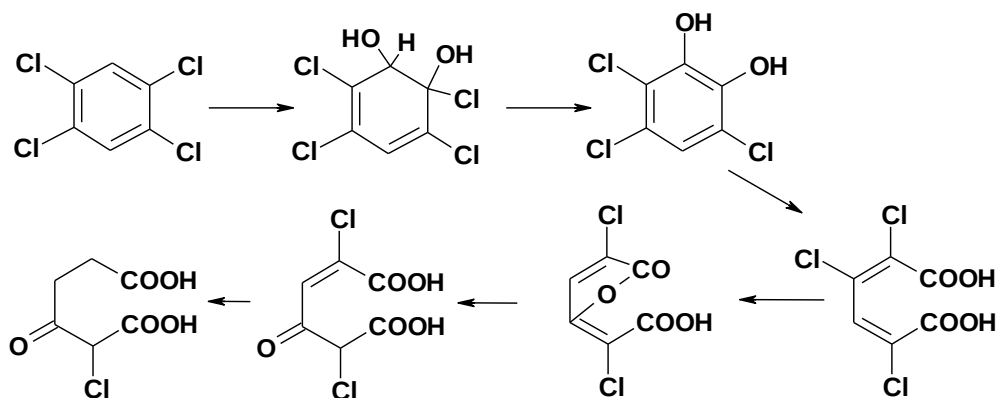
Az eddigi lebontó utakban először távozott a halogén elem a vegyületről, és csak utána hasadt az aromás gyűrű.

4. Halogén elem elimináció a nem aromás intermedier molekuláról:

Ez esetben az első lépcső egy 'orto' gyűrű hasítási lépés, ezt követi a halogén elem eliminációja. Egy izomeráz vagy reduktáz enzimmel 'meglazított' halogén-szén kötésből a halogén elem már spontán távozik. Pl. a 2,4-diklórfenoxiacetát (2,4-D) bontása során hasonló metabolikus út zajlik több *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* fajokban is. Először az oldallánc szabadul fel egy oxigén beépülésével, majd diklórkatekol intermedieren keresztül hasad a gyűrű.

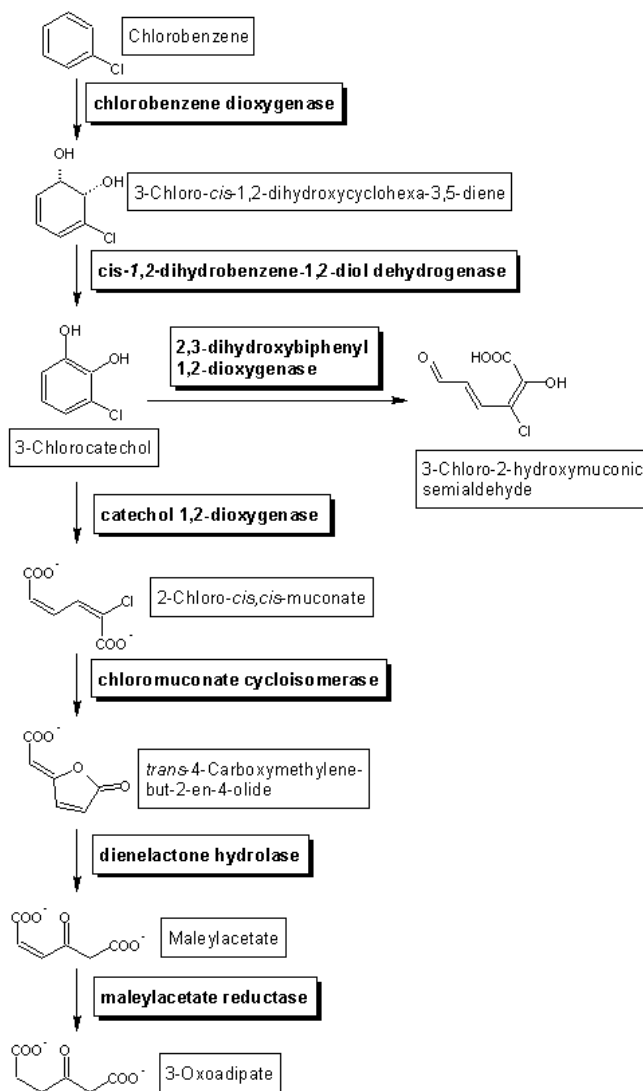
II.4.2.2.1. Klórbenzolok mikrobiális bontása

A klórbenzolok vízzoldékonysága a klórozottsági fokkal ellentétesen csökken, azaz minél több a klór szubsztituens a gyűrűn, annál kevésbé oldódik vízben a molekula, viszont nagyon illékonyak, lipofil tulajdonságúak, ami megnehezíti lebontásukat. Ha csak egy-két klór szubsztituens található a gyűrűn inkább aerob módon bomlanak (II.33. ábra), viszont a klórozottsági fok emelkedésével az anaerob reduktív folyamatok kerülnek előtérbe természetes körülmények között [Rehm 2000]. Ennek ellenére nemrég megjelent egy-két tanulmány [Beil 1998, Potrawfke 1998], melyben tetraklórbenzoátot aerob módon, dioxigenáz enzim katalizálta reakcióban bontani egy *Pseudomonas* törzs segítségével (II.32. ábra).



II.32. ábra

Tetraklórbenzol biodegradációja dioxigenáz enzim katalizálta reakcióban



II.33. ábra

Klórozott benzolszármazékok aerob metabolizmusának bemutatása a klórbenzol molekulán keresztül

1,2-, 1,3- és 1,4-diklórbenzol: szerepük peszticid készítmények, festékek előállításában jelentős. Mind az *o*-, mind pedig a *m*- és *p*-DCIB lebontás egyik

intermediere a diklórkatekol. Az *Alcaligenes sp.* és *Pseudomonas sp.* [Reineke 1984] képesek a DCIB-t egyedüli szénforrásként hasznosítani, mind az *o*-, mind pedig a *m*- és *p*-DCIB lebontás egyik intermediereként diklórkatekol keletkezik, melyet a benzolgyűrű hasítása követ.

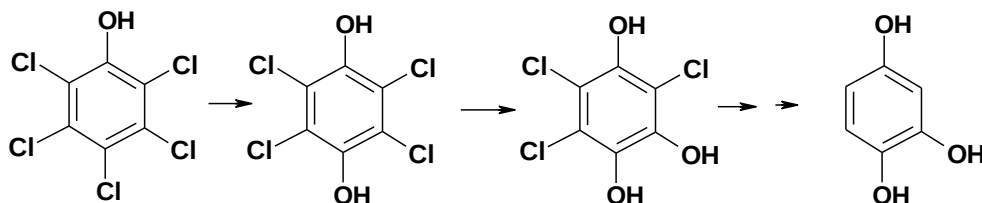
Halobenzoátok: Vízoldékonyságuk jó, és alacsony a toxicitásuk, ezért előszeretettel alkalmazzák őket, mint modell vegyületek a lebontási folyamatok feltérképezésében. 2CBA, 3CBA, 4CBA, 2,4DCBA. 3CBA bontásának lépései *Pseudomonas sp. B13* törzssel (pWR1 plazmid), ill. az ezekért felelős enzimek ismertek [Reineke 1986]. Gyakori lebontási intermedier a klórkatekol (3CBA-nál és 2-klórfenolnál a 3-klórkatekol, 4-klórfenolnál a 4-klórkatekol), mely orto hasítással bomlik tovább. Számos plazmid (pJP4, pRC10) a klórfenoxiacetátok bontása mellett a klórozott benzolszármazékok degradációs folyamataiban is szerepet játszik [Don és Pemberton 1981]. Aerob metabolizmusuk mellett ismert redukzív bontásuk is, a *Desulfomonile tiedjei* az első tiszta kultúra, melyről leírták, hogy redukzív halogén eltávolító aktivitást mutat, és ebből energiát nyer [Mohn és Tiedje 1990].

Klórfenolok: mineralizációjuk történhet aerob módon vagy redukzív dehalogénezéssel, bár az utóbbi esetben a folyamat nem mindig eredményez teljes lebontást. A mono- és diklórfenolok hidroxilációval klórkatekolokká alakulnak, mely tovább bomlik orto hasítással. A több klórt hordozó fenolok hidroxilációja para helyzetben következik be hidrokinon molekulát eredményezve, mely molekulán az egyik klór további hidroxil csoportra cserélődik hidroxil hidrokinon keletkezése közben, melyről a további klórok redukcióval távoznak. Gombákban ettől eltérő metabolizmust figyeltek meg. A TCP vagy PCP oxidációja után a kinon redukálódik és metilálódik [Joshi 1993].

PCP (pentaklórfenol): faanyagok tartósítására, herbicidként, fungicid szerként alkalmazzák őket. Mivel minél több klorid szubsztituenst tartalmaz a vegyület, toxicitása annál jelentősebb, annál fokozottabban áll ellen a mikrobiális lebontásnak – következésképp a környezetben feldúsuló PCP bontására igen kevés mikroorganizmus képes. Főleg Gram negatív baktériumok egy kezdeti oxigenolitikus támadással gyengítik a molekulaszervezetet, *Pseudomonas cepacia* [Karns és mts. 1983] és PCP tartalmú hulladékból izolált *Flavobacterium sp.* játszik szerepet: PCP

⇒ ⇒ tetraklór-*p*-hidrokinon ⇒ triklórkinon és diklórhidrokinon [Sandmann és Loos 1988]. Az *Arthrobacter* sp. ATCC33790 törzsének szerepét vizsgálták a PCP dehalogénezésében [Schenk és mts. 1989].

Hagglom és mtsai 1989-ben ismertették a Gram negatív baktériumokban előforduló hasonló PCP lebontási útvonalat (II.34. ábra).



II.34. ábra
PCP mikrobiális halogénmentesítése

A hidroxilált intermediér bekapcsolódva a β -ketoadipát lebontási útvonalba, alakul tovább. A kezdeti oxidációs folyamatot egy PCP monooxygenáz katalizálja, mely valószínűleg egy flavin monooxygenáz enzimből formálódott [Copley 1997].

Klórozott toluolszármazékok: az 1, ill. 2 klór szubsztituenst hordozó toluolszármazékok bontásában a *Pseudomonas cepacia* és több más, olyan *Pseudomonas* faj szerepét figyelték meg, ahol a vegyület metabolizálásáért felelős gének plazmidon kódoltak [Pierce és mts. 1983].

II.4.2.3. Poliklórozott bifenilek

A többszörösen klórozott bifenileket (PCB) 1929-től 1977-ig nagy mennyiségben állították elő különböző célokra, pl. antimikrobiális ágensek-, herbicidek (pl. Aroclor-ok)-, orvosságok előállításához, kenőolajok gyártásakor, elektronikai iparban általánosan használatosak voltak [Abramowitz 1995]. Ám az 1960-as években felfedezték, hogy a gyártott PCB-k mintegy harmada akkumulálódik a környezetben kémiai- és hőstabilitásuknak, és a biológiai bontással szembeni ellenállóságuknak köszönhetően. Így mikor bizonyítást nyert az is, hogy emberre és állatra nézve egyaránt toxikusak, használatukat 1979-ben betiltották.

Természetesen ennek a vegyület csoportnak a lebontására is “nagy erővel” keresték a megfelelő biológiai megoldást. A PCB-k biodegradációjára 3 általános út írható le: 1. aerob útvonal, a PCB, mint szubsztrát szerepel, 2. aerob kometabolizmus (azaz a PCB nem szubsztrátja a mikroorganizmusnak), 3. anaerob reduktív halogén eltávolítás.

Az 1980-as évek elején jelentek meg az első jelentősebb beszámolók, elsősorban anaerob biodegradációról számoltak be [Sylvestre 1982, Quensen 1988], de komoly eredményeket ért el Japánban Furukawa és csoportja *Pseudomonas* fajokkal. Izolátumukat *Pseudomonas paucimobilis*-ként azonosították [Furukawa 1983] (ma *Sphingomonas paucimobilis*). Ez a törzs rendelkezik egy kulcs enzimmel a 2,3-dihidroxi-bifenil dioxigenázzal, mely enzim katalizálja az aromás gyűrű hasítást [Taira 1988]. Egy másik kutatócsoport Kanadában *Pseudomonas testosteroni* baktériumot azonosított, mely képes oxigenáza segítségével a bifenil és klórbifenilek oxigenolitikus hasítására [Sondossi 1992].

Az anaerob biodegradációban metanogének [Ye 1995], szulfátredukálók [Zwiernik 1998] vesznek részt, de még nem sikerült tiszta tenyészeteket előállítani, és így az anaerob lebontási útvonalak feltérképezése nehézkes.

Az aerob biodegradációban azonban egyre újabb eredmények születtek, több baktérium fajban is azonosították a bifenil dioxigenáz enzimet kódoló géneket, pl. *Burkholderia* sp. LB400, *Rhodococcus globerulus* P6 [Seeger 2001]. Cho és mtsai 2002-ben arról számoltak be, hogy jelentősen javul a PCB biodegradáció, ha klórbenzoátok, klórbenzolok vagy klórfenolok jelenlétében szaporítják a starter mikroba kultúrákat [Cho 2002]. 2004-ben Yang és mtsai leírtak egy *Rhodococcus* törzset, mely 7 különböző PCB-t is képes bontani.

Az utóbbi egy-két évben megjelent cikkek azzal foglalkoznak hogyan tehető hozzáférhetőbbé a molekula, mert ez nagyban gyorsítaná a lebontási folyamatot. Felületaktív anyagok alkalmazásával már régóta próbálkoznak a vízben nem oldódó vegyületek esetében [Christofi 2002, Mulligan 2005]. A ciklodextrineket, mint immobilizáló ágensek elsősorban a gyógyszeriparban hasznosították, de megjelentek a bioremediációs eljárásokban is, Fava és mtsai 1998-ban számoltak be először sikeres bioremediációs kísérletekről, melyekben ciklodextrineket is alkalmaztak. A

ciklodextrinek metilezésével még hatékonyabb bioremediációt lehet elérni, erről számoltak be 2005-ben Fedi és mtsai, akik egy immobilizált ágyas hurok reaktorban végezték a biodegradációt, melyben az anyagáramlás, a homogenitás megfelelően biztosítva volt.

Rysavy és mtsai nem nyugodtak bele, hogy az anaerob biodegradációról oly kevés az információ, és a tiszta tenyészetek hiányában nem tudják a metabolikus utakat vizsgálni. Az elmúlt években felvetettek egy hipotézist, melyet 2005-ben adatokkal is bizonyítottak. Abból indultak ki, hogy vannak olyan mikroorganizmusok, melyek képesek PCB-respirációra, és a klóreltávolításból energiát nyernek. Ha ez igaz, akkor a megfelelő elektron donorok alkalmazásával a szennyezett területeken stimulálható a remediáció. Elemi vasat (Fe^0) adtak folyó trokolatból gyűjtött, mikrobákat is tartalmazó üledékhez. Az eredmények azt mutatták, hogy $0,1 \text{ g Fe}^0/\text{g}_{\text{üledék}}$ koncentráció alkalmazása mellett a lag fázis ideje (ez néhány hónaptól néhány évig is terjedhet) csökkent, és hamarabb megindult a para- helyzetű klór elem eltávolítása a molekuláról. H_2 hozzáadásával az elemi vas korrodálódik, ezért azt is megvizsgálták, hogy mi történik a rendszerben, ha H_2 -t adnak hozzá. Ugyanúgy csökkent a lag fázis, és beindult a klóreltávolítás, mint az elemi vas hozzáadása esetében. Nagyobb vas, vagy hidrogén koncentráció esetén a lag fázis ideje nőtt. A redukív klóreltávolításhoz hidrogénre szükség van, tehát érthető, ha kevés hidrogén van jelen lassú a folyamat. Összességében az eredményeik azt bizonyítják, hogy az elemi vas alkalmazása jelentősen javítja a bioremediáció sebességét, hatékonyságát.

II.4.2.4. A biodegradáció génszintű szabályozása

Amikor egy mikroorganizmus új szervesanyaggal találkozik környezetében, képes új katabolikus géneket szerezni pl. más mikroorganizmusoktól konjugációval, vagy transzformációval (plazmidon kódolt degradatív gének), illetve mutáció következtében. Bár a klórozott szénhidrogének csak néhány évtizede jelentek meg a természetben, máris sok-sok bontó szervezet található a szennyeződések környékén. Legtöbb esetben plazmidon kódoltak a lebontásért felelős enzimek génjei. A legjobban tanulmányozott csapat a *Pseudomonas*ok, melyekből nagyon sok plazmidot izoláltak, jellemeztek.

A következő néhány példában szeretnénk bemutatni a plazmid kapcsolt biodegradációt:

Igen jól tanulmányozott a 2,4-D bontása [Fulthorpe 1995], és az ebben résztvevő pJP4 és pRC10 plazmidok. A plazmidon kódolt *tfd* génnek többsége egy nagy operonba szerveződött *tfdCDEF* illetve külön található a *tfdA* és *tfdB*. További vizsgálatokkal kiderítették, hogy az operon és a *tfdA* működését egy *tfdR* gén szabályozza. Egyes funkcionálisan hasonló enzimek génjeinek szekvenciája is hasonló [Reineke 1998], bár többször előfordul, hogy teljesen eltérő a szekvencia. A *Pseudomonas putida* pAC27 plazmidján található, 3-klórbenzoát (3-ClB) bontásért felelős enzimeket kódoló *clcB* és *clcD* gének nagy hasonlóságot mutatnak a *tfdD* és *tfdE* génekkel, melyet hibridizációs kísérletekkel igazoltak [Perkins 1990]. Ezek szerint a 2,4-D és 3-ClB bontásért felelős plazmidoknak közös ősök/eredetük lehetett, így nem meglepő, hogy a *tfdCDEF* operon, a *tfdA* és a *clcABD* promoterei esetében hasonló konzervált operátor régiót figyelhetünk meg nukleotid szekvenciájuk alapján.

A degradatív génnek azonban nemcsak plazmidon lehetnek kódolva, sokszor előfordul kromoszómán, operonba szerveződve (*bphABCD*) is, pl. *P. putida* klórbifenil bontásáért felelős enzimeit kódoló gének. Érdekes, hogy két különböző *P. putida* törzs azonos operonja eltéréseket mutat [Khan 1990], pl. az egyik törzs *bphC* génje hibridizál a TOL ill. NAH plazmid megfelelő szakaszával, míg a másik törzsé nem.

A biodegradációs potenciál növelése

Több mikroorganizmus esetében is megfigyelték, hogy míg néhány szubsztrátot képes átalakítani, addig összképletében hasonló egyéb szubsztrátokat nem: pl. a 3-ClB-ot és 2,4-D-t hasznosító *Pseudomonas* B13 törzs képes metabolizálni a 4-klórkatekolt is, de nem képes oxidálni a 4-klórbenzoátot (4-ClB), mivel a 3-ClB oxigenáznak nagyon szűk a szubsztrát specifitása. Ha ebbe a törzsbe széles szubsztrát specifitású benzoát oxigenáz enzimet kódoló TOL plazmidot juttatunk [Reineke 1980] képessé válik a törzs a 4-ClB-t is átalakítani 4-klórkatekollá. Nagyon egyszerű kísérletben végezték el ezt a transzformációt [Chatterje 1982]. A *Pseudomonas* B13 törzset együtt inkubálták a TOL plazmidot hordozó törzsszel egy kemosztátban Megfigyelték, hogy a *Pseudomonas* B13 törzs képessé vált a 4-ClB

bontására. A törzsben új plazmidokat figyeltek meg (pAC27), melyek annyiban különböztek az eredeti pAC25 plazmidtól, hogy egy kb 11 kb-os fragment hiányzott belőlük, továbbá megtalálták a TOL plazmid egy fragmentjét a kromoszómába integrálódva. Azonosították e szakaszt, és a kb 41,5 kb szakasz a toluát 1,2-dioxigenáz aktivitásért volt felelős. Ezekkel a módosulásokkal vált képessé a sejt már nemcsak a 4-ClB bontására, de egyes mutánsok még a 3,5-diklórbenzoátot is bontották ezután. Tehát plazmidok bejuttatásával képesek vagyunk új és újabb, egyre jobb hatékonyságú törzseket létrehozni, melyek komoly segítséget nyújtanak környezetünk tisztogatásában.

A degradatív gének karakterizálása, klónozása segít abban, hogy még pontosabban megismerjük a lebontási útvonalakat, és tervezhessünk tökéletesebb törzseket a bioremediációs eljárásokat segítve. Gyakran találkozunk olyan problémával, hogy a laboratóriumban tökéletesen működő rendszer a 'mezőn' csődöt mond, ezért az új törzseket kifejlesztve erre a problémára is figyelve kiküszöbölhetjük e buktatókat.

II.4.3. IRODALOMJEGYZÉK

1. Abramowicz, D.A., D.R. Olson (1995) *Chemtech*. Vol.25: 36-41.
2. Barton, M.R., R.L. Crawford (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 54: 594-595.
3. Beil, S., J.R. Mason, K.N. Timmis, D.h. Pieper (1998) *J. Bacteriol.* Vol. 180: 5520-5528.
4. Cervantes, F.J., L. Vu-Thi-Thu, G. Lettinga, J.A. Field (2004) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 64: 702-711.
5. Chatterjee, D. K., A. M. Chakrabarty (1981) *FEMS Symp.* 12: 213-219.
6. Chatterjee, D. K., A. M. Chakrabarty (1982) *Mol. Gen. Genet.* Vol. 188: 279-285.
7. Chaudhry, G. R., G. H. Huang (1988) *J. Bacteriol.* 170 : 3897-3902.
8. Chaudhry, G. R., S. Chapalamadugu (1991) *Microbiol. Rev.* Vol. 55: 59-79.
9. Cho, Y-C., E. B. Ostrofsky, R. C. Sokol, R.C. Frohnhofer, G-Y. Rhee (2002) *FEMS Microbiol. Ecol.* Vol. 42: 51-58.
10. Christofi, N., I.B. Ivshina (2002) *J. Appl. Microbiol.* Vol. 93: 915-929.
11. Copley, S.D. (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 169-174.
12. De Best, J.H., E. Salminen, H.J. Doddema, D.B. Janssen, W. Harder (1998) *Biodegradation* Vol. 8: 429-436.

13. Deo, P.G., N.G. Karanth, N.G.K. Karanth (1994) *Crit. Rev. Microbiol.* Vol.20: 57-78.
14. Dolfing, J., J.M. Tiedje (1986) *FEMS Microbiol. Ecol.* Vol. 38: 293-298.
15. Don, R. H., and J. M. Pemberton (1981) *J. Bacteriol.* 145 : 681-686.
16. Egli, C., R. Scholtz, A.M. Cook, T. Leisinger (1987) *FEMS Microbiol. Lett.* Vol. 43: 257-261.
17. Egli, C., S. Stromeyer, A.M. Cook, T. Leisinger (1990) *FEMS Microbiol. Lett.* Vol. 68: 207-212.
18. Fava, F., D. Di Gioia, L. Marchetti (1998) *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 58: 345-355.
19. Fedi, S., V. Tremaroli, D. Scala, J.R. Perez-Jimenez, F. Fava, L. Young, D. Zannoni (2005) *Res. Microbiol.* Vol. 156: 201-210.
20. Freedman, D.L., J.M. Gossett (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2144-2151.
21. Fulthorpe, R.R., C. MCGowan, O.V. Maltseva, W.E. Holben, J.M. Tiedje (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 61: 3274-3281.
22. Furukawa, K., J.R. Simon, A.M. Chakrabarty (1983) *J. Bacteriol.* Vol. 154: 1356-1362.
23. Goldman, P., G.W.A. Milne, M.T. Pignataro (1967) *Arch. Biochem. Biophys.* Vol. 118: 178-184.
24. Hanson, R.S., T.E. Hanson (1996) *Microbiol. Rev.* Vol. 60: 439-471.
25. Hashsham, S.A., D.L. Freedman (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 65: 4537-4542.
26. Horowitz, A., J.M. Sulfit, J.M. Tiedje (1983) *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 45: 1459-1465.
27. Hynková, K., Y. Nagata, M. Takagi, J. Damborsky (1999) *FEBS Lett.* Vol. 446: 177-181.
28. Jahng, D., T.K. Wood (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 60: 2473-2482.
29. Janssen, D.B., F. Pries, J. Van der Ploeg, B. Kazemier, P. Terpstra, B. Witholt (1989) *J. Bacteriol.* Vol. 171: 6791-6793.
30. Johnston, H.W., G.G. Briggs, M. Alexander (1972) *Soil Biol. Biochem.* Vol. 4: 187-190
31. Joshi, D.K., M.H. Gold (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 59: 1779-1785.
32. Khan, A., S. Walia (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 56: 956-962.
33. Karns, J.S., J.J. Kilbane, S. Duttagupta, A. M. Chakrabarty (1983) *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 1176-1181.
34. Kersten, P.J., P.J. Chapman, S. Dagley (1985) *J. Bacteriol.* Vol. 162: 693-697.
35. King, G.M. (1986) *Nature (London)* 323 : 257-259.
36. Lee, C.H., T.A. Lewis, A. Paszczynski, R.L. Crawford (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 261: 562-566.
37. Little, C. D., A. V. Palumbo, S. E. Herbes, M. E. Lidstrom, R. L. Tyndall, P. J. Gilmer (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 54 : 951-956.
38. Lontoh, S., J.D. Semrau (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 64: 1106-1114.
39. Mägli, A., M. Messmer, T. Leisinger (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 64: 646-650.

40. Marks, T.S., A.R.W. Smith, A.V. Quirk (1984) *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 1020-1025.
41. McCormick, M.L., E.J. Bouwer, P. Adriaens (2002) *Environ. Sci. Technol.* Vol. 36: 403-410.
42. Messmer, M., S. Reinhardt, G. Wohlfarth, G. Diekert (1996) *Arch. Microbiol.* Vol. 165: 18-25.
43. Miyauchi, K., S.K. Suh, Y. Nagata, M. Takagi (1998) *J. Bacteriol.* Vol. 180: 1354-1359.
44. Mohn, W.W., J.M. Tiedje (1990) *Arch. Microbiol.* Vol. 153: 267-271.
45. Mohn, W.W., J.M. Tiedje (1992) *Microbiol. Rev.* Vol. 56: 482-507.
46. Mulligan C. N. (2005) *Environ. Pollut.* Vol. 133: 183-198.
47. Müller, R., J. Thiele, U. Klages, F. Lingens (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 124: 178-182.
48. Nagata, Y., R. Ohtomo, K. Miyauchi, M. Fukuda, K. Yano, M. Takagi (1994) *J. Bacteriol.* Vol. 176: 3117-3125.
49. Nelson, M. J. K., S. O. Montgomery, P. H. Pritchard (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 54 : 602-606.
50. Perkins, E.J., M.P. Gordon, D. Caceres, P.F. Lurquin (1990) *J. Bacteriol.* Vol. 172: 2351-2359.
51. Picardal, F.W., R.G. Arnold, H. Couch, A.M. Little, M.A. Smith (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 59: 3763-3770.
52. Pierce, G.E., J.B. Robinson, J. R. Colaruotolo (1983) *Dev. Ind. Microbiol.* Vol. 24: 499-507.
53. Potrawfke, T., K.N. Timmis, R.-M. Wittich (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 64: 3798-3806.
54. Quensen, J.F., III., J.M. Tiedje, S.A. Boyd (1988) *Science* Vol. 242: 752-754.
55. Rehm, H.-J., G. Reed, A. Pühler, P. Stadler (2000) *Biotechnology* Vol. 11b, *Environmental Processes II*. ISBN 3-527-28323-4, Wiley-VCH pp: 241-271.
56. Reineke, W., H.-J. Knackmuss (1980) *J. Bacteriol.* Vol. 142: 467-473.
57. Reineke, W., H.-J. Knackmuss (1984) *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 47: 395-402.
58. Reineke, W. (1986) *J. Basic. Microbiol.* Vol. 26: 551-567.
59. Reineke, W., H.-J. Knackmuss (1988) *Annu. Rev. Microbiol.* Vol. 42: 263-287.
60. Reineke, W. (1998) *Annu. Rev. Microbiol.* 52 : 287-331.
61. Rysavy, J.P., T. Yan, P.J. Novak (2005) *Water Res.* Vol. 39:569-578.
62. Rui, L., Y.M. Kwon, A. Fishman, K.F. Reardon, T.K. Wood (2004) *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 70: 3246-3252.
63. Sandmann, E. R. I. C., M. A. Loos (1988) *Microbiol.* 34 : 125-130.
64. Schenk, T., R. Müller, F. Mörsberger, K. Otto, F. Lingens (1989) *J. Bacteriol.* Vol. 171: 5487-5491.
65. Seeger, M., B. Cámara, B. Hofer (2001) *J. Bacteriol.* Vol. 183: 3548-3555.
66. Shelton, D.R., J.M. Tiedje (1984) *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 48: 840-848.
67. Shim, H., T.K. Wood (2000) *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 70: 693-698.
68. Shim, H., D. Ryoo, P. Barbieri, T. K. Wood (2001) *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* Vol. 56 (1-2): 265-269.

69. Sondossi, M., M. Sylvestre, D. Ahmad (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 58: 485-495.
70. Sulfita, J.M., A. Horowitz, D.R. Shelton, J.M. Tiedje (1982) *Science* Vol. 218: 1115-1117.
71. Sylvestre, M., J. Fauteux (1982) *J. Gen. Appl. Microbiol.* Vol. 28: 61-72.
72. Sylvestre, M., R. Masse, C. Ayotte, F. Messier, J. Fauteux (1985) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21 : 192-195.
73. Taira, K., N. Hayase, N. Arimura, S. Yamashita, T. Miyazaki, K. Furukawa (1988) *Biochem.* Vol. 27: 3990-3996.
74. Takase, I., T. Omori, Y. Minoda (1986) *Agric. Biol. Chem.* 50 : 681-686.
75. Tsuchiya, T., T. Yamaha (1984) *Agric. Biol. Chem.* Vol. 48: 1545-1550.
76. Vandenberg, P.A., B.S. Kunka (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2578-2579.
77. Vanelli, T., A. Studer, M. Kertesz, T. Leisinger (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 64: 1933-1936.
78. Yang, X., Y. Sun, S. Qian (2004) *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 31: 415-420.
79. Ye, D., J.F. Quensen, III., J.M. Tiedje, S.A. boyd (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 61: 2166-2171.
80. Zwiernik, M., J.F. Quensen, III., S. Boyd (1998) *Environ. Sci. Technol.* Vol. 32: 3360-3365.

II.5. BTEX vegyületek bontása

Bevezető

Az elmúlt években az ipar rohamos fejlődésével a kibocsájtott szennyezőanyagok mértéktelen megjelenése okozott komoly fejtörést kutató-fejlesztő laboroknak, környezetvédő szervezeteknek, és az ipari nagyüzemeknek is.

A sérüléseknek leginkább kitett elem a talaj a környezeti elemek közül, hiszen a körforgási folyamatokban (biológiai, kémiai) központi szerepet játszik. Nagy adszorpciós képessége következtében a legtöbb környezetre toxikus anyag képes a talajszemcsékhez tapadni. Onnan a talajvíz lemoshatja, vagy az illékony szennyezők a levegőbe távoznak, melyek lecsapódva ismét a talajt szennyezik.

Környezetünk megóvása érdekében számos erőfeszítéssel találkozunk napjainkban. Fizikai, kémiai és biológiai módszereket fejlesztenek a világ minden országában, keresik a leghatékosabb megoldásokat az egyedi esetek kezelésére is.

Ahol lehetséges előnyben részesítik a költségkímélőbb biológiai megoldásokat, sajnos erre nem minden esetben van lehetőség. A vízdélkező szennyezőkkel a gyors szétterjedés a probléma, a vízben nem oldódók pedig a biológiai hozzáférést nehezítik, illetve az illékonyak a levegőbe illanak mielőtt még hatékony eltávolításukra megoldást találhatnánk.

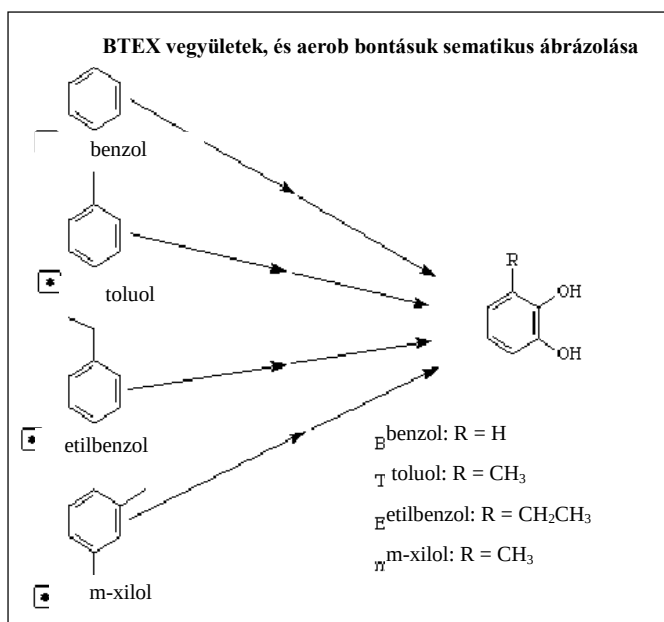
A biológiai módszerek alkalmazása előtt számos paramétert meg kell vizsgálnunk, hogy eldönthessük milyen megoldást választhatunk a laboratóriumokban kidolgozott lehetőségek közül:

- a szennyezett talaj, talajvíz természetes mikroflórája
- talaj szerkezet
- szennyező anyag(ok) minőségi, mennyiségi paraméterei
- oxigén-, vagy alternatív elektronakceptorok jelen vannak-e megfelelő mennyiségben
- egyéb ásványianyagok jelenléte/hiánya
- a szennyeződés kiterjedtsége
- a szennyezett terület környezete

A leglátványosabb szennyeződések a kőolaj-eredetű vegyületek okozzák. A kőolaj számos alkotóelemből álló szénhidrogén keverék (pl. alkánok, alkének, cikloalkánok, mono-, és poliaromás szénhidrogének), mely feldolgozása, szállítása

során kerül, mint szennyezőanyag a talajba, talajvízbe, légkörbe. Az olajtároló tartályok, csővezetékek kilyukadása, az olajfeldolgozó üzemek környékére való kiömlés, szállítás közben a transzport jármű balesete során kerül a környezetbe nem kívánatos mennyiségben kőolaj származék. Az alifás alkotó elemek lebontását többé-kevésbé gyorsan elvégzik a szennyeződés helyén élő honos mikroflóra tagjai, azonban az aromás komponensek bontása sokkal bonyolultabb feladat, ritka szerencse, amikor a honos mikroflórában találunk bontó szervezetet, vagy a bontáshoz megfelelő körülményt.

Az egyik legismertebb, és legtöbb gondot okozó monoaromás csoport a BTEX = benzol, toluol, etilbenzol, xilolok (II.35. ábra). Természetes előfordulásuk nyersolaj, dízelolaj, benzin, de ipari felhasználásuk is jól ismert, így antropogén eredetű szennyezőként is megjelennek a környezetünkben, pl. a benzolt szintetikus anyagok (műanyag, nylon, peszticidek, festékek) előállítása során; a toluolt és a xilolokat oldószerekként használják; az etilbenzol festékekben, tintákban, műanyagokban, peszticidekben lehet jelen [Holliger 1996]. Kimutatták, hogy komoly egészségkárosító hatásuk van a központi idegrendszerre, légzési rendszerre, valamint kimutatták, hogy a benzol kacinogén, a leukémia kialakulásának valószínűségét jelentősen növeli.



II.35. ábra

A környezetbe jutva párolgással, beoldódással terjednek, vagy talajrészecskékhez kötődnek. Általában együtt jelennek meg.

Mikrobiális lebomlásuk lassú, mivel a talajszemcsékről viszonylag gyorsan lemosódnak jó vízdékonyságuk következtében, és a talajvízzel szétdiffundálnak. Ennek ellenére számos kísérletben bizonyították, hogy biológiai bontásuk végbemegy mind aerob, mind anaerob módon.

II.5.1. BTEX biodegradáció

A Minnesota Egyetem egy kutatócsoportja rendkívül hasznos, és szemléletes adatbázist hozott létre (<http://umbbd.ahc.umn.edu/index.html>), ahol a kutatók számos biológiai lebontási útvonal grafikus megjelenítése mellett információt kapnak a különböző bontó szervezetekről és enzimeikről, valamint hipotetikus lebontási útvonalakat is lehet tervezni, keresni.

A bakteriális metabolikus lebontási utakat két fő kategóriára oszthatjuk az aromás vegyületek esetében: 1. perifériás utak, 2. központi/fő lebontási utak

Az első esetben egy egyedi vegyület olyan anyaggá alakul, mely sok metabolikus út közös intermedier molekulája, mely továbbakul a központi útvonal enzimei segítségével. A második esetben egy központi intermedier illetve származéka a fő lebontási útvonal enzimeinek közreműködésével átalakul, és a sejtek anyagcsere folyamataiban hasznosul.

Mindegyik BTEX tagra ismert legalább egy **aerob lebontási útvonal**, mely a katekol központi intermedieren keresztül alakítja át az aromás vegyületet. A benzol katekollá alakul, a toluol legtöbbször 3-metilkatekollá, de több más út is ismert. Az etilbenzol esetében is több lebontási megoldás lehetséges, de általában 3-etilkatekol intermedieren keresztül történik az átalakítás. A xilolok szintén monometilált katekollá alakulnak az első lépcsőben. A központi intermedier tehát a katekol, melynek aromás gyűrűje a fő lebontási útvonalban dioxigenáz enzimek támadásának következtében felhasad.

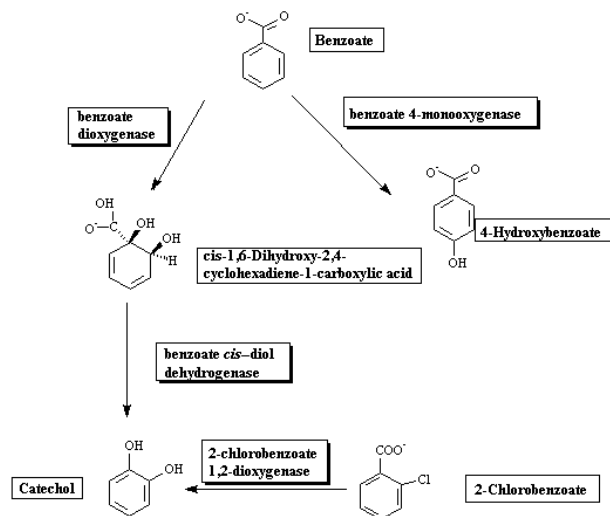
Sajnos gyakran találjuk e vegyületeket olyan körülmények között, amikor az aerob lebontás nem oldható meg, vagy nagyon költséges lenne, pl. ha az oxigén fogyasztás gyorsabb, mint az utánpótlás (talajvíz, üledékek, mélyeb talajrétegekben). A kutatások ezért kiterjedtek az **anaerob lebontási utak** vizsgálatára is. Bár kevesebb megoldást fedeztek fel, de megállapíthatjuk, hogy **mindegyik BTEX elemre van biológiai lebontási lehetőség csak a körülmények nem mindig adottak!**

A következő részben bemutatunk néhány lebontási útvonalat a bontó mikroorganizmus és kulcsenzimeik megjelölésével.

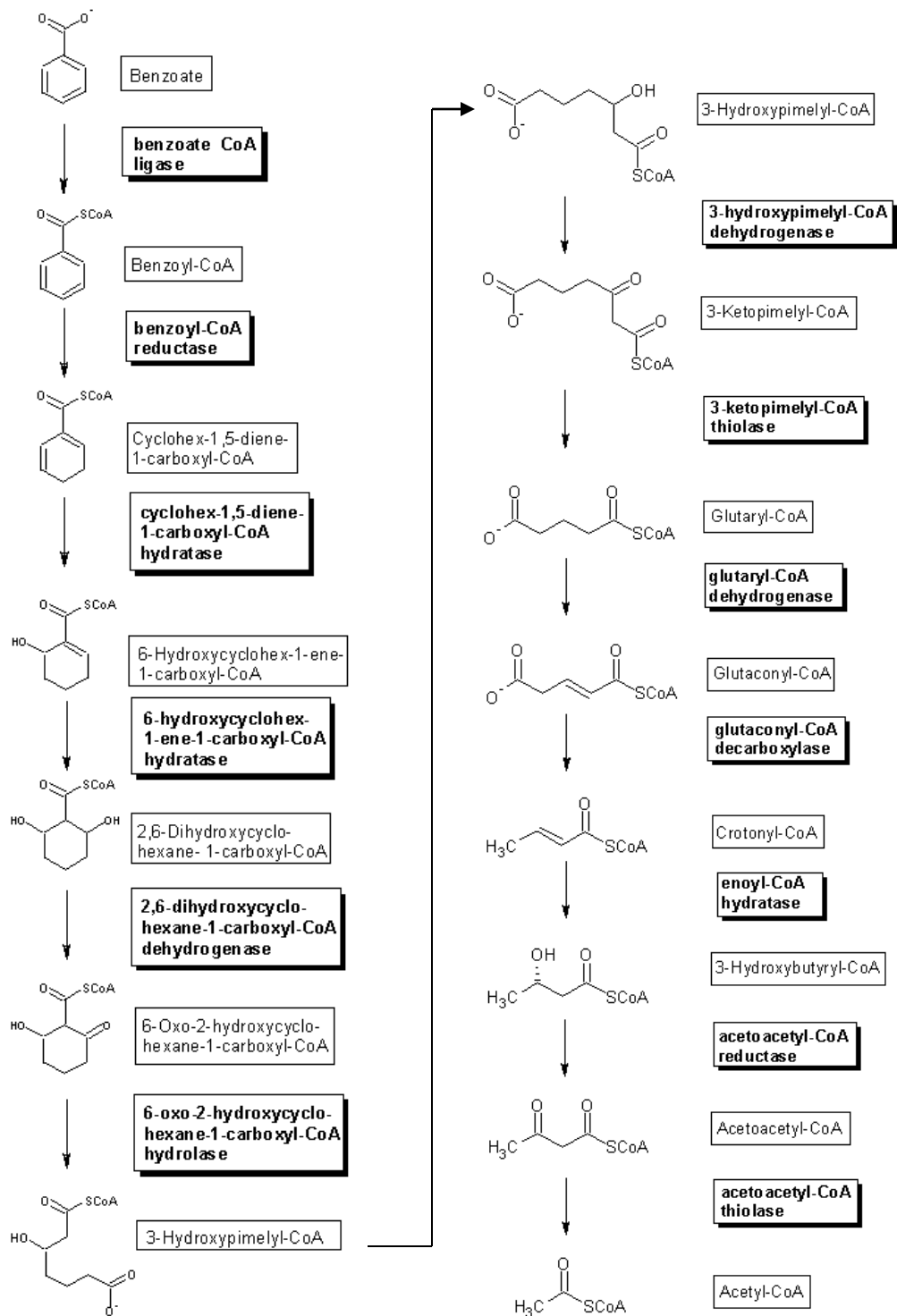
II.5.1.1. Benzol

- **Aerob** módon képes elbontani pl. *Pseudomonas putida* benzol-dioxigenáz enzime segítségével, *Pseudomonas* sp., *Aspergillus niger*, *Rhodotorula graminis* fajok benzol-4-monooxygenáz enzimeikkel (II.36. ábra).

- **Anaerob** lebontását Vogel és mtsai írták le először 1986-ban. Metanogén környezetben bizonyították e vegyület bomlását, mely esetben az első lépés a benzol fenollá alakulása volt. Az 1990-es években figyelték meg szulfát- és vas-redukáló körülmények között gyors oxidációját. A legtöbb mikroba - pl. *Thauera aromatica* K172, *Rhodopseudomonas palustris*, *Azoarcus evansii* - benzoil-KoA központi intermedierré alakítja át első lépcsőben benzoát-KoA ligáz enzimeik segítségével, majd redukációs lépésekben a központi intermedier is átalakul (II.37. ábra)



II.36. ábra
Benzoátok aerob lebontásának grafikus ábrázolása

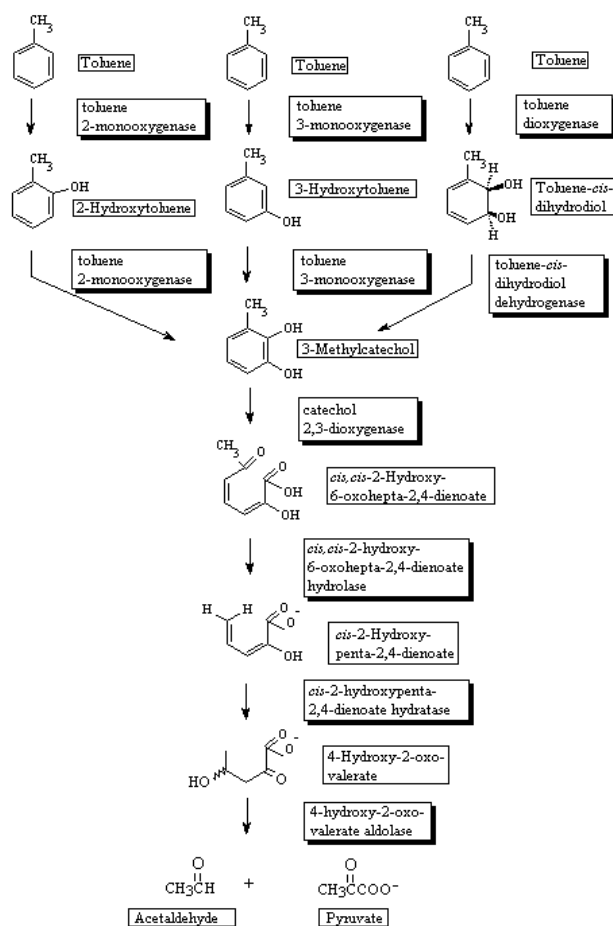


II.37. ábra
Anaerob benzoát bontás

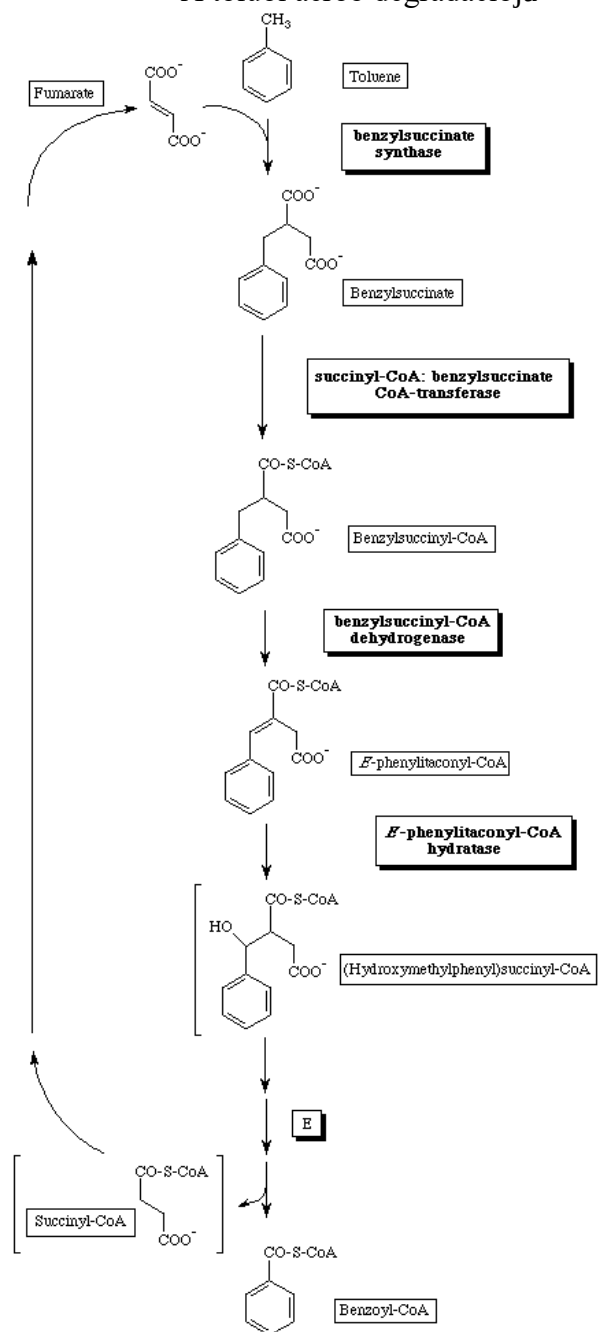
II.5.1.2. Toluol

- *Pseudomonas* fajok - pl. *Pseudomonas mendonica*, *P. pickettii*, *P. putida*, - **aerob** módon képesek megtámadni az aromás vegyületet mono-, vagy dioxigenáz enzimeik segítségével (II.38. ábra), miközben mikróbatól/ enzimtől függően különböző intermedierek keletkeznek. Két-három lépés után egy központi intermedier, 3-metilkatekol vagy benzaldehid keletkezik, melyek aztán a fő lebontási útvonalak enzimei segítségével teljesen lebomlanak, illetve a Szentgyörgyi-Krebs ciklusba épülnek.

- **Anaerob** módon az egyik legjobban bontható aromás szénhidrogén denitrifikáló (*Azoarcus* sp., *Thauera aromatica*), szulfátredukáló (*Desulfobacula toluolica*), vasredukáló (*Geobacter metallireducens*) baktériumok segítségével, melyek képesek szén- és energiaforrásként hasznosítani. A toluol metabolizmusban (II.39. ábra) benzilszukcinát, benzilszukcinil-KoA, benzoil-KoA intermediereket tudtak azonosítani.



II.38. ábra
A toluol aerob degradációja



Alfred Spormann and Eva Young

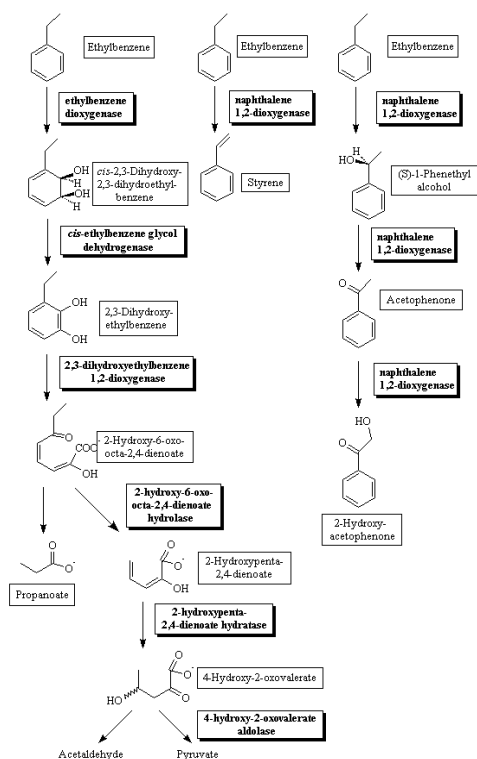
II.39. ábra
Anaerob toluol bontás

II.5.1.3. Etilbenzol

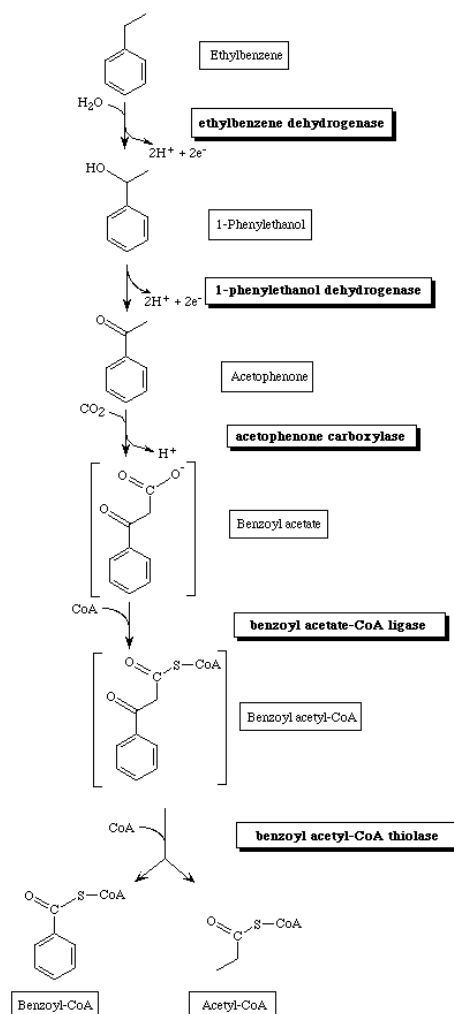
Az etilbenzol az egyik legvízoldékonyabb aromás szénhidrogén. Aerob lebontásában oxigenáz reakciók szerepelnek, anaerob bontása denitrifikálók aktivitásának köszönhető.

- Hasonlóan az eddigi molekulákhoz, az etilbenzolt is több mikroorganizmus képes bontani (II.40. ábra), elsősorban **aerob** *Pseudomonas*ok (*Pseudomonas* sp. NCIB10643, NCIB 9816, *P. putida*). Az alkilbenzolokat bontó *Pseudomonas* sp. NCIB10643 törzs először dioxigenálja az aromás gyűrűt, majd extradiol (meta-) gyűrűhasítással továbbalakítja. Más *Pseudomonas*ok naftalin-dioxigenáza mutat aktivitást etilbenzol jelenlétében.

- Az **anaerob** etilbenzol mineralizáció denitrifikáló körülmények között zajlik, tiszta, de nem azonosított mikrobákkal (*Proteobacteria*). A kezdeti reakció az etilbenzol dehidrogénezése, majd többlépcsős folyamatban e vegyület bontása is a benzoil-KoA központi intermedieren keresztül történik (II.41. ábra).



II.40. ábra
Etilbenzol aerob lebontása



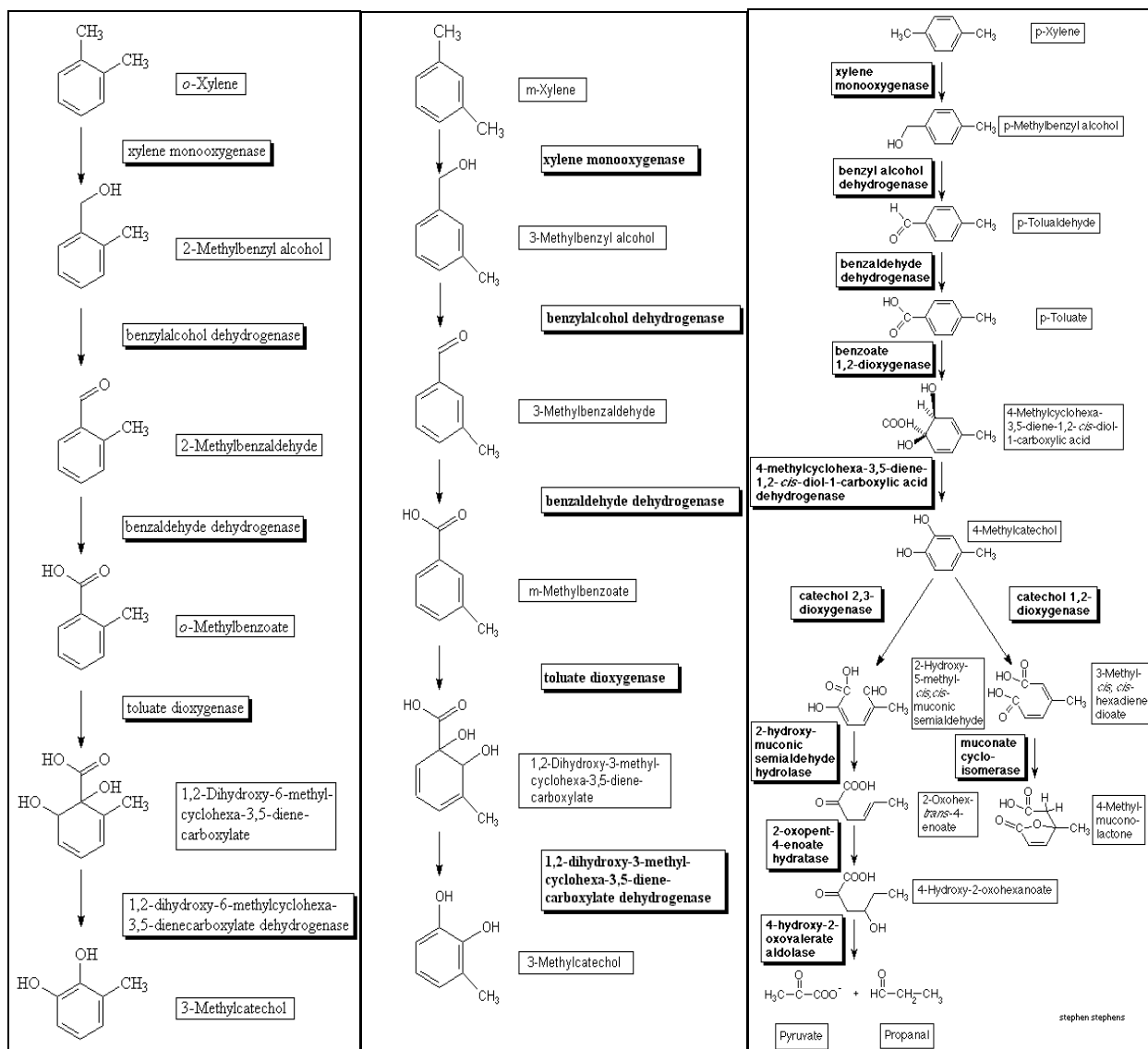
II.41. ábra
Etilbenzol anaerob lebontási útvonal

II.5.1.4. Xilolok

Illékony alkotói a benzinnek, gyakran találkozunk velük, mint talajvíz szennyezők. Mindhárom izomer egyik fő felhasználása, mint oldószerek különböző vegyszerek előállítása során. További alkalmazásuk: a p-xilolt szinte teljesen felhasználják a kőolaj frakcióból tereftálsav gyártásához. Az o-xilolt főleg a ftálsavanhidrid gyártáshoz használják.

- **Aerob** lebontási útjuk igen hasonló, a p-, és m-xilolt a *P. putida* xilol-monooxygenáz enzimével képes bontani, az o-xilolt a *Burkholderia cepacia* támadja

meg xilol monooxygenáz enzimével, többlépcsős folyamatban 3-, 4-, ill. 2-metilkatekol központi intermedier keletkezik (II.42. ábra). Megfigyelték, hogy kometabolizmussal is bonthatók: denitrifikáló ill. szulfátredukáló - toluol bontó mikroorganizmusok a toluol bontása közben támadják a xilol vegyületeket is.



II.42. ábra
Xilolok aerob lebontási útvonala

A konkrét és hipotetikus lebontási útvonalak ismerete, feltérképezése azonban nem elegendő a valós bioremediáció kivitelezéséhez, illetve annak sikeres

megvalósításához. Számos paraméter befolyásolja az adott területen a szennyezőanyagok lebontásának lehetőségeit. A következő néhány tanulmányban a körülmények vizsgálatáról, azok optimalizálásáról lesz szó.

II.5.2. A bioremediáció körülményei

Az egyik legfontosabb paraméter az oxigén. Jelenléte/hiánya alapvetően meghatározza a bioremediációs lehetőségeket. A talajvízben, a talaj mélyebb rétegeiben, üledékekben az oxigén mennyisége erősen limitált. Amennyiben oxigénhiányos környezettel találkozunk, nem kell rögtön feladnunk azt a lehetőséget, hogy aerob lebontási módot válasszunk, hiszen több megoldás is létezik alternatív elektronakceptorok reakciótérbe juttatásával, pl. nitrát, szulfát, Fe(III), Mn(IV) vegyületek, de alkalmazhatunk H_2O_2 , vagy MgO_2 is.

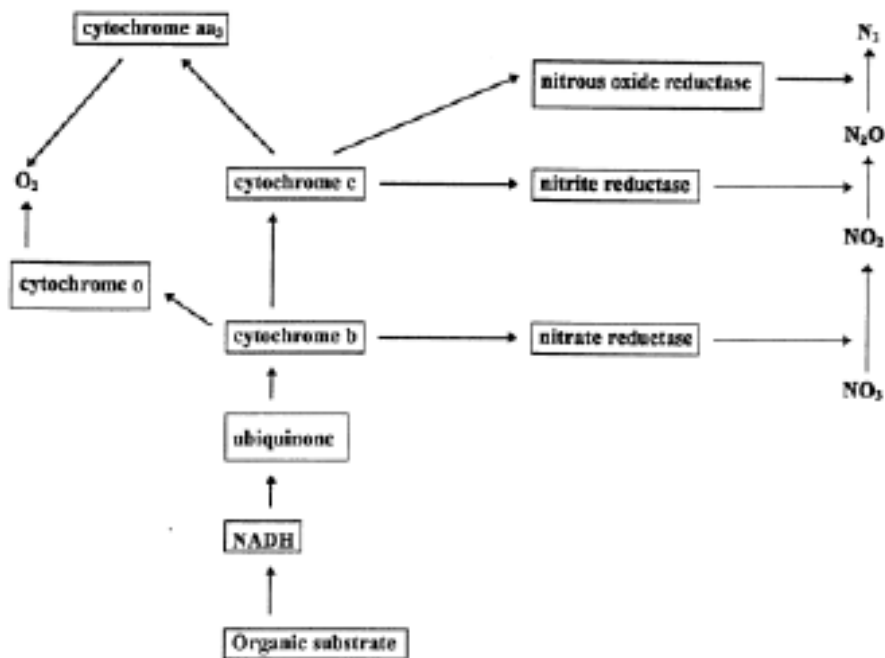
Wilson és Bouwer érdekes összefoglalót jelentetett meg 1997-ben a J. of Industrial Microbiology and Biotechnology újságban. Azt elemezték, hogy oxigén illetve denitrifikáló feltételek mellett hogyan szabályozódik a baktériumokban az elektrontranszfer. Az aerob biodegradáció során az aromás vegyületek oxidációja molekuláris oxigén segítségével történik, a keletkező intermedier a központi metabolikus utakba lép (Szentgyörgyi-Krebs ciklus és β -oxidáció). Az aerob légzés során a mikroorganizmusok tehát oxigént használnak a benzol gyűrű hidroxilálásához, miközben felhasad a gyűrű. A mono- és dioxigenáz enzimek egy vagy két oxigén atomot építenek az aromás molekulára.

Oxigén hiányában, alternatív elektronakceptorok jelenlétében szintén lehetséges az aromás vegyületek biotranszformációja, sőt megfigyelték, hogy a funkciós csoportokat hordozó származékok könnyebben bomlanak. Ezesetben az un. anaerob hidroxilációhoz szükséges oxigént a víz hasításával nyerik a mikróbák metanogén körülmények között.

A kritikus oldott oxigén szint igény eltérő az egyes mikróbák esetén, de azt megfigyelték, hogy általában az aromás szénhidrogének biodegradációjához nagyobb oxigénszintre van szükség, mint egyszerűbb molekulák, pl. glükóz bontásához.

Számos mikróba fontos szerepet játszik az aromás vegyületek biodegradációjában, azonban a fakultatív anaerobok különösen nagy jelentőségűek

kevert elektronakceptorok környezetében, mivel mind az oxigént, mind a nitrátot képesek hasznosítani. Ezek a baktériumok tipikusan az átmeneti redox zónában fordulnak elő, ahol mikroaerofil körülményeket találnak. Ezek a baktériumok molekuláris oxigén jelenlétében aerob lebontási útvonalakat használva metabolizálják a szervesanyagot. Amikor az oxigénszint egy bizonyos koncentráció alá csökken, a baktériumok nitrát légzésre kapcsolnak át (II.43. ábra). Azt is megfigyelték, hogy a kritikus oxigén szint felett a denitrifikáció nem tud működni.



II.43. ábra

Az elágazó légzési elektron transzport lánc sematikus ábrázolása

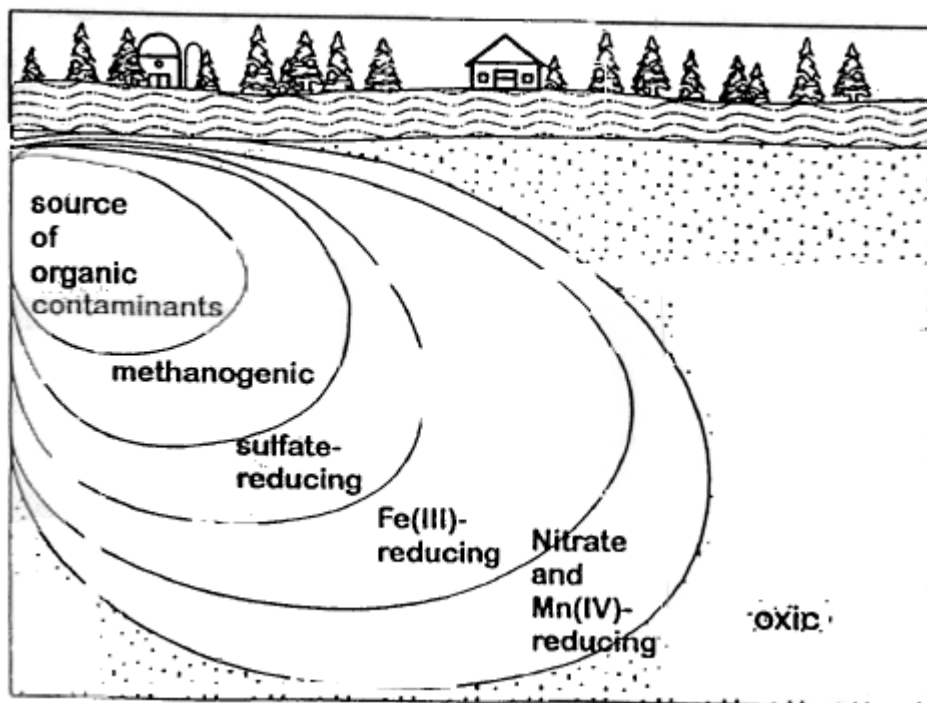
A fenti ábra talán magyarázatot ad arra, hogy miért lehetséges a denitrifikáló mikroorganizmusokban mindkét körülmény között az elektrontranszport.

Az oxigén kompetitív gátlója a denitrifikációnak, a vas(III) ionokat viszont elfogadja a nitrátreduktáz nitrát helyett, mint elektronakceptor, bár a nitrátot előnyben részesíti.

Egy talaj vagy üledék mintában az oxigénszint nagyon hullámzó, ezért rendkívül fontos a mikrobák túlélése szempontjából, hogy gyorsan tudjanak váltani. Ezt a váltást egyrészt az oxigénszint befolyásolja, de meghatározó paraméter maga a

szállító közeg is a víz, és a talaj porozitása, mely a vízáramot szabályozza attól függően, hogy mennyire laza vagy kötött a talaj. Ha a szubsztrát koncentráció magas, akkor nagy az elektronakceptor igény is, ekkor viszont maga a szubsztrát a legfontosabb regulátora a denitrifikációnak. Ezek szerint viszont kevert oxigén/nitrát környezetben végbemehet folyamatosan az aromás szubsztrátok metabolizációja akár úgy is, hogy a kezdeti lépésekhez még molekuláris oxigént használnak a denitrifikálók oxigenáz enzimeiket bevetve, de a következő bontási lépésekben, az oxidált aromás intermedier metabolizálásában már a nitrát szerepel elektronakceptorként. Ezt konkrét kísérletekben is megfigyelték [Su és Kafkewitz 1994], a toluol és xilol bontó *P. maltophilia* jobban szaporodik 2% oxigén és nitrát keveréken, mint csak nitráton, bár azt nem tudjuk, hogy az oxigén és nitrát hasznosítása szimultán vagy felváltva történik-e. Alvarez és Vogel [1995] nagyobb mérvű benzol eltávolítást és intenzívebb biodegradációt tapasztalt oxigén és nitrát együttes jelenlétében, mint külön-külön. Major és mtsai [1988] egy mikroközösség benzol, toluol, m-xilol bontó aktivitását vizsgálva figyelték meg hasonló eredményeket. Amíg a BTEX funkciós csoportokat hordozó tagjai oxigénlimitált környezetben nitrát jelenlétében biodegradálódnak, a benzol ellenáll a bontásnak [Hutchins 1991]. Oxigén jelenlétében viszont a benzol is bontható.

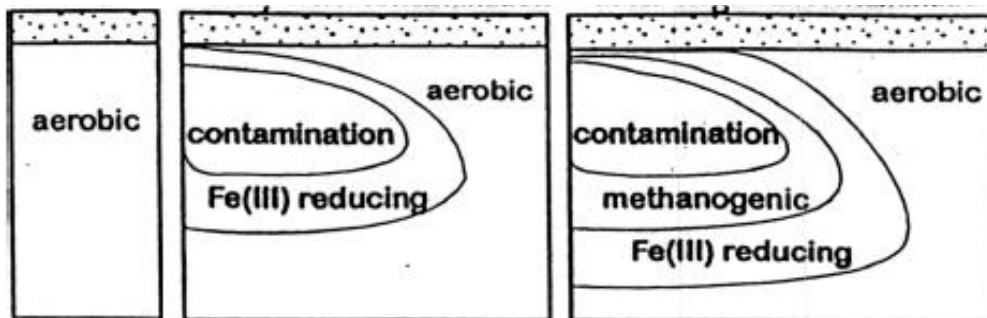
Lovley tanulmányában kifejti, hogy a BTEX szennyezés bekövetkezése után a vízzáró rétegben anaerob terminális elektron fogó folyamatok elkülönült zónákat alkotnak (II.44. ábra). Ez valószínűleg annak a következménye, hogy milyen elektronakceptor van jelen, és a mikroorganizmusok harca az elektronakceptorokért hogyan alakul. Egy idő után a szennyezőforráshoz legközelebbi zónát metanogén közösség alkotja, ekkor már Fe(III) és szulfát nincs jelen a környezetben. Ha e két elektronakceptor még fellelhető, akkor a vas-, és szulfátredukálók elnyomják a metanogéneket (II.45. ábra). A vasredukálók Fe(III) jelenlétében a szulfátredukálókat is elnyomják. Ha Mn(IV) és/vagy nitrát jelen van, akkor Mn(IV) és/vagy nitrát-redukáló zóna kialakulása várható.



II.44. ábra

Tipikus anaerob terminális elektron-fogó folyamatok zónáinak alakulása olajszennyezett vízzáró rétegben

eredeti állapot röviddel a szennyezés után későbbi állapot a szennyezés után



II.45. ábra

A mikrobiális zónák kialakulásának folyamata

Megfigyelték, hogy ebben az anaerob kőolaj-szennyezett környezetben a Fe(III) a legbőségesebb elektronakceptor a szervesanyagok oxidációjához, ezt geokémiai adatok is alátámasztják. Miközben a Fe(III) mennyisége csökken, Fe(II) feldúsulását detektálták, és a BTEX mintegy fele ennek következtében oxidálódott CO₂-dá, melyet ¹⁴C izotóppal bizonyítottak.

A talajvizekben általában alacsony a szulfát koncentráció, ezért a szulfát-redukálók szerepe kisebb. A nitrát jelenlétre sem lehet számítani, de a szulfát és nitrát is jól oldódik vízben, ezért könnyű gyorsan elegendő szulfát, vagy nitrát koncentrációt biztosítani.

Az eddig említett tanulmányok a BTEX bontását baktérium közösségekkel mutatták be, azonban léteznek egyedi fajok tiszta kultúrái, melyek képesek a BTEX egyes komponenseit vagy azok keverékét bontani. Erről számolt be Yadav és Reddy 1993-as cikkében, amelyben *Phanerochaete chrysosporium* fehér rothadást okozó gombával végzett kísérleteiket írták le. Ez a gomba régóta ismert lignint, és egyéb ellenálló szervesanyagokat, pl. klórozott aromás vegyületeket bontó képességéről. Mutáns törzsekkel bizonyították, hogy a BTEX molekulák bontásában nem a jól ismert extracelluláris lignin peroxidáz és mangán-függő peroxidáz enzimei vesznek részt, hanem a fő lebontási útvonal enzimei lehetnek felelősek a mineralizációért.

A BTEX molekulák azonban nemcsak talajvizeket, üledékeket, talajt szennyeznek, hanem illékonyságuk révén az atmoszférát is. A gyorsan illanó vegyületek felfogására különböző biofiltereket fejlesztettek ki. A filterágy általában természetes szerves anyag pl. tőzeg, komposzt, levél, faforgács és/vagy talaj. A filterágyon alakul ki az aktív biofilm réteg, mely állandó nedvességtartalmat igényel, amit a levegővel együtt juttatnak be a rendszerbe. Az illékony szervesanyagot tartalmazó levegőáramból a biofilter kifogja a szervesanyagot, mely abszorbeálódik a biofilm rétegbe, majd szén és/vagy energiaforrásként hasznosul. A csepegtetőágyas levegő biofilter rendszer szintetikus, szervesetlen közeget alkalmaz [Lu és mtsai 2002], és folyadék formában biztosítja a tápanyagokat és pufferreket. A természetes közeghez képest ennek a rendszernek az az előnye, hogy pontosabban tudja szabályozni a pH-t, nedvességtartalmat, tápanyag koncentrációt. Megfigyelték, hogy a rendszer pH optimuma 7,5-8,0 körül van, a BTEX mineralizáció fokozódott, ha növelték a tápanyagadagolást 3-8 l/m³/h tartományban, de 17 l/m³/h felett már csökken az aktivitás. Az optimális feltételekkel akár a BTEX 80%-át is el tudták bontani.

Egy másik tanulmányban [Shim és mtsai 1999, 2002] konkrét mikrobákkal rostágyas bioreaktort hoztak létre. Ko-kultúrában *Pseudomonas putidát* és *P. fluorescens* baktériumokat alkalmazták a BTEX molekulák bontására. A bioágyon

BTEX tartalmú szennyvizet engednek át. Levegőáram helyett H_2O_2 -ot használtak oxigénforrásként. A BTEX hatékony eltávolítását érték el, részben úgy, hogy a rostágyat a baktérium immobilizáció előtt átitatták BTEX vegyületekkel, nagy felületet biztosítottak a baktériumok számára, melyen a szaporodásuk nem gátolt. Találtak egy megfelelő alternatív oxigénforrást, mely segítségével az illékony szervesanyagok 'kihajtása' (a légárammal) elkerülhető volt. Képesek voltak ezzel a rendszerrel akár 600 mg/l/h hatékonyságot elérni.

A *Pseudomonas* csoport tagjai általában könnyen szaporíthatóak, különleges tápanyag igényük nincs, így a bioremediációs kísérletekbe egyszerűen beilleszthetők az aktivitás, majd stabilitás vizsgálatok után.

II.5.3. A BTEX bontás genetikai háttere

Funkcionális és filogenetikai diverzitás vizsgálatokkal fedeztek fel számos toxikus szervesanyag bontó mikroorganizmust. A BTEX vegyületek esetén is végeztek hasonló kísérleteket [Sentchilo 2000, Cavalca 2004]. A molekuláris biológiai és biokémiai kutatások szerint az aromás szénhidrogének bontásában főszerepet játszanak az oxigenáz enzimek, pl. toluol-monooxigenáz, katekol 1,2-dioxigenáz, katekol 2,3-dioxigenáz, toluol-dioxigenázok, stb. Ezeket az enzimeket kódoló génszakaszokat specifikus primerek segítségével közvetlenül a környezeti mintákból is ki lehet mutatni, ha van olyan mikroorganizmus a szennyezés környezetében, mely képes bontani e vegyületeket. Ma már tudjuk, hogy a laboratóriumi körülmények között a környezeti mintákból szaporítható mikroorganizmusok száma igen csekély, mindössze 1-5%-a a mintában jelenlévő összes mikroorganizmusnak. Az elmúlt évtizedben kifejlesztett molekuláris biológiai módszerek segítségével ez a százalék jelentősen javulhat. Specifikus, a mikrobákra nagyon jellemző, konzervatív szakaszok kifogása a környezeti mintákból segít azonosítani a mikrobát, vagy annak valamilyen funkciós fehérjét kódoló genetikai anyagát. Egy, akár kis koncentrációban jelenlévő génfragmentet is láthatóvá, mérhetővé tudunk tenni egy úgynevezett polimeráz-láncreakció segítségével (PCR), ahol specifikus primerek és polimeráz enzim segítségével felsokszorozzuk a vizsgálni kívánt génfragmentet. A PCR-sokszorosított fragmenteket denaturáló grádiens

gélelektroforézis (DGGE) és/vagy hőmérséklet grádiens gélelektroforézis (TGGE) technikák segítségével tovább tisztíthatjuk, a hasonló, de nem azonos fragmenteket elválaszthatjuk egymástól különböző elektroforetikus migrációjuknak köszönhetően.

Cavalca és mtsai 2004 írtak egy összefoglalót, melyben a BTEX bontó mikroorganizmusokat és specifikus enzimeiket, illetve azokat kódoló génszakaszokat részletezik, melyeket a fent említett módszerekkel környezeti mintából, szennyezett talajvízből 'halásztak' ki. A BTEX bontó törzsek a *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Microbacterium*, *Azoarcus*, *Bradyrhizobium* családok tagjai. Megfigyelték azt is, hogy néhány mikroorganizmusban egyszerre több toluol bontó útvonal is aktív, ami nem olyan meglepő, ha visszatekintünk a denitrifikáló mikroorganizmusok azon tulajdonságára, hogy oxigénhiányos körülmények között azonnal átváltanak nitrátlégzésre. A gének szintjén is megfigyeltek a körülményektől függő eltéréseket. A mintákból tudták azonosítani a toluol dioxigenáz *todC1*, a toluol monooxigenáz *tmo*, valamint a *meta*-, és *orto*-hasító dioxigenázok *xylE* és *catA* génjeit. Ha oxigénlimitált körülményeket biztosítottak, akkor a *tmo* géneket hordozó mikrobák sokkal hatékonyabbak voltak, mint a *todC1*-el rendelkezők, míg nagy oxigén koncentráció mellett a dioxigenáz enzimeket termelő törzsek bontották sokkal hatékonyabban a toluolt. Ebből megállapíthatjuk, hogy alacsony oldott oxigénszint esetén a TOM (monooxigenáz enzimek részvétele) lebontási utakat használó mikroorganizmusok kerülnek előtérbe.

A katabolikus utak enzimeit kódoló gének gyakran plazmidon találhatók, ezt bizonyítja Sentchilo és mtsai [2000] tanulmánya, melyben *Pseudomonas* törzs toluol, m-xilol és p-xilol bontó képességét tanulmányozták. A plazmidon a *meta*-hasító útvonal enzimeit találták, a plazmid a TOL plazmid. A TOL plazmid hasonmásait több mikroorganizmusban is megtalálták, ami arra utal, hogy ezek a plazmidok az evolúció során egyik mikroorganizmusból átjuthattak másikba. Ezt több plazmid esetében is valószínűsítik. Sőt a molekuláris biológiai eljárásokban irányított plazmid transzfert alkalmaznak ezen ismereteken alapulva. Ezek a kutatások előrevetítik azt a lehetőséget, melyet japán kutatók már meg is próbáltak, hogy olyan szuper mikroorganizmusokat hozzanak létre, melyek számos metabolikus út enzimeit kódoló génklasztert hordoznak elsősorban plazmidokon.

A fent részletezett tanulmányokból, kísérletekből levonhatjuk azt a következtetést, hogy a BTEX vegyületek mikrobiálisan bonthatók, legfőljebb az adott körülmények nem alkalmasak a biodegradációra. A feltételek megváltoztatásával azonban előidézhető a várt reakció. Mind aerob, mind anaerob körülmények között ki tud alakulni olyan mikroflóra, mely képes az összetett szerves szennyeződést is, mint szén- és/vagy energiaforrást hasznosítani. A legígéretesebb kísérleteket denitrifikáló baktériumokkal végezték, melyek, bár alapvetően aerob mikroorganizmusok oxigénlimitált környezetben alternatív elektronakceptor jelenlétében is kifejtik metabolikus aktivitásukat. Az ismeretek alapján joggal várjuk, hogy ki tudunk fejleszteni olyan biodegradációs eljárást, mely a hazai problémák megoldására alkalmazható.

II.5.4. Irodalomjegyzék

- Alvarez P.J.J. and T.M. Vogel (1995) Water Sci. Tech. 31: 15-29
- Cavalca L., E. Dell'Amico, V. Andreoni (2004) Environm. Biotechnol. 64: 576-587
- Holliger C. and A.J.B. Zehnder (1996) Current Op. in Biotechnol. 7: 326-330
- Hutchins SR (1991) App. Environ. Microbiol. 57: 2403-2407
- Lovley OR (1997) J. Ind. Microbiol. and Biotechnol. 18: 75-81
- Lu C., M-R Lin, C. Chu (2002) Adv. in Environm. Res. 6: 99-106
- Major DW, CI Mayfield, JF Barker (1988) Ground Water 26: 8-14
- Reinhard M., S. Shang, P.K. Kitanidis, E. Orwin, G.D. Hopkins, C.A. Lebron (1997) Environ. Sci. Technol. 31: 28-36
- Sentchilo V.S., A.N. Perebituk, A.J.B. Zehnder, J.R. Van Der Meer (2000) Appl. and Environm. Microbiol. 66(7): 2842-2852
- Shim H., S.T. Yang (1999) J. of Biotechnol. 67: 99-112
- Shim H., E. Shin, S.T. Yang (2002) Adv. in Environm. Res. 7: 203-216
- Su J.J and D. Kakewitz (1994) FEMS Microbiol. Rev. 15: 249-258
- Tumbiolo S., J-F Gal, P-C Maria, O. Zerbinati (2004) Anal. Bioanal. Chem. 380: 824-830
- Wilson LP. and EJ Bouwer (1997) J. of Ind. Microbiol. & Biotechnol. 18: 116-130
- Yadav J.S. and C.A. Reddy (1993) Appl. and Environm. Microbiol. 59: 756-762
- UM-BBD: Metapathway Map <http://umbbd.ahc.umn.edu/index.html>

II.6. Nitro- funkciós csoportot hordozó vegyületek mikrobiális bontása

Bevezetés

A víz, talaj levegő szennyező anyagok nagyon sokfélék lehetnek. A xenobiotikumok okozzák a legtöbb problémát, mikrobiológiai lebontásuk ígéretes, környezetbarát módszer, és remény van arra, hogy a lebontás eredménye a toxikus vegyület detoxifikációja, sőt eliminálása a környezetből.

Nitro funkciós csoportot hordozó vegyületek természetes előfordulásával (pl. azomycin, klóramfenikol, pirrolnitrin) ritkán találkozunk, minden bizonnyal ennek köszönhető ellenállásuk a biológiai bontással szemben. Perzisztenciájuk fő oka valószínűleg szoktatlan funkciós csoportjuk pl. NO_2 , $\text{N}=\text{N}-\text{R}_2$, ezek erős elektronelszívó hatásúak, és akadályozzák az oxigenolitikus degradációt. Bonthatóságukat persze egyéb faktorok is befolyásolják, pl. szorpciós/desorpciós tulajdonság, oldhatóság/biológiai hozzáférés, koncentráció, kémiai természet. A problémát csak fokozza, hogy ezek a szerves vegyületek nemcsak bontásnak ellenállóak, de toxikusak, sőt mutagének vagy karcinogének is [Honeycutt 1996]. A nitro- funkciós csoportot hordozó szennyező vegyületek nagy része antropogén eredetű, főleg festék-, peszticid- és robbanóanyag-gyártás hulladékeként jelenik meg. Mivel a nitro-csoport könnyen átalakítható más funkciós csoporttá, kedvelt intermedierek számos kémiai szintézisben, a nitrobenzol klasszikus alapanyaga az anilin gyártásnak, de a klórbenzol és fenol gyártók is egyre gyakrabban használják. A nitrotoluolok a robbanószerkezetek pl. TNT (2,4,6-trinitrotoluol) építőelemei. Érdekes, hogy a parfümgyártók is használják, speciális vegyületei pézsmailatot árasztanak.

Néhány szervezet képes nitro funkciós csoportot hordozó vegyületeket szintetizálni, ezek a természetes előfordulású molekulák pl. a klóramfenikol,

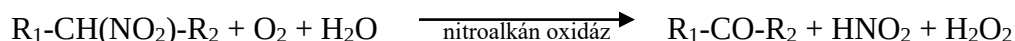
azomicin, melyeket antibiotikumokként ismerünk, de néhány növény, főleg a hüvelyesek nitro toxinokat termelnek pl. 3-nitro-1-propionsav, 3-nitro-1-propanol.

Bár ismerünk oxigenolitikus támadást nitroaromás vegyületek esetében, a nitro csoport erős elektronelszívó hatása miatt az aromás gyűrű elektronhiányos, így az oxigenázok elektrofil támadása gátolt, leginkább mononitroaromás, ritkán dinitroaromás vegyületek esetében lehetséges oxigenolitikus támadás. Ennek az a magyarázata, hogy a természetesen előforduló vegyületek általában mononitro-vegyületek, így az evolúció során képesek voltak egyes szervezetek adaptálódni, és e vegyületeket hasznosítani.

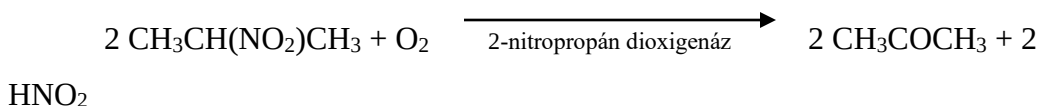
II.6.1. Alifás nitro funkciós csoportot hordozó vegyületek mikrobiális bontása

II.6.1.1. Nitroalkánok

Egyes gombák, streptomycesek bontják, de a mechanizmusról viszonylag keveset tudunk [Dhawale 1979]. Nemrég a *Fusarium oxysporum* –ban azonosítottak egy nitroalkán oxidáz enzimet, mely különböző nitroalkánok oxidációját és nitrát csoport eltávolítását katalizálja, aldehidek képződése közben [Heasley 1996]. (Az enzim, flavoenzim, FAD prosztetikus csoportja van).



Egy élesztőből, a *Hansenula mrakii*, a 2-nitropropán dioxigenáz enzimet azonosították, mely szintén tartalmaz FAD prosztetikus csoportot [Kido 1976]. Ennek az enzimnek az az érdekessége, hogy a **dioxigén két atomját a szubsztrát két külön molekulájába építi be!** Ez igen ritka a dioxigenázoknál.



Egyes gombákat, főleg fehér rothadást okozó gombákat (pl. *Phanerochaete chrysosporium*) egyre gyakrabban alkalmazzák bioremediációs célokra. Miután

felfedezték, hogy olyan összetett és perzisztens molekulákat, mint pl. a lignin képesek bontani, alaposabban is megvizsgálták biodegradatív képességeiket, és azt találták, hogy sok toxikus vegyületet képesek bontani. Kulcs enzimeik a peroxidázok, melyek segítségével oxidálják a vegyületeket, pl. 2,4-dinitrotoluol konverziója mangán peroxidázzal, mely során metanol és 4-nitro-1,2-benzokinon keletkezik, mely továbbalakul 4-nitrokatekollá. A lignin peroxidáz katalizálta reakcióban a nitro csoport felszabadul, metilált és hidroxilált termékek keletkeznek.

II.6.1.2. Nitrát észterek (C-O-NO₂)

A mai napig nem ismerünk természetesen előforduló nitrát észtert, azonban annál inkább ismerjük a szintetikus formáikat. Legismertebb vegyület a pl. glicerol trinitrát vagy nitroglicerín. Bontásukra alig van példa, nem specifikus enzimreakciót feltételznek, ráadásul rendkívül lassú esemény, akár több év. Egy-két mikroorganizmus, mely képes volt átalakítani ezeket a vegyületeket pl. *Agrobacterium radiobacter* és *Pseudomonas sp.* képesek a glicerín tri- és dinitrátról a nitrát csoportot eltávolítani, de csak mononitrátig megy a reakció [White 1996]. A nitrátot nitrogén forrásként hasznosítják. Hasonlóan az *Enterobacter cloacae*-hoz ez esetben annyi a különbség az előző példához képest, hogy e baktérium enzime NADPH függő.

II.6.2. Nitroaromás vegyületek biodegradációja

II.6.2.1. Nitroaromások aerob bontása

A nitroaromások erősen mérgező vegyületek, a gyógyszer- és festékipar számára azonban nélkülözhetetlen kiindulási anyagok.

Mikrobiális mineralizációjukra négy ismert mechanizmus:

- a) oxigén jelenlétében kezdeti oxigenációs reakcióban nitrit szabadul fel (pl. monoxigenáz katalizálta reakcióban a 4-nitrofenol katekollá és nitritté alakul, *Alcaligenes eutrophus*)
- b) kezdeti redukció eredménye aromás amin, ami tovább metabolizálódik
- c) nitro csoport teljes reduktív eliminációja, nitrit szabadul fel

d) nitro csoport részleges redukciója hidroxilaminná, mely tovább metabolizálódik [Marvin-Sikkema 1994]

A nitroaromások a mikroorganizmusok számára szén- és nitrogén forrásként szolgálhatnak, azonban sok mikroba, főleg az anaerobok csak redukálják a molekulákat aminokká. Az oxidatív folyamatokban pedig a nitro csoport nitrogén forrásként szolgál, azonban a szénvázhoz kevés kivétellel nem nyúlnak a mikroorganizmusok, pl. *Pseudomonas sp.*, *Nocardia sp.*, *Ralstonia sp.*, *Comamonas acidovorans*, *Phanerochaete sp.*

II.6.2.1.1. A nitrobenzolok

A nitrobenzolok legegyszerűbb lebontására pl. a *Comamonas acidovorans* esetében láthatunk példát, a nitrobenzol direkt dioxigenáz támadást követően katekollá alakul [Nishino 1995]. Ennél bonyolultabb folyamat zajlik *Pseudomonas pseudoalcaligenes* törzsben. Ez a törzs szén-, nitrogén- és energiaforrásként is hasznosítja a vegyületet, de szoktalan megoldással, az első lépés egy redukció egy NADPH függő nitrobenzol reduktáz enzim segítségével hidroxilaminobenzol keletkezik, majd egy mutáz enzim átrendezi a molekulát 2-aminofenollá [He 1998]. A további lépésekben a gyűrű felhasad 2-aminomukonsavszemialdehid keletkezik, majd egy deamináz eltávolítja az aminocsoportot.

Azonban nem csak a teljes lebontás lehet a cél. Érdekes kísérletek a mikrobiológusok, kémikusok számára nitroaromás vegyületekből biológiai úton más szubsztituent hordozó pl. hidroxilált aromás vegyületet szintetizálni. Ez kiválthatná a nagyon költséges kémiai szintézist. *Comamonas acidovorans* NBA-10 törzsszel a 4-nitrobenzolt 3,4-hidroxibenzoáttá alakították.

II.6.2.1.2. A nitrofenolok

A nitrobenzolok mellett a nitrofenolok toxicitása jól ismert. Az oxidatív foszforilációs folyamatokat szétkapcsolják a sejtekben, ezzel komoly hatásuk van a sejtek metabolizmusára. Az atmoszférába kerülve a növényekre van komoly károsító hatásuk.

Noha biológiai lebontásukra az első esetet már 1953-ban leírták [Simpson 1953], egy *Pseudomonas* törzs a p-nitrofenolt képes hidroxikinonon keresztül

átalakítani nitrit felszabadulása mellett, a lebontási útvonalat jóval később, csak néhány éve sikerült részletesebben megismerni. Azóta több enzimet és bontó szervezetet fedeztek fel, pl. *P. putida* 2-nitrofenol monooxygenáz enzimét [Spain 1979], mely széles szubsztrát specifitású, képes támadni az o- és m-nitrofenol molekulát is (a 2-nitrofenol konverzióját 1,2-benzokinon majd katekol és nitrit átalakuláson keresztül katalizálja, kétértékű kationok, Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} stimulálják az enzim aktivitását) [Zeyer 1988]. A 4-nitrofenol lebontására egy *Arthrobacter* fajban találtak megoldást, ebben az esetben a nitrofenol nitrokatekollá alakul, és csak ezután távozik a nitro csoport a molekuláról [Jain 1994]. Egy másik leírásban egy kétkomponensű monooxygenáz katalizációt írnak le *Bacillus sphaericus* JS905 törzsben [Kadiyala 1998]. Az egyik komponens egy flavoprotein reduktáz, a másik egy monooxygenáz, melyek által a 4-nitrofenol először 4-nitrokatekollá, majd 1,2,4-trihidroxibenzollá alakul nitrit felszabadulása mellett. Bakteriális dioxigenáz reakciókat az ismert *Pseudomonas* fajok mellett, pl. egy fototróf baktériumban is kimutattak, a *Rhodobacter capsulatus*-ban a 2,4-dinitrofenol redukcióját tapasztalták 2-amino-4-nitrofenollá, ami továbbalakul egy, még nem ismert fényfüggő folyamatban. A 2,4-dinitrofenol bontására a *Rhodococcus* fajok között is találunk példát, két hidrid transzferen át orto-gyűrűhasítással 3-nitroadipát keletkezik, miközben az orto helyzetű nitro csoport távozik a molekuláról. Ecker és mtsai [1992] leírtak egy érdekes lebontási utat *Alcaligenes etrophus* JMP134 törzsben, ahol a 2,6-dinitrofenol lebontása oxigénfüggő folyamat, és 4-pirogallo keletkezik egy dioxigenáz katalizálta reakcióban, viszont a második nitro csoport csak a gyűrű hasítását követően távozik a molekuláról.

Bár tény, hogy a polinitroaromás vegyületek sokkal elektrofilebbek, így gátolt az oxigenázok támadása, ezért a reduktív folyamatok valószínűsíthetők lebontásukra. A természetben találunk olyan aerob mikroorganizmust, mely képes hasznosítani a 2,4,6-trinitrofenolt reduktív mechanizmuson keresztül, hidrid ion formálódik, és ez rendeződik 2,4-nitrofenollá, nitrit felszabadulása mellett.

II.6.2.1.3. A nitrotoluolok

A nitrotoluolok bontásában sok a hasonlóság a nitrobenzol és –fenolok bontásához. A toluol, és származékainak lebontása részletesen tanulmányozott, köszönhetően a *P. putida*-ban felfedezett TOL plazmidnak [Delgado 1992].

A 2,4-dinitrotoluol az egyik legfontosabb toluol származék, diizocianátok gyártásában szerepel, mely a poliuretánok egy komponense. A dinitrotoluolok szintén fontos prekursorai illetve degradációs termékei robbanószernek (2,4,6-trinitrotoluol). Dioxigenáz enzimrendszer katalizálta lebontásukra ismerünk megoldást pl. *Pseudomonas*okban [An 1994].

II.6.2.1.3.1. A 2,4,6-trinitrotoluol biodegradációja

A TNT a legjobban kutatott vegyület, mivel a nitroaromások között a fő szennyező, évente kb. 1×10^6 kg-ot gyártanak, és, mint minden szintetikus vegyület ez is megjelenik a gyár elfolyó szennyvizében a környék talajában, felszíni- és talajvízben. A molekula gyengén vízdékony (140 mg/l 25°C-on), ellenáll az oxigenolitikus támadásnak, toxikus [Rieger 1995]. Bár több mikroorganizmusban (*Pseudomonas* sp. C1S1, *Mycobacterium vaccae*, *Serratia marcescens*, *Bacillus* sp.) is leírtak TNT bontást, azonban konkrét bizonyítékot a bontási útvonalra nem tudtak szolgáltatni. Igéretesnek tűnhet viszont a *Pseudomonas savastanoi* faj esetében megfigyelt TNT bontás. Bár sejtszaporodást nem figyeltek meg (azaz valószínűleg szénforrásként nem hasznosítja e vegyületet a sejt), de a TNT denitrációját kimutatták, ami NO_2^- hozzáadásával javult, és dinitrotoluol keletkezett, ami már az oxigenázok támadásának elfogadható alany [Martin 1997]. A nitrát észterek bontása kapcsán említettük az *Enterobacter cloacae*-t, mely nitrátésztereket elfogad nitrogén forrásként. Ez a faj képes TNT szubsztráton aerob módon lassan szaporodni, mely képességét a NADPH-függő PETN (pentaeritritol tetranitrát) reduktázának köszönheti [Binks 1996]. Az enzim redukálja a TNT-t egy hidrid-, majd dihidrid komplexen keresztül, így nitrit szabadul fel, ezáltal képes a TNT-t, mint nitrogén forrást hasznosítani, bár a gyűrűt nem hasítja.

Eddig tehát szén- és energiaforrásként a TNT-t hasznosító mikroorganizmus nem került a kutatók hálójába. A TNT-t azonban bizonyos mikrobák, mint előbb olvashattuk képesek átalakítani, valószínűleg inkább kometabolikus folyamatok

The diagram illustrates the chemical transformations of 2,4,6-trinitrotoluidine (TNT) and its derivatives. A central circle labeled "talaj" (clay) is connected to various chemical structures by arrows, indicating reversible and irreversible reactions.

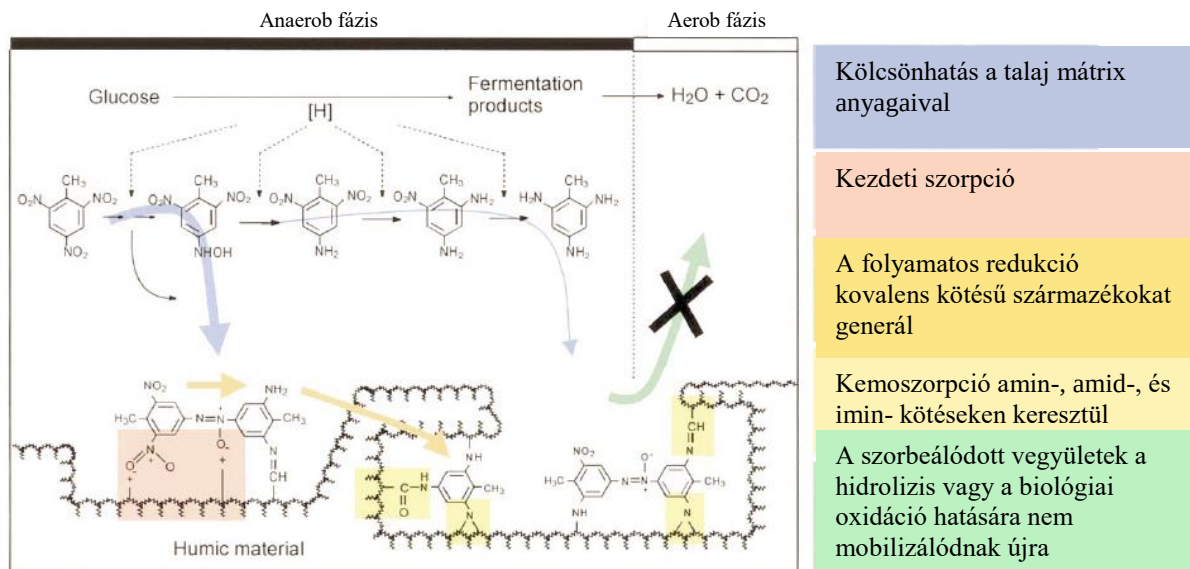
Chemical Structures and Reactions:

- Top Structure:** 2,4,6-trinitrotoluidine (TNT) derivative with a methyl group at position 1 and nitro groups at positions 2, 4, and 6.
- Top-Right Structure:** 2,4,6-trinitrophenylhydrazine derivative with a methyl group at position 1 and nitro groups at positions 2, 4, and 6.
- Right Structure:** 2,4,6-trinitrophenylhydrazone derivative with a methyl group at position 1 and nitro groups at positions 2, 4, and 6.
- Bottom-Right Structure:** 2,4,6-trinitrophenylhydrazone derivative with a methyl group at position 1 and nitro groups at positions 2, 4, and 6.
- Bottom Structure:** 2,4,6-trinitrophenylhydrazone derivative with a methyl group at position 1 and nitro groups at positions 2, 4, and 6.
- Bottom-Left Structure:** 2,4,6-trinitrophenylhydrazone derivative with a methyl group at position 1 and nitro groups at positions 2, 4, and 6.
- Left Structure:** 2,4,6-trinitrophenylhydrazone derivative with a methyl group at position 1 and nitro groups at positions 2, 4, and 6.
- Top-Left Structure:** 2,4,6-trinitrophenylhydrazone derivative with a methyl group at position 1 and nitro groups at positions 2, 4, and 6.

Reaction Pathways:

- Reversible reactions (indicated by double-headed arrows) connect the central "talaj" to the top, bottom, and right structures.
- Irreversible reactions (indicated by single-headed arrows) connect the top structure to the top-right structure, the top-right structure to the right structure, the right structure to the bottom-right structure, the bottom-right structure to the bottom structure, the bottom structure to the bottom-left structure, the bottom-left structure to the left structure, and the left structure to the top-left structure.
- A question mark (?) is placed near the top-left structure, suggesting an unknown or uncertain reaction pathway.

A TNT és fontosabb metabolitjainak kapcsolata a talajjal (a vastagított szürke nyíl az irreverzibilis szorpciót jelöli, a beszínezett aromás gyűrű azokat a metabolitokat jelöli, melyeket azonosítottak a redukációs folyamatban). [Rieger and Knackmuss 1995].



II.46. ábra

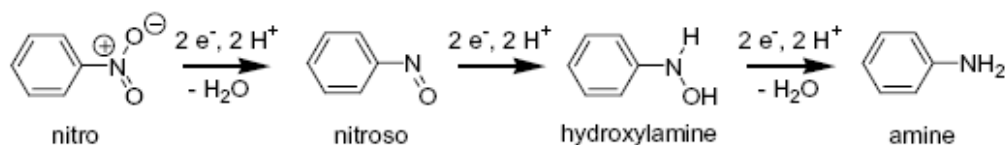
Hipotetikus ábra: a TNT redukciója és kemisorpciója a talaj szervesanyagaihoz anaerob/aerob kezelés után

A TNT redukált metabolitjainak kovalens kötéseit sárgával jelölték, melyeket NMR vizsgálatokkal igazoltak [Rieger 2002].

II.6.2.2. Nitroaromás vegyületek anaerob bontása

A természetben oxigénben gazdag és oxigén hiányos környezetet egyformán találunk, a talajban azonban csak igen kis rétegben megfelelő az oxigén ellátottság. Nem meglepő tehát, hogy a mikroorganizmusok igyekeznek idomulni az oxigénhiányos környezethez. A nitrocsoport redukciója 2 elektron hozzáadásával, az anoxiás élőhelyekre jellemző. Ebben a reakcióban a nitro csoportok hidroxilaminokká, vagy aminokká alakulnak a nitroreduktázok aktivitásának köszönhetően, legtöbb esetben az elektrondonorok piridin nukleotidok. Valószínűsítik, hogy ezen enzimeknek nem ez a fiziológiai szerepük, bár kivétel a *Comamonas sp.* és *Pseudomonas sp.*-ből származó nitroreduktázok, melyek nitroaromás vegyületekkel indukálhatók [Groenewegen 1992, Somerville 1995]. A legtöbb esetben a redukciós út az amin vegyületek keletkezésével bwe is fejeződik, a vegyületek általában nem alakulnak tovább. Nitroreduktázokat azonosítottak *E. coli*, *Bacteroides fragilis*, *Enterobacter cloacae*, *Clostridium sp.*, *Vibrio harveyi*, ezek közül a legérzékenyebbek oxigénre az *E. coli*, *Vibrio harveyi* nitroreduktázai [Rehm 2000].

A nem aromás nitro csoportot hordozó vegyületek anaerob biotranszformációja jól tanulmányozott. Anoxiás környezetben, ahol a nukleofil reakciók a favoritok [Kröger 2004], elektronszívó csoportok ($-\text{NO}_2$, $-\text{Cl}$) jelenlétében a kezdeti redukzív támadásokkal találkozhatunk, a redukciós úthoz 3 mól hidrogénre van szükség (II.47. ábra)



II.47. ábra

Nitro csoporttól az amino csoportig történő redukció

Anaerob körülmények között a szulfát redukáló mikroorganizmusok szubsztrát hasznosítását alaposan tanulmányozták. Ezek a fajok elektronakceptorként szulfátot használnak. A *Desulfovibrio* fajok képesek különböző nitroaromás vegyületeket, közöttük a TNT-t is nitrogén forrásként hasznosítani [Boopathy 1993]. A metabolizmus során a szénforrás piruvát volt, a nitrogént a TNT-ből nyerték, mely a folyamat során triaminotoluollá redukálódott, majd az aminocsoportok lehasításával nyerték a sejtek a számukra létfontosságú nitrogént.

Anaerob fermentatív baktérium közösségek (*Clostridium* fajok) szintén képesek a TNT bontására.

II.6.3. Nitro csoportot hordozó egyéb szénhidrogének, pl. policiklikus aromások, herbicidek, nitrodifenilaminok biodegradációja

A környezetben csak minor komponensként jelennek meg, azonban potenciális mutagének, ezért lebontásukkal/eltávolításukkal a környezetből foglalkoznunk kell.

A nitro csoportot hordozó policiklusos aromás szénhidrogének megtalálhatók a levegőben diesel motorok kipufogó gázából, feketeszen és bizonyos fénymásoló tonerekből származóan, illetve kőolaj származékok nem tökéletes égésének melléktermékeként. Biológiai hozzáférésük kicsi köszönhetően nagy molekula

méretüknek, nem, vagy gyengén vízdoldhatók, így nincs kialakult mikroközösség bontásukra. Ennek ellenére egy olajszennyezett területről izolált *Mycobacterium* faj mutatott némi aktivitást az 1-nitropirén bontásában [Heitkamp 1991].

A Dinoseb néven ismert herbicid (2-sec-butil-4,6-dinitrofenol) anaerob körülmények között mikrobiális konzorciummal sikeresen bontható a nitro csoport redukcióján keresztül [Kaake 1995].

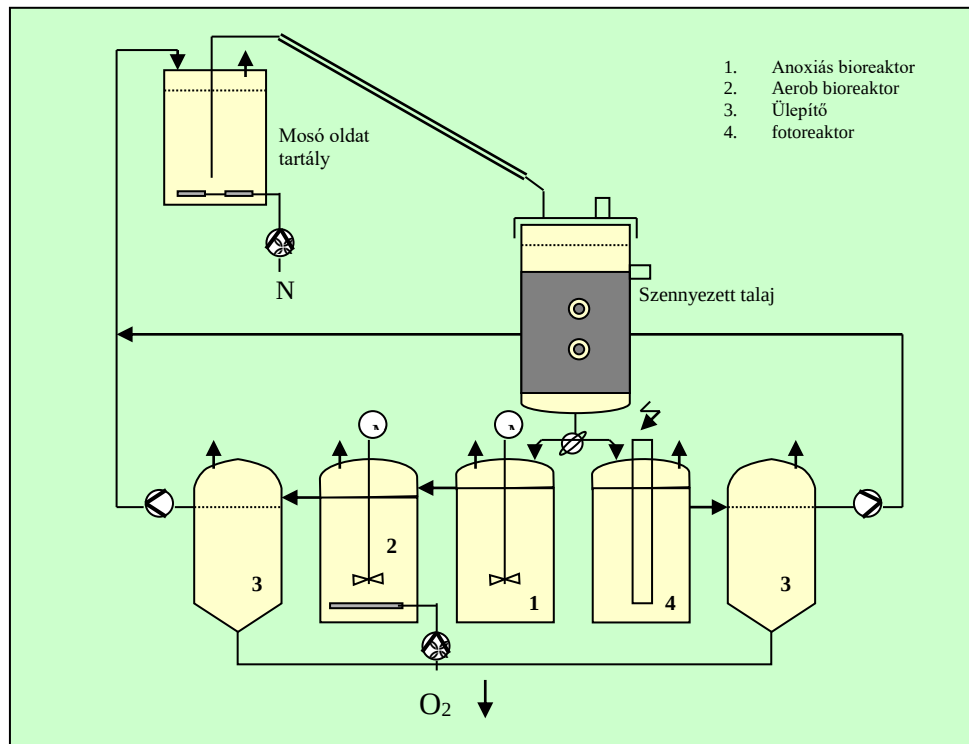
A difenilaminokat stabilizátorokként használják nitrocellulóz tartalmú robbanószeres esetében. A stabilizációs folyamatban a difenilamin nitro-, di-, trinitrodifenilaminná alakul, és ezek a vegyületek jelennek meg szennyezőanyagként az előállítás illetve a felhasználás helyén. Szulfát redukáló mikroorganizmusok képesek kometabolikus úton átalakítani anilinné laktát vagy benzoát szubsztrát jelenlétében [Drzyzga 1996].

II.6.4. Bioremediációs eljárások bemutatása nitro csoportot hordozó szennyezők esetén

Talaj, talajvíz robbanószerekkel történt szennyezésére eleinte kevert kultúrákat használtak, vagy biostimulációt alkalmaztak. Az utóbbi években sikeres komposztálási eljárásokról számoltak be, anaerob módon előkezelt, majd levegőztett komposzt esetén az anaerob fázis monoamino-dinitrotoluol keletkezett, mely az aerob fázisban továbbalakult. Problémát jelent viszont, hogy az amino származékok a talaj humusz anyagához kötődnek, így nehéz meghatározni a valós mineralizációt. Ennek ismeretében több esetben inkább a humifikációnak megfelelő körülményeket optimalizálták, és nem a mineralizációt stimulálták, viszont ezzel az a baj, hogy, bár a szennyező toxikus hatása csökken, de növekedett mutagén hatása a patkány kísérletekben.

Robbanószerral (TNT) szennyezett talaj bioremediációjára Kahl és mtsai [1996] dolgoztak ki eljárást (II.48. ábra). A tisztítás során 40 hét alatt a kezdeti 2,5 g TNT/kg_{talaj szárazsúly} szennyező koncentrációja mintegy 95%-kal csökkent. Az anoxiás szakaszban amino származék keletkezik, mely az aerob reaktorban továbbalakul. A mosóvíz cirkuláltatásával a szennyezett talajból folyamatosan mossák ki a TNT-t,

illetve a nem bomlott TNT is ezzel visszakerül a folyamatba. A folyamathoz használt vizet pl. fotokatalitikus eljárással utókezelik.



II.48. ábra

TNT szennyezett talaj dekontaminálására fejlesztett eljárás (Kahl és mtsai 1996)

II.6.5. Irodalomjegyzék

- An, D., D.T. Gibson, J.C. Spain 1994. Oxidative release of nitrite from 2-nitrotoluene by a three-component enzyme system from *Pseudomonas* sp. strain JS42. J. Bacteriol. 176:7462-7467
- Binks, P.R., C.E. French, S. Nicklin, N.C. Bruce 1996. Degradation of pentaerythritol tetranitrate by *Enterobacter cloacae*. Appl. Environ. Microbiol. 62:1214-1219
- Blasco R, E. Moore, V. Wray, D. Pieper, K. Timmis, F. Castillo 1999. 3-Nitroadipate, a metabolic intermediate for mineralization of 2,4-dinitrophenol by a new strain of a *Rhodococcus* species. J Bacteriol, 181:149-152
- Boopathy, R., C.F. Kulpa 1993. Nitroaromatic compounds serve as a nitrogen source for *Desulfovibrio* sp. (B strain). Can. J. Microbiol. 28:131-137

- Delgado, A.M., G. Wubbolts, M.-A. Abril, J.L. Ramos 1992. Nitroaromatics are substrates for the TOL plasmid upper-pathway enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 415-417
- Dhawale, M.R., U. Hornemann 1979. Nitroalkane oxidation by streptomyces. *J. Bacteriol.* 137: 916-924
- Drzyzga, O., A. Schmidt, K.H. Blotevogel 1996. Cometabolic transformation and cleavage of nitrodiphenyl amines by three newly isolated sulfate-reducing bacterial strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1710-1716
- Ecker, S., T. widmann, H. Lenke, O. Dickel, P. Fischer et al. 1992. Catabolism of 2,6-dinitrophenol by *Alcaligenes eutrophus* JMP 134 and JMP 222. *Arch. Microbiol.* 158: 149-154
- Esteve-Nuñez A, A. Caballero, J.L. Ramos 2001. Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65:335-352
- Groenewegen, P.E.J., P. Breeuwer, J.M.L.M. van Helvoort, A.A.M. Langenhoff, F.P. DeVries, J.A.M. de Bont 1992. Novel degradative pathway of 4-nitrobenzoate in *Comamonas acidovorans* NBA-10. *J. Gen. Microbiol.* 138:1599-1605
- He, Z., J.C. Spain 1998. A novel 2-aminomuconate deaminase in the nitrobenzene degradation pathway of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *J. Bacteriol.* 180:2502-2506
- Heasley, C.J., P.F. Fitzpatrick 1996. Kinetic mechanism and substrate specificity of nitroalkane oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225: 6-10
- Heiss G, H-J Knackmuss 2002. Bioelimination of trinitroaromatic compounds: immobilization versus mineralization. *Curr. Opin. Microbiol*, 5:282-287
- Heitkamp, M.A., J.P. Freeman, D.W. Miller, C.E. Cerniglia 1991. Biodegradation of 1-nitropyrene. *Arch. Microbiol.* 156: 223-230
- Honeycutt, M.E., A.S. Jarvis, V.A. MacFarland 1996. Cytotoxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its metabolites. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 35: 282-287
- Jain, R.K., J.H. Dreisbach, J.C. Spain 1994. Biodegradation of p-nitrophenol via 1,2,4-benzenetriol by an *Arthrobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3030-3032
- Kaake, R.H., D.L. Crawford, R.L. Crawford 1995. Biodegradation of nitroaromatic herbicide Dinoseb (2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol) under reducing conditions. *Biodegradation* 6:329-337
- Kadiyala, V., J.C. Spain 1998. A two-component monooxygenase catalyses both the hydroxylation of p-nitrophenol and the oxidative release of nitrite from 4-nitrocatechol in *Bacillus sphaericus* JS905. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2479-2484
- Kahl, M.W., T. Gorontzy, K.H. Blotevogel 1996. Reinigung TNT-kontaminierter Böden durch anaerobe Prozeßführung. *Gwf-Wasser/Abwasser* 137: 140-146
- Kido, T., K. Soda, T. Suzuki, K. Asada 1976. A new oxygenase, 2-nitropropane dioxygenase of *Hansenula mrakii*. *J. Biol. Chem.* 251:6994-7000
- Kröger, M., M.E. Schumacher, H. Risse, G. Fels 2004. Biological reduction of TNT as part of a combined biological–chemical procedure for mineralization. *Biodegradation* 15: 241–248

- Martin, J.L., S.D. Comfort, P.J. Shea, T.A. Kokjohn, R.A. Drijber 1997. Denitration of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas savastoni*. Can. J. Microbiol. 43: 447-455
- Marvin-Sikkema, F.D., J.A.M. de Bont 1994. Degradation of nitroaromatic compounds by microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42: 499-507
- Nishino, S.F., J.C. Spain 1995. Oxidative pathway for the biodegradation of nitrobenzene by *Comamonas* sp. strain JS675. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2308-2313
- Pak JW, K.L. Knoke, D.R. Noguera, B.G. Fox, G.H. Chambliss 2000. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by purified xenobiotic reductase B from *Pseudomonas fluorescens* I-C. Appl Environ Microbiol, 66:4742-4750.
- Ramos, J.L., M M. González-Pérez, A. Caballero, P. van Dillewijn 2005. Bioremediation of polynitrated aromatic compounds: plants and microbes put up a fight. Curr. Opin. Biotechnol., 16:275–281
- Rieger, P.-G., H.-J. Knackmuss 1995. Basic knowledge and perspectives on biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene and related nitroaromatic compounds in contaminated soil. In: *Biodegradation of Nitroaromatic compounds* (Spain, J.C. Ed.) New York: Plenum Press
- Rieger, P.-G., H.-M. Meier, M. Gerle, U. Vogt, T. Groth, H.-J. Knackmuss 2002. Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence. J. Biotechnol. 94: 101-123
- Robertson BK, P.K. Jjemba 2005. Enhanced bioavailability of sorbed 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by a bacterial consortium. Chemosphere, 58:263-270
- Rodgers JD, N.J. Bunce 2001. Treatment methods for the remediation of nitroaromatic explosives. Water Res, 35:2101-2111
- Simpson, J.R., W.C. Evans 1953. The metabolism of nitrophenols by certain bacteria. Biochem. J. 55: 24
- Somerville, C.C., S.F. nishino, J.C. Spain 1995. Isolation and characterization of nitrobenzene nitroreductase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. J. Bacteriol. 177:3837-3842
- Spain, J.C., O. Wyss, D.T. Gibson 1979. Enzymatic oxidation of p-nitrophenol. Biochem. Biophys. Res. Commun. 88: 634-641
- Spain, J.C. 1995. Biodegradation of nitroaromatic compounds. Annu. Rev. Microbiol. 49: 523–555
- Williams, R.E., D.A. Rathbone, N.S. Scrutton, N.C. Bruce 2004. Biotransformation of explosives by the old yellow enzyme family of flavoproteins. Appl Environ Microbiol. 70: 3566-3574
- White, G.F., J.R. Snape, S. Nicklin 1996. Biodegradation of glycerol trinitrate and pentaerythritol tetranitrate by *Agrobacterium radiobacter*. Appl. Environ. Microbiol. 62:637-642
- Zeyer, J., H.P. Kocher 1988. Purification and characterisation of a bacterial nitrophenol oxygenase which converts *orto*-nitrophenol to catechol and nitrite. J. Bacteriol. 170: 1789-1794

II.7. Indol származékok biodegradációja

Az indol benzolgyűrűvel kondenzált pirrolszármazék, mely megtalálható pl. kőszénkátrányban, szennyvíz iszapban, kimutatták cigaretta füstből is. Színtelen, kristályos anyag, vízben kevésbé oldódik. Az indol és származékai igen gyenge bázisok, NH csoportjaik inkább savasak (amfoter karakter), aromás szubsztitúciójuk a 3-as pozícióban következik be (ha az szabad).

Indolszármazékok pl. az indolin, mely az indol pirrolgyűrűjének katalitikus hidrogénezésével állítható elő; a gramin, 3-dimetil-amino-metil-indol; heteroauxin, mely növekedési hormonként ismert 3-indolil-ecetsav; fontos természetes indolszármazék a triptofán, mely létfontosságú aminosav; a szkatol az emlősök bélsarában is előforduló 3-metil-indol; a triptofán enzimikus dekarboxilezésének eredménye a triptamin, melynek 5-hidroxi származéka a szerotonin, vérnyomásszabályozó hormon. Az oxindol és az indoxil az indol pirrolgyűrűn hidroxilált származékai, az utóbbiból állítják elő az indigo festéket oxidációval. Az indigo a természetben is előfordul pl. növényekben: *Indigofera* fajokban, de nem színezék formájában, hanem az indoxil glikozidjaként. A növényi kivonat előállítása azonban költséges, ezért szintetikus változatának olcsó ipari előállítását hamar kifejlesztették. Az indigo szubsztituált származékai szintén színezékek, pl. antikbíbor, az indigó 6,6'-dibróm származéka, mely a természetben is előfordul, a bíborcsiga festékanyaga.

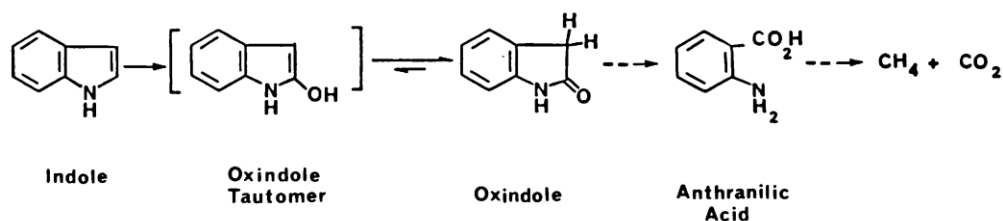
Kis koncentrációban az indol kellemes illatú, ezért előszeretettel alkalmazzák kozmetikai szerekben, illetve a gyógyászatban is használják alkaloidját: citotoxikus hatást mutat élesztőkben (voacristine).

Bakteriális lebontását számos nemzetközi kutatóhelyen vizsgálták, tanulmányozták gombákban is a metabolikus folyamatokat, de ismert metabolizmusuk növényekben is, pl. *Jasminum grandiflorum* indol oxigenáza az indolt antraniláttá alakítja, majd o-aminofenollá alakul.

Mivel nagy mennyiségben állítják elő az indol származékokat, elkerülhetetlenül megjelennek a szennyvizekben, szennyvíziszapokban szennyező

komponensként. Nagy mennyiségben toxikusak az élő szervezetekre, tehát eltávolításukról gondoskodni kell.

Az 1980-as évek elején jelentek meg az első beszámolók az indol származékok mikrobiális bontásáról. Wang és mtsai megfigyelték, hogy aktív szénre immobilizált mikrobiális sejtek metanogenezeise közben a rendszerhez adott indol eltűnt. Ezt a kísérletet fejlesztette tovább Berry munkatársaival. Anaerob emésztett iszap mikrobiális közösségét használva az indol metanogén bontására azt figyelték meg, hogy oxindol intermediér jelent meg a reakcióelegyben, majd a teljes degradáció 10 nap alatt bekövetkezett 50 µg/ml indol koncentráció mellett, 17 nap után metánképződést detektáltak. A feltételezett lebontási útvonalat a II.49. ábrán mutatjuk be.



II.49. ábra

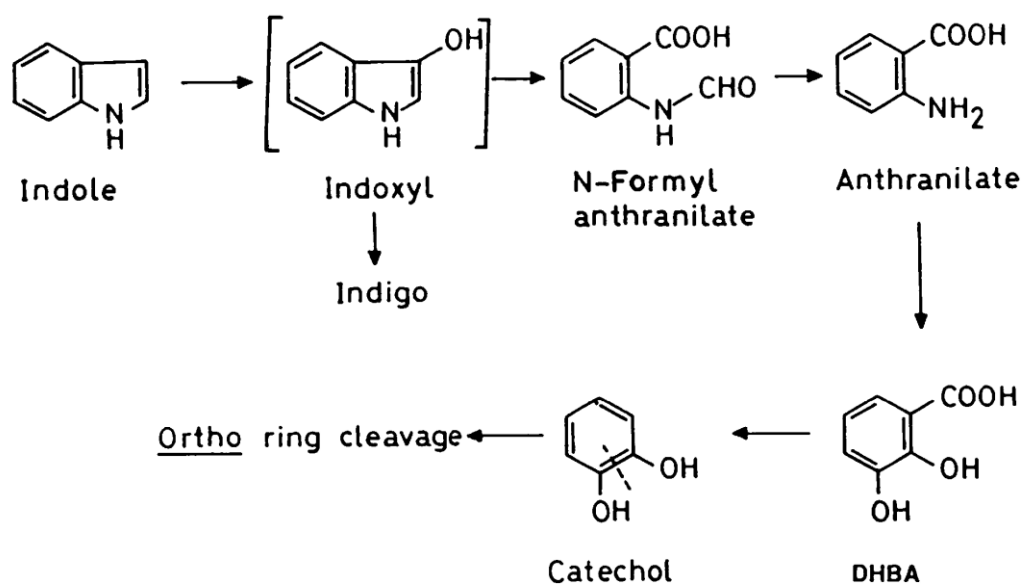
Indol anaerob bontása oxindol intermediéren keresztül

A lebontási útvonal első intermediér molekulája az oxindol, melyet HPLC-MS analízissel kimutattak, mely bizonyítja, hogy az első lépés a metabolizmusban egy hidroxilálás, ami nem meglepő, hiszen más rendszerekben is gyakori, pl. *Pseudomonas*ok esetében.

Több példát is találunk az 1980-as évekből az indol anaerob degradációjára metanogén, denitrifikáló körülmények között. Míg a metanogén környezetben átmeneti oxindol intermediér feldúsulás figyelhető meg, denitrifikáló környezetben ezt nem tapasztalták, ami arra utal, hogy a meghatározó konzorciumi tagok azonos sebességgel bontják az indolt és oxindolt [Madsen 1988].

Az 1980-as évek végéig szinte kizárólag bakteriális metabolizmusról számoltak be a kutatók. 1990-ben Kamath és mtsai *Aspergillus niger* segítségével sikeresen bontották el az indolt, bár a gomba nem hasznosította a vegyületet egyedüli

szén-, és nitrogén forrásként, de glükóz és nitrát jelenlétében képes volt ko-metabolizálni. A tolerancia határa az *Aspergillusnak* 0,02% indol volt, melynek a tápoldatba adagolása után a sejtek átmenetileg nyugalmi fázisba kerültek, majd az indolt kezdték bontani. A glükózt az indol jelenlétében nem bontották, valószínűleg a glikolitikus enzime(ke)t gátolta az indol jelenlét. Kromatográfiás módszerek segítségével meghatározták az intermediér molekulákat, így alakult ki a feltételezett lebontási útvonal, melyet a II.50. ábrán mutatunk be.

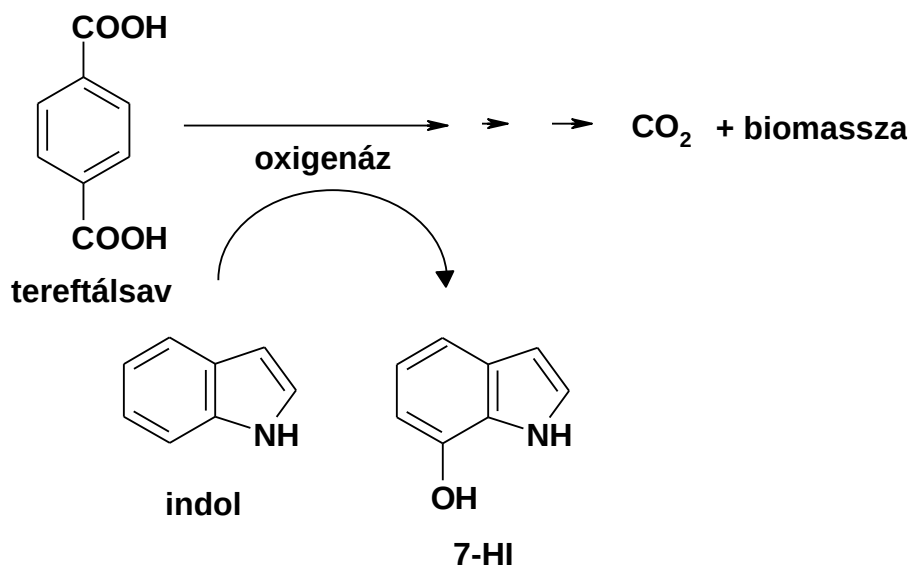


II.50. ábra
Indol bontása *A. niger* segítségével

Hasonlóan az aerob és metanogén metabolizmusban megismertekhez, ez esetben is egy hidroxilálással indul a reakció. Az indoxil intermediér instabil molekula, ezért vagy dimerizálódik levegőn és indigóvá alakul, vagy az *A. niger* indukálódó dioxigenáz enzime formil-antraniláton keresztül antraniláttá alakítja. Az antranilát szubsztrátja a NADPH függő antranilát hidroxiláznak mely segítségével az antranilát dihidroxibenzoáttá (DHBA) alakul, melyet a DHBA-dekarboxiláz enzim katekollá bont, a katekolt egy gyűrűhasító dioxigenáz hasít mukonáttá orto hasítással, ez a molekula pedig belép a Szentgyörgyi-Krebs ciklusba.

Az indol és származékai igen gyengén oldódnak vízben, ezért Doukyu és Aono [1990] olyan mikroorganizmusokat kerestek, melyek oldószer toleránsak, ezáltal az indol koncentráció a reakcióelegyben megnövelhető két-fázisú rendszert alkalmazva. Kimutatták, hogy az indol difenilmetánban oldódik a legjobban, tehát olyan mikroorganizmust kellett találniuk, mely ezt az oldószert elviseli. Először egy *Pseudomonas* törzset használtak, mely az indolt izatinsavvá bontotta, majd a reakció megállt, az izatinsav feldúsult a reakcióelegyben. Tovább keresgéltek, és egy *Acinetobacter* törzsre leltek, mely az indolt indigóvá alakította igen jó konverzió sebességgel. Ezzel a lépéssel tulajdonképpen újrahasznosítható a szennyeződésként megjelenő indol. 2002-ben az akkor ismert biológiai indigó-előállító rendszerek között ez volt a leghatékonyabb. Hatékonyságát elsősorban az befolyásolta, hogy mennyi a vizes fázisban lévő indol mennyisége, az oldószer – difenilmetán-mennyisége kevésbé hatott az indigó képződésre.

Szintén *Acinetobacter* törzset, az *A. calcoaceticus*-t, használták fel kísérleteikhez Sugimori és mtsai [2004]. Ez a törzs tereftalátot bont, de közben képes volt kometabolizálni, az indolt (II.51. ábra)

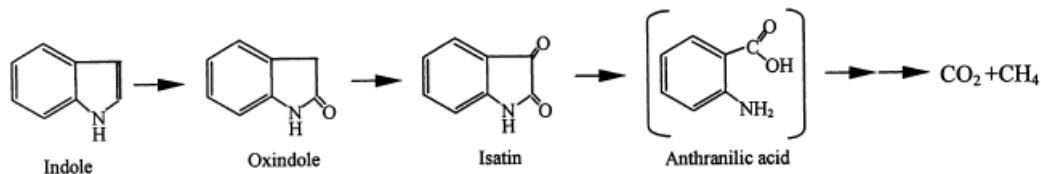


II.51. ábra

Indol bontása kometabolikus folyamatban

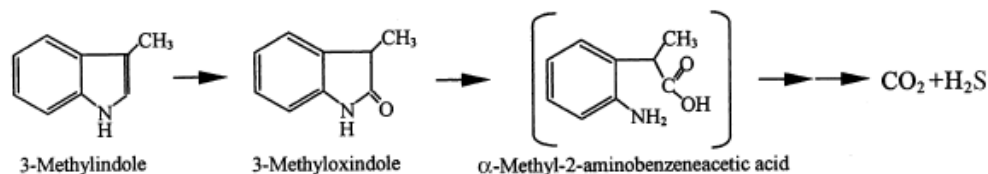
A tereftalátot támadó oxigenáz enzim, ha indol van jelen a reakcióterben, azt is megtámadja, hidroxilálja, miközben 7-hidroxi-indol (7-HI) keletkezik. Ez az eredmény azért figyelemre méltó, mert a 7-HI számos gyógyszer szintézisének építő eleme, valamint a festék-, és vegyszergyártásban is használják. E biotranszformációs folyamatnak számos előnye van a szintetikus 7-HI előállítással szemben, mivel költség-, és anyagkímélő eljárás, és a 7-HI kivonása a reakcióelegyből olcsóbb és egyszerűbb, mint a szintetikus előállítási folyamatban.

Gu és mtsai tengeri üledék mikroorganizmusával figyeltek meg hasonló jelenséget/folyamatot 2002-ben, mint korábban Berry vagy Madsen kutató csoportja metanogén ill. denitrifikáló körülmények között. Esetükben is metanogén körülmények között a tengeri üledék mikroorganizmusaival az indol degradációja során metán és szén-dioxid keletkezik. Kromatográfiás technikák segítségével azonosították az intermedier molekulákat (II.52. ábra).



II.52. ábra

Az első két lépésben oxidációval oxindol, majd izatin keletkezik, majd egy reduktív lépés a pirrol gyűrű hasítása előtt. A számolások alapján várt metán mennyiség csaknem 86%-át ki tudták mérni, ami azt bizonyítja, hogy valóban az indol szubsztrátból képezték a mikrobák a metánt, és nem történt indol, vagy az egyik intermedier akkumulációja a sejtekben. Gu-ék az indol mellett indol metil szubsztituált származékainak lebontását is vizsgálták kísérleti rendszerükben. Érdekes volt, hogy a szkatol (3-metil-indol) metanogén környezetben csak a 2-s pozícióban oxidálódott, míg szulfátredukáló környezetben teljesen elbomlott. Szulfátredukáló körülmények között a szulfát szolgál elektronakceptorként, és H₂S keletkezik, eközben képes oxidálódni a szerves vegyület, mely szénforrásként szolgál (II.53. ábra).



II.53. ábra

2002-ig egy szulfátredukáló törzset azonosítottak, a *Desulfobacterium indolicum*-ot, mely képes az indolt elbontani. A szulfátredukálók a tengeri környezetben erősebb kompetitorok, mint a metanogének, mivel nagyobb az affinitásuk a biológiai eredetű molekuláris hidrogén iránt, azonban, ha van elegendő „bio”-hidrogén a környezetükben akkor együttműködve, hatékonyan bontják pl. az indolt.

A fenti kísérletek bizonyítják, hogy egy szerves vegyület bontása nagyon sok paramétertől függ, a környezeti faktorok mellett fontos maga a molekula szerkezete is, pl. megfigyelték, hogy az indol gyűrű 2-, és 3-s pozíciója, funkciós csoportjai nagyon fontosak a lebontási út első lépésében. A hidroxiláció mindig a 2-s pozícióban indul, de a metanogének nem tudják a 3-s pozícióban a 2. oxidációs lépést katalizálni, viszont a szulfátredukálók képesek erre.

Említettük az előzőekben, hogy nemcsak az indol elbontása lehet az egyetlen megoldás a kármentesítési folyamatban, hanem hasznos terméket pl. indigó festéket is lehet belőle előállítani. Más kutatócsoportok is találtak hasznos transzformációs folyamatokat. Watanabe már 1972-ben leírta, hogy a triptofanáz enzim, mely alapvetően triptofánból indolt, piruvátot és ammóniát képez, bizonyos feltételek mellett képes e folyamatot megfordítva is katalizálni. Ennek feltétele, hogy a reakcióelegyben megfelelő mennyiségű piruvát és ammónia legyen jelen az indol mellett. Így az indolból a triptofanáz enzim segítségével létfontosságú aminosavat tudtak előállítani, melynek a gyógyászatban óriási szerepe lehet.

II.7.1. Kénhidrogén eltávolítás mikrobiológiai módszerekkel

Kénhidrogén szulfát-redukáló mikroorganizmusok szervesanyagbontása során is felszabadulhat, pl. indol vegyületek oxidációja közben, tehát az indol származékok bontását ilyenkor kénhidrogén elimináló rendszerrel kell összekapcsolni.

A kénhidrogén megjelenése a környezetben számos ipari tevékenység következménye, pl. szennyvízkezelés, papírgyártás, állatfeldolgozás, komposztálás, valamint a kipufogó gázok egyik fő, kellemetlen szagú komponense. Mivel igen alacsony a „szag-küszöb” értéke, azaz alacsony koncentrációban is nagyon érződik kellemetlen szaga, ezért is fontos hatékony eliminálása a környezetből. Gyakran egyéb kéntartalmú vegyületekkel együtt, keverten jelenik meg, pl. metántiol, dimetilszulfid, dimetildiszulfid vegyületekkel.

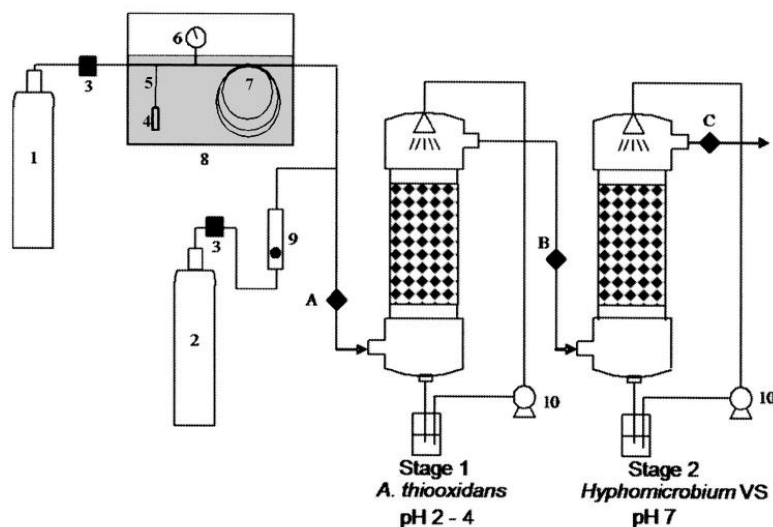
A fizikai/kémiai módszerek a szennyezett gáz tisztítására relatíve nagy energia, vegyszer szükséglettel járnak, és nagy mennyiségű hulladék keletkezik közben.

Alternatív megoldásként már az 1970-es években elkezdtek foglalkozni a kénhidrogén szennyezett gázok biológiai kezelésével. Főleg **autotróf** rendszereket fejlesztettek ki, kísérleteket végeztek pl. színtelen kénbaktériumokkal – *Thiobacillus*, *Thiotrix*, *Beggiatoa*; metilotrófokkal – *Hyphomicrobium*; fototrófokkal – *Chlorobium*, *Chromatium*, *Rhodobacter*, *Ectothiorhodospira*; és cianobaktériumokkal. Az első komoly **heterotróf** H₂S elimináló biofiltert 1992-ben írták le [Cho és mtsai 1992] egy *Xanthomonas* fajt használva.

Az autotróf baktériumokat használó eljárásokkal az a gond, hogy a baktériumokat nehéz kezelni/felhasználni, mert kicsi a növekedési sebességük, jóval elmarad a heterotróf baktériumokétól. A fototróf baktériumokat alkalmazó eljárásokhoz pedig nap-, vagy egyéb energiaforrás szükséges, mely akadályokat jelenthet a folyamatos/zavartalan üzemelésben. A heterotróf rendszerek előnye, hogy könnyebben kezelhető, általában egyszerűbb és gyorsabb a sejtek felszaporítása, bár hátránya lehet a nagy biomassza tömeg. Cho és mtsai [1992] által alkalmazott *Xanthomonas* DY44 törzs egy konstitutívan termelődő intracelluláris enzimmel képes hatékonyan oxidálni a kénhidrogént, miközben sárgás-fehér polisulfid csapadék keletkezik. Ennek köszönhetően a reakció könnyen nyomonkövethető, és a

csapadékot könnyű eltávolítani. Az autotróf rendszerekben viszont szulfát képződik, melynek hatására savanyodik a rendszer. Éveken keresztül hasonló rendszereket próbáltak optimalizálni, majd 2004-ben egy érdekes eljárást mutattak be Chen és mtsai. Egy olyan kénhidrogén elimináló mikroorganizmust találtak aktivált iszapban, mely tioszulfátot használ egyedüli energiaforrásként és CO₂-ot szénforrásként. Az azonosítás alapján egy Gram negatív kén-oxidáló baktérium –*Thiomonas sp.*-, mely képes autotróf és heterotróf, sőt **mixotróf** módon is szaporodni. Ez a törzs képes volt 55-60 ppm koncentrációban jelenlévő kénhidrogént 5,65 mg/l/h sebességgel 99%-ban eltávolítani. A biofilteren ezt a törzset azért is előnyös használni, mert megfigyeléseik szerint nincs nyugalmi fázisa, rögtön megindul a kénhidrogén oxidációja. További előnye, hogy bár a *Thiomonas* optimális szaporodási körülményként a pH=6,0 környezetet kedveli, savanyú kémhatású oldatban is aktív marad.

Legtöbb esetben azonban nem elegendő csak a kénhidrogénnel foglalkozni. A H₂S-t kísérő egyéb kéntartalmú szagos vegyületek bontását is meg kell oldani párhuzamosan. Erre kerestek megoldást Sercu és mtsai. 2004-ben számoltak be arról, hogy kifejlesztettek egy két-állásos biotrickling (csöpögtetőágyas) filter rendszert (II.54. ábra), melynek egyik reaktorában kénhidrogén eltávolító baktériummal kezelt/telített filtert, míg a másik reaktorba dimetilszulfid elimináló baktérium-filtert tettek.



II.54. ábra

Két-lépcsős bio-csepegtetési filter rendszer: 1. száraz levegő tartály, 2. H₂S gáztartály, 3. áramlás szabályozó, 4. DMS tároló, 5. kapilláris cső, 6. manométer, 7. kapilláris, 8. hőszabályozott

A H₂S-t oxidáló törzs, *Acidithiobacillus thiooxidans* széles pH tartományban aktív marad, így az első reaktor esetén a pH ellenőrzéssel nem kellett bajlódni. A második filterre *Hyphomicrobium* fajt immobilizáltak, mely csak semleges pH-n szeret szaporodni/élni, ezért itt már fontos volt a pH kontroll. A filtereken átáramoltatott gázból 83 g H₂S/m³/h maximális eliminációs kapacitással 100%-osan el tudták távolítani a kénhidrogént, a dimetilszulfid (DMS) elimináció ettől kissé elmaradva 58 g DMS/m³/h hatékonysággal, kb 88%-os eredményt értek el, és még 65 nap után is stabil biofilmet találtak a reaktorokban, noha a működési paraméterek indóról időre változtak.

A H₂S elimináló rendszereket próbálták egyszerűsíteni, az utóbbi évek publikáció már ezekről a fejlesztésekről számolnak be. Faforgácsra immobilizált mikroközösséget használva Jones és mtsai 2005-ben számoltak be eredményeikről. 50 ppm H₂S tartalmú gőzt a biofilteren átáramoltatva értek el 95%-os eredményt 2 napon át működtetve. Szulfát hozzáadásával sem csökkent az aktivitás, viszont a pH csökkenésével pH=4,0 kémhatású közegben a hatékonyság jelentősen csökken, visszaesett 36%-ra. A mikroba összetételt nem ismertették.

Egy másik kutató csoport, Li és mtsai, szintén 2005-ben számolt be lávakő alapú biofilter rendszeréről. Vizsgálták a lávakő szerkezetét, kémiai összetételét, valamint mikroflóráját. A vasat Fe^{2+} és Fe^{3+} formájában találták, és *Acidithiobacillus* fajokat azonosítottak. Mivel hatékonyan tudták használni a lávakő alapú biofiltert, azt várták, hogy az irodalomból ismert *A. thiooxidans* felelős a kénhidrogén eliminálásáért, azonban a domináns mikroorganizmus az *A. ferrooxidans* volt. A rendszer előnye, hogy egyszerű, eleve a lávakövön élő mikrokolóniát használja a kénhidrogén eltávolítására, így külön költséget nem jelent a mikrobák felszaporítása, és immobilizálása sem.

II.7.2. Irodalomjegyzék

- Chen X.-G., A.-L. Geng, R. Yan, W.D. Gould, Y.-L. Ng and D.T. Liang (2004) Isolation and characterization of sulphur-oxidizing *Thiomonas* sp. and its potential application in biological deodorization. Letters in Applied Microbiology vol. 39: 495–503
- Cho K-S., M. Hirai, M. Shoda (1992) Degradation of Hydrogen Sulfide by *Xanthomonas* sp. Strain DY44 Isolated from Peat. Appl. Environm. Microbiol., Vol. 58(4):1183-1189
- Li H., Dr. Lueking, JR. Mihelcic, K. Peterson (2005) biogeochemical analysis of hydrogen sulfide removal by a lava-rock packed biofilter. Water Environ. Res. Vol. 77(2): 179-186
- Jones K., A. Martinez, M. Rizwan, J. Boswell (2005) Sulfur toxicity and media capacity for H_2S removal in biofilters packed with a natural or a commercial granular medium. J. Air Waste Manag. Assoc. vol.55(4): 415-420
- Sercu B., D. Nuñez, H. Van Langenhove, G. Aroca, W. Verstraete (2005) Operational and Microbiological Aspects of a Bioaugmented Two-Stage Biotrickling Filter Removing Hydrogen Sulfide and Dimethyl Sulfide. Biotechnol. and Bioeng., vol. 90(2): 259-269
- Berry D.F., E.L. Madsen, J.-M. Bollag (1987) Conversion of Indole to Oxindole under Methanogenic Conditions. Appl. Environm. Microbiol. Vol. 53(1): 180-182
- Doukyu N., R. Aono (1997) Biodegradation of indole at high concentration by persolvent fermentation with *Pseudomonas* sp. ST-200. Extremophiles 1: 100-105
- Doukyu N., T. Nakano, Y. Okuyama, R. Aono (2002) Isolation of an *Acinetobacter* sp. ST-550 which produces a high level of indigo in a water-organic solvent two-phase system containing high levels of indole. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58: 543–546

- Gu Ji-Dong and D.F. Berry (1991) Degradation of Substituted Indoles by an Indole-Degrading Methanogenic Consortium. *Appl. Environm. Microbiol.* Vol. 57(9): 2622-2627
- Gu Ji-Dong, Y. Fan, H Shi (2002) Relationship between structures of substituted indolic compounds and their degradation by marine anaerobic microorganisms. *Marine Pollution Bulletin* vol. 45: 379–384
- Kamath V. and C. S. Vaidyanathan (1990) New Pathway for the Biodegradation of Indole in *Aspergillus niger*. *Appl. Environm. Microbiol.* Vol. 56(1): 275-280
- Kovács K., Halmos M. (1985) A szerves kémia alapjai. Tankönyvkiadó ISBN 963 17 7288 8, pp.:382-384
- Madsen E.L., A.J. Francis, J.-M. Bollag (1988) Environmental Factors Affecting Indole Metabolism under Anaerobic Conditions. *Appl. Environm. Microbiol.* Vol. 54(1): 74-78
- Sugimori D., T. Sekiguchi, F. Hasumi, M. Kubo, N. Shirasaka, M. Ikunaka (2004) Microbial hydroxylation of Indole to 7-Hydrxyindole by *Acinetobacter calcoaceticus* Strain 4-1-5. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* Vol.68(5): 1167-1169
- Watanabe T. and E.E. Snell (1972) Reversibility of the Tryptophanase Reaction: Synthesis of Tryptophan from Indole, Pyruvate, and Ammonia. *Proc. Nat. Acad. S&i. USA* Vol. 69(5): 1086-1090

III. Kőolaj származékok bioremediációja

Horváth Lenke, Füle Gabriella, Dr. Perei Katalin

Tartalomjegyzék

III. Kőolaj származékok bioremediációja	141
III.1. Az alifás szénhidrogének előfordulása és környezeti jelentősége	142
III.2. Talajtisztítási technológiák	146
III.3. Bioremediáció és az optimális feltételek megteremtése	147
III.4. A bioremediációs eljárásokban sikeresen alkalmazott mikroorganizmusokról	151
III.4.1. Alifás szénhidrogének aerob lebontása	152
III.4.1.1. Alkánok oxidációja oxigenázokkal	154
III.4.1.2. Cikloalkánok gyűrűhasítása	157
III.4.1.3. Katabolikus útvonalak példái	160
III.4.1.3.1. <i>Pseudomonas oleovorans</i> alkán hasznosítása	160
III.4.1.3.2. <i>Rhodococcus izoprénbontása</i>	160
III.4.2. Az alifás szénhidrogének anaerob lebontása:	161
III.5. A szénhidrogének biodegradációját befolyásoló biológiai tényezők	164
III.6. Mikrobiális kénmentesítés	167
III.7. Felületaktív anyagok szerepe a bioremediációban	172
III.7. Irodalomjegyzék	179

Bevezetés

Az emberiséget egyre inkább aggasztja környezetének, a levegőnek, a víznek, a talajnak, valamint az élő szervezeteknek az elszennyeződése. Civilizációnk nagymértékben a kémiai elemek (növényi tápelemek, fémek) felhasználásán alapul. A növekvő népességgel párhuzamosan olyan gazdasági rendszert működtetünk, amely a termelés és a fogyasztás fajlagos növelésére ösztönöz. Ebből adódóan a környezet igénybevétele hatványozottan jelentkezik. Az ásványi nyersanyagok kitermelése és felhasználása a közelmúltig úgy történt, mintha a készletek kimeríthetetlenek lennének a Földön [Kádár I., Internet].

A fogyasztás növekedésével világszerte együtt jár a hulladékok mennyiségének állandó emelkedése. A természetes nyersanyagokból termékeket állítunk elő, miközben hulladék és szemét képződik. A fogyasztás is a termékek további átalakítását jelenti szemétté, hulladékká. A termelés méretének bővülésével szükségszerűen növekvő mennyiségű melléktermék hasznosítatlanul felhalmozódva

egyre nagyobb mértékű környezetszennyezést és gyakran súlyos környezeti károsodást okoz. A fejlesztők a termékek, technológiák kialakítása során régen nem számoltak azoknak a környezetre gyakorolt kedvezőtlen hatásával.

A környezetkímélő eljárások helyett elterjedtek azok a technológiák, melyek az ingyen felhasználható levegőt, vizet, talajt, élővilágot terhelik. A költségesebb újrahasznosítás, a zártabb termelési ciklus, a szennyvíztisztítás csökkentette volna versenyképességüket a piacon. Csak az utóbbi évtizedekben tudatosult, hogy a környezet is érték, figyelembe veendő a gazdasági számításokban. A tiszta környezet megőrzése összehasonlíthatatlanul olcsóbb, mint a szennyezett környezet megtisztítása, amennyiben egyáltalán lehetséges [Kádár I.].

Az iparban keletkező, a gyártási folyamatba vissza nem vezethető hulladékok ártalmatlanítása gyakran speciális problémákat vet fel. A felhalmozódó és az öregedő szennyezések megszüntetésére a fizikai-kémiai módszerek mellett helyet kapnak a biológiai eljárások is.

III.1. Az alifás szénhidrogének előfordulása és környezeti jelentősége

Az alifás szénhidrogének csoportjába tartoznak az egyszeres szén-szénkötést tartalmazó alkánok (paraffinok), ezek telítetlen formái az alkének (olefinek), valamint a cikloalkánok (cikloparaffinok), melyeknél a szénatomok ciklikus struktúrákat képeznek.

Az alifás vegyületek széles spektrumát használja fel az ipar oldószer-, üzemanyag-, valamint tisztítószergyártásban, és egyéb más területeken. E vegyületek termelésével együtt járhat azok felvétele vagy kibocsátása, amelynek különböző, akár ellentétes hatása is lehet az élővilágra. Az illékony alifás szénhidrogének a levegőbe kerülve, fontos szerepet játszanak az atmoszférikus kémiában, emellett számos alkán talaj- és talajvízszennyezőként fordul elő. Az alkánok változatos mérgező hatása idegrendszeri és májkárosodást is okozhat. A petrokémiában gyártott és az iparban alkalmazott legtöbb alifás vegyület nem sorolható a xenobiotikumok közé, mivel a természetesen előforduló anyagokban, mint pl. anyagcsere intermedierekben, kőolajban is

megtaláljuk azokat. Néhány alifás szénhidrogén nagy mennyiségben képződik biotikus forrásból is. A metán például számos anaerob közegben képződik, ahonnan az atmoszférába jut. Jelentős szerepet tulajdonítanak ennek a szénhidrogénnek a globális felmelegedés kialakulásában. Az izoprén, amely igen reaktív két telítetlen kötésének köszönhetően, a növényekből hő-stresszre való válaszreakció során szabadul fel, termelése szorosan kapcsolódik a fotoszintézishez. Jól ismert, hogy a hőkárosodás gyorsan csökkenti a fotoszintézis mértékét. A fotoszintetikus membránokban az izoprén a kettős lipidréteg stabilizálásában vagy a fehérje-membrán és a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat védő szerepet tölthet be. Izoprén kibocsátást nemcsak növényekre, hanem baktériumokra (Kuzma, 1995) és állatokra (Sharkey, 1996) is leírtak. Más fontos természetes módon keletkező alifás szénhidrogén a növények elhalása során szabadul fel pl.: a növényi etilén hormon, közepes- és hosszú szénláncú alkánok stb.

A talajba, természetes vizekbe számos szerves szennyezőanyag kerülhet be, többek között a kőolaj és kőolajszármazékok, ezek alkotóiként az alifások is, melyek a hétköznapi élet szinte minden területén megjelennek, és széleskörű felhasználásukkal összefüggésben környezetkárosító hatásuk is meglehetősen nagy.

A kőolaj kémiai szempontból természetes eredetű szénhidrogének bonyolult elegye. A kőolajok átlagosan 80-88% szén, 10-14% hidrogént, 0,1-7% oxigént, 0,02-1,1% nitrogént, 0,01-5% ként és több szervesetlen elemet tartalmaznak. A kőolajokban több száz vegyületet azonosítottak, melyek szénatomjainak száma 1-től 60-ig változik, és ezek főleg paraffinok, olefinek, naftének, cikloparaffinok, acetilének, poliolefinek, cikloolefinek, aromás vegyületek, oxigén-, kén-, és nitrogéntartalmú vegyületek. Ennek következtében az egyes szennyezett területeken rendkívül változatos összetételben jelenik meg [Anton és mtsai, 1999]. A kőolaj 20-50%-át az olaj forrásától függően alkánok képezik.

A talaj központi szerepet játszik a földi ökoszisztémákban, a Földön lejátszódó fizikai, kémiai és biológiai folyamatokban, az elemek körforgásában. A talajban élő mikroorganizmusoknak köszönhetően a talajba kerülő szerves anyagok mineralizálódnak, így a növények számára felvehetőek lesznek. A talaj a tápanyagokat megfelelő időben és formában a növények rendelkezésére bocsátja. Ez

a tulajdonsága a talaj bonyolult fizikai - kémiai - biológiai együttesének köszönhető, annak a szerves és szervetlen anyagokból álló összetett rendszernek, melyhez a tápanyagok és a víz a legkülönbébb erősségű fizikai vagy kémiai kötődésekkel kapcsolódhatnak, és ahol a talajmikroorganizmusok különleges biofilmekben élnek a talajszemcsék felületén és a mikropillárakban [Gruiz K., Internet]. Ugyanazok a talajalkotók, melyek a növényi növekedés szempontjából hasznos vizet és tápanyagokat kötik meg, képesek a környezetünkbe kerülő szerves és szervetlen szennyezők, környezetre káros, toxikus anyagok, így a kőolaj és származékainak megkötésére és tárolására is.

A talajt és a vizet éri leggyakrabban olajszennyeződés. Általában tankhajók vagy csővezetékek meghibásodása, olajkutak fúrása, szénhidrogén bányászat során kerülnek a környezetbe. A kőolaj kezelése és szállítása során is keletkezhetnek környezetszennyező olajtartalmú hulladékok. A talajba került olaj egy része a talajszemcsékhez kötődik, másik része pedig a talajvízbe kerülhet, mely nagyobb távolságokra is eljuttatja a szennyeződést. Az olajszennyezés során toxikus anyagok jutnak a talajokba és az élő vizekbe, ennek következtében a talaj, víz- és levegőháztartása felborul, mely kihat az élővilágra is. A kőolaj-szennyeződések a hetvenes években történt tankhajó-katasztrófákkal kapcsolatban kerültek az érdeklődés középpontjába. Noha a szárazföldi káresetek publicitása kisebb, potenciális környezetkárosító hatása akár nagyobb is lehet, mivel hosszú ideig maradhatnak rejtve. A szennyezés eltávolításának megoldását gyakran nehézfémek is bonyolítják [Anton és mtsai, 1999].

A kőolaj és a kőolajszármazékok a talajfelszín alatt több formában fordulhatnak elő: folyékony (szabad) fázisként a talajban, kötött fázisként a talajszemcsék felszínén, gázfázisként a talajpórusokban, és oldott fázisként a felszín alatti vizekben. Az egyes előfordulási formákat a talaj illetve a kőolaj és származékainak fizikai és kémiai tulajdonságai, valamint a hidrogeológiai adottságok határozzák meg.

A kőolajszármazékok mozgását a talajban és a talajvízben nagymértékben befolyásolják azok fizikai és fiziko-kémiai tulajdonságai, mint pl. az illékonyság, a viszkozitás, a sűrűség stb. Egyes illékony kőolajszármazékok (pl. a benzin) könnyen elpárolognak, és egy részük összegyűlhet a talaj szabad pórustérfogatában. A

kőolajszármazékok viszkozitása hatással van azok talajbéli mozgására. A benzin a talajvíznél gyorsabban, a többi olajszármazék lassabban szivárog a talajban. A kőolaj és a kőolajszármazékok többsége kisebb sűrűségű a víznél (ellentétben pl.: a klórozott szénhidrogénekkel), ezért a talajba jutva a talajvíz felszínén maradnak, és adott körülmények között a talajvízzel továbbterjedhetnek [Anton és mtsai, 1999].

A talaj számos tulajdonsága befolyásolja az olaj mozgását és kötésformáit. A szennyezők, így az olaj is immobilizálódhatnak a talajban, azaz fizikai vagy kémiai erőkkel kötődnek a talaj szilárd részecskéihez. Ez a kötőerő a laza fizikai adszorpciótól a kovalens kémiai kötésekig sokféle lehet, a szennyező szinte beépülhet a talaj szerkezetét alkotó szerves vagy szervetlen mikroszemcsékbe, s így pl. a növények számára felvehetetlen állapotba kerül [Gruiz K., Internet]. A szénhidrogének közül az olefinek és az aromások jobban, a cikloparaffinok és paraffinok kevésbé kötődnek meg a talajkolloidokon. A talajrészecskék töltése hatással van az olajszennyeződés megkötődésére vagy leválására. A talaj kapilláris és vízemelő képessége befolyásolja a kőolaj beszivárgási hosszát. Ha a talaj olajvisszatartó képessége meghaladja a beszivárgott olaj mennyiségét, az olajszennyezés helyben marad, és a talajfelszínen végbemenő kémiai oxidáció, vagy a talaj mikroszervezeteinek aktivitása révén lebomlik. Ellenkező esetben a beszivárgó olaj a kapilláris zónáig illetve az összefüggő talajvízszintig terjed, és ott olajlencse alakul ki, amely a talajvíz áramlási irányában tovább terjedhet, így a talajvízmozgás teljes tartománya elszennyeződhet.

A hosszú szénláncú alkánok vízben nehezen oldódnak, ami korlátozza azok biológiai hasznosíthatóságát, és azokon a helyeken, ahol ezeket a vegyületeket magas koncentrációban találjuk, gyakran nem-vizes fázisú folyadékokként (non-aqueous phase liquids- NAPL) vannak jelen [Atlas, 1981, 1984]. Némely esetben a baktériumok biológiai felületaktív anyagokat termelnek, melyek megnövelik a hosszú szénláncú alkánok vízben való oldódását, így megkönnyítve azok növekedési szubsztrátként való hasznosítását [Zhang és Miller, 1994; Rosenberg 1986].

III.2. Talajtisztítási technológiák

A remediálás kifejezés a terület megjavítását, meggyógyítását, rendbehozatalát jelenti, a latin *remedium* = gyógyszer, segítő eszköz kifejezés alapján. Ezt a szakkifejezést használják a talaj megtisztítására és az azt követő újrahasznosításra. A remediációs technológiák közül költségét tekintve legelőnyösebb a bioremediáció. A remediációs technológiák esetében, más biotechnológiához hasonlóan a központi szerep az élő sejteké, elsősorban a vízben, a talajban, vagy az üledékben élő és működő mikroorganizmusoké. Ehhez kapcsolódnak a működésükhöz szükséges optimális körülmények, melyeket a biotechnológusnak kell biztosítani [Gruiz K.].

A talajok tisztítása *in situ* vagy *ex situ* történhet:

- **In situ** remediálás a talajnak kiásás és eltávolítás nélküli, helyben való kezelését jelenti. Ezek a módszerek főleg nagyobb területeket érintő szennyeződések esetén előnyösek.
- **Ex situ** talajtisztítás során a talajt a helyszínről való eltávolítás után, vagy a szennyeződés helyéhez közel (on site), vagy a talajtisztító telepre szállítva (off site) kezelik. Az *ex situ* technológiák kis területekre kiterjedő és a vízbázisokat is veszélyeztető balesetek nyomán keletkező talajszennyeződések esetén prioritást élveznek.

Összehasonlítva az *ex situ* módszerekkel, az *in situ* módszerek kevésbé költségesek, viszont hosszabb időt vesznek igénybe, s az inhomogenitás és a visszamaradt szennyeződés nagyobb veszély jelent, mint a kiásott talajnál alkalmazott technológiák esetében. Az *in situ* technológiák további előnye, hogy a terület felszíne a mélyebb rétegek kezelése során zavartalanul használható.

Könnyen illó komponensek esetén a talajszellőztetés, vízzeloldható talajszennyezők esetén a vizes mosás lehet az *in situ* megoldás, a talaj belsejének hőmérsékletemelése is elérhető a legkülönbözőbb, általában igen energiaigényes melegítési módszerekkel, de az *in situ* talajtisztításnál leggyakoribb a biológiai talajtisztítási módszer alkalmazása, mely a mikroorganizmusok mindenre kiterjedő bontóképeségén alapul.

A biológiai tisztítás történhet a talaj saját mikrobiológiai aktivitásának kihasználásával vagy megfelelő bontóképeségű mikroorganizmusok talajba juttatásával [Gruiz K., Internet].

III.3. Bioremediáció és az optimális feltételek megteremtése

A bioremediáció során a talajba jutott szerves szennyezőanyagokat mikroorganizmusok segítségével lebontjuk, és ártalmatlan anyagokká (pl. széndioxid és víz) alakítjuk. Ez egy igen lassú folyamat. A bioremediáció során a talajmikrobák számára optimális körülményeket teremtünk, hogy a biodegradáció jelentősen felgyorsuljon [Anton és mtsai, 1999].

Más esetben a szennyezett talajból izolált mikroorganizmusokat laboratóriumi körülmények között fermentorokban felszaporítjuk, majd visszajuttatjuk a szennyezett talajba. Mindkét esetben a szennyeződés hatékony lebontásának feltétele, hogy a mikroorganizmusok aktív anyagcserét folytassanak. Ennek a feltételnek a biztosításához ismernünk kell a szennyezett terület állapotát, a szennyezést eltávolító mikrobák minimális igényeit. A biotechnológus feladata az, hogy ezen ismeretek birtokában meghatározza a mikrobiológiai események optimális menetéhez szükséges feltételeket, illetve biztosítsa azokat.

Régóta ismert tény, hogy a talajban élő mikroorganizmusok elbontják a szerves anyagokat, közöttük a szénhidrogéneket is. A kőolajnak és származékainak lebontása igen összetett folyamat, mely során a mikroszervezetek leggyakrabban mikrobiális konzorciumokat alkotva biodegradáció során egymást segítve fokozatosan bontják el az egyes komponenseket, melyek átalakíthatósága nagymértékben függ kémiai szerkezetüktől [Margesin et al., 2001]. Az *n*-alkánok könnyebben, az aromás szénhidrogének nehezebben bonthatók. A talajszennyező szénhidrogének lebontására elsősorban *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Rhodococcus*, *Bacillus* nemzetségbe tartozó baktériumokat lehet hasznosítani, melyek a szennyezőanyagok hatására kisselektálódnak és a legellenállóbbnak bizonyulnak [Anton és mtsai, 1999].

A lebontás sebessége a környezeti tényezők, az oxigénjelenlét-hiány, valamint a lebontási folyamatokhoz nélkülözhetetlen tápanyagok, mint a nitrogén, foszfor,

kálium, stb. megfelelő mennyiségének és arányának függvénye. Noha az olajszennyeződések mikrobiológiai lebontásáról nagy mennyiségű irodalmi adat áll rendelkezésünkre, mégis aktuális probléma a helyi szennyezések ártalmatlanítása. A hatékony remediálás érdekében a célvegyületekre illetve a szennyezett talajra célirányosan olyan mikroorganizmusokat célszerű kiszelektálni, amelyek az adott környezetben a leghatékonyabbak.

In situ bioremediációs eljárásokban, a talajban jelenlévő, a körülményekhez adaptálódott mikroorganizmusok szénhidrogénbontó hatékonysága növelhető a talaj jelentősebb megbontása nélkül, ha a bontáshoz szükséges optimális feltételek folyamatosan biztosítottak. Ilyen feltételek a megfelelő nedvességtartalom, a kiegyensúlyozott tápanyagellátás, hőmérséklet, kémhatás és a megfelelő mennyiségű oxigén a talaj belsejében. A mikrobák számára nitrogénnel, foszforral, magnéziummal és mikroelemekkel dúsított tápoldatot készítenek, mely elősegíti azok gyors szaporodását a talajban.

A bioremediációt, mikrobákkal végzett szennyezőanyag eltávolítást néhány évtizede alkalmazzák. Az első sikeres gyakorlati megvalósítást 1972-ben végezték, amikor az USA-ban (Amber, Pennsylvania) egy olajvezeték sérüléséből a környezetbe került szennyeződést távolították el sikeresen a mikrobiológiai és mérnöki ismeretek egyesítésével.

A környezetet szennyező szerves anyagok legnagyobb része aerob körülmények között bontható hatékonyan, ezért a levegőztetés megoldásai alapvető fontosságúak a bioremediáció során. A szénhidrogén szennyeződések nehezen kezelhető része a talaj mélyebb rétegeiben alakul ki. Ennek oka az, hogy a szénhidrogéneket eltávolító mikroorganizmusok a szennyeződést oxidatív mikrobiális anyagcsere-folyamatok eredményeként tudják felhasználni. A mikroorganizmusok számára a legfontosabb környezeti feltétel az aktív anyagcsere folytatásához az oxigén, pontosabban a megfelelő elektron akceptor jelenléte. Minél mélyebbre kerül a szénhidrogén szennyeződés a talajban, annál kevésbé teljesül a megfelelő oxigénellátottság igénye, tehát annál kevésbé aktív mikroorganizmus populáció tud kialakulni. Ezen túlmenően a szénhidrogének hidrofób természetű anyagok, a hidrofób fázisban pedig az oxigén különösen rosszul oldódik, ezért még a felszínhez közeli régiókban is könnyen

anaerobbá válik a környezet az olajos szennyeződések helyén. Az oxigénellátást vízben oldható vagy rosszul oldódó peroxi-vegyületek, vízben oldott levegő, vagy oxigén biztosíthatja. Bejuttatása a víz recirkuláltatásával vagy a talajvízbe injektálással oldható meg. Oxigén helyett némely esetben elektronfogóként nitrátokat, szulfátokat vagy széndioxidot is alkalmaznak. A hidrogén-peroxid sikeres alkalmazását több bioremediációs kísérlet is bizonyítja. Egy texasi kutatóintézetben, 1982-ben olyan eljárást fejlesztettek ki, melyben a baktériumok számára az oxigént hidrogén-peroxiddal biztosították [R. A. Brown, R. D. Norris, 1994]. A baktériumok képesek voltak tolerálni a vegyszer jelenlétét 1000 mg/l koncentrációban is, és megállapították, hogy ötvenszer megnövelte az oxigénhez való hozzáférést, mint azt a levegővel telített víz esetében tapasztalták. A sikeres alkalmazás mellett azonban a vegyületnek vannak hátrányai is: a gyors dekompozíció, valamint a mikroorganizmusok eltérő toleranciája a hidrogén-peroxiddal szemben. Az oxigénbevitel egyik legegyszerűbb módja oxigénfejlesztő szilárd vegyület, pl. magnézium-peroxid kihelyezése a szennyezett területre. Előnye a folyékony oxigén-kibocsátókkal szemben, hogy az oxigén felszabadulása fokozatos, a tisztítandó közeg nem telítődik túl oxigénnel, és a mikroorganizmusok számára túl erős oxidáló hatás is kizárható.

További lehetőség az adszorbeálódott szennyezőanyagok oldhatóvá tétele pl. felületaktív anyagok, kelátképzők, tenzidek adagolásával, melyek feladata, hogy az adott szennyezőanyagok hozzáférhetőségét a mikrobák számára elősegítsék.

R. Margesin és munkatársai a dízel olaj mikrobiális bontásának intenzifikálására nátrium-dodecil-szulfátot (SDS) használtak anionos felületaktív anyagként különböző koncentrációban. Kis koncentrációban (50-100 mg SDS/l) jelentősen hatékonyabb volt az olajbontás, viszont 500-1000 mg SDS/l koncentrációban a felületaktív anyag már gátolta a pszikrofil baktérium aktivitását [R. Margesin, F. Schinner, 1999].

A nehézfémtartalom csökkentésére kelátképző anyagokat használnak, amelyek stabil komplexeket képeznek a fémekkel, és többségük nem toxikus a környezetre. Az egyik legismertebb kelátképző az etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), amely fémek távollétében ionos formában van jelen.

A biológiai lebontás optimális hőmérséklete általában 20-24°C, a talaj optimális nedvességtartalma 20-80%, optimális kémhatása pedig pH= 6,0 - 8,0.

A hőmérséklet a kőolaj biodegradációját oly módon befolyásolja, hogy hatással van az olaj fizikai természetére és kémiai összetételére, a mikroorganizmusok szénhidrogén anyagcseréjének mértékére, valamint a mikrobiális közösség összetételére [Atlas, 1981]. Alacsony hőmérsékleten az olaj viszkozitása megnő, a mérgező rövid szénláncú alkánok párolgása lecsökken, vízdékonyságuk pedig megnő, így módon a biodegradációt késleltetik. A bontás sebessége általában a hőmérséklet csökkenésével egyenesen arányos, amit elsősorban az enzimek aktivitásának csökkenése okoz. A magasabb hőmérsékletek a szénhidrogén anyagcserét a maximumig tolják, általában 30-40°C, mely felett a szénhidrogének membránra való toxikus hatása megnövekszik. Ennek ellenére alkán-hasznosító termofil baktériumok léteznek [Klug, Markovetz, 1967].

A legtöbb vízi ökoszisztémával ellentétben a talaj pH-ja nagyon eltérő lehet: a beomlott bányákban mért pH=2,5-től az alkalikus sivatagokban megtalálható pH=11,0 értékig. A legtöbb heterotróf baktérium és gomba a semleges pH-t kedveli, utóbbiak jobban tűrik a savas körülményeket. Szélsőséges pH értékek megfigyelhetők egyes talajokban, és ezek várhatóan negatív hatással vannak a mikrobiális közösségek szénhidrogén bontó képességére.

A bioremediációs eljárások legnagyobb előnye, hogy a szerves szennyezőanyagok veszélytelen anyagokká bomlanak, míg más fizikai-kémiai talajtisztítási eljárás során a talajszennyezők csupán más közegbe (levegőbe, extrahálószerbe, abszorbensbe) helyeződnek át [Anton 1999]. A konkrét kísérletek megkezdése előtt azonban fel kell térképeznünk, hogy az adott olajszennyeződés milyen formában van jelen: folyékony, kötött, gáz vagy oldott fázisként.

A bioremediáció viszont rossz hatékonyságú, ha többféle szerves szennyezőanyag fordul elő együtt a talajban, vagy ha azok nehézfémekkel, cianidokkal kombinálódnak, illetve ha a szennyezők nehezen hozzáférhetőek a mikrobák számára. A hozzáférhetőséget fizikai-kémiai eljárásokkal lehet növelni, ezért a bioremediációt célszerű ezekkel a módszerekkel kombinálni. Végül, de nem utolsó sorban, a

bioremediációs talajtisztítás becslések szerint legalább 30%-kal olcsóbb, mint a kitermelt talaj hőkezelése vagy extrahálása [Anton 1999].

III.4. A bioremediációs eljárásokban sikeresen alkalmazott mikroorganizmusokról

A jelenlegi bizonyítékok arra utalnak, hogy a vízi és a szárazföldi környezetekben a mikroorganizmusok a főszereplők a környezetre ártalmas molekulák biodegradációjában, beleértve a kőolajat és a szénhidrogéneket általában [Alexander et al., 1982]. A szénhidrogénbontó baktériumok és gombák széles körben népesítik be a tengeri, vízi és szárazföldi élőhelyeket. Tudományos körökben általánosan elfogadott tény, hogy a mikroorganizmusok egyetlen képviselője sem képes teljes mértékben lebontani a kőolajat [Colwell and Walker, 1977]. Mind a nyersolaj, mind a finomított olaj lebontásában mikroorganizmusok konzorciumai játszanak szerepe, ugyanis a kevert mikrobiális közösségekben sokkal hatékonyabb biodegradatív potenciál rejlik, mert a szennyezett területeken előforduló szerves vegyületek komplex keverékének lebontásához egynél több szervezet genetikai információja szükséges. Az olajbontásért felelős legismertebb baktériumok főképp a *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Rhodococcus*, *Bacillus* nemzetségekbe tartoznak [Atlas, 1981; Bossert and Bartha, 1984; Atlas and Bartha, 1992; Sarkhoh et al., 1990].

A III.1. táblázat összefoglalja azon nemzetségek egy részét, amelyekhez olyan törzsek tartoznak, amelyekből alkán lebontásában szereplő géneket klónoztak, illetve amelyek gyakran előfordulnak az alkánok lebontásával kapcsolatos tanulmányokban. A (+) jellel ellátott nemzetségek képviselőinél az alkán lebontás genetikai háttér-információi hozzáférhetőek [van Beilen et al., 2003].

Microorganisms that aerobically degrade aliphatic hydrocarbons

Bacteria	Yeasts	Fungi	Algae
<i>Achromobacter</i>	<i>Candida</i> (+)	<i>Aspergillus</i>	<i>Prototheca</i>
<i>Acinetobacter</i> (+)	<i>Cryptococcus</i>	<i>Cladosporium</i>	
<i>Alcanivorax</i> (+)	<i>Debaryomyces</i> (+)	<i>Corollasporium</i>	
<i>Alcaligenes</i>	<i>Hansenula</i>	<i>Cunninghamella</i>	
<i>Bacillus</i>	<i>Pichia</i>	<i>Dendryphiella</i>	
<i>Brevibacterium</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>Fusarium</i>	
<i>Burkholderia</i> (+)	<i>Saccharomyces</i>	<i>Gliocladium</i>	
<i>Corynebacterium</i>	<i>Sporobolomyces</i>	<i>Lulworthia</i>	
<i>Flavobacterium</i>	<i>Torulopsis</i>	<i>Penicillium</i>	
<i>Mycobacterium</i> (+)	<i>Trichosporon</i>	<i>Varicospora</i>	
<i>Nocardia</i>	<i>Yarrowia</i> (+)	<i>Verticillium</i>	
<i>Pseudomonas</i> (+)			
<i>Rhodococcus</i> (+)			
<i>Sphingomonas</i>			
<i>Streptomyces</i>			

III.1. táblázat

A mikroorganizmusok a különböző olajfrakciókban a közepes hosszúságú *n*-alkánokat (C₁₀-C₂₀) részesítik szubsztrátként előnyben, és ezek tűnnek a legkönnyebben bonthatóknak [Singer and Finnerty, 1984], míg a rövidebb szénláncú vegyületek sokkal toxikusabbak [Klug and Markovetz, 1971]. A hosszabb szénláncú alkánok (C₂₀-C₄₀) hidrofóbok, szegényes vízdékonyságuk és biológiai hasznosíthatóságuk következtében nehezen bonthatóak [Bartha, 1986]; az elágazó láncú alkánok is sokkal lassabban bontódnak, mint a megfelelő *n*-alkánok [Singer and Finnerty, 1984].

III.4.1. Alifás szénhidrogének aerob lebontása

Az alifás szénhidrogének aerob környezetben történő lebontásának kezdeti lépéséhez molekuláris oxigénre van szükség. A szubsztrát természetétől és a mikroorganizmus enzimmérszletétől függ, hogy milyen enzimreakció megy végbe. Az *n*-alkánok a kőolaj legfőbb alkotói. A hosszú szénláncú *n*-alkánok (C₁₀-C₂₄) a

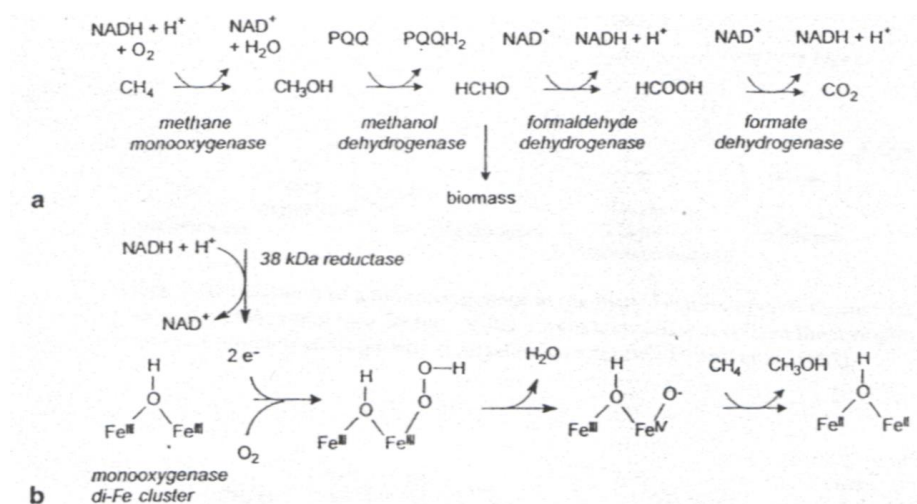
leggyorsabban a 3. ábrán látható mechanizmusokkal bontódnak le. A rövid szénláncú alkánok ($<C_9$) számos mikroorganizmus számára mérgező hatásúak, de a kőolajjal szennyezett területekről gyorsan el is illannak. Az alkánok oxidációja terminális és diterminális oxidációra csoportosítható. A monoterminális oxidáció képezi a legfőbb útvonalat, mely során megfelelő alkohol, aldehid és zsírsav képződik. A zsírsavak β -oxidációja acetyl-CoA-t eredményez. A fiziológiai hosszúságú zsírsavak közvetlenül be is épülhetnek a membránlipidekbe, de a legtöbb lebontási termék a trikarbonsav-ciklusba kerül. A szubterminális oxidáció rövidebb (C_3 - C_6) és hosszabb szénláncú alkánok esetén fordul elő, szekunder alkohol, majd keton képződésével. A telítetlen 1-alkének a lánc telített végén oxidálódnak. Egy kisebb útvonal epoxidon keresztül megy végbe, amely zsírsavvá alakul. Az elágazás általánosságban csökkenti a biodegradációs rátát. A cikloalkánok a kőolaj kisebb hányadát képezik, és általában ellenállnak a mikrobiális támadásoknak. Néhány faj azonban képes ciklohexánt hasznosítani egyedüli szénforrásként, de gyakoribb a kevert kultúrákkal történő kometabolizmusa. A ciklohexán lebontási mechanizmusa a 4. ábrán látható. Általánosságban megállapítható, hogy a cikloalkánok alkil- oldalláncai megkönnyítik azok lebontását.

Az alifás szénhidrogének a lánchosszúság növekedésével kevésbé lesznek vízdékok (C₁₂-től hosszabb láncúak gyakorlatilag vízben oldhatatlanok). Az ilyen lipofil jellegű szubsztrátok felvételére két mechanizmus létezik: a mikrobiális sejtek olajcseppekhez való kötődése és biológiai felületaktív anyagok termelése. A sejteknek a kötődési mechanizmusa még mindig tisztázatlan, a biológiai felületaktív anyagok viszont igen jól tanulmányozott területet képviselnek. Ezek a hidofil és lipofil részből álló molekulák emulzifikáló ágensként hatnak, csökkentve a felületi feszültséget és micellákat képezve. A mikrocseppek a hidrofób mikrobiális sejtfelületbe ágyazódhatnak. A szénhidrogénbontó baktériumok egy fontos csoportja, a Gram-pozitív, aerob *Rhodococcusok* általában magas és változatos metabolikus aktivitásuk mellett képesek ilyen felületaktív anyagok termelésére, ilymódon megkönnyítve a szénhidrogénhez való hozzáférést, és annak bontását [Rehm et al., 2000].

III.4.1.1. Alkánok oxidációja oxigenázokkal

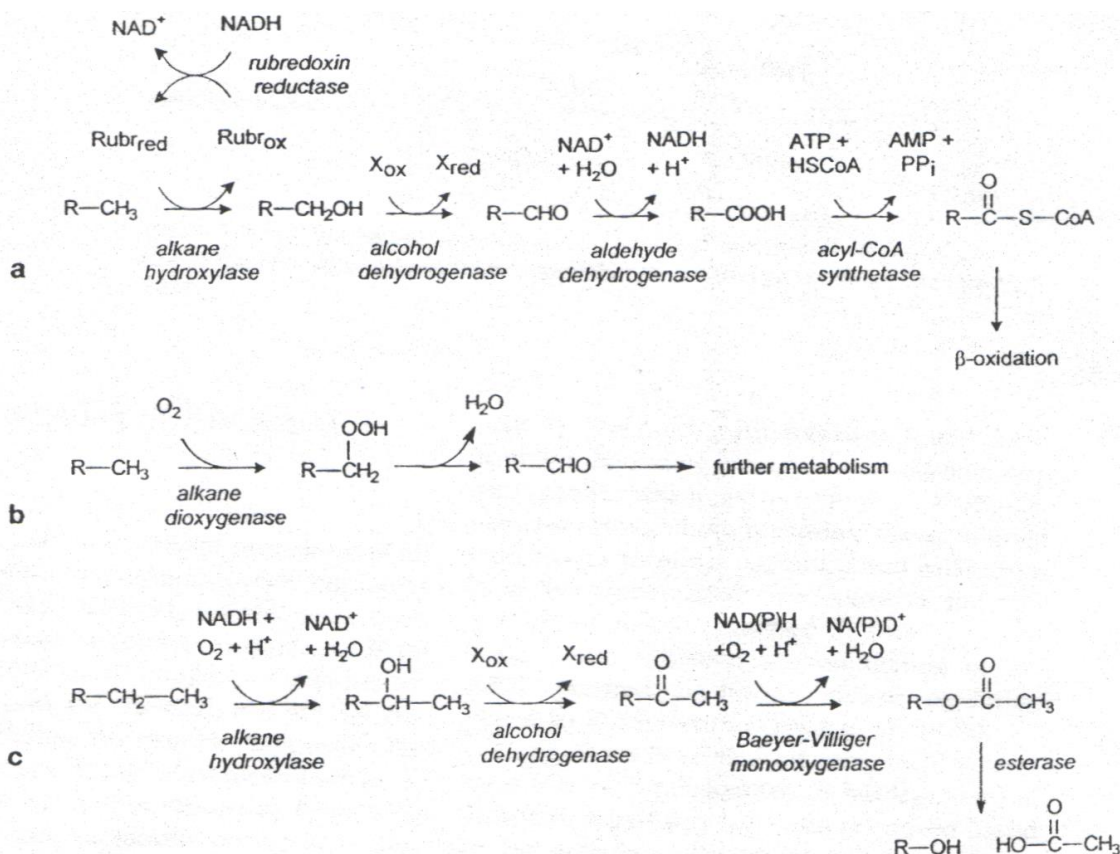
Aerob körülmények között egyszerű *n*-alkánokat, alkéneket és cikloalkánokat bontó mikroorganizmusokat már évtizedek óta viszonylag könnyen lehet talajból és vízből izolálni. Ezeknek a vegyületeknek a bontását általában monooxygenáz enzimek katalizálják, melyek az adott alkánt a megfelelő alkoholra, az alként pedig epoxidra bontják. Az első lépés egy kritikus bioaktivációs reakciónak tekinthető, mely a kémiai inert alkánt hidroxilált terméké alakítja, mely sokkal fogékonyabb a további biokémiai átalakításokra. A reakciókorlát energetikailag oly módon hidalódik át, hogy egy erős redukátans, általában NADH, molekuláris oxigén segítségével oxidálódik. E lépés ad magyarázatot arra, hogy az alkánok általában miért olyan ellenállóak az anaerob anyagcserére. A monooxygenázzal egyesülő oxigénatom a molekuláris oxigénből származik, melyből a másik oxigénatom vízzé redukálódik NADH (mint elektrondonor) segítségével [Rehm et al., 2000].

A monooxygenázokat legrészletesebben metánfalo baktériumokban (III.1. ábra), és *n*-alkánokat hasznosító *Pseudomonas oleovorans*-ban (III.2. ábra) jellemezték [Lange és Que, 1998]. Ezek az egymástól független fehérjék több polipeptidláncból állnak: egy tartalmazza az aktív centrumot két Fe-atommal, és a szubsztát hidroxilálásában vesz részt, és legalább kettő a NADH-ról a monooxygenázra történő elektrontranszferben játszik szerepet.



III.1. ábra

A metán oxidáció útvonala (a) metanotróf baktériumokban és (b) a szolubilis metán monooxygenáz katalitikus mechanizmusa



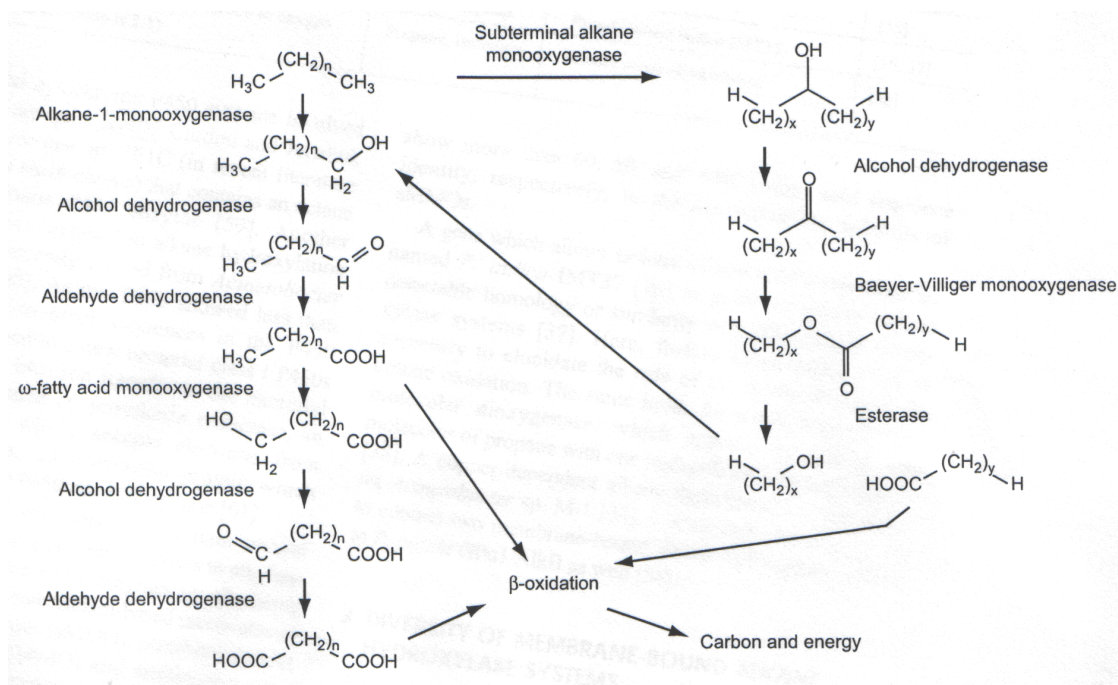
III.2 ábra

a-c.: *n*-alkánok oxidációs útvonalai. (a) hidroxiláció és alkanol konverzió *Pseudomonas oleovorans*-ban. (b) feltételezett dioxigenálás hexadekánt oxidáló *Acinetobacter*-ben. (c) szubterminális oxidáció és lánchasítás Baeyer-Villiger oxidációval.

Az egyedüli alkán monooxygenázok, melyeknek X-sugaras szerkezete ismert, a *M. trichosporium* és a *M. capsulatus* Bath-ban megtalálható szolubilis metán monooxygenázok (sMMO), melyek egymáshoz nagymértékben hasonlítanak. Mindkét szervezetnek sMMO-t kódoló génjeit klónozták és megszekvenálták. Ezeknek az enzimeknek a hidroxiláz komponense hat alegységből áll ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$; 60, 45 és 20 kDa-os polipeptidekkel). A második komponens egy 38 kDa súlyú NADH-függő reduktáz, mely egy $[\text{FeS}_2]$ -klusztert és FAD-ot tartalmaz, és a NADH-ról a hidroxilázra való elektrontranszferben vesz részt. A harmadik komponens egy 15 kDa-os fehérje, melynek szabályozó szerepe van. Az aktív centrum a hidroxiláz α alegységén található, és egy nem-hem Fe-Fe kockát tartalmaz, melyben a vasatomok $[\text{Fe(II)}]$ glutaminsav-, aszparaginsav- és hisztidin oldalláncokhoz kötődnek. Az enzimreakció

az enzim NADH-val történő redukálásával indul, azután az oxigén kötődik, majd lehasad, és a keletkező igen reaktív Fe-kötött oxo-vegyület a szubsztrátról egy hidrogénatomot elvon. A termék az oxigénnek egy metilgyökkel való rekombinációját követően jön létre (III.1. ábra). Egy ettől eltérő, szintén alaposan tanulmányozott hidroxiláz a *Pseudomonas oleovorans* alkán hidroxiláza (III.2./a. ábra), amely szintén rendelkezik nem-hem típusú Fe kockával. Ugyanígy találtak hexadekánt hasznosító *Acinetobacter* törzsben, és feltételezik, hogy ezek az enzimek a hidroxilázok egy másik csoportját alkotják, melyekhez sorolható a *Pseudomonas putida* xilol monooxygenáza is [Lange és Que, 1998].

A monooxygenázok egy másik típusa a citokróm P450, melyet egy kámfort hasznosító *Pseudomonas putida* törzsből izoláltak [Trudgill, 1984]. Az enzim X-sugaras szerkezete ismert, és eukarióta szervezetek citokróm P450 izoenzimeinek szerkezeti modellezésére használják, melyek fontos szerepet töltenek be a xenobiotikumok és endogén vegyületek metabolizmusában. Maeng és munkatársai (1996) feltételezték, hogy a dioxigenázok is szerepet játszhatnak az alkánok biodegradációjában. Egy *Acinetobacter* törzset jellemeztek, mely képes volt *n*-alkánokon (C₁₃-C₄₄-ig) nőni és megállapították, hogy a mikroorganizmus *n*-alkán-oxidáló enzimet termel, melynek aktivitásához nincs szükség redukáló kofaktorokra, prosztetikus csoportként pedig FAD-ot és rezet tartalmaz. A feltételezett dioxigenálás a hexadekánt oxidáló *Acinetobacter*ben a III.2/b. ábrán látható. A legtöbb alkán monooxygenáz az alkánok lebontását terminális támadással indítja, de szubterminális támadásra is van példa (III.3. ábra). Például az alkánok szekunder alkoholokká, majd ketonokká oxidálhatók. Ezt észterképződés követheti, a Baeyer-Villiger típusú reakciónak megfelelően, mely után észteráz hasítással alkoholt és karbonsavat kapunk. Az útvonal utolsó szakaszát (III.2. ábra) *Pseudomonas* és *Nocardia* törzsek tridekanon bontásánál bizonyították [Britton, 1984].

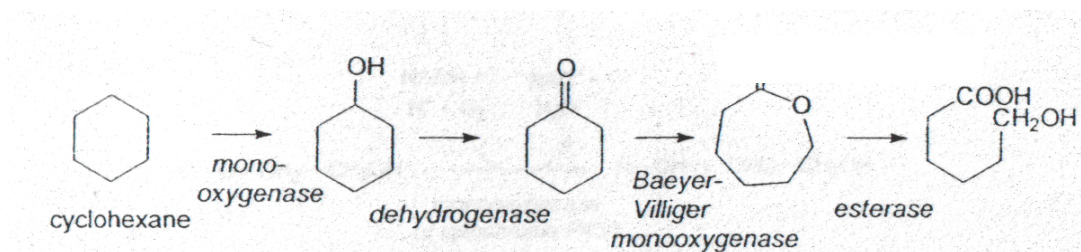


III.3. ábra

Alkán lebontási útvonalak terminális, szub – és biterminális oxidációval. A terminális oxidáció zsírsavak képződéséhez vezet, mely a β - oxidációs útvonalba csatlakozik. Másrészt ω – hidroxiláció zsírsav – monooxygenázzal vagy alkán hidroxilázzal is létrejöhet, mely során dikarbonsavak keletkezhetnek. A szubterminális oxidációval szekunder alkoholok keletkeznek, melyek oxidálásából ketonok jönnek létre. A Baeyer-Villiger monooxygenáz a ketonokat észterekké alakítja, amelyeket azután észteráz hasít el.

III.4.1.2. Cikloalkánok gyűrűhasítása

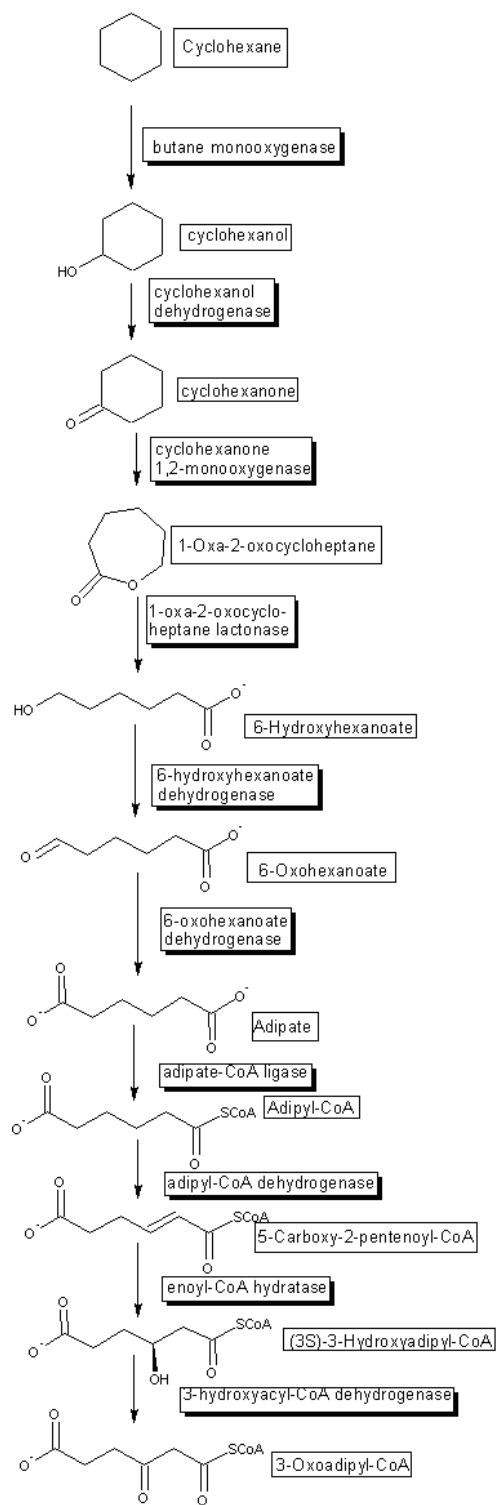
A leggyakrabban alkalmazott cikloalkánok a ciklohexán és a ciklopentán. A cikloalkánok bakteriális lebontása hidroxil származékok átalakításával indul, melyet citokróm P450 enzim vagy nem-hem típusú monooxygenáz katalizál. A ciklikus alkanolok ezután cikloketonokká oxidálódnak, majd Baeyer-Villiger típusú monooxygenáz reakció során (pl. *Acinetobacter calcoaceticus*, *Rhodococcus* vagy *Xanthobacter* törzsek ciklohexanon monooxygenáza) gyűrűhasadás jön létre (III.4. ábra).



III.4. ábra

A ciklohexán hidroxilációját monooxygenáz katalizálja. A ciklohexanol oxidációja Baeyer-Villiger monooxygenázzal észterképződéshez vezet, melyet tovább észteráz hasít.

Rouviere P. E. and Chen M. W. (2003) β -proteobaktériumokhoz tartozó törzset izoláltak (*Brachymonas petroleovorans* CHX), amely képes a ciklohexánt növekedéséhez szénforrásként felhasználni (III.5. ábra). Az alábbi bontási útvonalon látható a fenti baktériummal történő ciklohexán bontás, központi intermedierei a már említett ciklohexanol, ciklohexanon, gyűrűhasadást követően 6-hidroxihexanoát, majd adipinsav keletkezik, amely β -oxidációs folyamat során szén-dioxiddá bomlik.



III.5. ábra

Ciklohexán *Brachymonas petroleovorans* CHX általi aerob lebontásának grafikus
ábrázolása

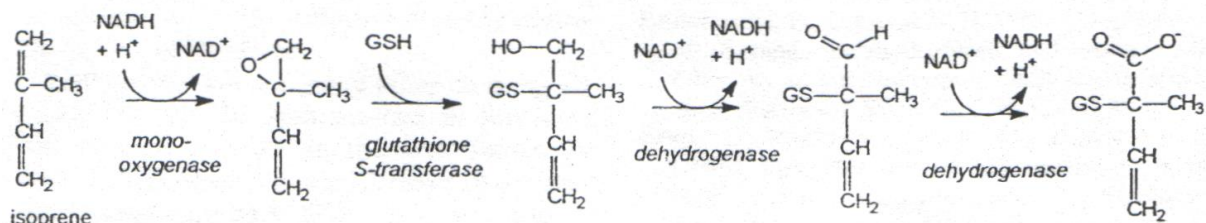
III.4.1.3. Katabolikus útvonalak példái

III.4.1.3.1. *Pseudomonas oleovorans* alkán hasznosítása

Legrészletesebb kutatásokat az alkánok bontásával kapcsolatosan a *Pseudomonas oleovorans* Gpo1-el végeztek. Az alkán oxidáció egy plazmidon kódolt alkán hidroxilázzal (AlkB) történik, mely egy membránkötött nem-hem típusú 46 kDa-os monooxigenáz, aktív centrumában vasat tartalmaz. Az alkán alkohollá történő átalakítását követően és tovább oxidálva karbonsavvá, CoA-val egyesül, amit β -oxidáció követ. A kofaktor-független flavintartalmú alkohol-dehidrogenáz (AlkJ, 58 kDa), a nem esszenciális NADP-függő aldehyd-dehidrogenáz (AlkH, 49 kDa) és az ATP-függő acil-CoA-szintáz (AlkK, 59 kDa) génjei is plazmidon kódoltak, így az alkán oxidáció teljes útvonala a β -oxidációs intermediérig plazmidon van kódolva, noha kromoszómán lokalizált komplementer gének létezését is feltételezik. Az alkán oxidációs rendszer a NADH-tól származó elektronokat rubredoxinon (AlkG, 18 kDa) és rubredoxin-reduktázon (AlkT, 48 kDa) keresztül nyeri, mely egy másik operonon helyezkedik el regulátor génnel együtt. Létezik egy másik érdekes ORF is az *alk* rendszerben (az AlkL), mely egy külső membránproteint kódolhat, de az alkán oxidációban betöltött szerepe egyelőre ismeretlen.

III.4.1.3.2. *Rhodococcus izoprénbontása*

A mikroorganizmusok az izoprént még nyomokban lévő koncentrációban is képesek felvenni, és a talajmikroorganizmusok az atmoszférikus izoprénnek jelentős biológiai kútfőit képezik. Az izoprén anyagcserét *Rhodococcus sp.* AD45-ben, melyet Van Hylckama Vlieg és munkatársai izoláltak (1998), monooxigenáz katalizálja, és az első lépésben 1,2-epoxi-2-metil-3-butén keletkezik (III.6. ábra). Ezt követően glutathion-S-transzferáz hatására glutathion kapcsolódik az előbbi intermediérről, az epoxid gyűrű felnyílik, és 1-hidroxi-2-glutathionil-2-metil 3-butén jön létre. Ez a vegyület a továbbiakban NAD^+ -függő dehidrogenázzal két egymást követő oxidációs lépés után 2-glutathionil-2-metil-3-buténsavvá alakul, a NAD^+ pedig NADH-vá redukálódik.



III.6. ábra

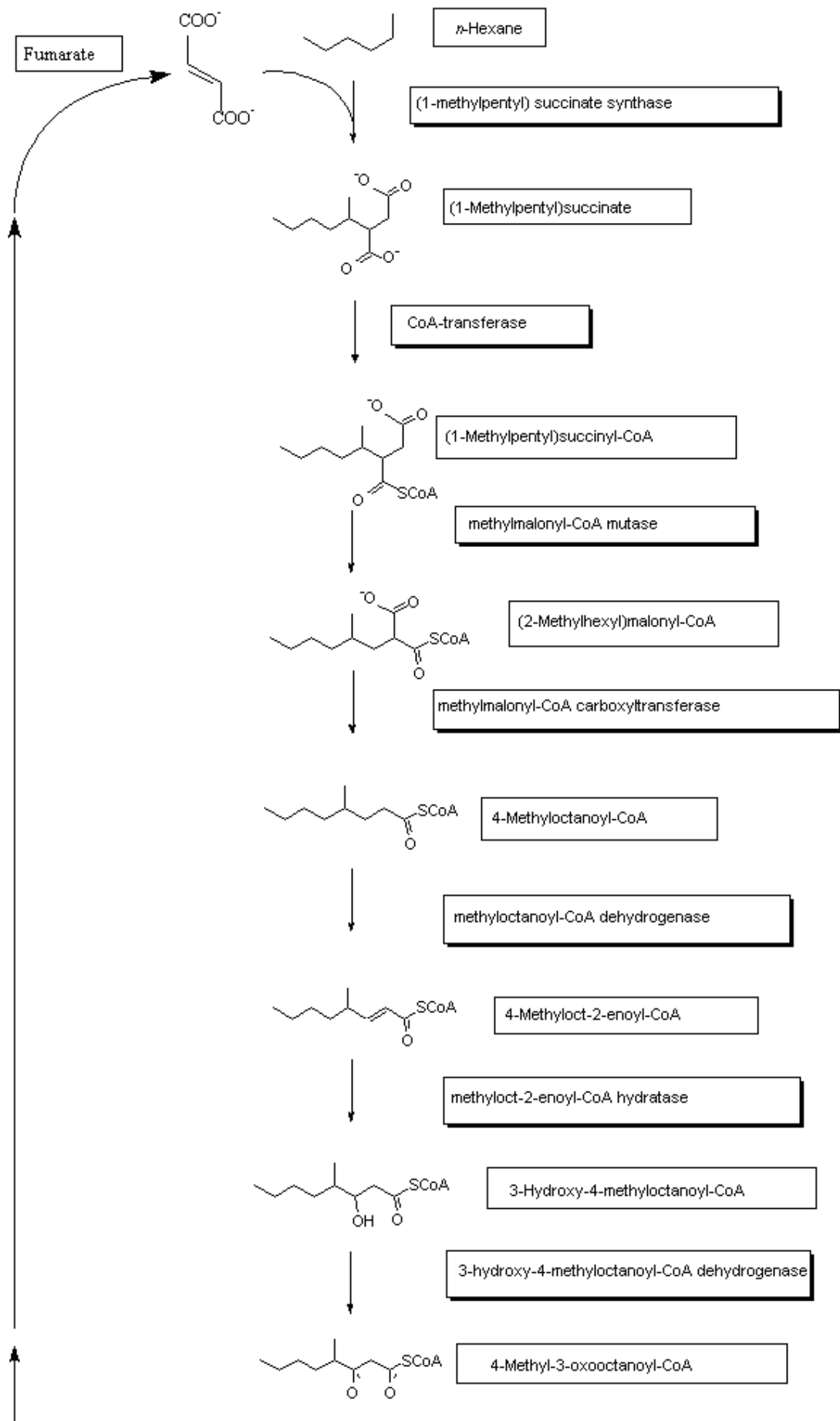
Az izoprén bakteriális metabolizmusa

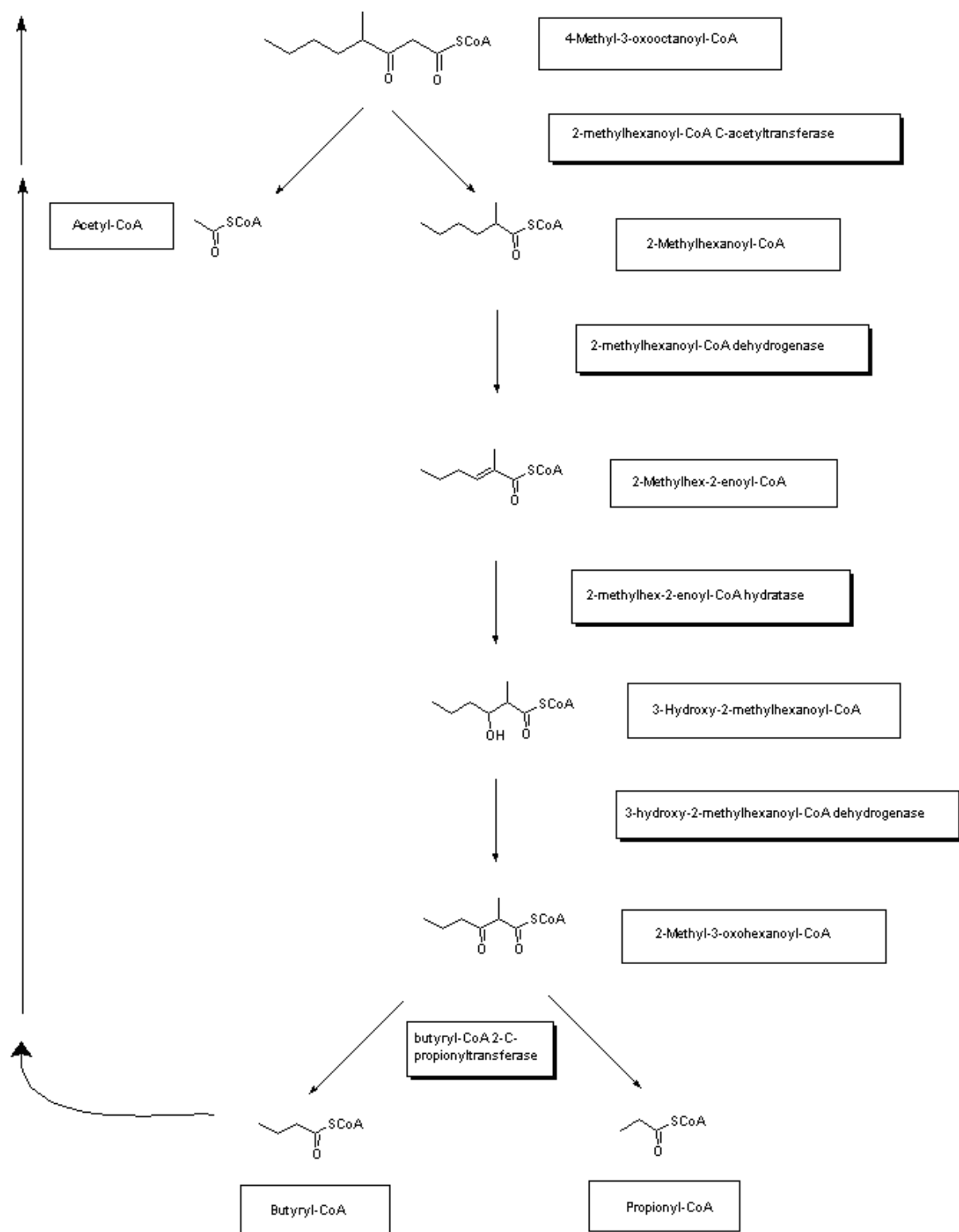
III.4.2. Az alifás szénhidrogének anaerob lebontása:

A telített alifás szénhidrogének oxigén hiányában is bonthatóak, de a folyamat lassú. Az első bizonyítékot ilyen reakció létezésére szulfátredukáló baktérium kultúráknál találtak [Aeckersberg, 1991].

A kultúra hexadékanon való növekedése rendkívül lassú volt, megkétszereződési ideje optimális körülmények között több mint egy hetet vett igénybe. Később számos alkán oxidáló anaerob mikroorganizmust izoláltak [Aeckersberg, 1998; Rueter, 1994], amelyek vagy hosszú- (C_{12} - C_{20}) vagy közepes szénláncú (C_6 - C_{16}) alkánokra specializálódtak (III.7. ábra), elektronakceptorként pedig szulfátot vagy nitrátot használtak. Rövid szénláncú alkánok ($<C_6$) anaerob bontását eddig nem figyelték meg.

Az alkán aktiváció biokémiája oxigén hiányában még mindig nem világos. Valószínűsítik, hogy több útja is létezik. Mindenesetre a szénhidrogének anaerob lebontása nagyon lassú folyamat, és bizonyára nehezen alkalmazható pl. kőolajjal szennyezett területek biológiai tisztítására.





III.7. ábra

Az *n*-hexán denitrifikáló mikroorganizmussal történő anaerob lebontásának grafikus ábrázolása

A *n*-hexán anaerob lebontása fumarát hozzáadásával kezdődik, amely hasonló az anaerob toluén lebontási útvonalához. A lebontást végző baktérium mellett, a további lépésekben egyéb más mikroorganizmusok is részt vehetnek.

Terepkísérletekben, mikrobiális konzorciumokkal dúsított kultúrákban, valamint mikrokozmoszokban végzett kísérletek bizonyították, hogy pl. hat szénatomnál hosszabb láncú *n*-alkánok, elágazó alkánok, szénhidrogénkeverékek is bonthatók anaerob körülmények között, éppúgy mint más szénhidrogének (toluén, benzén, fenantrén stb.). Ezek a reakciók Fe(III)-redukáló, denitrifikáló és szulfátredukáló körülmények mellett játszódhatnak le, anaerob fotoszintetikus baktériumok közreműködésével, vagy protonredukáló és metanogén baktériumok összehangolt társulásaival [Van Hamme et al., 2003].

Az alkán aktiváció biokémiája oxigén hiányában még mindig nem világos. Valószínűsítik, hogy több útja is létezik. Mindenesetre a szénhidrogének anaerob lebontása nagyon lassú folyamat, és bizonyára nehezen alkalmazható pl. kőolajjal szennyezett területek biológiai tisztítására.

III.5. A szénhidrogének biodegradációját befolyásoló biológiai tényezők

A mikroorganizmusok előzetes vizsgálata antropogén vagy természetes forrásokból származó szénhidrogéneket tartalmazó közegben nagyon fontos szempontja annak, hogy megállapíthassuk, hogy az ezt követően hozzáadott szénhidrogén milyen gyorsan bomlik le. Ez a jelenség az adaptáció, mely a közösség szénhidrogén-oxidáló képességének megnövekedéséből ered. A három egymással összefüggő mechanizmus, mely során adaptáció léphet fel:

- speciális enzimek indukciója/depressziója
- olyan genetikai változások, melyek új metabolikus képességeket eredményeznek, és
- az érdekelt vegyületek transzformálására képes szervezetek szelektív dúsítása [Leahy és Colwell, 1990]

Számos tanulmányban megállapították, hogy a szénhidrogén-hasznosító mikroorganizmusok mennyisége általában az ökoszisztémában előforduló szennyeződés mértékét tükrözi. A mikrobiális közösségek szénhidrogénekhez való adaptációjának számos példája van: Walker és Colwell (1975) kevert szénhidrogén szubsztrátok hatékonyabb bontását figyelték meg olajszennyezett öbölből származó üledéki baktériumokkal, mint egy viszonylag szennyezetlen környezetből származó baktériumok esetén. [^{14}C]hexadekán felvétele és mineralizációja szintén nagyobb mértékű volt, szennyezett területről származó planktonikus baktériumok esetén. Hasonlóképp Caparello és La Rock (1975) egy kísérlet során, melyben [^{14}C]hexadekán és *n*-alkán keverékek bakteriális lebontását vizsgálták számos felszíni víz- és homokmintában, arra a következtetésre jutottak, hogy a magasabb szénhidrogén-tartalmú területeknek magasabb szénhidrogén-oxidáló aktivitással rendelkeznek.

A mikrobiális közösség adaptációjának elsődleges genetikai mechanizmusa az amplifikáció a szelektív dúsítás eszközeivel, valamint a kémiai szennyeződés metabolizmusában résztvevő gének transzfere és mutációja. A folyamat közvetlen nyomon követése a szénhidrogénekhez való adaptációt illetően a DNS próbák kifejlesztésével vált lehetővé, melyek specifikusak a szénhidrogén-katabolikus útvonalakat kódoló génekre. A dot blot hibridizáció például, melyben a DNS-t a környezeti mintákból kiextrahálják, majd próbának vetik alá, a környezetben előforduló specifikus DNS szekvenciák detektálására alkalmas a mikroorganizmus kiizolálása és tenyésztése nélkül, amelynek nagy jelentősége van, ha figyelembe vesszük azt a tényt, hogy laboratóriumi körülmények között a környezeti mintákból szaporítható baktériumok száma igen alacsony (1-5%). Az ilyen módszereknek az alkalmazásával a szénhidrogén anyagcserében résztvevő gének nukleinsav-próbáival együtt lehetővé válik ezeknek a géneknek a gyakoriságának a nyomon követése adott mikrobiális közösségben.

A molekuláris genetika rohamos elterjedése, egy sereg PCR-alapú megközelítés tette lehetővé specifikus mikroorganizmusok (csoportok) és specifikus gének tanulmányozását, valamint közösség profilok átfogó értékelését. Ez utóbbira szolgáló módszerek közé sorolható a denaturáló- és hőmérséklet grádiens gélelektroforézis, a

riboszómális intergénikus spacer analízis, amplifikált riboszómális DNS restrikciós analízis stb. [Kent és Triplett, 2002]. Nemrég a DNS-mikrochipek terén történt fejlesztések felkeltették a környezeti mikrobiológusok figyelmét, amely módszerrel gének ezrei vizsgálhatók egyidejűleg.

Néhány tanulmányt említve a teljesség igénye nélkül, fontos kiemelni, hogy ezek zöme tenyésztéstől független módszerekkel jellemzett mikrobiális közösségeket, más mikrobiális aktivitást mérő megközelítést is alkalmazott, beleértve a tenyésztés-függő módszereket is. Ez az alapkövetelménye annak, hogy a tenyésztéstől független módszerek eredményei értékelhetőek legyenek, valamint új megközelítések kifejlesztése és kiértékelése lehetővé váljon. Ovreas (2000) denaturáló grádiens gélelektroforézist (DGGE), szekvenálást és DNS-reasszociációs térképezést alkalmazott metán és metanol oxidációs mérésekkel kombinálva mezőgazdasági talajok metán-perturbációja alatti diverzitás csökkenés, és a velejáró metanotrófok számának növekedésének szemléltetésére. MacNaughton és munkatársai (1999) 16S rRNS PCR-DGGE-t és foszfolipid zsírsav analízissel azonosított szennyeződést mentesítő populációkat, mialatt olajszennyezésre bioremediációs technikákat értékelt ki. Colores és munkatársai (2000) felületaktív anyagok hatását vizsgálta C₁₆ és fenantrén lebontását végző kevert kultúrákra laboratóriumi mikrokozmoszban respirometriás, 16S rRNS, DGGE és tenyésztés-függő technikákkal. Azt találták, hogy akritikus micellaképzés szintjéhez közeli talajban levő felületaktív anyag szintek gátolták a mineralizációt, a közösséget pedig *Rhodococcus* és *Nocardia* populációból *Pseudomonas* és *Alcaligenes* fajokba tolta el, amelyek képesek voltak mind a felületaktív anyagokat, mind a szénhidrogéneket bontani.

A közösségi vizsgálati módszerek, mint amilyen a 16S rRNS DGGE alkalmazása nem mindig elegendő közösségek változásainak vizsgálatára. Több információt kaphatunk, amikor specifikus izolátumokra, genotípusokra vagy metabolikus aktivitásokra használnak próbákat, és az ilyen jellegű megközelítéseket mind aerob, mind anaerob rendszerekbe alkalmazzák.

Amennyiben ismert a biokémia és a genetikai diverzitás, a megfelelő génpróbákkal a bakteriális lebontási potenciál nagyobb eséllyel értékelhető ki pontosan. Az alkán

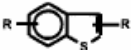
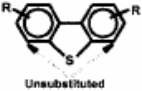
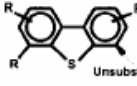
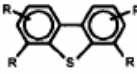
anyagcsere jellemzésében történt előrelépések több szervezetben lehetővé tette számos primer megtervezését gének detektálására, mint amilyen pl. a *Pseudomonas putida* GPo1 alkB génje. Ez a terület nagymértékben haladhat előre, ha környezetileg fontos mikroorganizmusok genomprojektjeit kezdeményezik, beleértve a gombákat is, ha a szénhidrogén anyagcsere útvonalak diverzitását részletesebben jellemzik, és ha a génexpresszió nagyléptékű monitorozására megfelelő eszközöket fejlesztenek ki.

A fenti tanulmányokból arra a következtetésre juthatunk, hogy az alifás szénhidrogének a szénhidrogének környezetvédelmileg fontos csoportját képezik, biodegradációjuk aerob és anaerob körülmények között lehetséges a megfelelő feltételek megteremtésével, és új genetikai, molekuláris biológiai módszerek kifejlesztésével lehetővé válik katabolikus gének azonosítása, jellemzése, mely információ megléte mellett kiválogathatók az egyes szennyeződések bontására legalkalmasabb mikroorganizmusok.

III.6. Mikrobiális kénmentesítés

Az utóbbi években rengeteg pénzt költöttek a fosszilis energiahordozók minőségének javítására. Naponta 10 millió m³ olajat pumpálnak ki a Földből, ennek 90%-át energia nyelés céljára elégetik. A nyersolaj azonban nagy mennyiségben tartalmaz kén tartalmú vegyületeket (III.8. ábra), melyekből az elégetés során kénoxidok szabadulnak fel, melyek alapvetően felelősek a savas esők kialakulásáért. Ennek következtében a legtöbb országban szigorították az üzemanyagok kén koncentrációját. A nyersolajban kb 1000 ppm kén található, de akár 30000 ppm is lehet [Monticello 2000]. A nyersolaj feldolgozása során keletkező diesel olaj frakcióban a kén tartalom általában 5000 ppm, ez a frakció tartalmazza a legtöbb kén, mely heterociklusos vegyületekben, szerves kötésben található meg (dibenzotiofén). Jelenleg a hidrodieszulfurizációs technológiát használják kénmentesítésre, ez egy katalitikus folyamat, mely során a szerves kötésben lévő kén hidrogénszulfid gáz formájában távozik [Gray 2003, McFarland 1999]. A nyersolaj frakciót hidrogénnel reagáltatják nyomás alatt magas hőmérsékleten (290-455°C). Ez az nagyon költséges, ráadásul nagyon lecsökkentették a megengedett kén

koncentrációt (500 ppm), ezért alternatív megoldásokat keresnek a kénmentesítésre [Monticello 2000].

FOSSIL FUEL TYPE	SULFUR COMPOUND CLASSIFICATION	CHEMICAL STRUCTURE	DISTILLATION BOILING POINT
Gasoline	Nonthiophenic	$R-S, R-S-R, R-S-S-R$	
	Thiophenes		84°C
	Methyl-tertiary butyl sulfides	$C-S-C(C)(C)C$	99°C
Jet	Methyl-ethyl sulfides	$C-S-C-C$	135°C
	Benzothiophenes		219°C
Diesel	Non-β-substituted dibenzothiophenes	 Unsubstituted	~293°C
	β-substituted dibenzothiophenes	 Unsubstituted	
	Di-β-substituted dibenzothiophenes		

Crude oil (sulfur type varies with crude oil source)

Current Opinion in Microbiology

II.8. ábra

A fosszilis energiahordozókban jelenlévő kéntartalmú szerves vegyületek

Amikor felfedezték, hogy a *Rhodococcus* fajok többsége képes deszulfurizációra, melynek során C-S kötések hasítják enzimatikusan a C-C kötések megbontása nélkül, előtérbe került a kénmentesítés biológiai úton történő megvalósítása, sok laboratórium kezdte intenzíven vizsgálni a konverzió körülményeit, és nagyon sok pénzt költöttek el egy hatékony biotechnológia kidolgozására. Sajnos jelenleg még nem sikerült kifejleszteni olyan eljárást, mely stabil és gyors, ám számos kutatási eredmény optimizmusra adhat okot.

Anaerob kén-specifikus biodeszulfurizációval a szulfát-redukáló baktériumoknál találkozunk, ennek során hidrogénszulfid keletkezik. Az oxigén kizárásával elkerülhető a szénhidrogének nonspecifikus oxidációja, ami savas illetve gumiszzerű termékhez vezetne. Sajnos ez a folyamat csöppet sem hatékony, így kicsi az esélye az

üzemi szintű anaerob deszulfurizációs eljárás hatékony működésének [McFarland 1999].

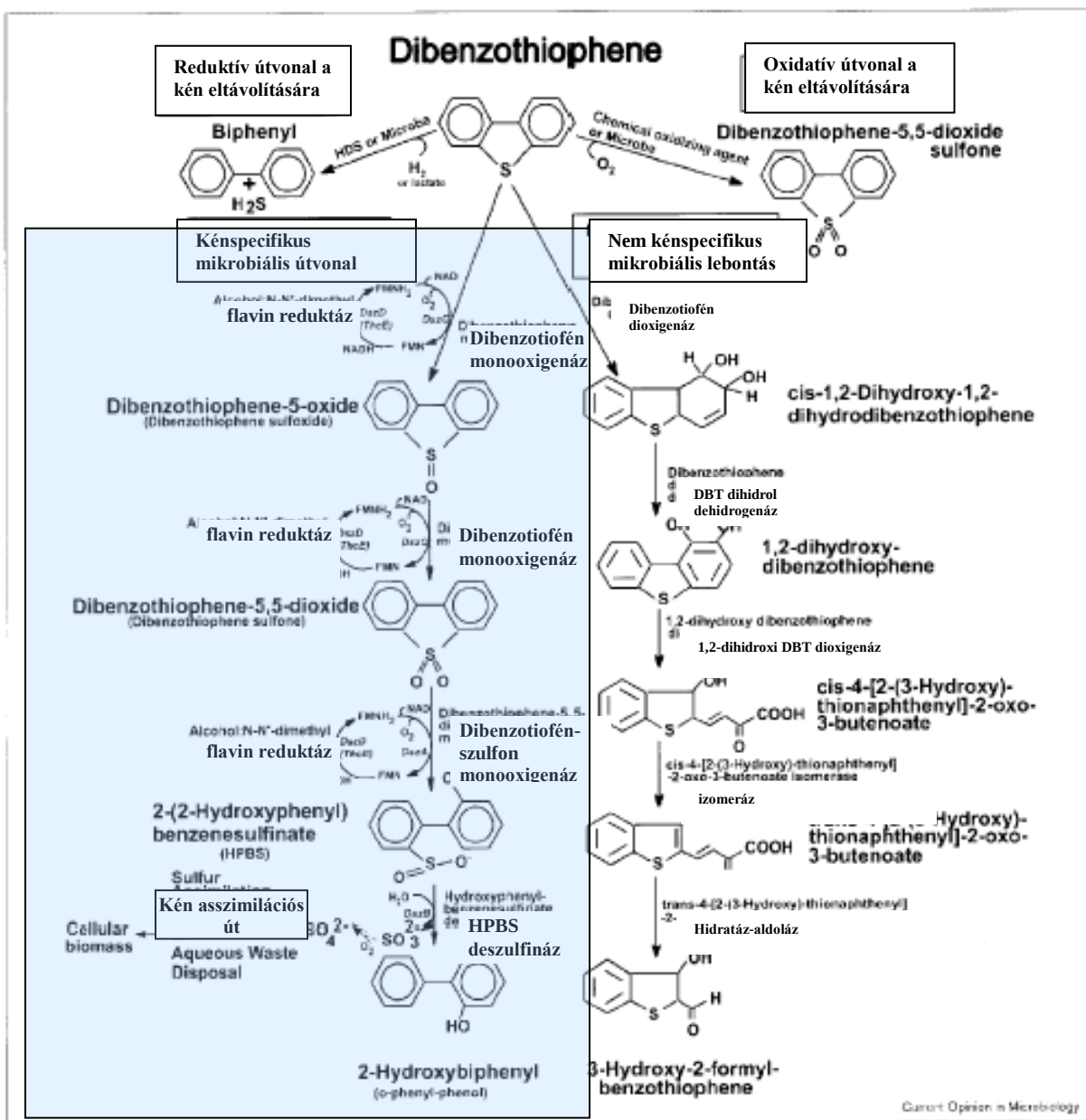
A legismertebb **aerob** biodeszulfurizáló fajok a *Rhodococcus*-ok, de leírták *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Mycobacterium*, *Sphingomonas* törzsekben sőt egy termofil *Paenibacillus* fajban is e folyamatot [McFarland 1999].

A folyamatot *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 törzsben vizsgálták legalaposabban [Kilbane 1992]. Nagyon specifikus metabolikus út, mely során a heterociklusos vegyületekből felszabadított kenet a sejtek kénforráként hasznosítják, és mindemellett a szénváz oxidációja nem következik be (azaz a molekula intakt marad, csak kenet nem tartalmaz tovább). A deszulfurizáció energiaigényes folyamat, mivel 4 mol NADH szükséges 1 mol DBT kénmentesítéséhez. A reakcióhoz négy enzimre van szüksége a sejteknek [Duarte 2001]: DBT monooxygenáz, mely a konverziós útvonal első két lépését katalizálja. A 3. lépést katalizáló DBT-szulfon monooxygenáz flavin függő enzim. Mindkét oxygenáznak szüksége van a harmadik enzimre, a flavin reduktázra. A negyedik enzim a HPBS (hidroxifenil-benzolszulfonát) deszulfináza. A folyamat végén hidroxibifenil és szulfonátot kapunk (III.9. ábra). A monooxygenázok citoplazmatikus enzimek (nem membránkötöttek!), ami azért érdekes, mert katalitikus hatásuk kifejtéséhez a szubsztrátnak be kell jutnia a sejtbe az olajfrakcióból. Eddig azonban aktív transzportot, illetve az azt segítő fehérjéket nem sikerült kimutatni. Azt sem tudják még, hogy a keletkező HBP hogyan jut ki a sejtekből vissza az olaj frakcióba.

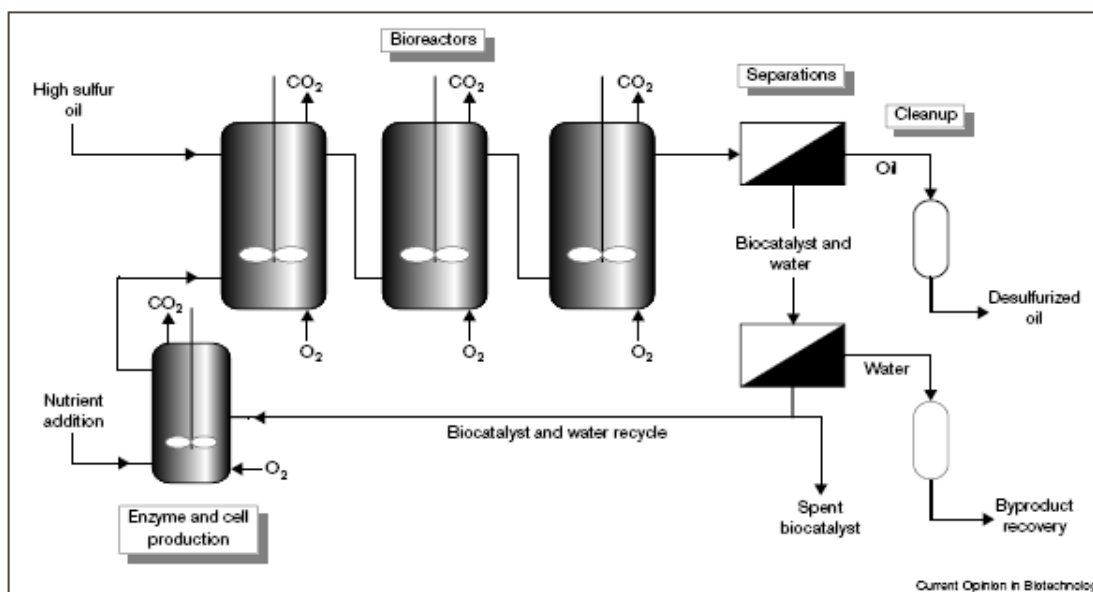
A *Rhodococcus*-ok hidrofób természete (mikolát tartalmú sejtfa!) lehetővé teszi a sejtek számára, hogy közvetlenül az olaj-víz határfelületen kapcsolódjon az olajcseppekhez. A vizes fázisban szinte egyáltalán nem találunk baktériumot, ellenben a *Pseudomonas* fajok, noha felületaktív anyagokat termelnek, mégis a vizes fázisban találjuk meg őket, és csak azt a szubsztrátot képes hasznosítani, mely ott megjelenik [Monticello 2000]. Ezek alapján azt mondhatjuk, hogy a *Rhodococcus*-ok az 'olajból isznak', míg a *Pseudomonas* fajok a 'vízből isznak'.

A vad típusú *Rhodococcus*-ok lassú biokatalizátorok, stabilitásuk sem mindig kielégítő, és válogatósak a kén-tartalmú komponensekben. Ezért rekombináns mikroorganizmusokkal próbálják a kénmentesítést gyorsabbá, hatékonyabbá tenni.

Tovább bonyolítja a helyzetet, hogy üzemi szintű kénmentesítést (III.10. ábra) *Rhodococcus*-okkal nem könnyű kivitelezni, mivel a kialakult emulziót szét kell választani a kénmentes szénhidrogén kinyeréséhez, és a sejtek szeparációjához [Monticello 2000].



III.9. ábra
A dibenzotiofén kén specifikus és nem kén specifikus mikrobiális bontása



III.10. ábra
Biodeszulfurizációs eljárás sematikus ábrázolása

A biodeszulfurizációs eljárások fejlesztése során megállapították, hogy legalább 3 levegőátáramoltatásos reaktorra van szükség az alacsony kéntartalom eléréséhez. Mivel a felszabaduló szervesen kötött kén komponensek gátolják az enzimek aktivitását viszonylag nagyobb átfolyási sebességgel kell dolgozniuk, hogy kimossák a keletkező kénvegyületeket. Javítani kell az enzimkinetikán, és a kénmentes termék elválasztása a vizes frakciótól és a sejtektől szintén problematikus lépés.

A petrokémiai folyamatok magas hőmérsékleten és nyomáson történnek, a termék lehűtése a bioreakciókhoz nem mindig praktikus. Próbálnak keresni olyan enzimeket, illetve mikróbákat, melyek magas hőmérsékleten képesek katalizálni a kénmentesítő reakciókat, pl. egy *Paenibacillus* törzs képes 55°C-on deszulfurizálni a DBT-t. További probléma az oldószer tolerancia, míg a rhodococcusoknak alacsony a toleranciájuk, a pseudomonasok a képesek legjobban elviselni oldószerek jelenlétét.

A fentiekből látszik, hogy a biodeszulfurizációs eljárások megjelenése a piacon még várat magára.

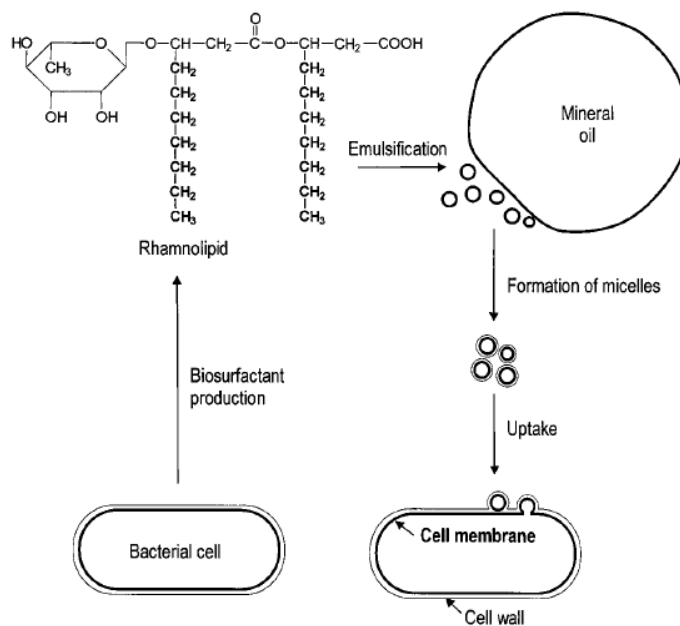
III.7. Felületaktív anyagok szerepe a bioremediációban

A felületaktív anyagok (tenzidek) olajszennyezett talajok bioremediálásában betöltött szerepe alapvető fontosságú. A kőolaj és származékainak bontására számos mikroorganizmus képes, melyek a szénhidrogéneket energia- és szénforrásként hasznosítják. Ezek a mikrobák a természetben általánosan előfordulnak és a különböző típusú szénhidrogén molekulák bontására képesek (rövid és hosszú szénláncúak, aromások, policiklusos aromások). Mivel ezek a komponensek nem vízzoldékonyak, a bontásukhoz pedig legtöbbször membránkött oxigenáz enzimek szükségesek, a baktériumoknak szükségszerűen közvetlen kapcsolatba kell kerülniük a szénhidrogén szubsztráttal.

Olajjal szennyezett talajok kármentesítési kezelése során az egyik limitáló tényező a különböző frakciók hozzáférhetősége. A szénhidrogénbontó mikroorganizmusok annak érdekében termelnek felületaktív anyagokat (surfactant = surface active agent), hogy hozzáférjenek a hidrofób szennyeződéshez, így azt fel tudják venni, le tudják bontani. A talajremediálási technológiák során felületaktív anyagok adagolása elősegíti a szennyeződés szétoszlását, így könnyebben hozzáférnek az azt bontani képes mikrobák (III.11. ábra).

A felületaktív anyagok szerepe igen széles, de döntően a felületi feszültség csökkentése egymással nem elegyedő folyadékok között, a hidrofób anyag felületének növelése, a biológiai hozzáférhetőség fokozása.

A felületaktív anyagok a mikroorganizmus és szubsztrátjuk (a szénhidrogén) közötti kapcsolat erősítésével, az olajcsepp hasznosítható felületének növelésével, a felületi feszültség csökkentésével segítik elő a szénhidrogén felvételt (III.11. ábra). A felületaktív anyagok tehát a hidrofób szennyezőanyagokat "előkészítik" a bioremediációs folyamatok, a lebontás számára. Bioremediációs eljárások keretében nemcsak felületaktív anyagok adagolása lehetséges, hanem a felületaktív anyagot termelő mikroorganizmusoké, illetve felületaktív anyagokat túltermelő, genetikailag manipulált törzsek alkalmazása is.



III.11. ábra

A felületaktív anyagok elősegítik a mikróbák számára a szubsztráthoz való hozzáférést

Felületaktív anyagokat termelnek a mikroorganizmusokon (III.1. táblázat) kívül növények, állatok és az ember is, illetve a szintetikus felületaktív anyagok is igen elterjedtek az iparban. Tenzidek a foszfolipoidok között (pl. lecitin, kefalin) és a szteránvázas vegyületek között (pl. koleszterin) is találhatóak.

A felületaktív anyagok hidrofíl (poláros) és hidrofób/lipofíl (apoláros) résszel rendelkeznek, így amfipatikus molekuláknak tekinthetők. A hidrofíl részt gyakran "fej"-nek, a hidrofób részt pedig "farok"-nak nevezik. Így a felületaktív anyagok az adott folyadékok polaritásának megfelelően tudnak elrendeződni azok határfelületén. tulajdonságaikat, ily módon kötődhetnek felszínekhez, vagy leválhatnak róluk. Tipikus példája a fenti mechanizmusnak a *Rhodococcus*, ahol a sejtfalban található arabinogalaktánhoz kapcsolódó mikolsav biztosít hidrofób jelleget a sejtnak. A sejtfal lipidek döntő szerepet játszanak a hidrofób szénforrás felvételében.

kis molekulásúlyú felületaktív anyagok (a folyadékok határfelületi feszültségének csökkentésében játszanak szerepet)	Glikolipidek	trehalóz tetraészterek, dikorinomikolátok, fruktóz lipidek, szoforolipidek, ramnolipidek, cellobiolipidek
	lipopeptidek/peptidil lipidek	szurfaktin, viszkozín, polimixin, szubtilizin, gramicidin, szerravettin
nagy molekulásúlyú felületaktív anyagok emulziók képzéséért felelősek, a felületi feszültséget nem csökkentik; a stabil emulziók képzése lehetővé teszi a baktériumok számára, hogy hidrofób felületekhez (anyagokhoz) kötődjenek	lipopoliszacharidok	emulzán, biodiszperzán
	lipoproteinek	
	ezek kombinációi	alazán, lipozán, mannoprotein
zsírsavak, neutrális lipidek, foszfolipidek		
részecske természetű felületaktív anyagok (extracelluláris membrán vezikulumok, melyek a szénhidrogénnel mikroemulziót képeznek, így elősegítve alkánok felvételét a sejtek számára)		

III.1. táblázat

A mikroorganizmusok által termelt felületaktív anyagok felosztása

A mikroorganizmusok kötődhetnek közvetlenül az olajcseppekhez, és a megnövekedett felület gyorsabb degradációt eredményez. Ilyenkor a felületaktív anyag a külső sejtfalon lokalizálódik, hidrofób jelleget adva annak, így biztosítja a sejtek kötődését az olajcseppekhez. A mikrobák a felületaktív anyagaikkal szabályozni tudják a sejtfal hidrofóbicitásukat.

Számos mikroorganizmus képes olaj-víz emulziók (emulzió akkor képződik, amikor egy folyadék fázis mikroszkópikus cseppek formájában oszlik szét egy másik folyadék folyamatos fázisában) képzésére extracelluláris felületaktív anyagok segítségével. A felületaktív anyagok jelenléte a hidrofób anyagok feldúsulásához vezet a vizes fázisban.

Egy bizonyos (kritikus micella) koncentráción felül a felületaktív anyag molekulák micellákká állnak össze. A hatékony felületaktív anyagok alacsony kritikus micella koncentrációval (CMC= critical micelle concentration) jellemezhetők, vagyis kevesebb felületaktív anyag elegendő a felületi feszültség csökkentéséhez. Gyakorlatban a CMC a felületaktív anyag monomerek maximális koncentrációja a vizes fázisban. Ha a felületaktív anyag molekulák az olajban állnak össze aggregátumokká, reverz micellák képződnek. Ilyenkor a molekulák „feji” részei a micella belsejében helyezkednek el, míg a „farok” hidrofób részek az olaj felé néznek.

A felületaktív anyagok egyfajta védőgátként is szolgálnak más, az olajcseppek jelenlévő kompetitív mikroorganizmusok ellen.

Bizonyos felületaktív anyagok antimikrobiális jelleggel bírnak (pl. *Bacillus*ok által termelt polimyxin, gramicidin). A *Bacillus subtilis* által termelt szurfaktin például jelentős biológiai tulajdonságokkal rendelkezik. Így többek között befolyásolja tumorok, baktériumok, gombák, vírusok, mikoplazmák növekedését. (Ez a kivétel tehát gyakorlatilag ellentmond az általános nézetnek, miszerint a biológiai eredetű felületaktív anyagok kevésé toxikusak a mikroorganizmusok számára.)

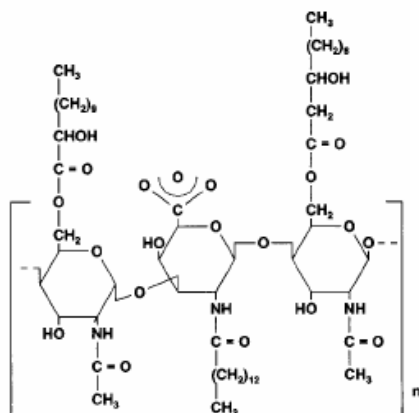
A felületaktív anyagok mikrobiális termelését befolyásolják a különféle környezeti faktorok, így pH, hőmérséklet, rázatás, oxigén hozzáférhetőség. Bizonyos baktériumok nitrogén éheztetés mellett fokozott felületaktív anyag termelést mutatnak.

Számos szénhidrogén bontó mikroorganizmus képes felületaktív anyag termelésre.

Jelentősebb fajok:

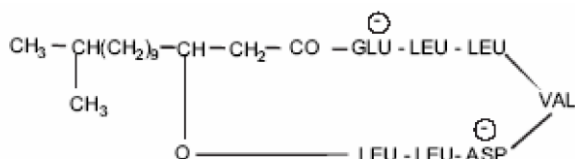
- *Acinetobacter calcoaceticus* (emulzán – III.12. ábra)
- *Acinetobacter radioresistens* (alazán)
- *Arthrobacter sp.* (glikolipidek, lipopeptidek, heteropoliszacharidok)

- *Arthrobacter paraffineus* (foszfolipidek)
- *Bacillus licheniformis* (számos lipopeptid)
- *Bacillus subtilis* (szurfaktin – III.13. ábra)
- *Candida lipolytica* (lipozán)
- *Clostridium spp.* (neutrális lipidek)
- *Corynebacterium sp.* (foszfolipidek, zsírsavak)
- *Nocardia sp.* és *Rhodococcus sp.* (glikolipidek – III.14. ábra, neutrális lipidek és zsírsavak, trehalóz dimikolátok és dikorinomikolátok, poliszacharidok)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ramnolipidek – III.15. ábra)
- *Pseudomonas sp.* (viszkozín, ornitin, glikolipidek),
- *Saccharomyces cerevisiae* (mannoprotein)
- *Thiobacillus spp.* (foszfolipidek)
- *Torulopsis (Candida) spp.* (szoforolipidek – III.14. ábra)



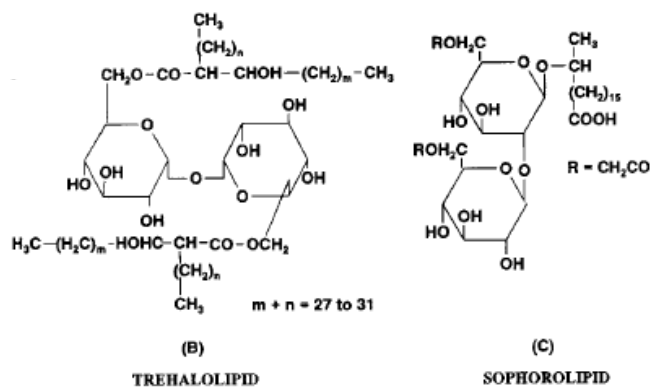
III.12. ábra

Az *Acinetobacter calcoaceticus* által termelt emulzán szerkezete



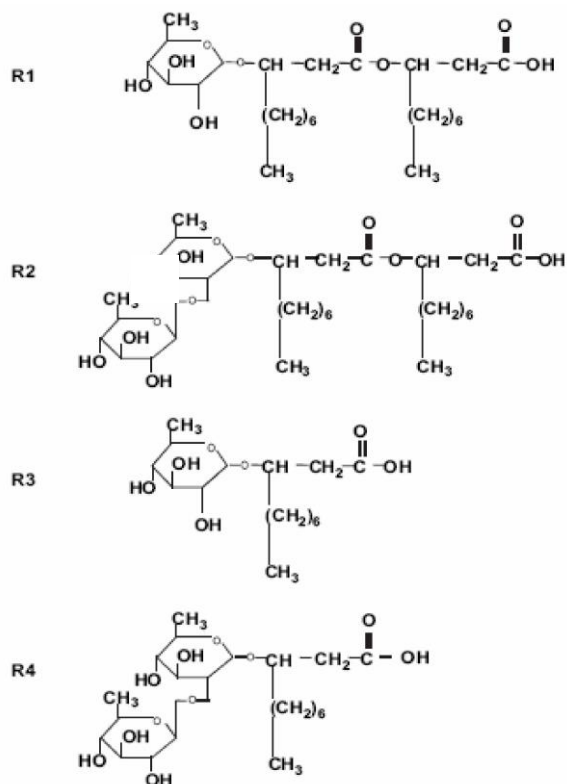
III.13. ábra

Szurfaktin szerkezete (*Bacillus subtilis*)



III.14. ábra

Rhodococcus-okra jellemző trehalolipid és *Torulopsis (Candida) bombicola*-ra jellemző szoforolipid struktúrája



III.15. ábra

Pseudomonas-okra jellemző ramnolipidek

Bioremediációs eljárások keretében alkalmaznak szintetikus felületaktív anyagokat is a szénhidrogének mikroorganizmusok számára hozzáférhetővé tétele érdekében.

A biológiai eredetű felületaktív anyagok előnye a szintetikusakkal szemben alacsony toxicitásuk (kevésbé károsak a mikroorganizmusok számára), biológiai lebonthatóságuk, specifitásuk, továbbá csak kis mennyiségben szükségesek. Fermentációs úton könnyedén, olcsón előállíthatók. A biológiai eredetű felületaktív anyagok hatékonyabban fokozzák a biológiai hozzáférhetőséget is a szintetikusaknál, ugyanakkor kevésbé stabilak.

A biológiai eredetű felületaktív anyag molekulák hidrofób részét képezhetik hosszúláncú zsírsavak, hidroxizsírsavak vagy α -alkil- β -hidroxizsírsavak, a hidrofil rész pedig szénhidrát, aminosav, peptid, foszfát, karboxilsav vagy alkohol.

A legjobban tanulmányozott glikolipid felületaktív anyag a ramnolipid, melyet számos *Pseudomonas* termel és ramnóz, illetve β -hidroxidekanoinsav épít fel.

A nagy molekulású felületaktív anyagok igen kis koncentrációban hatékonyak. Ezen típusú felületaktív anyagok közül a legjobban tanulmányozottak az *Acinetobacter* törzsek által termelt emulzánok. Az *Acinetobacter radioresistens* által termelt alazán egyedi abban, hogy kovalensen kötött alanint tartalmaz. Az alazán fehérjetartalma fontos szerepet játszhat a komplex szerkezetében és aktivitásában.

A felületaktív anyagok fémek különféle felszínekről való eltávolítására is alkalmasak. Mindez komplexképzésen keresztül valósul meg (nem ionos formájú fémek), vagy anionos felületaktív anyagok léphetnek kapcsolatba fémekkel, ami azok deszorpciójához vezet, a felületaktív anyag-fém egységek azután eltávolíthatók a talajból.

A felületaktív anyagok csoportosíthatók ionos töltésük alapján is, így beszélhetünk ionos (anionos, kationos, ikerionos) és nemionos felületaktív anyagokról.

A tenzidek az emulgeátorok (emulziók képzéséhez szükséges anyagok) egyik nagy csoportját alkotják. A szintetikus tenzidek legközismertebb példája a szappan. Megemlíthető továbbá pl. a Tween, Triton X-100, SDS (nátrium-dodecilszulfát), az alkilammónium- és alkilpiridinium-sók.

A szintetikus felületaktív anyagokat nagy mennyiségben alkalmazza az élelmiszeripar, vegyipar, kozmetikai ipar.

III.7. Irodalomjegyzék

A. III.1.-III.5. fejezetekhez

1. Alexander S. K., Schropp S. J., Schwarz J. R. (1982), Spatial and seasonal distribution of hydrocarbon-utilizing bacteria of sediment from the northwestern Gulf of Mexico, *Contrib. Mar. Sci.* 25: 13-19
2. Anton A., Dura Gy., Gruiz K., Horváth A., Kádár I., Kiss E., Nagy G., Simon L., Szabó P. (1999), *Talajszennyeződés, talajtisztítás*, Budapest, Környezetgazdálk.. Intézet
3. Atlas R. M. (1981), Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective, *Microbiol. Rev.* 45: 180-209
4. Atlas R. M. (1984), *Petroleum Microbiology*, New York:Macmillan.
5. Atlas R. M., Bartha R. (1992), Hydrocarbon biodegradation and oil-spill bioremediation. *Adv. in Microbial Ecology*, vol. 12 Plenum Press, New York p: 287-338
6. Bartha R. (1986), Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation, *Microbiol. Ecol.* 12: 155-172
7. Bossert I., Bartha R. (1984), The fate of petroleum in soil ecosystems. *Petroleum Microbiology*, Macmillan Inc., New York, p: 435-473
8. Brown R. A., Norris R. D. (1994), The Evolution of a Technology: Hydrogen Peroxide in In Situ Bioremediation, *Hydrocarbon Bioremediation* p: 148-163
9. Colwell R. E., Walker J. D. (1977), Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment, *Crit. Rev. Microbiol.* 5: 423-445
10. Klug M. J., Markovetz K. (1971), Utilization of aliphatic hydrocarbons by microorganisms, *Adv. Microbial Physiol* 5: 1-39
11. Leahy J. G., Colwell R. R. (1990), Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment, *Microb. Rev.*, p.305-315

12. Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. (2003), Brock Biology of Microorganisms, Pearson Education Inc.
13. Margesin R., Schinner F. (1999), Biodegradation of diesel oil by cold-adapted microorganisms in presence of sodium-dodecyl-sulfate, Chemosphere, 38(15):3463-3472
14. Margesin R., Schinner F. (2001), Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area, Appl. and Env. Microbiol. 67: 3127-3133
15. Rehm H.-J., Reed G., Pühler A., Stadler P. (2000), Biotechnology, Vol. 11b Environmental Processes II, WILEY-VCH Verlag GmbH
16. Sarkhoh N. A., Ghannoum M. A., Ibrahim A. S., Stretton R. J., Radwan S. S. (1990), Crude oil and hydrocarbon degrading strains of *Rhodococcus*: *Rhodococcus* strains isolated from soil and marine environments in Kuwait, Environ. Pollut 65: 1-18
17. Singer, M. E., Finnerty W. R. (1984), Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes petroleum, Petroleum microbiology, Macmillan Inc., p: 1-59
18. van Beilen J. B., Li Z., Duetz W. A., Smits T. H. M., Witholt B. (2003), Diversity of Alkane Hydroxylase Systems in the Environment, Oil & Gas Science and Technology, vol.58, 4:427-440
19. Van Hamme J. D., Singh A., Ward O. P. (2003), Recent Advances in Petroleum Microbiology, Microb. and Mol. Biol. Reviews, p.503-549

Internet adatbázisból származó szakirodalom:

20. UM-BBD: Metapathway Map: <http://umbbd.ahc.umn.edu/index.html>
21. Gruiz Katalin, Szennyezett talajok remediálása: www.kornyezetunk.hu/belso/t31.html
22. Gruiz Katalin, Vegyi anyagok környezeti kockázata: <http://simba.ara.bme.hu/oktatas/letolt/gruizk3.doc>
23. Kádár Imre, A környezetszennyezés forrásai és következményei: www.kornyezetunk.hu/belso/s2.html

B. III.6. fejezet

1. Duarte, G.F., A.S. Rosado, L. Seldin, W. de Araujo, J.D. van Elsas 2001. Analysis of bacterial community structure in sulfurous-oil-containing soils and detection of species carrying dibenzothiophene desulfurization (*dsz*) genes. Appl. Environ. Microbiol. 67: 1052-1062
2. Gray, K.A., G.T. Mrachko, C.H. Squires 2003. Biodesulfurization of fossil fuel. Curr. Op. Microbiol. 6: 229-235
3. Kilbane II, J.J., K. Jackowski 1992. Biodesulfurization of water-soluble coal-derived material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. Biotechn. Bioeng. 40: 1107-1114
4. McFarland, B. 1999. Biodesulfurization. Curr. Op. Microbiol. 2:257-264
5. Monticello, D.J. 2000. Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. Curr. Op. Biotechnol. 11:540-546
6. Oldfield, C., O. Pogrebinsky, J. Simmonds, E.S. Olson, C.F. Kulpa 1997. Elucidation of the metabolic pathway for dibenzothiophene desulfurization by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 (ATCC53968). Microbiology 143: 2961-2973

C. III.7. fejezet

1. In Seon Kim, Julia M. Foght, Murray R. Gray 2002., Selective transport and accumulation of alkanes by *Rhodococcus erythropolis* S+14He, Biotechnology and Bioengineering Vol.80, No.6,
2. Jitendra D. Daesai, Ibrahim M. Banat 1997., Microbial production of surfactants and their commercial potential, Microbiology and Molecular Biology Reviews Mar. 47-64
3. Christofi N., I.B.Ivshina 2002., Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation, Journal of Applied Microbiology, 93: 915-929
4. Neu Thomas R. 1996., Significance of Bacterial Surface-Active Compounds in Interaction of Bacteria with Interfaces, Microbiological Reviews, Mar., p. 151-166
5. N. Mulligan Catherine 2005, Environmental applications for biosurfactants, Environmental Pollution 133 183-198

6. Philp J. C., M. S. Kuyukina, I. B. Ivshina, S. A. Dunbar, N. Christofi, S. Lang, V. Wray 2002., Alkanotrophic *Rhodococcus ruber* as a biosurfactant producer, Appl Microbiol Biotechnol, 59: 318-324
7. Sokolovska Ivana, Raoul Rozenberg, Christophe Riez, Paul G. Rouxhet, Spiros N. Agathos and Pierre Wattiau 2003., Carbon source-induced modifications in the mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis* E1, Appl. Environ. Microbiol., Dec., p. 7019-7027
8. Szántó Ferenc 1986, A kolloidkémia alapjai
9. Wilkinson S., S. Nicklin and J.L. Faulk 2002, Biodegradation of fuel oils and lubricants: Soil and water bioremediation options, Biotransformations: Bioremediation Technology for Health and Environmental Protection, Elsevier Science, p. 69-100
10. Wouter H. Noordman and Dick B. Janssen 2002., Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds, Applied and Environmental Microbiology, Sept. p. 4502-4508
11. Z. Ron Elora, Eugene Rosenberg, Biosurfactants and oil bioremediation, Environmental Biotechnology

IV. Polimerek

Dr. Perei Katalin

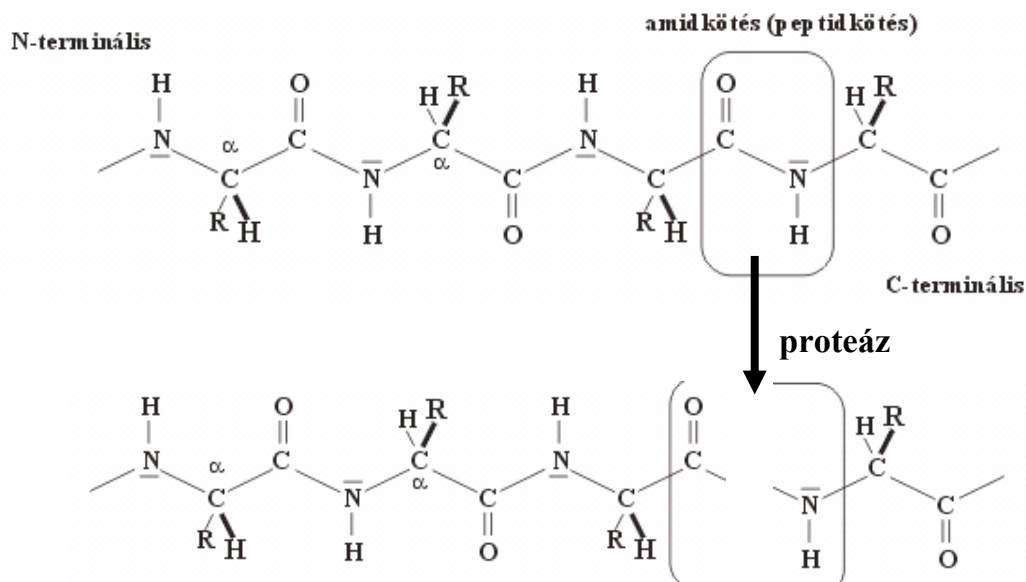
Tartalomjegyzék

IV. Polimerek	183
IV.1. Fehérjék biodegradációja	184
IV.1.1. Keratin	185
IV.1.2. Proteázok	186
IV.1.3. Keratin bontás	187
IV.1.4. Irodalomjegyzék	189
IV.2. Szénhidrát polimerek	191
IV.2.1. Lignocellulóz mikrobiális bontása	191
IV.2.1.1. A lignocellulóz	191
IV.2.1.1.1. Lignin	192
IV.2.1.1.2. Hemicellulózok	193
IV.2.1.1.3. A cellulóz	194
IV.2.1.2. Bakteriális és gomba cellulolitikus enzimek	195
IV.2.1.2.1. Clostridiumok cellulóz bontása	196
IV.2.1.2.2. Celluloszóma	196
IV.2.1.2.3. A Trichoderma reesei nem-komplex celluláz rendszere	197
IV.2.1.2.4. Phanerochaete chrysosporium lignocellulóz bontó komplexe	198
IV.2.1.2.5. Cellulomonas és Thermobifida fajok cellulóz bontása	199
IV.2.1.3. A cellulolitikus mikrobák fiziológiája	199
IV.2.1.4. Hasznosítás	201
IV.2.1.4.1. Etanol előállítása lignocellulózból – bioetanol	202
IV.2.2. A keményítő biodegradációja, hasznosítása	206
IV.2.2.1. Ipari alkalmazás	207
IV.2.3. Egyéb cukorpolimerek	208
IV.2.3.1. Ciklodextrinek	208
IV.2.3.2. Dextránok	209
IV.2.3.3. Glikolipidek (lipopoliszaharidok), glikoproteinek	209
IV.2.4. Irodalomjegyzék	209
IV.3. Zsírok, olajok, szappanok	211
IV.3.1. Zsírok	211
IV.3.2. Éterek és észterek	213
IV.3.3. Zsírok biodegradációja	213
IV.3.4. Irodalom jegyzék	216

IV.1. Fehérjék biodegradációja

Bevezető

A természetben leggyakrabban szintetikus anyagok felhalmozódását tapasztalhatjuk, azonban az élelmiszeripar számottevő fejlődése következtében felszaporodtak a fehérje, zsír, szénhidrát alapú hulladékok is. Ezen melléktermékek nem toxikusak, azonban szervesanyagtartalmuk igen nagy, így veszélyes hulladéknak minősülnek. A fehérjék megjelenése a hulladékokban hosszútávú problémát általában nem jelent, hiszen minden mikroorganizmus rendelkezik fehérje bontó enzimekkel, a különbség csak a hatékonyságban van. Azonban mégis foglalkoznunk kell bizonyos fehérjék – a vízben nem oldódó fehérje polimerek eltávolításával. Elsősorban a hús-, és baromfi feldolgozó üzemek keratin alapú hulladékának megsemmisítése jelenti a világ számára az egyik legnagyobb gondot. Óriási mennyiségben keletkezik naponta, tehát elhelyezésük, megsemmisítésük komoly fejtörést okozott. Bár elhidrolizálható, ez a kémiai művelet költséges, és pazarló, hiszen aminosav alapú szervesanyagot herdál el a technológia, így igen fontossá válik mikrobiális lebontásuk oligopeptidekre, aminosavakra (IV.1. ábra), melyeket azután fel lehet használni számos célra.

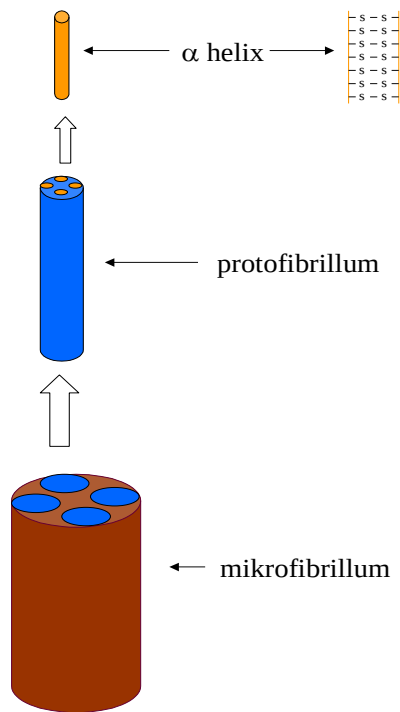


IV.1. ábra

Fehérje szerkezet. A proteázok a peptid kötések hidrolízisét katalizálják, mely következtében a polimer lánc hasad

IV.1.1. Keratin

A keratin vízben oldhatatlan fehérje (IV.2. ábra), mely igen ellenálló a proteolitikus aktivitással rendelkező enzimekkel szemben. Három fő csoportba sorolható fehérje [Lynch és mtsai 1986] építi fel: 1. glicin/tirozin gazdag fehérjék (6-9K) 2. alacsony kéntartalmú fehérjék (40-60K), melyek ~10nm-es filamentumokat alkotnak 3. magas kéntartalmú fehérjék (10-25K). Az 1. és 3. csoportba tartozó fehérjék a filamentumok közötti anyagot képezik. A filamentumok között kénhidak és másodlagos hidrogén kötések alakulnak ki, melyek nagy számuk miatt megnehezítik a keratin mikrobiális lebontását. Habár keratin felhalmozódás a természetben eddig nem volt tapasztalható, lebomlása igen lassú folyamat. Több módszer is lehetséges ezen diszulfid hidak felhasítására. Ezek közül említhetjük a kémiai kezeléseket. Az egyik legdrasztikusabb módszer a NaOH-val való hidrolízis. Ez tulajdonképpen azt jelenti, hogy a keratin fehérjét aminosavaira bontjuk. A keletkezett hidrolizátumot tápanyagként alkalmazzuk a baktériumok számára. A hidrolízist magas hőmérsékleten (forralva) kell elvégezni. Egyéb kémiai módszerek is léteznek pl.: thioglikolsav, dithiothreitol vagy dimetilszulfoxid redukálószerrel történő előkezelések [Onifade és mtsai 1998], azonban az itt alkalmazott vegyszerek környezetet károsító, veszélyes anyagoknak minősülnek, ezért ezek a módszerek sem jelentenek számunkra megfelelő megoldást. További lehetséges megoldás a hőkezelés. Magas hőmérsékleten, nyomás alatt a keratinban lévő kénhidak jelentős része elbomlik, közben káros melléktermék nem keletkezik. Hőkezelést követően a fehérje elveszíti stabil szerkezetét, így a mikrobák által termelt proteázok számára hozzáférhetővé válik.



IV.2. ábra
Az α-keratin szerkezeti felépítése

IV.1.2. Proteázok

A természetben mindenhol találkozhatunk proteázokkal, azaz fehérje bontó enzimekkel, hiszen szerepük létfontosságú minden élő szervezet számára.

Növényi proteázok: papain (pl. Carica papaya), bromelain (pl. ananász), keratinázok

Állati proteázok: tripszin (bélcsatorna), kimotripszin (pankreász), pepszin (gyomor), renin (fiatal állatok gyomrában)

Mikrobiális proteázok: baktériumokban pl. szubtilizin, thermolizin elasztáz; gombákban pl. karboxipeptidázok, metallokarboxipeptidáz, pepszin-, rennin-szerű enzimek, klostripain, sztreptopain, kollagenáz; vírusokban találunk szerin-, aszparagin-, cisztein endopeptidázokat, de metalloproteázokat nem [Beynon 1989].

Azon proteázokat, melyek a sejten kívül fejtik ki aktivitásukat extracelluláris proteázoknak, amelyek a sejten belül intracelluláris proteázoknak nevezzük. A proteázokat hasítóhely szerint csoportosíthatjuk, mint endo- ill. exoproteázok, azaz a fehérje polimert a láncon belül bárhol hasítja, vagy csak a szélén található egy-, vagy néhány aminosavat hasítja le. Ha az exoproteázok az N-terminálisról hasítanak le aminosavakat, akkor aminopeptidázoknak, ha a C-terminálisról hasítanak, akkor karboxipeptidázoknak hívjuk őket. Az endopeptidázokat az aktív centrumban található aminosavak szerint csoportosítjuk: szerin proteázok, aszpartát proteázok, cisztein/tiol proteázok, és metalloproteázok, melyek divalens kationokat igényelnek aktivitásuk kifejtéséhez.

Aktivitásuk optimális körülményeit figyelembe véve csoportosíthatjuk őket pH optimumuk alapján is: savas-, semleges-, bázikus proteázok.

A proteázok felhasználása sokrétű, óriási szerepük van az iparban [Onifade 1998]. Közismert a szubtilizin felhasználása a mosószeriparban, mint Calsberg enzim vált a kereskedelemben ismertté. A rennin- és tripszin szerű proteázokat az élelmiszer-, illetve a gyógyszeripar hasznosítja. Semleges proteázokat használnak elsősorban a bőriparban, de az élelmiszeriparban is fellelhetők [Rao 1998].

IV.1.3. Keratin bontás

A keratin tartalmú szennyeződések eltávolítására csak az extracelluláris proteázok jöhetnek szóba.

A tudomány számára jelenleg számos extracelluláris proteázt termelő mikroorganizmus ismert. Felhasználásuk számos előnnyel jár, ezek közül említhetjük olcsóságukat, működésük nagy hatékonyságát, valamint legfőképpen azt, hogy nem szennyezik a környezetet. Bioremediációs eljárásokban a baktériumok közül leggyakrabban valamely *Bacillus* törzset alkalmaznak, mivel a legtöbb *Bacillus* törzs számos extracelluláris proteázt termel [Takami és Horikoshi 2000]. Ezek közül említhetjük például a *Bacillus halodurans*, *Bacillus pseudofirmus*, *Bacillus clausii*. Számos, közelebből meg nem határozott *Bacillus* sp. szintén termel proteázokat.

Az irodalomban leírtak keratin bontására képes enzimeket termelő mikroorganizmusokat, azonban többségük keratinbontó képessége kicsi (egy

gombák), vagy összetett táptalaj szükséges a fenntartásukhoz (*Streptomyces*), esetleg humán patogének (dermatofita gombák), így felhasználhatóságuk korlátozott. Baktérium, illetve gomba törzsek is képesek olyan proteolitikus enzimek termelésére, melyek keratinolitikus aktivitással rendelkeznek. Az egyik ilyen baktérium törzs a *Streptomyces fradiae* [Noval és mtsai 1959; Kitadokoro és mtsai 1993; Böckle és mtsai 1995]. A baktérium egy 19 kDa molekulatömegű monomer extracelluláris proteázt termel, mely keratináz aktivitással rendelkezik [Kitadokoro és mtsai 1994]. A gomba törzsek közül említhető az *Aspergillus fumigatus* [Santos és mtsai 1996]. Ezen gomba törzsből egy 48 kDa nagyságú, szintén monomer keratinázt tisztítottak ki. Mivel a keratinázok fontos szerepet játszanak a bőr gombás fertőzésében a dermatophytákból származó keratinázokat igen sokat vizsgálták. Ilyen gomba törzs a *Trichophyton sp.* [Yu és mtsai 1968; Tsuboi és mtsai 1989]. A *Microsporum sp.* [Page és Stock 1974] szintén patogén gomba. Ezen mikroorganizmusból izolált keratináz 33 kDa tömegű. A fehérje rendelkezik exokeratináz és endokeratináz aktivitással is. A nem patogén gombák által termelt keratinázokról eddig egy tanulmány ismert [Gradisar és mtsai 2000]. A *Doratomyces microsporus* extracelluláris keratináz aktivitása összevethető az ismert dermatofita és egyéb toxintermelő gombák keratinolitikus aktivitásával. Előnye, hogy nem patogén, toxint nem termel.

Magyarországon debreceni és szegedi kutatólaboratóriumok munkatársai szintén vizsgálták egyes mikrobák keratináz enzimeinek hatékonyságát. A szegedi labor 2000-ben szabadalmat nyújtott be [Perei és mtsai 2000], mivel *Bacillus* törzsük keratináza rendkívül jó hatékonysággal bontotta nemcsak a toll, de a szőr eredetű keratinszálakat is. Azóta ez a technológia tovább fejlődött, ma már a keletkező biomasszát energiatermelő rendszerek szervesalapanyagaként hasznosítják.

Kollagén, elasztán bontását kollagenáz (*Clostridium hystolyticum* termeli), elasztáz (pl. *Pseudomonas aeruginosa* termeli) enzimekkel végezhetjük [Rao és mtsai 1998].

IV.1.4. Irodalomjegyzék

1. Beynon R.J., Bond J.S. (1989). Proteolytic enzymes a practical approach. *Oxford University Press, Oxford OX2 6DP*
2. Bockle, B., Galunsky, B. & Muller, R. (1995). Characterization of a keratinolytic serine protease from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 3705-3710
3. Gradisar H., S. Kern, J. Friedrich (2000). Keratinase of *Doratomyces microsporus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**: 196-200
4. Kitadokoro K., Tsuzuki H., Nakamura E., Sato T., Teraoka H. (1994). Purification, characterization, primary structure, crystallization and preliminary crystallographic study of a serine proteinase from *Streptomyces fradiae* ATCC 14544. *Eur. J. Biochem*, **220**: 55-61
5. Kitadokoro K., E. Nakamura, M. Tamaki, T. Horii, H. Okamoto, M. Shin, T. Sato, T. Fujiwara, H. Tsuzuki, N. Yoshida, H. Teraoka (1993). Purification, characterization and molecular cloning of an acidic amino acid-specific proteinase from *Streptomyces fradiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1163**: 149-157
6. Kobayashi T., Y. Hakamada, J. Hitomi, K. Koike, S. Ito (1996). Purification of alkaline proteases from a *Bacillus* strain and their possible interrelationship. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**: 63-71
7. Lynch M.H., O'Guin W.M., Hardy C., Mak L., Sun T. (1986). Acidic and basic hair/nail („hard”) keratins: Their colocalization in upper cortical and cuticle cells of the human hair follicle and their relationship to „soft” keratins. *The Journal of Cell Biology*, 2593-2606
8. Noval J.J., W.J. Nickerson (1959). Decomposition of native keratin by *Streptomyces fradiae*. *J. Bact.*, **77**: 251-263
9. Onifade A.A., N.A. Al-Sane, A.A. Al-Musallam and S. Al Zarban (1998). A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degradating microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technology*, **66**: 1-11
10. Page W.J., J.J. Stock (1974). Phosphate-mediated alteration of *the Microsporum gypseum* germination protease specificity for substrate: Enhanced keratinase activity. *Journal of Bacteriology*, 422-431
11. Perei K., Kovács L.K., Bagi Z., Takács J. Mikrobiológiai keratinbontó eljárás, az eljárással előállított biomassza, valamint keratinbontó baktérium és extracelluláris proteáz. Magyar Szabadalmi Hivatalhoz 2000. december 7-én benyújtott szabadalmi leírás, szabadalmi ügyszám: P0004865

12. Rao M.B., A.M. Tanksale, M.S. Ghatge, V.V. Deshpande (1998) Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* Vol. 62: 597-635
13. Santos RMDB, Firmino AAP, de Sá CM, Felix CR (1996) Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Curr Microbiol* **33**: 364-370
14. Takami H., K. Horikoshi (2000). Analysis of the genome of an alkaliphilic *Bacillus* strain from an industrial point of view. *Extremophiles*, **4**: 99-108
15. Tsuboi R., Ko I.J., Takamori K., Ogawa H. (1989). Isolation of a keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH. *Infect Immun*, **57**: 3479-3483
16. Yu R.J., S.R. Harmon, F. Blank (1968). Isolation and purification of an extracellular keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. *Journal of Bacteriology*, 1435-1436

IV.2. Szénhidrát polimerek

IV.2.1. Lignocellulóz mikrobiális bontása

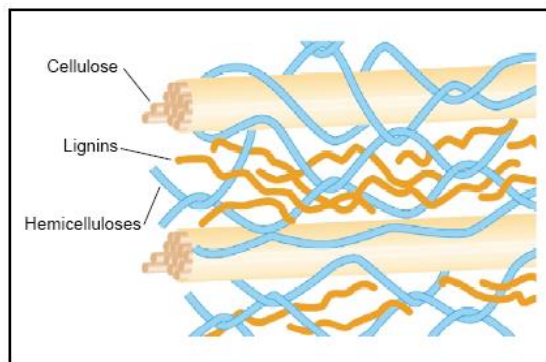
Bevezető

A kommunális hulladék, különösen a zöld hulladék szervesanyag tartalma igen magas, ezért kiváló alapanyag komposzt előállításához. Hátránya, hogy olyan cukor polimerek alkotják – cellulóz, hemicellulóz - melyek természetes lebontása nagyon lassú. A természetben számos olyan mikroorganizmust találunk, melyek képesek enzimszereik segítségével e stabil polimer szerkezeteket megbontani, és a felszabaduló oligo-, di-, vagy monoszaharidokat szénforrásként hasznosítani. A nagy mennyiségben felszabaduló cukor molekulák nagyon sok mikroorganizmus számára jelentenek könnyen felvehető szénforrást. Zöld hulladék esetében a C/N arány nem megfelelő az optimális lebontáshoz, ezért gyakran nitrogén forrást kell biztosítani a folyamatokhoz. Ez lehetséges egyéb, pl. élelmiszeripari hulladék hozzákeverésével, melynek általában magas a fehérje tartalma.

Irodalmi adatok bizonyítják, hogy aerob és anaerob mikroszervezetek képesek extracelluláris enzimeikkel cellulózt, és hemicellulózokat bontani [Lynd és mtsai 2002]. A lignin bontása nehezebb feladat, nem ismerünk olyan mikroorganizmust, mely egyedüli szénforrásként hasznosítaná. Azonban ismerünk egy-két gomba fajt, mely peroxidáz enzime segítségével, egyéb szénforrás jelenlétében megtámadja a lignin bonyolult szerkezetét.

IV.2.1.1. A lignocellulóz

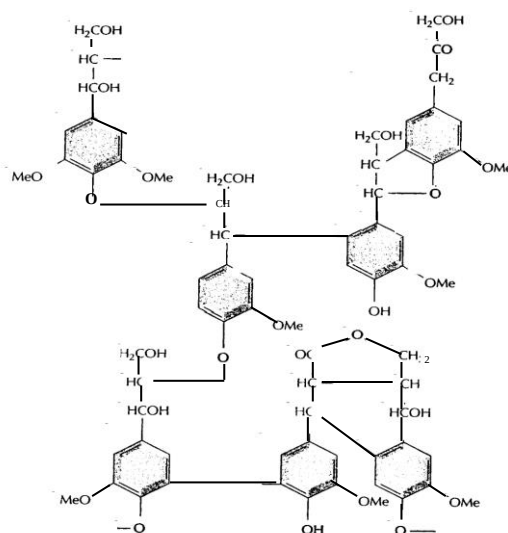
A lignin, hemicellulóz, cellulóz polimerek különböző kombinációja a lignocellulóz (IV.3. ábra), mely a növények szerkezeti felépítésében alapvető fontosságú. A lignocellulóz, mint hulladék jelenhet meg a növények feldolgozása során.



IV.3. ábra
Lignocellulóz szerkezet

IV.2.1.1.1. Lignin

Három dimenziós, globuláris, szabálytalan, nem oldható, nagy molekulású polimer, melyben fenilpropán alegységek- különböző kémiai kötésekkel kapcsolódnak össze (IV.4. ábra). A lignin összeköti és így merevvé teszi a cellulóz rostokat, kémiai kötésekkel kapcsolódik a hemicellulózhoz is, és a cellulóz szálakat beburkolja ezért a feltárás alkalmával el kell távolítani. Felelős a növény rigiditásáért, a mechanikai behatásokkal és mikroorganizmus támadásokkal szembeni ellenállóképességért.

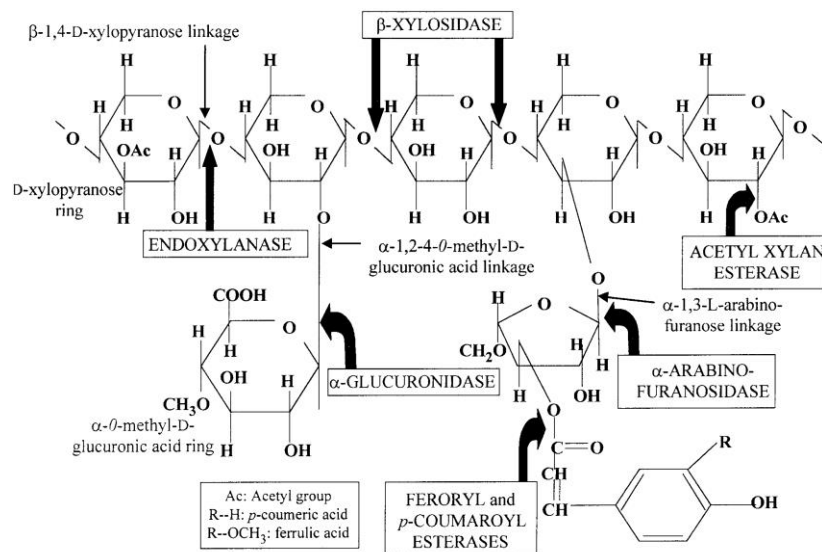


IV.4. ábra
Lignin szerkezet részlete

IV.2.1.1.2. Hemicellulózok

Rövid láncú, többnyire elágazó heterogén polimerek - hexózokat (pl. glükóz, mannóz, galaktóz), pentózokat (xilóz, arabinóz) tartalmazznak. Három fő csoportjuk: xilánok, mannánok, arabinogalaktánok.

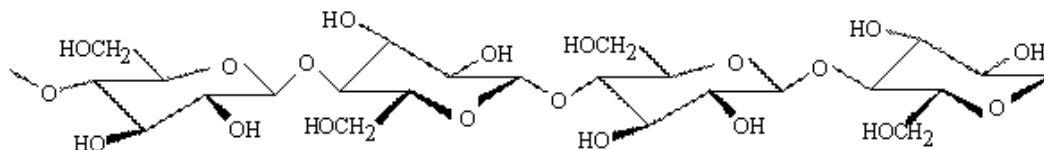
A xilán (IV.5. ábra) az egyik leggyakoribb poliszacharid a természetben, a növények hemicellulózának fő alkotója. A xilán a lignin és a cellulóz szálak között húzódik, az előzőhöz kovalens, míg az utóbbihoz hidrogén kötésekkel kapcsolódik. Ez a komplex struktúra megvédi a növényeket az enzimatis támadásoktól. Ez a védelem szükségessé tette, hogy a papíripar speciális, nagy hatékonyságú enzimpreparátumokat használjon a hulladékpapír újrahasznosításában, valamint a szalma alapanyagok előkezelésében. Az elmúlt években számos elegyet dolgoztak ki különböző kutató-fejlesztő laboratóriumokban, azonban tiszta xilanáz enzimpreparátumot még ma is nehéz előállítani. A kevert enzimsziszterek hátránya, hogy pl. cellulázt is tartalmazznak, mely kifejezetten hátrányos lehet a jó minőségű papír előállításában.



IV.5. ábra
Reprezentatív xilán szerkezet a hasító enzimekkel

IV.2.1.1.3. A cellulóz

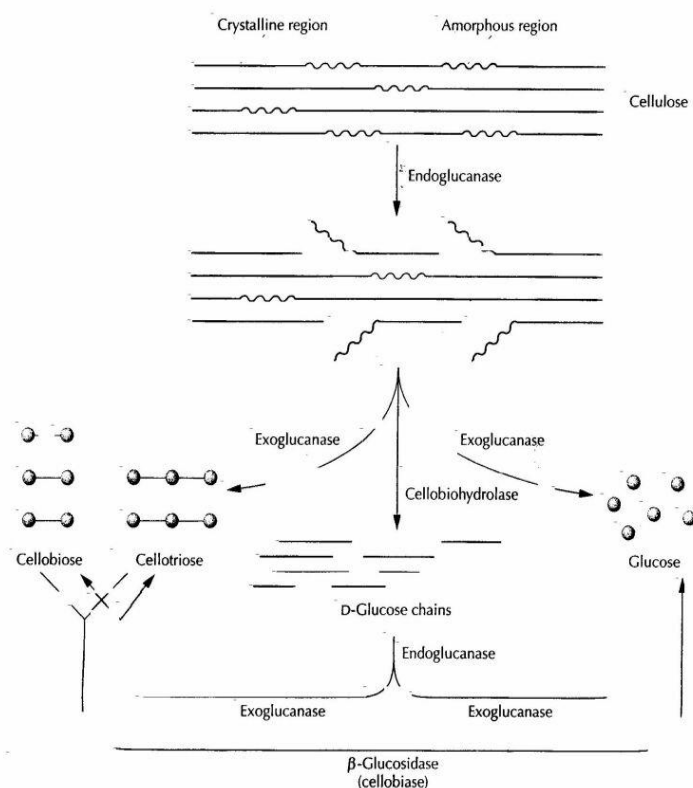
A papírgyártás legfontosabb nyersanyagának, a természetes növényi rostoknak meghatározó összetevője a cellulóz. A cellulóz Földünkön a legnagyobb mennyiségben előforduló szénvegyület, a növények szárazsúlyának mintegy 35-50%-át teszik ki. Anselme Payen (1837) a cellulóz felfedezője.



IV.6. ábra
Cellulóz polimer szerkezete

A cellulóz láncalakú polimer, amely mindig különböző számú β -D-glükóz molekula összekapcsolódásával jön létre (IV.6. ábra). A glükóz molekulák 1-es és 4-es szénatomjai glikozidkötéssel fűződnek egymáshoz, a 3-as szénatom hidroxil csoportjának hidrogén atomja a szomszédos glükóz gyűrűt alkotó oxigénjével hidrogén-híd kötést létesít. Az intramolekuláris hidrogén-hidak mellett intermolekuláris H-hidak is kialakulnak, ennek segítségével alakul ki a rostszerű szerkezet, mely a növények számára nagyon fontos vázanyagot ad.

Eredetétől függően az átlagos polimerizációs foka 3000 és 8000 között van. A papírba kerülő cellulóz a feldolgozás közben hidrolizál így az átlagos polimerizációs fok 600 és 1000 közöttire csökken. A hidrolízis savas közegben (pl. 40%-os sósavban) egészen a monoszacharidig folytatódhat. A cellulázok hasonló hidrolízist eredményeznek (IV.7. ábra). Cellulóz biológiai bontásra a molekula nagy stabilitása ellenére számos példát ismerünk. A celluláz enzimek csírázó magvakban, gombákban, baktériumokban és a kérődző állatok emésztőrendszerében megtalálhatóak.



IV.7. ábra
A cellulóz és hasító enzimeik

IV.2.1.2. Bakteriális és gomba cellulolitikus enzimek

A cellulózbontó képesség széles körben elterjedt a Baktériumok és Eukarióta gombák körében [Lynd 2002]. Az *Actinomyceták* aerob, a *Clostridiumok* anaerob körülmények között tudják a cellulóz szálat hasítani.

A gombák között a legegyszerűbb *Chyridomycetáktól* a fejlettebb *Basidiomycetáktig* találunk cellulolitikus aktivitással rendelkező fajokat. A *Chyridomyceták* képviselői az állatok emésztőrendszerében, anaerob körülmények között bontják a cellulózt [Carlile 1997]. Aerob gombák, pl. a *Zygomyceták* között csak egyes *Mucor* gombák bontják többé-kevésbé a cukor polimert, míg más aerob családok tagjai nagy számban rendelkeznek cellulolitikus aktivitással: pl. *Ascomyceták*: *Bulgaria*, *Chaetomium*, *Helotium*; *Basidiomyceták*: *Phanerochaete*, *Poria*, *Schizophyllum*, *Serpula*; *Deuteromyceták*: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Trichoderma*.

A cellulolitikus baktériumok között többféle fiziológiás csoportot tudunk megkülönböztetni: 1. fermentatív anaerob, tipikusan Gram pozitív: *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Caldicellulosiruptor*, bár ide tartozik néhány Gram negatív faj is, melyek filogenetikailag a *Clostridiumokhoz* állnak közel: *Butyrivibrio*, *Acetivibrio*. 2. aerob Gram pozitív baktériumok: *Cellulomonas*, *Thermobifida*. 3. aerob *Cytophaga*, *Sporocytophaga*.

Kevés kivétellel az anaerob baktériumok jól tanulmányozott policelluloszóma organellumokba szerveződve, komplex celluláz rendszerrel bontják a cellulózt. A celluláz enzimek általában extracellulárisan jelennek meg, hiszen a polimer szálakhoz így tudnak könnyebben hozzáférni. A celluláz komplexek a sejtek felszínén ülnek, néha szabadon úsznak a periplazmatikus térben. A cellulóz anaerob fermentációjának végterméke etanol, szerves savak, CO₂, és H₂.

IV.2.1.2.1. *Clostridiumok* cellulóz bontása

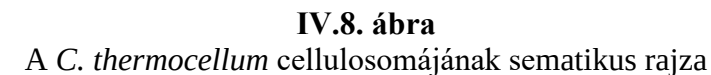
Az 1970-es években kialakult olajválság hatására fellendült a megújuló energiaforrásokkal kapcsolatos kutatás (pl. cellulózból etanol és más hasznos vegyület termelése). Ekkor kezdtek intenzíven foglalkozni a *Trichoderma* gombák cellulolitikus képességével. Felfedezték, hogy egyes fajoknál egyedi enzimek dolgoznak egymással szinergizmusban (aeroboknál általában igaz) pl.: *Trichoderma reesei*.

Más pl. termofil *Clostridiumok* (Gram pozitív, obligát anaerob bacik) pl.: *C. thermocellum*, *C. cellulolyticus* úgynevezett cellulóz kötő faktorokkal rendelkeznek (cellulose binding factor =CBF) [Demain 2005].

IV.2.1.2.2. Celluloszóma

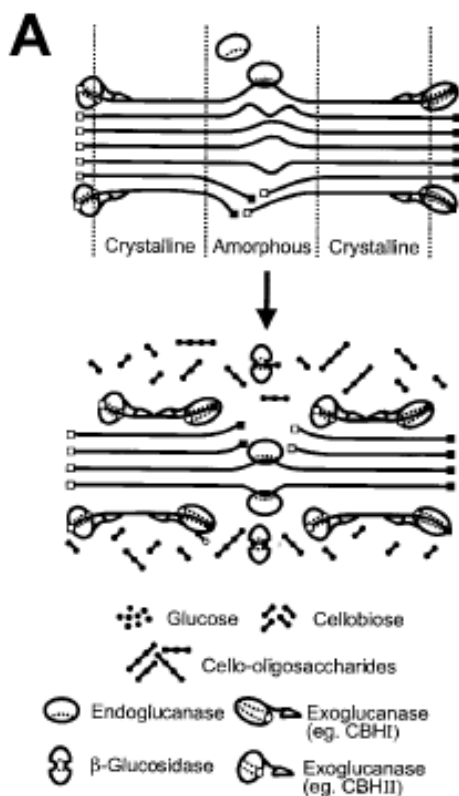
Sok van a sejt felszínén, valamint extracellulárisan, a táptalajban is, nagy molekulák (kb. 2000 kDa), nagy a celluláz-aktivitásuk, enzímösszetételük valószínűleg a szubsztráttól is függ. Megfigyelték, hogy extracellulárisan rakódnak össze, kialakul egy extracelluláris szupramolekuláris komplex (IV.8. ábra), ami hatékonyan bontja a cellulózt és más sejtalkomponenseket.

A kísérletek igazolták ezt, amikor összehasonlították a *C. thermocellum* (celluloszóma) a *Trichoderma reesei* (egyedi enzimek) celluláz bontó képességét, és a *C. thermocellum* hatékonyabbnak bizonyult.



Bár tény, hogy az eredmények egyértelműen a celluloszómákat mutatják hatékonyabbnak, ennek ellenére nagy szerepük van az egyedi cellulázoknak is. A *T. reesei* többféle cellulázt is termel, melyek más-más helyen támadják a cukorpolimert (IV.9. ábra).

197



IV.9. ábra

Az exoglukanáz, endoglukanáz és β -glükoszidáz enzimek cellulóz bontása

IV.2.1.2.4. *Phanerochaete chrysosporium* lignocellulóz bontó komplexe

Az egyik legjobban tanulmányozott gomba faj, melynek enzimsziszteme nemcsak lignocellulózok bontásában jelentős, de peroxidáz enzime segítségével számos toxikus szerves vegyület, pl. klórozott aromás vegyületek bontására is képes. E gombafaj nemcsak cellulázokat, de hemicellulázokat és lignin bontó enzimeket is termel [Covert 1992, Broda 1996, Copa-Patino 1993,], ezáltal központi szerepet vívott ki a növényi eredetű hulladékok kezelésében. A cellulóz és hemicellulóz bontása elsődleges metabolizmus, míg a lignin bontás másodlagos, szén-, nitrogén vagy kénhiány idézheti elő [Broda 1996]. A rendelkezik kétféle cellobiohidrolázzal, és szénhidrát kötő modult nem tartalmazó endoglukanázzal (ilyen enzimet a *T. reesei*-

nél is azonosítottak. Ezeken kívül termel egy celobióz dehidrogenáz enzimet is, mely O_2 jelenlétében a cellobiózt oxidálja cellobionolaktonná, mely a vízzel spontán reagálva cellobiosavvá alakul. E dehidrogenáz szerepe még nem teljesen tisztázott, valószínűleg segít a hidroxil gyökök képzésében, melyeknek a lignin és cellulóz depolimerizációban van szerepük [Henriksson 2000].

IV.2.1.2.5. Cellulomonas és Thermobifida fajok cellulóz bontása

A cellulolitikus aerob baktériumok között a *Cellulomonas*ok a legjobban tanulmányozott csoport. Corineform baktériumok, melyek legalább 6 endoglükánázzal és egy exoglükánázzal (Cex) rendelkeznek [Chaudhary 1997]. Az egyedi cellulázok hasonlítanak az aerob gombákban talált enzimekre, és tartalmaznak cellulózkötő doméneket.

A termofil *Thermobifida fusca* a fő cellulózbontó a talajban. Hat cellulázt, 3 endoglükánázt, 2 exoglükánázt, és egy szokatlan cellulázt - melynek mind endo-, mind exoglükánáz aktivitása is van - azonosítottak e fajban.

IV.2.1.3. A cellulolitikus mikrobák fiziológiája

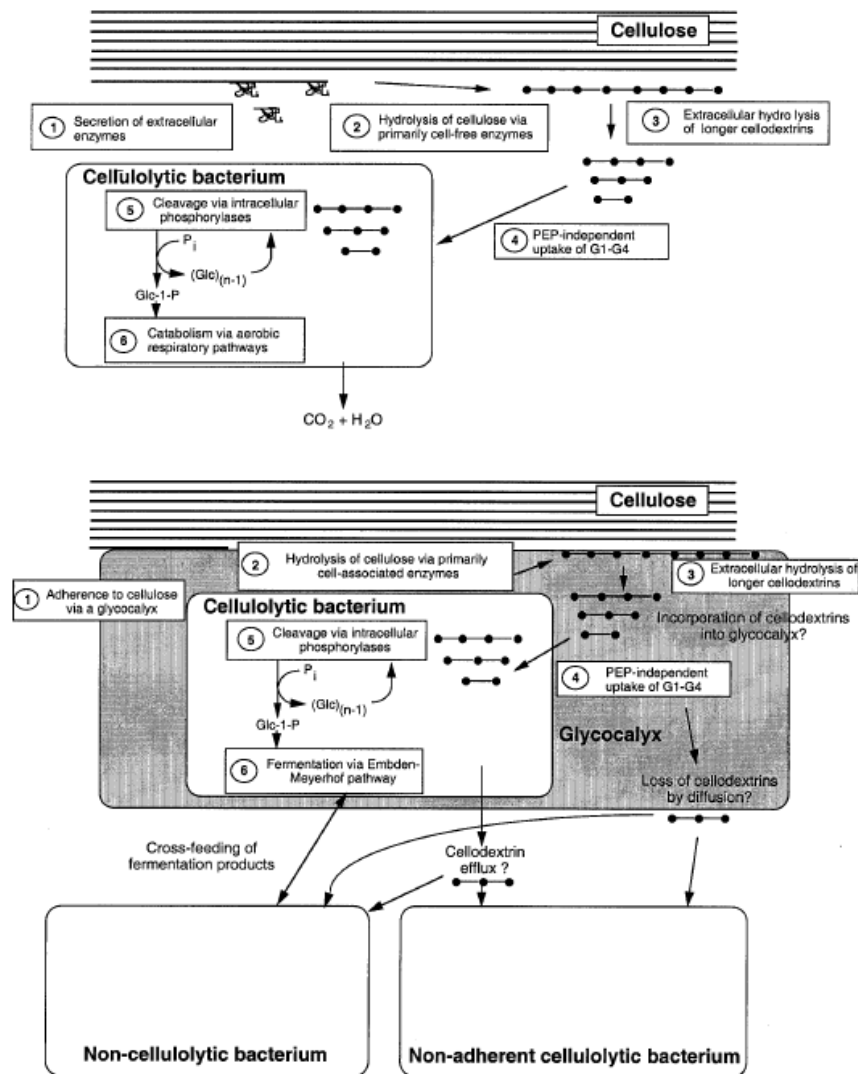
Általában a cukorbontó mikroorganizmusok nem hasznosítják szaporodásukhoz a fehérjéket, lipideket, illetve azok komponenseit, mint energia-, és szénforrások. A cellulolitikus mikrobák a cellulóz mellett egyéb szénhidrátokat is hasznosítanak [Poulsen 1988, Rajoka 1997], de vannak olyan anaerob fajok (*Fibrobacter*, *Ruminococcus*, *Clostridium*), melyek a cukroknak csak szűk spektrumát képesek felhasználni, pl. nem szaporodnak olyan mono-, oligo-, vagy poliszaharidon, melynek alapeleme más, mint glükóz [Ng 1982].

A szénforrás mellett egyéb tápanyagokra is szüksége van a sejteknek (mint sok más rendszerben is), pl. nitrogén, foszfor, kén, valamint makro- és mikroelemek, vitaminok.

A cellulóz katabolizmusán az enzimatis depolimerizációt, és a hidrolizátum celluláris felhasználását értjük. Két fő stratégia ismert a kristályos cellulóz hasznosítására: **1.** aerob baktériumok és gombák nem tapadnak a cellulóz szálra,

hanem szabad (nem komplexben lévő) cellulázokat termelnek, majd oxidálják a hidrolitikus terméket CO_2 -ra és vízre. 2. Az anaerob baktériumok és gombák általában a cellulóz szálhoz tapadnak, és főleg komplexbe vitt cellulázokat termelnek, és különböző fermentációs termékeket produkálnak a cellulózból.

A következő szemléltető ábrán (IV.10. ábra) bemutatjuk hogyan is zajlik a cellulóz lebontása sejtszinten aerob és anaerob rendszerekben:



IV.10. ábra

A cellulóz bontása és a hidrolizátum felhasználása cellulárisan aerob és anaerob mikroorganizmusokban. Az ábra felső részén az egyedi enzimekkel történő cellulóz bontást láthatjuk, az ábra alsó része a cellulózhoz tapadó sejtek cellulóz bontását mutatja be

Természetesen a cellulóz bontó folyamatot számos környezeti faktor befolyásolja, így a természetben korántsem olyan egyszerű és gyors a cellulóz bontás, ami arra ösztönzi a kutatókat, hogy a cellulóz bontó folyamatokat tovább vizsgálják, fejlesszék, hiszen a növényi hulladékok számos technológiában kitűnő szervesanyag alapot képezhetnek, ha a glükóz molekulákat hozzáférhetővé tesszük.

IV.2.1.4. Hasznosítás

Magyarországon egyedül Dunaújvárosban működik cellulózugyár, mely búzaszalmából állít elő szulfátos feltárással és hagyományos CEH eljárással fehérített szalmacellulózt. A gyár európai viszonylatban is egyedülálló, hiszen szalma alapanyag felhasználásával egyedül ez a gyár készíti cellulózt, a fennmaradása annak köszönhető, hogy az elhasznált feltáró vegyszerek regenerálása megoldott és így a környezetszennyezés minimális. A gyár a papíripari felhasználásra alkalmas cellulóz mellett közel 10 éve az élelmiszeripar számára is gyárt adalékanyagul szolgáló speciálisan fehérített szalmacellulózt.

A gyártás problémája a fehérítés során alkalmazott klór és klórvegyületek, hiszen a CEH (elemi klór + nátrium-hidroxid + nátrium-hipoklorit) fehérítési technológia során 1 tonna cellulóz fehérítéséhez kb. 100 kg klór szükséges. A felhasznált klór mintegy 10 %-a a szerves vegyületekkel szerves klórszármazékokat, többek között dioxinokat és furánokat képez. A képződött szerves klórvegyületek eltávolítása a fehérítés során keletkező szennyvízből költséges eljárás, így a fehérítői vizek újrahasznosítása nem megoldott. Másrészt a szerves klórvegyületek egy része a késztermékben marad, így az EU előírásokat és az élelmiszeripari követelményeket figyelembe véve, időszerű áttérni a TCF (Total Chlorine Free) fehérítésre.

A TCF fehérítés során a klórt helyettesítő oxigén vagy oxigént termelő vegyületek felhasználására több eljárás ismert, de az elérhető fehérség gyakran a kívánalmak alatt marad vagy a kívánt fehérség eléréséhez szükséges beruházási és gyártási költségeket a piac nem respektálja.

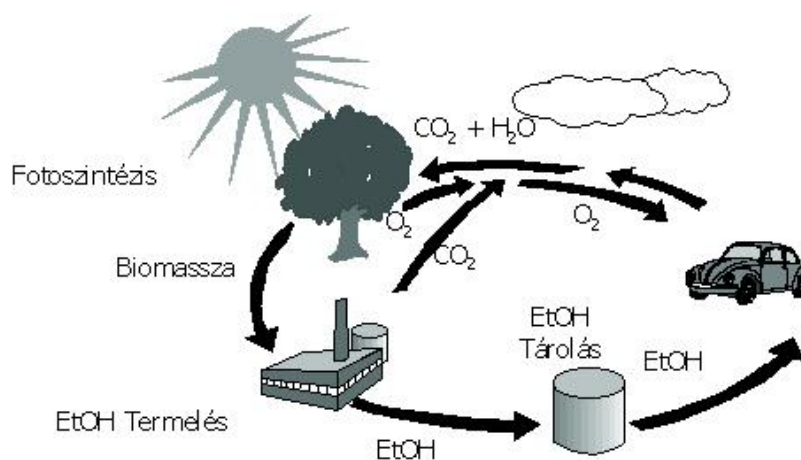
Az elmúlt években a cellulóz fehérítésében alternatív technológiaként került előtérbe a xilánbontó xilanáz enzimek alkalmazása.

IV.2.1.4.1. Etanol előállítása lignocellulózból – bioetanol

Az elmúlt évek politikai eseményei, és az a tény, hogy a fosszilis energiahordozókészletek kimerülőben vannak, arra ösztönzik az országokat, hogy alternatív megoldásokat találjanak energiaigényünk kielégítésére.

Több megoldás is formálódóban van, az egyik lehetőség a cellulóz alapú eljárások kifejlesztése, mely során bioetanol nyerhető. Cellulóz alapú biomassa hatalmas mennyiségben keletkezik, ezért adott a lehetőség, hogy ezt hasznos célokra fordítsuk. Bár alkoholt ipari méretekben cellulózból annak savas hidrolízisével az 1. és 2. világháborúban már állítottak elő, mely technológiát az 1940-es évek végén tovább fejlesztettek. Azonban a hidrolízis alacsony hozama és a savkatalízis okozta korróziós problémák miatt a technológia nem volt versenyképes a kőolaj alapú üzemanyaggyártással szemben. Az 1970-es években bekövetkezett olajválság idején újra előtérbe kerültek az alternatív üzemanyagok melyek előállítási költségei az időszak gazdasági viszonyai mellett vonzóvá váltak. Amikor a nyersolaj ára visszaállt, ismét csökkent a biomassa alapú etanol iránti érdeklődés.

A lignocellulózokból történő etanol gyártás során nem szükséges fosszilis üzemanyagokat felhasználni az energia szükséglet fedezésére, ez megoldható a lignin elégetésével, mely a gyártás mellékterméke. A bioetanol előállítása és felhasználása során keletkező széndioxid energianövények termesztése során ismét biomasszává alakul, melyek a gyártás újabb nyersanyagai lehetnek. Ennek eredményeként a bioetanol hozzájárulása az atmoszféra üvegházhatású gáz tartalmához elhanyagolható (IV.11. ábra).



IV.11. ábra
Biomasszából történő etanol gyártás környezetterhelése minimális

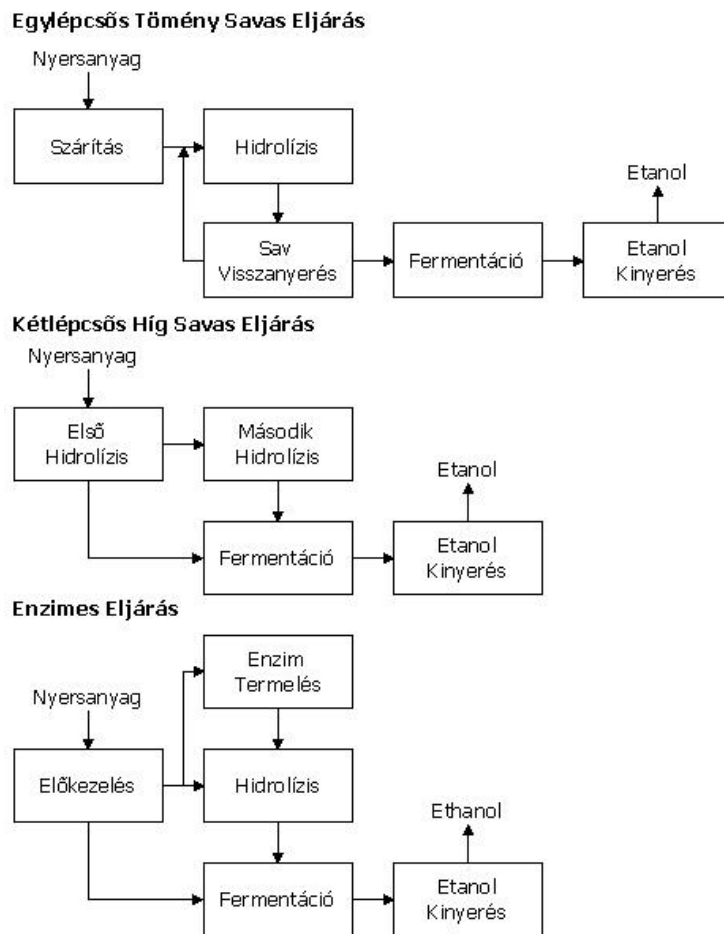
Lignocellulózból 3 féle eljárással is nyerhetünk glükózt (IV.12. ábra), melyből fermentációval, vagy kémiai módszerekkel etanol állítható elő.

1. Egylépcsős tömény savas hidrolízis, melynek során a biomassza cellulóz és hemicellulóz tartalmának lebomlása koncentrált sav pl. kénsav, sósav, hatására alacsony hőmérsékleten (<100°C), egy lépésben történik. Az eljárás hátránya, hogy a hemicellulóz frakció gyorsabban hidrolizálódik, mint a cellulóz, ezért a hemicellulózból származó monoszaccharidok a szükségesnél hosszabb ideig vannak kitéve a katalizátorként használt sav hatásának, aminek következtében a cukrokból különféle degradációs termékek keletkeznek, melyek anyagvesztést jelentenek. Hátránya még, hogy jó minőségű rozsdamentes acél berendezéseket igényel az eljárás, ami jelentősen megnöveli a beruházási költségeket, továbbá gazdasági és környezeti szempontból szükséges a felhasznált sav visszanyerése.

2. Kétlépcsős híg savas eljárás, melyben a cellulóz és a hemicellulóz frakciót külön-külön hidrolizálják. A hemicellulóz hidrolizátumot elválasztják az első hidrolízist követően. Ezzel a módszerrel mindkét frakció hidrolízise optimalizálható. Mivel a második lépcsőben jóval magasabb hőmérsékletet alkalmaznak (200°C körül),

jelentős mennyiségű cukor és lignin degradációs termék keletkezik, így még ez a módszer sem tökéletes az anyagmérleg szempontjából.

3. Enzimes hidrolízis, melynek első lépéseként a lignocellulóz biomasszát előkezelik, ezzel növelve a hozzáférhetőséget a cellulózbontó enzimek számára. Az előkezelés során a hemicellulóz hidrolízise hasonló módon történik, mint a kétlépcsős híg savas eljárásnál, így itt is melléktermékek képződése figyelhető meg. Az enzimes hidrolízis szintén egy kétlépcsős technika, de itt a cellulóz frakció hidrolízise nem sav, hanem celluláz enzimek hatására megy végbe. Mivel az enzimes hidrolízis körülményei jóval enyhébbek, kevesebb melléktermék szabadul fel, így nagyobb a fermentálható cukrok kihozatala. A cellulóz nagy arányú konverziójának eléréséhez nagy mennyiségű celluláz enzim adagolása szükséges, ez jelentősen megnöveli a költségeket. Ebből következően az enzim termelés a folyamat kritikus lépése. A gazdaságosság javításának legfontosabb tényezője a hatékony enzimtermelés, mely olcsó, a folyamatban rendelkezésre álló szénforrás felhasználásával valósítható meg.



IV.12. ábra
Lignocellulóz biomasszából etanol előállítása 3 féle módszerrel

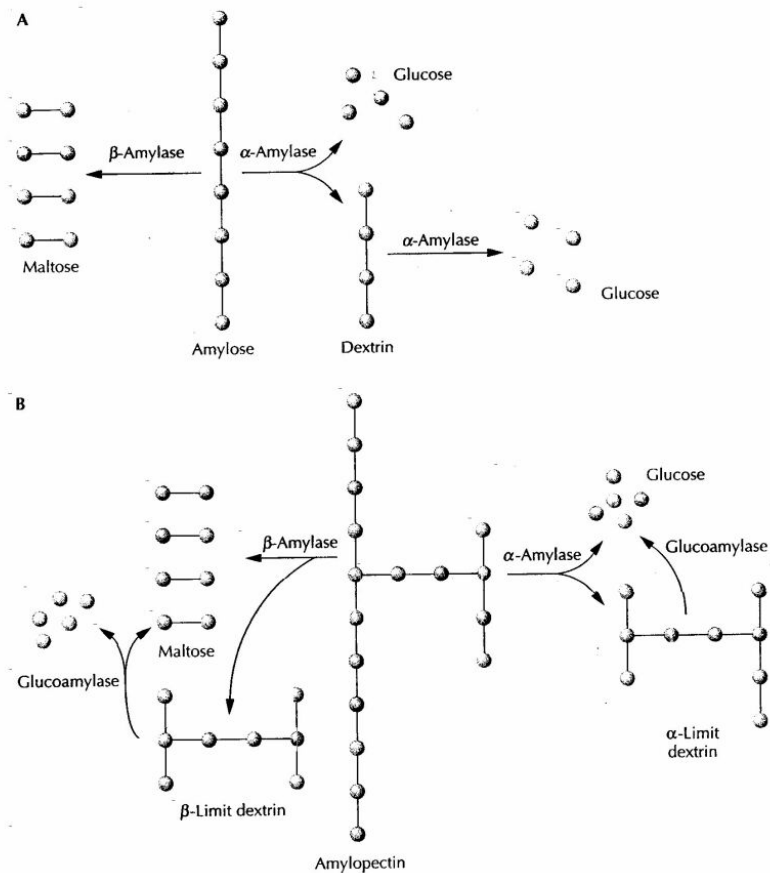
Az elmúlt évtizedben egyre intenzívebben vizsgálták a cellulóz enzimes konverzióján alapuló technológiák lehetőségét. a folyamat többlépcsős: a nyersanyag előkezelése, mely magában foglalja a faapríték méretének csökkentését, frakcionálását és a hemicellulózok hidrolízise; a celluláz enzim termelése; a cellulóz enzimes hidrolízise; fermentáció megfelelő élesztő törzzsel; és az etanol finomítása. A hemicellulóz hidrolízisét különböző lignocellulóz biomasszáknál az alapanyagot gőzrobbantással kezelték katalitikus mennyiségű kén-dioxid jelenlétében. A folyamatban a hemicellulóz hidrolizálódik, a cellulóz pedig hozzáférhetőbbé válik a későbbi enzim támadás során. A következő lépésben meggy végbe a cellulóz

hidrolízise celluláz enzimek hatására, melyeket az enzimtermelés lépésben, cellulolitikus mikroorganizmusok, pl. *Trichoderma reesei* felhasználásával állítanak elő. A fermentáció során a hidrolízis termékeként kapott cukrok átalakítása történik etanollá. A lehető legnagyobb cukor konverzió eléréséhez, különösen a pentózok megfelelő átalakításához fontos a megfelelő élesztő törzs alkalmazása, ez meghatározza a gyártás versenyképességét a benzinnel szemben. Az etanol desztillációval 95%-osra töményíthető, melyből azeotróp desztillációval történő vízelvonással 100%-os, tiszta etanol nyerhető.

IV.2.2. A keményítő biodegradációja, hasznosítása

A keményítő a cellulózhoz nagyon hasonló felépítésű poliszaharid, növényi tápanyagraktár. D-glükóz molekulák α -1,4 kötéssel kapcsolódnak egymáshoz, lineáris homopolimert (amilóz) létrehozva illetve elágazó (α -1,6 ritkán α -1,3 kötésekkel) homopolimerjének (amilopektin) keverékéből áll (IV.13. ábra). Az amilopektin elágazásainak mértéke és az amilóz:amilopektin arány a keményítő „korától” és származásától függ. A polimert hidrogénkötések erősítik. Vízben oldódva kolloidális oldatot képez, s így enzimatikusan bontható.

A keményítőt hasító enzimek: α -amiláz (főleg *Bacillus*-ok termelik), β -amiláz, glükóamiláz (extracelluláris glükóamiláz termelő pl. *Aspergillus niger*), glükóz izomeráz. Az α -amiláz véletlenül hidrolizálja az α -1,4 kötések oligoszaharidokra (dextrinek), maltóz, és maltotrióz egységekre, majd glükóz monomerekre a keményítőt. A β -amiláz a láncvégi, nem redukáló csoportoknál hasít le maltóz molekulákat. A glükóamiláz enzim mindhárom, a keményítőben jelenlévő (α -1,4, -1,6, α -1,3) kötést képes hasítani, de a hatékonysága elmarad az α -amilázétól. Fő szerepe a glükóamiláznak az amilopektin keresztkötések hasításában van. A glükóizomeráz enzim glükózból fruktózt képez.



IV.13. ábra

A keményítő szerkezete, és enzimatis hasítása

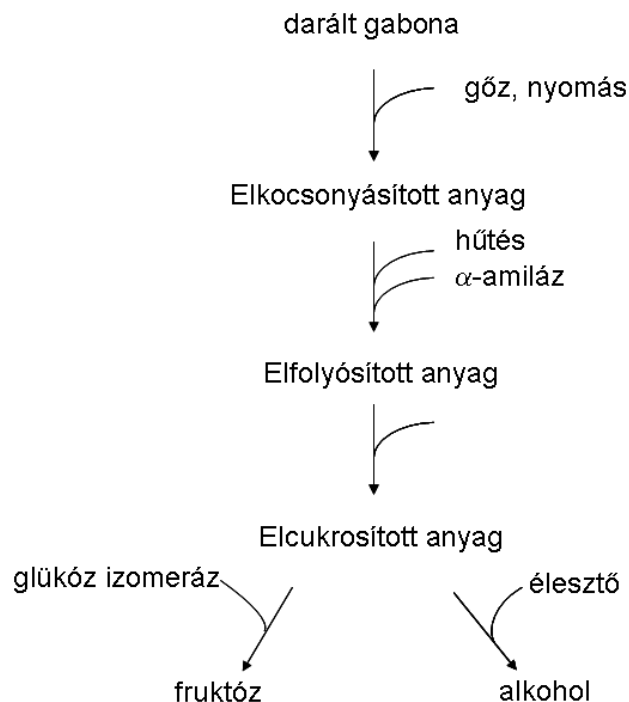
IV.2.2.1. Ipari alkalmazás

A keményítő elsődleges felhasználói az élelmiszer-, és szeszipar, ahol általában először kis molekula súlyú komponensekre hidrolizálják, majd fruktóz- ill. alkohol gyártás alapanyagaként hasznosítják (IV.14. ábra).

A fruktóz és alkohol ipari előállítása keményítőből

1. Őrölt gabona keményítőjét gőz és nyomás segítségével gélesítik
2. Lehűtik 50-60°C-ra és α -amilázt adnak hozzá, mely az α -1,4-kötéseket elhasítja rövidebb poliszaharid szálakra
3. Glükóz felszabadítása glükoamiláz enzimmel, a végtermék glükóz

4. Glükóz izomeráz hozzáadásával fruktózt állíthatunk elő
5. Élesztő sejtek hozzáadásával a glükózból alkohol fermentálható

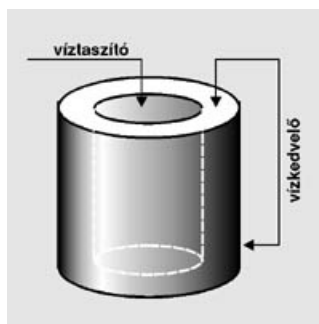


IV.14. ábra
A keményítő feldolgozása

IV.2.3. Egyéb cukorpolimerek

IV.2.3.1. Ciklodextrinek

A keményítő amilóz komponenséből képezhető gyűrűs oligoszaharidok. Szerkezetüknek köszönhetően „molekuláris csomagolóanyagként” hasznosíthatók (IV.15. ábra) a gyógyszeriparban, a mezőgazdaságban, élelmiszeriparban. A bioremediációs eljárásokban a jelentősége az, hogy bizonyos anyagok hozzáférhetőségét javítja, nehezen oldódó vegyületeket kolloidális állapotba juttatva bonthatókká válhatnak. (későbbiekben az immobilizáció fejezetben találkozunk ezzel a vegyülettel)



IV.15. ábra
A dextrin, mint molekuláris csomagolóanyag

IV.2.3.2. Dextránok

Jellegzetes baktérium eredetű ún. tokanyag poliszaharidok. Szerkezetükre a D-glükóz részek α -1,6 kötése jellemző, néhol láncelágazódást is megfigyeltek. Mesterségesen térhálósított alakja a Sephadex, melyet kromatográfiás eljárásokban, sok biológiai anyag (fehérjék, DNS, stb) elválasztására használják.

IV.2.3.3. Glikolipidek (lipopoliszaharidok), glikoproteinek

Sejtek határoló membránokban fordulnak elő. Jelentőségük a biodegradációs eljárásokban jelentős lehet, mint felületaktív anyagok. Néhány mikroorganizmus képes az extracelluláris terébe kijuttatni e molekulákat, melyek a vízben nem, vagy rosszul oldódó anyagokkal micellákat képezve a szerves tápanyagokat hozzáférhetővé teszik a mikroorganizmusok számára.

IV.2.4. Irodalomjegyzék

- Boudet, A.M., S. Kajita, J. Grima-Pettenati, D. Goffner. 2003. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. Trends in Plant Science. 8:576-581.
- Broda, P., P. R. J. Birch, P. R. Brooks, and P. F. G. Sims. 1996. Lignocellulose degradation by *Phanerochaete chrysosporium*: gene families and gene expression for a complex process. Mol. Microbiol. **19**:923–932.
- Carlile, M. J., and S. C. Watkinson. 1997. The fungi, p. 269–275. Acad. Press, New York, N.Y.
- Chaudhary, P., N. N. Kumar, and D. N. Deobagkar. 1997. The glucanases of *Cellulomonas*. Biotechnol. Adv. **15**:315–331.

- Copa-Patiño, J. L., G. K. Young, and P. Broda. 1993. Production and initial characterisation of the xylan-degrading system of *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **40**:69–76.
- Covert, S. F., J. Bolduc, and D. Cullen. 1992. Genomic organization of a cellulase gene family in *Phanerochaete chrysosporium*. Curr. Genet. **22**:407–413.
- Demain A.L., M. Newcomb, J.H. D. Wu. 2005. Cellulase, Clostridia, and Ethanol. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **69**:124–154
- Henriksson, G., G. Johansson, and G. Pettersson. 2000. A critical review of cellobiose dehydrogenases. J. Biotechnol. **78**:93–113.
- Kubicek, C. P., and M. E. Penttilä. 1998. Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*, p. 49–72. In G. E. Harman and C. P. Kubicek (ed.), *Trichoderma and Gliocladium*, vol. 2 ed. Taylor & Francis Ltd., London, United Kingdom.
- Lynd, L. R., P. J. Weimer, W. H. van Zyl, and I. S. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **66**:506–577.
- Miller, T. L., E. Currenti, and M. J. Wolin. 2000. Anaerobic bioconversion of cellulose by *Ruminococcus albus*, *Methanobrevibacter smithii*, and *Methanosarcina barkeri*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **54**:494–498.
- Ng, T. K., and J. G. Zeikus. 1982. Differential metabolism of cellobiose and glucose by *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. J. Bacteriol. **150**:1391–1399.
- Nogawa, M., M. Goto, H. Okada, and Y. Morikawa. 2001. L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. Curr. Genet. **38**:329–334.
- Poulsen, O. M., and L. W. Petersen. 1988. Growth of *Cellulomonas* sp. ATCC 21399 on different polysaccharides as sole carbon source induction of extracellular enzymes. Appl. Microbiol. Biotechnol. **29**:480–484.
- Rajoka, M. I., and K. A. Malik. 1997. Cellulase production by *Cellulomonas biazotea* cultured in media containing different cellulosic substrates. Biores. Technol. **59**:21–27.
- Takashima, S., A. Nakamura, M. Hidaka, H. Masaki, and T. Uozumi. 1999. Molecular cloning and expression of the novel fungal beta-glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. J. Biochem. **125**:728–736.

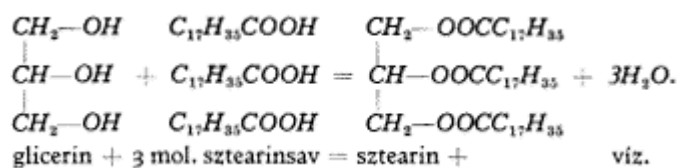
IV.3. Zsírok, olajok, szappanok

IV.3.1. Zsírok

A zsírok és zsírszerű anyagok (olajok) annyira elterjedtek a növényvilágban, hogyha csekély mennyiségben is, de majdnem minden növényi alkatrészben feltalálhatók. A növények egyes részei, leggyakrabban a magvak, súlyuknak mintegy felét kitevő magas zsírtartalommal bírhatnak. Az állatvilágban a növényvilághoz hasonlóan szintén igen elterjedtek az olaj- és zsírféleségek. Egyes rovarok, pl. a méhek testükből nagy mennyiségű zsírt (viaszt) választanak ki. A tengerekben élő állatok, nevezetesen a bálnák és rozmárfajták teste különösen zsírdús.

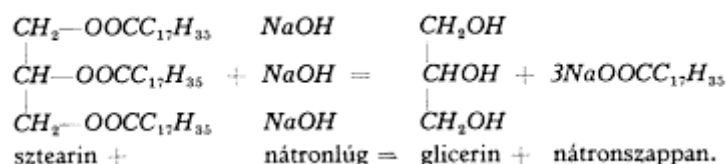
Bármily sokfélék is a zsírok és olajok keletkezésük szerint, vegyileg mégis nagyon hasonlók egymáshoz, minden zsír és olaj főtömegét háromféle zsír keveréke (nem vegyülete!) képezi, melyeket *sztearin*, *palmitin*, illetőleg *olein* névvel jelölünk. A különböző eredetű zsírok és olajok ezeket a főalkotókat változó arányban tartalmazzák. Ezenfelül minden zsírnak és olajnak egyéb alkotó elemei is vannak, melyektől azok jellegzetes tulajdonságai származnak.

A sztearin, a palmitin és az olein egyaránt egységes, tisztán is könnyen előállítható vegyület. Mindegyikben közös a glicerín, melynek 1 molekulája sztearin esetén 3 molekula *sztearinsavval*, palmitin esetében 3 *palmitinsavval*, végül az olein esetében 3 *olajsavval* (oleinsavval) lép reakcióba. A glicerín ($C_3H_8O_3$) háromértékű alkohol, vagyis három hidroxil (OH) csoportot tartalmaz. Utóbbiak útján a glicerín 1–1 molekulája az említett savak 3–3 molekuláját képes lekötni ún. *glicerínészter* alakjában:



Ha a zsírokat lúgokkal, pl. nátronlúggal (NaOH), oltott mésszel [$Ca(OH)_2$], vagy egyes fémoxidokkal, pl. ólomoxiddal (PbO) melegítjük, akkor a fenti ábrán

bemutatott folyamat fordított, nevezetesen a zsír bomlása következik be. A glicerin és a zsírsav tehát szétválak, de a felszabaduló zsírsav (pl. sztearinsav) nyomban sóvá alakul az alkalmazott bázis fémjével. Az utóbbi fémvegyületeket *szappanoknak* mondjuk. A mindennapi életben használt szappanok nátronszappanok, vagyis bennük a zsírsavak nátriumsói játsszák a főszerepet. A nátronlúggal való elszappanosítás reakcióegyenlete:



A zsírok megbontása, vagyis elszappanosítása nemcsak lúgok segítségével történhet, hanem erős savakkal, pl. kénsavval. Magas nyomáson és hőmérsékleten pedig magával a vízzel is felbonthatjuk a zsírokat glicerinre és zsírsavakra.

Vannak olyan zsírnemű anyagok is, melyekben glicerin helyett más alkoholok vannak jelen. A méhviasz pl. szabad *cerotinsav* mellett *palmitinsavas miricilésztert*, a kínai viasz pedig *cerotinsavat* és *cerilésztert* tartalmaz. A cetvelő folyékony része "trigliceridekből" áll, míg a szilárd rész az egyvegyértékű *cetilalkohol* palmitinsavas észtere, hasonlóan a méhviasz és a kínai viasz összetételéhez.

A sztearin-, palmitin- és olajsav glicerinészterein kívül a zsírokból és olajokból kisebb mennyiségben, legtöbbször ugyancsak glicerinészter alakjában másféle zsírsavakat is találunk, melyek a különféle zsírok jellegzetes tulajdonságait adják meg. Ezek pl. *vajsav*, *kapronsav*, *kaprilsav*, *kaprinsav*, *laurinsav*, *mirisztinsav*, nemkülönben a telítetlen savak közül az olajsav közeli rokonát, a *tiglinsavat* ($\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{COOH}$) és az ugyancsak telítetlen *lininsavat*, *taritinsavat*, illetőleg *oleomargarinsavat* (utóbbiak tapasztalati képlete egyforma: $\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{COOH}$), végül a *linolsavat* és a *linolénsavat* ($\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{COOH}$) stb.

A zsírok és olajok főalkatói közül a keményebb zsírokból (pl. disznózsírban és még inkább a faggyúban) a sztearinsavas és palmitinsavas glicerinészter, a folyékony zsírokból – vagyis olajokból – főként az olajsavas glicerinészter dominál.

Ismert káros tulajdonsága a zsíroknak és olajoknak, hogy a levegőn rövidebb-hosszabb idő alatt *megavasodnak*, amikor is csípős ízt és kellemetlen szagot kapnak. E változás alatt a zsírok kémhatása savanyúvá válik. Az avasodás nem minden zsírnál és olajnál következik be egyenlő mértékben és egyenlő idő alatt. Jórészt függ ez a zsír tisztaságától, a környezet nedvességétől, többé-kevésbé a hőmérséklettől és a fényhatásoktól. A zsírok avasodása mikrobiális hatás, az oxidációval kapcsolatosan előálló hidrolitos bomlás következménye. A megfigyelések szerint elsősorban azok a zsírok hajlamosak avasodásra, melyek könnyebben szappanosíthatók el. Az avasodás alkalmával a víz és az oxigén hatása alatt keletkező zsírsavak, továbbá aldehid- és ketonszerű termékek okozzák a szagot. Elősegíti az oxidációt a zsírban jelenlévő nitrogén- és kéntartalmú anyagok baktériumos bomlása is.

A *zsírok kinyerése* történhet: 1. kiolvasztással, 2. préseléssel, 3. extrahálással. E műveletekhez rendszerint a tisztítás és finomítás (raffinálás) is kapcsolódik. Az extrakciós eljárás a zsírok, olajok benzinben, éterben, benzolban, széntetrakloridban történő oldhatóságán alapszik.

IV.3.2. Éterek és észterek

Az alacsony molekulású észterek vízben alig oldódó, többnyire kellemes szagú folyadékok pl. szintetikus gyümölcsaroma-anyagok az *etilformiát*, HCOOC_2H_5 (rumaroma), az *etilacetát*, $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ (körte és málna), az *amilacetát*, $\text{CH}_3\text{COOC}_5\text{H}_{11}$, (császárkörte), az *etilbutirát*, $\text{C}_3\text{H}_7\text{COOC}_2\text{H}_5$ (ananasz), az *etilizovalerianát*, $\text{C}_4\text{H}_9\text{COOC}_2\text{H}_5$, (őszibarack), az *amilizovalerianát*, $\text{C}_4\text{H}_9\text{COOC}_5\text{H}_{11}$ (alma). A szervesen savak észterei közül legnagyobb jelentőségű a glicerinnalétromsav-észtere, az ú. n. *nitroglicerinn*.

A magasabb molekulású észterek közül legfontosabbak a zsírok és olajok, amelyekről az előző fejezetben tettünk említést.

IV.3.3. Zsírok biodegradációja

A szisztematikus lakossági szennyvizek komoly szennyező komponensei, a 'belépő' kémiai oxigén igény legalább 25%-át képviselik. Felelősek a szennyvízcsatornák dugulásáért, és a víztisztító üzemek működését is zavarják. Az aktivált iszap

kezelésben gátolják az oxigén transzfert, mivel lipidfilm képződik a levegő/víz határfelületen, valamint a lebegő baktériumcsoportokra is adszorbeálódik zsír. A lipid túlterhelés az egész tisztítási folyamatra kihat, a hatékonyság csökken, a fonalas mikroorganizmusok osztódása gátlódik, és a derítőben ülepedési problémák alakulnak ki. E gondok kiküszöbölésére a zsiradékot lefölozik a fermentorban a felszínről. Levegő flotációval eltávolítható kb a 20%-a, melyet főleg zsírsavak és gliceridek alkotnak.

A fizikai módszerek nem megfelelőek, viszont megfelelő alternatív kezelés lehet a lipidszármazékok biológiai, aerob emésztése, mivel eközben CO₂-dá, vízzé és biomasszává alakulnak. A biológiai emésztés két fő lépése: 1. a glicerideket extracelluláris lipolitikus enzimek glicerollá és zsírsavakká hidrolizálják; 2. a zsírsavak a sejtekbe transzportálódnak, ahol a szénlánc többszöri hasítással (β -oxidáció) végül acetyl-coA-vá alakul, mely a Szentgyörgyi-Krebs ciklusban hasznosul CO₂ és víz keletkezése közben.

A lipid biodegradációt azonban számos fiziko-kémiai paraméter befolyásolja, gátolja pl. nem oldódnak vízben, megdermednek, vagy félig dermednek a környezeti hőmérsékleten, tehát a biológiai hozzáférés akadályozott. Ha felületaktív anyagokat, vagy oldószert adunk a rendszerbe a degradációs ráta jelentősen megnő.

Kémiai reakciókkal is segíthetjük a jobb hozzáférést, pl. szappanosítás során a glicerid/zsírsav keverékből felszínaktív tulajdonságokkal bíró zsírsav-sók keletkeznek. E kémiai folyamat során a gliceridek glicerinné és zsírsavakká hidrolizálódnak, majd semlegesítődnek szappant formálva, melynek az oldékonysága nagyobb és emulzifikációs tulajdonsággal bír. A reakció számos faktortól függ, pl. a bázis természete, hőmérséklet. Az egyenes láncú zsírsavak kálium-sói sokkal oldékonyabbak, mint az analóg Na-, Ca-sók, tehát érdemes KOH-ot használni a szappanosításhoz. Bizonyítást nyert, hogy a szappanosított zsírok 3-4-szer gyorsabban elbomlanak, mint a kezeletlen zsírok.

Mongkolthanaruk és munkatársai hatékony zsírbontó mikrobiális konzorciumot hoztak létre (2002), melyben *Pseudomonas aeruginosa* LP₆₀₂, *Bacillus subtilis* B₃₀₄ és *Acinetobacter calcoaceticus* LP₀₀₉ törzseket használtak. A rendszer képes volt 12 nap

alatt kb. 20000 mg/l lipidet 20 mg/l mennyiségre csökkenteni aerob körülmények között.

A lipázok a lipidekhez hasonlóan széles körben elterjedtek a természetben, különböző növényekben, állatokban, mikroorganizmusokban megtalálhatók. A mikrobiális lipázoknak nagy a jelentőségük a biotechnológiában. Egyrészt a fent említett biodegradációs folyamatokban van nagy jelentőségük, másrészt ipari célokra, pl. mosószeriparban használjuk őket sikeresen.

Nagyon sokféle mikroorganizmus termel lipázokat, a legjelentősebbek a *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Bulkholderia* fajok. A lipázok stabil enzimek, széles a pH és hőmérséklet tartományuk, nagy a stabilitásuk szerves oldószerekben. Extracelluláris enzimek, tehát át kell jutniuk a sejtmembránon. A Gram-pozitív baktériumok esetében általában szignál szekvencia segítségével szállítódnak a felhasználási helyükre. Gram-negatív mikrobák esetében több megoldás is lehetséges, pl. a *P. aeruginosa*-nak legalább 4 féle szekréciós útja ismert [K-E Jaeger et al. 2002]. Indukálható enzimek, az inducereket lehetnek: olajok, triacilglicerolok, zsírsavak, hidrolizálható észterek, epesók és glicerin. A szénforrás mellett a nitrogénforrás is befolyásolja a lipáz termelődést, a szerves nitrogénforrások előnyösen hatnak pl. pepton, élesztőkivonat, de sok esetben a szervesetlen nitrogénforrások is javítják a termelődés hatékonyságát pl. ammónium-klorid, diammónium-hidrogén-foszfát. Háromféle mikrobiális lipáz csoportot ismerünk: nem-specifikus, régióspecifikus illetve zsírsavspecifikus lipázokat.

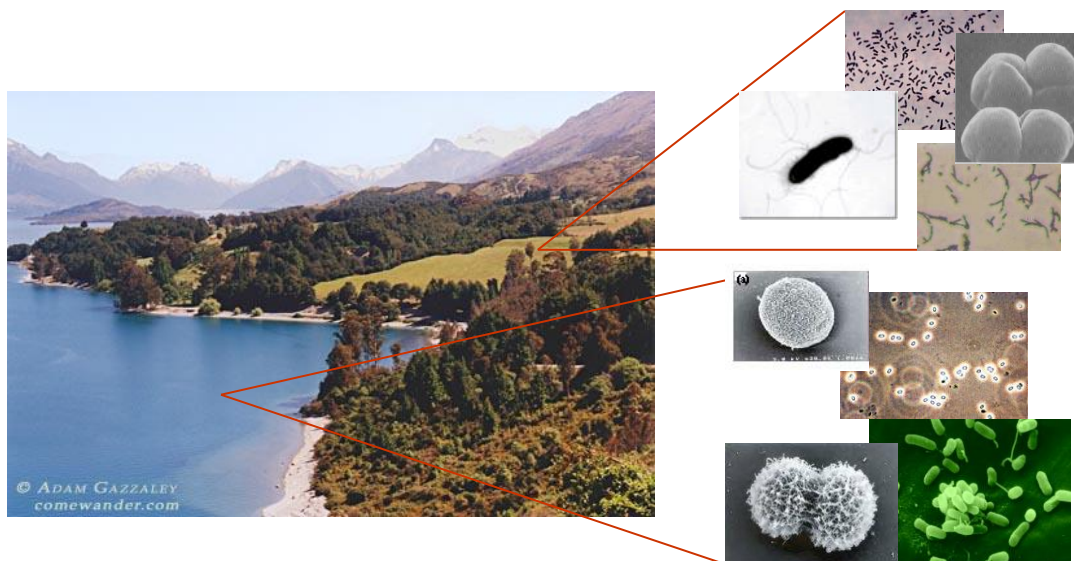
Inhibitorokkal gátolni lehet a lipázok aktivitását. Vannak 1. specifikus reverzibilis gátlók pl. boronsav származékok, szubsztrát analógok: glicerin triéter (triacilglicerid analóg); 2. specifikus irreverzibilis gátlószerek, melyek általában az aktív centrum körüli aminosavakhoz kötve gátolja az enzim működését: a lipázok szerin hidroláz csoportját gátolja a PMSF (fenil-metil-szulfonilfluorid, általános szerin proteáz gátló).

IV.3.4. Irodalom jegyzék

- Gupta R., N. Gupta, P. Rathi (2004) Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotech.* Vol.64:763-781.
- Jaeger K-E., T. Eggert (2002) Lipases for Biotechnology. *Curr. Op. Biotechnol.* Vol. 13: 390-397.
- Lefebvre X., E. Paul, M. Mauret, P. Baptiste, B. Capdeville (1998) kinetic characterization of saponified domestic lipid residues aerobic biodegradation. *Water Res.* Vol. 32: 3031-3038.
- Márkus Jenő: ZSÍROK, OLAJOK, SZAPPANOK. A kémia és vívmányai, II. rész, Kir. Magy. Természettudományi Társulat, Budapest, 1940.
- Mongkolthanaruk W., S. Dharmstithi (2002) Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. *Int. Biodeter.Biodegr.* vol. 50: 101-105.

V. Környezeti monitor, mikrobiális diverzitás, metagenom könyvtár

Dr. Perei Katalin, Dr. Rákhely Gábor, Horváth Lenke, Füle Gabriella



Tartalomjegyzék

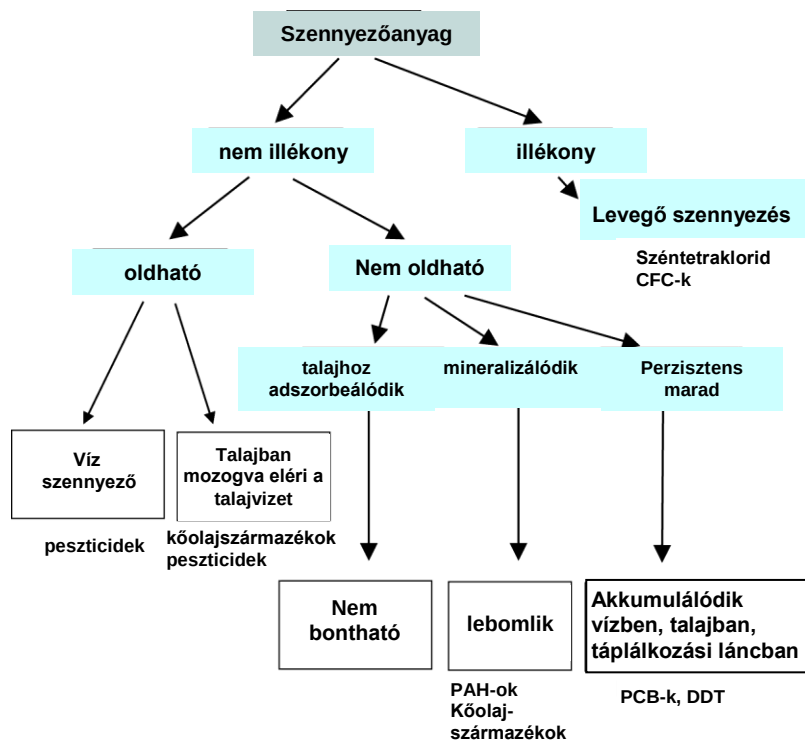
V. Környezeti monitor, mikrobiális diverzitás, metagenom könyvtár	217
V.1. Környezeti monitor	218
V.2. Fizikai, kémiai, biológiai analízisek	219
V.2.1. Fizikai analízis	219
V.2.2. Kémiai analízis	220
V.2.3. Biológiai analízis	221
V.2.3.1. Bioindikátorok	223
V.2.3.2. Biomarkerek	225
V.2.3.2.1. Biokémiai markerek	225
V.2.3.2.2. Immunkémiai markerek	226
V.2.3.2.3. Genetikai markerek	227
V.2.3.3. Bioszenzorok	227
V.2.3.4. Toxicitás tesztek	231
V.3. Mikrobiális diverzitás	233
V.4. Talaj metagenom	236
V.4.1. DNS kinyerése a környezeti mintából	237
V.4.2. Metagenom analízis	239
V.5. Irodalomjegyzék	242

V.1. Környezeti monitor

Csak az utóbbi néhány évtizedben figyeltünk fel környezetünkre, és tevékenységeink hatására. A környezeti változásokról, pl. globális felmelegedés, mely lassú és változó folyamat, információt csak akkor nyerhetünk, ha hosszabb távon végezzük megfigyeléseinket (monitorozás).

Számos vegyület, elem olyan kis koncentrációban marad tartósan a környezetben, hogy kimutatása kétséges (a kimutatási határon van). Azonban folyamatos ellenőrzéssel – monitorozással- a környezeti paraméterek változását figyelve következtetéseket lehet levonni a szennyezőanyag mennyiségi, minőségi változásairól. De mit is nevezünk szennyezésnek: mindent, ami negatívan visszahat végső soron az emberre és környezetére. Lehetnek szerves anyagok pl. fémek, nitrát stb., szervesanyagok pl. kőolaj és származékai, szintetikus vegyületek (xenobiotikumok), akár mikroorganizmusok is. A szennyező források: megszűnt vagy működő ipari üzemek, mezőgazdaság, lakosság, szállítás közben bekövetkező katasztrófák. A szennyezőanyag fizikai, kémiai tulajdonságaitól, a környezeti feltételektől függően a szennyezést követően az anyag sorsa más és más. Jelenlétük a környezetben egy bizonyos határérték felett nem megengedett. Az egyes vegyületekre egyedi határértékeket állapítottak meg Nemzetközi Törvények, de országonként lehetnek eltérések (szigorúbb követelmények). A két legismertebb szervezet, mely a szennyezések jelenlétével, eltávolításával, szabályozásával, törvények alkotásával, azok betartatásával foglalkozik Európában az EC = Európai Bizottság, és Amerikában az EPA (Environmental Protection Agency) = Amerikai Környezetvédelmi Iroda.

Monitorozással meghatározható a szennyezők jelenléte, sorsa, és a környezetre gyakorolt hatása is. A biológia, ezen belül a molekuláris biológiai módszerek egyre nagyobb segítséget nyújtanak ezen paraméterek meghatározásában. Új mikroorganizmusok és katabolikus génjeik felfedezése többek között a bioremediációs eljárások gyors fejlődését tette lehetővé.



V.1. ábra

A szennyezőanyag sorsa környezetben függ az anyag tulajdonságaitól és a környezeti viszonyoktól

V.2. Fizikai, kémiai, biológiai analízisek

A monitorozáshoz szükséges a folyamatos és pontos mintavételezés. A pontatlanság óriási hibalehetőségeket vonhat magával. Fizikai, kémiai, biológiai analízissel egy minta sokféle tulajdonsága megismerhető, ezek változásai jelezhetik a szennyezés megjelenését, eltűnését.

V.2.1. Fizikai analízis

Az egyes komponensek fizikai paramétereinek illetve a körülmények vizsgálata, melyeknek a szennyezőanyag ki van téve.

- *gravimetria*: szuszpendált szilárd anyagok-, teljes vagy illékony szilárd anyagok-, és szulfát meghatározásra
- *pH*: a túl savas illetve lúgos körülmények korrozívak, és gátolják a biológiai aktivitást, mérése egyszerű – pH elektród segítségével

- *kolorimetria*: a szín és zavarosság a vízminőség szempontjából fontos, többek között koloriméterrel, spektrofotométerrel mérhető
- *oldott oxigénszint*: szintén fontos vízminőségjelző paraméter, oxigén elektród segítségével egyszerűen megmérhető
- *ionok jelenlétének* mérése: ammónia, nitrát, nitrit, kalcium, nátrium, klorid, stb. ionok ionspecifikus elektródokkal mérhetők

V.2.2. Kémiai analízis

Rengeteg módszer áll rendelkezésünkre, hogy egy minta kémiai paramétereit meghatározzuk. Az alábbiakban felsoroljuk a legfontosabbakat:

- *kromatográfia*

TLC = vékonyréteg kromatográfia, mellyel számos vegyületet (illékony, vízdékony, aminosavak, lipdek, stb) ki tudunk mutatni azáltal, hogy a komponensek az adott oldószerben eltérő sebességgel vándorolnak a vékonyrétegen

GC = gázkromatográfia, az illékony komponensek kimutatására alkalmas, specifikus töltettel rendelkező hosszú, vékony oszlopon a meghatározandó anyagot is tartalmazó gázt áramoltatnak át, és specifikus detektorokat alkalmaznak a kimutatáshoz

HPLC = nagy felbontású folyadékromatográfia, specifikus töltettel rendelkező oszlopon folyadék fázisban, nagy nyomáson áramoltatják át a meghatározandó vegyületeket, ez esetben is specifikus detektorokkal mutatják ki a komponenseket

- *spektroszkópia*

Spektrofotometria = látható-, illetve ultraibolya tartományban számos vízdékony vegyületnek van elnyelési maximuma, mely alapján detektálható, nyomonkövethető egy-egy vegyület

infravörös spektroszkópia (IR) = infravörös tartományban mérhető komponensek, főleg szénhidrogének kimutatására használható

atomabszorpciós spektrofotometria (AAS) = fémek kimutatására alkalmas módszer

- *tömegspektrometria*

A mintát vákuumban elektronokkal vagy pozitív ionokkal bombázzák, fragmentek keletkeznek, melyek töltésük illetve méretük szerint elválnak. Gyakran alkalmazzák együtt GC-, illetve HPLC-vel

- *immunesztek*

enzimkapcsolt immunszorbens teszt (ELISA), mely a specifikus antigén-antitest kapcsolódáson alapszik, ahol az antigén a mérendő anyag, az antitest pedig enzimhez kapcsolt, és specifikus enzimrakciót létrehozva detektálható a mérendő minta a kapcsolódáson keresztül (leggyakoribb a peroxidáz, esetleg alkalikus foszfatáz enzimek használata)

radioimmun-teszt (RIA), mely hasonló elveken működik, mint az ELISA, de itt az antitest izotóppal jelölt, főleg ^{131}I -dal. Ez a módszer nagyon érzékeny, ezért viszonylag népszerű

A fenti módszerek mellett igen fontos szerepet játszik a **kémiai oxigénigény** meghatározása, mely azt az oxigénmennyiséget méri, mely a mintában lévő összes szervesanyag eloxidálásához szükséges. Ennek alternatív lehetősége az **összes szerves széntartalom** meghatározása, ahol nem az oxigénszükségletéről, hanem konkrétan a szervesanyagtartalomról biztosít adatot. Ezt a minta elégetésekor keletkező CO_2 tartalom mérésével határozhatjuk meg pl. infravörös analízis segítségével.

V.2.3. Biológiai analízis

- *sejtszám meghatározás*

Hagyományos mikrobiológiai módszer a mintában lévő mikrobák számának becslésére. Többféleképpen is mérhetjük, pl. szárazsúly meghatározásával (centrifugálással, vagy filtrálással összegyűjtjük a sejteket, majd kiszárítjuk a mintát). Sejtszámláló műszer vagy mikroszkóp segítségével szintén meghatározható az összsejtszám (bár ez az elpusztult sejteket is méri). Élő sejtszám meghatározása lemez-számolós módszerrel, vagy az un. MPN =

legvalószínűbb sejtszám módszerrel. Specifikusan festhetők az élő sejtek, így mikroszkópban jól elkülöníthető, számolható.

- *Molekuláris biológiai módszerek*

Segítségükkel képesek vagyunk tanulmányozni egy környezeti minta mikrobiális közösségeit. A szaporítás független technikák kifejlesztésével már nemcsak a szaporítható (az össz. Mikroba szám 1-10%-a) mikroorganizmusokról kapunk információt, hanem akár az összes, a mintában megbújó fajokról is, melyeket a hagyományos módszerekkel sosem ismerhetnénk meg. A DNS technológiák mellett egyre népszerűbb a fehérjék tanulmányozása, a proteomika, mely segítségével számos új információt nyerhetünk egy szennyezőanyag hatásáról, sorsáról a környezetben, sőt korai stádiumban kimutatható annak jelenléte a bontásában, átalakításában résztvevő specifikus enzim megjelenésének kimutatásával. A molekuláris biológiai módszerek ötvöztetésével nyerhetjük a legjobb információt környezetünkről, és a bekövetkező változásokról.

- *BOI*

A biológiai oxigénigény mérésével nemcsak a biológiailag lebontható szervesanyagokról, és mennyiségükről kapunk becslést, de a mintában jelenlévő aerob, a szennyezést bontani képes szervezetek jelenlétéről is. Hátránya, hogy nem kapunk valós adatokat az összes jelenlévő szervesanyagról csak a biodegradálható anyagokat mérjük.

Alternatív megoldás lehet ha a BOI-t a KOI (az összes oxidálható anyagot mérjük), ill. TOC mérésekkel kombináljuk. Pontosabb eredményt kapunk, ha a KOI/BOI arányát vesszük figyelembe.

A fenti módszerek mindegyike bizonyos szempontból fontos, vagy előnyös. Vizsgálunk kell a szennyezőanyag(ka)t, a környezetet, és a biodiverzitást. Minden eset eltérő kezelést, detektálást igényel, ezért nem emelhetjük ki egyik vagy másik módszert, sőt a módszerek kombinációi vezetnek komoly eredményre.

Kémiai analízis lehetővé teszi számunkra, hogy adatokat nyerjünk az adott állapotról, a szennyezés fajtájáról, azonban a környezetre gyakorolt hatásokról kevés

információt kapunk. A szennyezések monitorozására frappáns és érzékeny biológiai módszereket dolgoztak ki, melyek jelzik a környezet válaszát az adott szennyezésre. Ezekbe a biológiai rendszerekbe tartoznak a bioindikátorok, biomarkerek, specifikus teszt szervezetek:

- Amikor a szennyezőanyag a természetben egy reprezentatív teljes szervezetére hat, ezek a **bioindikátorok**.
- Amikor a szennyezőanyag a környezetben élő szervezetek fiziológiai, biokémiai és molekuláris jellemzőire hat, ezek a **biomarkerek**.
- Teszt szervezeteket használunk a laboratóriumban, hogy megvizsgáljuk a szennyező hatását az élő környezetre.

A bioindikátorok, biomarkerek használata azért előnyös, mert a valós helyzetben mérhető a szennyezőanyag hatása, ahol számolnunk kell komplex hatásokkal is.

V.2.3.1. Bioindikátorok

A környezetben egy reprezentatív, ép szervezet, melyre hat a szennyezés. Olyan szervezet lehet, melyen keresztül a szennyezés hatása meghatározható, mennyiségileg megadható, széles körben elterjedt, helyhez kötött (nem vándorol el), egész évben jelen van, könnyen begyűjthető, szenzitív a szennyezésre. Mi az ami változni fog: ökológiai (pl. populáció sűrűség, a kulcs faj és fajdiverzitás változásai), viselkedésbeli (aktivitás változás-tápanyagfelvétel, mobilitás), fiziológiai (pl. nehézfém akkumuláció, CO₂ termelés, oxigénigény) változások, melyek megfigyelhetők.

Példák: földigiliszta, méh, zuzmó, moha, kagyló

- Főleg a moha, zuzmó megfelelő, mivel nem mobilis, könnyen begyűjthető, a zuzmó nagyon érzékeny – levegő minőség vizsgálatra igen jó.
- A méhek az atmoszféra fémszennyezésére használható bioindikátorok lehetnek. A méz, a begyűjtött pollen, és a viasz fémtartalmát vizsgálják meg.
- A kagylók szintén fémszennyezés detektálására alkalmazhatók vízben (pl. tengerpart mentén)

“Vándorkagylók segítségével tesztelik az ivóvíz minőségét a csepeli vízkezelő műben is. A számítógépes mérőműszerre kapcsolt puhatestűek pontosabban jelzik a vízminőség változásait, mint bármely mechanikus mérőműszer. A biomonitor hónapokig működik felügyelet nélkül. Hirtelen fellépő szennyezéskor percekben belül vészjelet ad. A kagylómonitor olyan biológiai érzékelő- jelzőrendszer, amely folyamatos, on-line monitorozást tesz lehetővé a felszíni vizekben, ivóvíz-kivételi helyeken, szennyvízbevezetéseknél. A rendszer az élő szervezeteken, tehát a kagylókon értékeli a vízminőséget és így olyan összetevőket is vizsgál, amelyekre egy rutin kémiai analízis nem képes. A komponensek széles körét érzékelő monitor – napi huszonnégy órában – hónapokig működik felügyelet nélkül. Hirtelen fellépő szennyezéskor percekben belül vészjelet ad, amely után automatikus mintavételt indíthat el. A *Dreissena polymorpha*, azaz a vándorkagyló rendkívül érzékeny állat, reakcióival pontosabban jelzi a vízminőség legkisebb változását is, mint bármely mechanikus mérőműszer – tudtuk meg. A környezetében bekövetkező zavarok, például a szennyezés hatását a kagyló héjának zárásával igyekszik elkerülni. A vízművek szakemberei ezt a mozgást figyelik és elemzik a kagylókra kötött számítógépes műszer segítségével. Mivel a kagylók önfenntartóak, a rendszer hosszú ideig csak minimális felügyeletet, illetve karbantartást igényel, ami nagyon gazdaságossá teszi működését. A Kagylómonitor alkalmazhatóságát és megbízhatóságát több mint 10 év óta igazolja az ivóvíz előállításában, a folyóvizek biológiai monitorozásában, és az aquakultúrák védelmében.” (2002.04.11. Népszabadság)

- Lepényhalakat tengeri üledékek, vízminőség monitorozására használják, mert érzékenyek a megjelenő természetidegen szervesanyagokra pl. DDT, deformációk lépnek fel a testfelépítésükben.
- A perifitonok (algák és cianobaktériumok, melyek a folyóvizek kövein telepsznek meg) szintén megfelelő bioindikátorai különböző vízszennyezéseknek. Klorofill tartalmuk és biomasszájuk mérésével nyerhetünk információt a szennyezés mértékéről, megjelenéséről.
- A szennyezett talajok egyik legjobb bioindikátorai a földigiliszták, melyek akkumulálják a szennyezést, illetve elkerülik a szennyezett területet. Toxicitás tesztek is végeznek velük, melyben a letális, szubletális dózist határozzák meg (pl. TNT szennyezés).

V.2.3.2. Biomarkerek

A biológiai rendszerekben történő változásokat biomarkerek segítségével mennyiségileg mérhetjük, melyek fiziológiai, biokémiai, molekuláris biológiai karaktere egy, a környezetben jelenlévő szervezetnek, melyre hat a szennyezés.

Előnyei:

- hosszabb időn keresztül végezhetjük a méréseket (ellentétben a kémiai analízissel, ahol egy adott időben gyűjtött, konkrét mintát vizsgálunk)
- egy bizonyos vegyület kockázatát jelezni tudja
- információval szolgálhat egyedi komponensek vagy keverékek toxicitásáról a valós és összetett környezetben szubletális szinten

A biomarkerek 3 csoportba oszthatók: biokémiai-, immunkémiai-, és genetikai markerek.

V.2.3.2.1. Biokémiai markerek

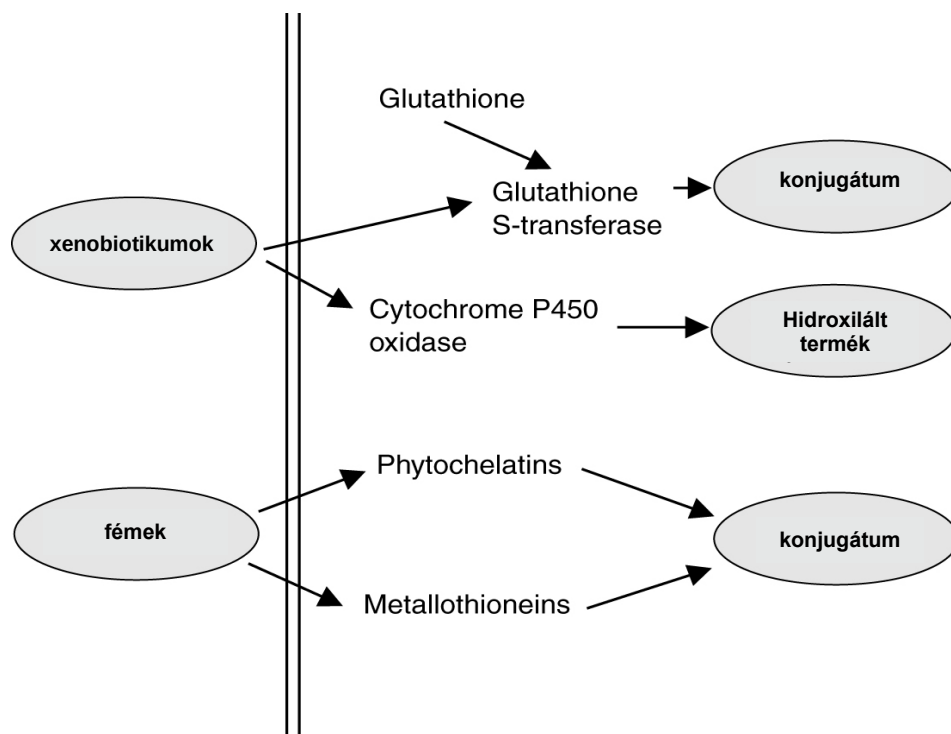
A szennyezés gén szinten generál választ, megváltozik azon specifikus enzimek mennyisége, melyek a szennyezés ártalmatlanításában részt vesznek. Ez esetben az enzim expresszió mértéke ad információt a szennyező anyag koncentrációjáról. A xenobiotikumok detoxifikációja lehet pl észteráz, amidáz enzimek hidrolitikus aktivitásának következménye, de a fő reakció általában oxidáció, melyet pl. a citokróm P450 enzimesalád tagjai, oxigenázok katalizálnak. Tehát a xenobiotikum megjelenése növekvő enzimaktivitást eredményez. Emlősökben, növényekben glutation kapcsolt folyamat segíti a detoxifikációt, és a glutation S-transzferáz katalizálja a reakciót. A nehézfémek ártalmatlanításához a baktériumok metallotionein-, a növények pedig fitokelatin fehérjéiket hívják segítségül (V.2. ábra). Gyakran találkozhatunk az EROD vagy AHH rövidítésekkel, ha biomarkerekről hallunk. Az EROD egy ethoxyresorufin-o-detiláz, az AHH aril szénhidrogén hidroxiláz enzimen alapuló teszt, melyeket szénhidrogén és PAH szennyezés detektálására fejlesztettek ki.

Példák: osztriga – metallotionein fehérje – fémek kimutatására

kagyló – glutation- többféle szennyezés detektálására

tengeri csillag – citokróm P450 PAH-ok jelenlétében

növények – EROD, AHH - dioxin szennyezésre



V.2. ábra

Xenobiotikumok ártalmatlanításának kezdeti stádiuma növényekben, baktériumokban

V.2.3.2.2. Immunkémiai markerek

Az antigén-antitest specifikus reakció kihasználható xenobiotikumok jelenlétének kimutatására is. Antitesteket elő lehet állítani pl. PCB-k, dioxinok ... stb. ellen, és ennek segítségével ELISA teszt fejleszthető ki a szennyezők detektálására. De lehet magát a mikroorganizmust is monitorozni, pl. metanogének kimutatása anaerob emésztőkben ELISA módszerrel.

V.2.3.2.3. Genetikai markerek

Számos molekuláris technika alkalmazható a környezeti szennyezések nyomonkövetésére, pl. genetikailag módosított szervezetekkel, antibiotikum-, nehézfém rezisztens génekkel.

A leggyorsabb, és legérzékenyebb módszerek egyike a génexpresszió ellenőrzése, mely olyan promoter szekvenciához kapcsolódik, melynek terméke könnyen detektálható (pl. színes termék keletkezése, de a legjobb, amikor fény keletkezik).

Példa: egy *E. coli* törzsbe *lacZ* gént (β -galaktozidáz enzimet kódol) hordozó plazmidot juttattak, mely génhez hozzákapcsolták az *arsR* gént (az *ars* operon regulátor fehérjéjét kódolja). Az *ars* operon részt vesz az antimon és arzén eltávolításában a sejtéből. Amikor e plazmidot hordozó sejtek antimon és/vagy arzén szennyezéssel találkoznak, a plazmidon kódolt *lacZ* génről átíródik az enzim, mely képes a rendszerbe adott *p*-aminofenil β -D-galaktopiranozidot hasítani, *p*-aminofenol keletkezik, mely könnyen detektálható. Ezáltal sikerült egy antimon, arzenát érzékelő rendszert fejleszteni.

Látványosabb, ha zöld fluoreszcen fehérjét kódoló génszakaszokat építünk be azon gének promotereinek szabályozása alá, melyek a szennyezésre reagálnak, így, amikor e baktérium toxikus anyaggal találkozik „fény gyullad” benne.

Genetikailag módosított baktériumot lehet nyomonkövetni folyamatosan, ha *lux* gént hordoz, és az adott feltételek mellett folyamatosan lumineszkál. Egy speciális kamera segítségével nyomonkövethető jelenléte a környezetben, ahol alkalmazzák, ezáltal valós-idejű mérési eredményeket kapunk.

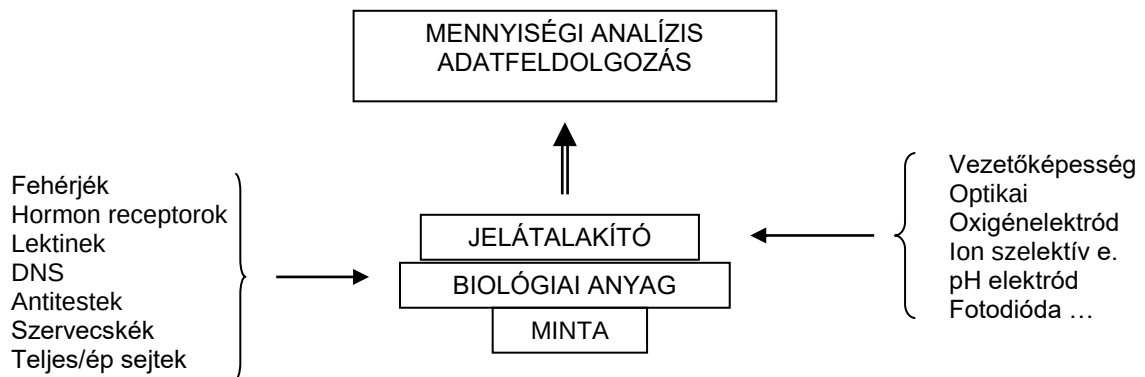
V.2.3.3. Bioszenzorok

A bioszenzor olyan érzékelő (szenzor v. detektor), amely biológiai rendszert v. annak valamely részét, pl. biokémiai reakciókat, enzimeket, ellenanyagokat, receptorokat v. mikroorganizmusokat, stb. használ fel valamilyen jel felismerésére vagy kimutatására (V.3. ábra). Ezek a biológiai anyagok szolgáltatják az érzékelés sajátosságát főként akkor, ha a mérendő jelet másképpen nehéz szelektíven meghatározni. A bioszenzor

rendszerint elektromos jelet hoz létre, amely azután elektromos v. elektronikus berendezésekkel már feldolgozható. A különbség egy egyszerű enzimteszt és egy bioszenzor között, hogy az utóbbiban lezajló reakció jelátalakítóval kapcsolt, mely arányos jelet produkál a jelenlévő molekulák számával, így folyamatosan nyomonkövethetjük a változásokat.

Előnyei: gyors, nagyon specifikus válasz, érzékeny a rendszer, folyamatos-, valós idejű érzékelés...

Hátrányok: biológiai anyag lévén nem sterilizálható, élettideje véges...



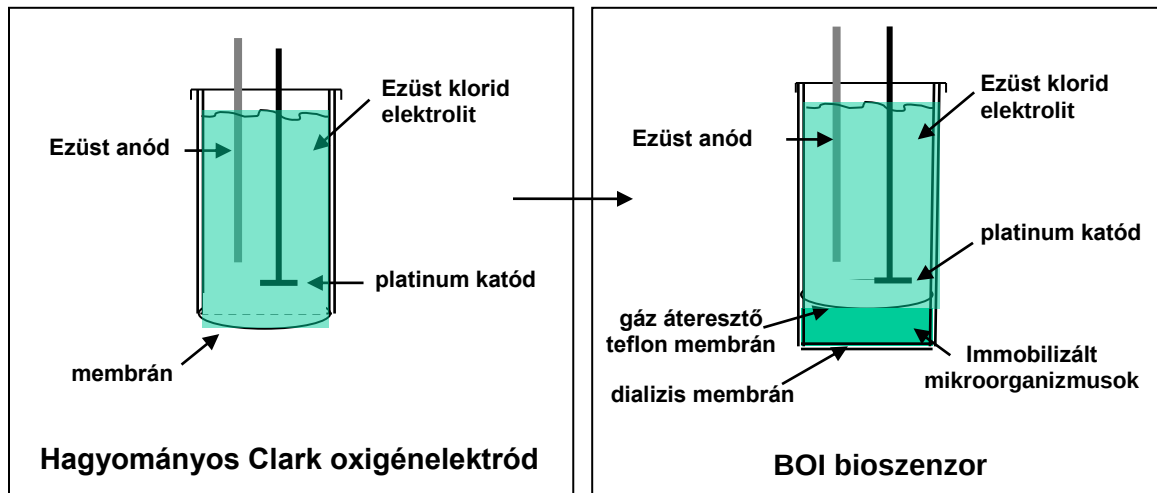
V.3. ábra
A bioszenzorok alapfelépítése

Ahhoz, hogy az eredmény pontos legyen közvetlen kapcsolatot kell biztosítani a biológiai anyag és a jelátalakító között, amit pl. immobilizálással megoldhatunk.

Az egyik legsikeresebb a glükóz bioszenzor, mely glükóz oxidázzal működik, régóta használják a gyógyászatban is.

Bár a mai napig egyik alapvető környezeti mérési módszer a BOI, sajnos lassú, ezért alternatív BOI bioszenzorokat is fejlesztettek, melyek gyorsak és folyamatos mérést biztosítanak. Ezek lehetnek biofilm vagy respirométer típusúak. A biofilm BOI bioszenzor esetében egy porózus membrán és egy Clark oxigén elektród oxigén-permeábilis membránja közé tették a biofilmet (V.4. ábra). Az oxigénszint változásával nyomonkövethető a mikrobiális aktivitás, ezen keresztül detektálható a

lebontandó anyag mennyisége, annak változása. A respirométer BOI módszer kis bioreaktort használ, ami egy mikroorganizmus tartalmú oxigénelektroddal kapcsolt. A mintát az elektródon keresztül adjuk, és a választ is ezen keresztül nyerjük.



V.4. ábra
Biofilm BOI bioszenzor

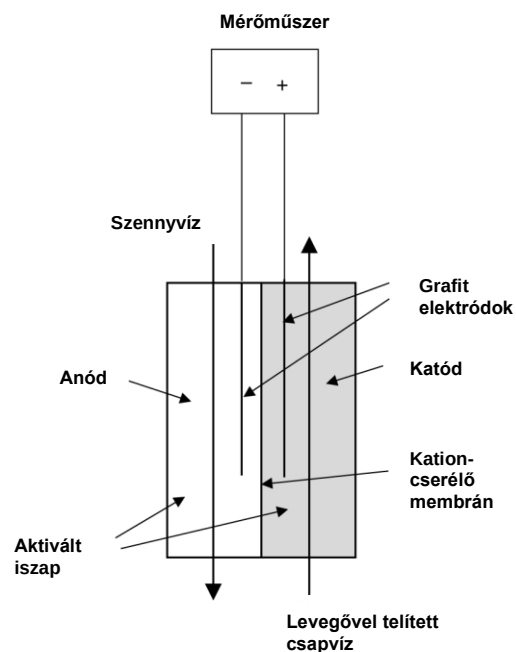
Minél több a metabolizálható anyag a tápoldatban, annál nagyobb a metabolikus aktivitása a sejteknek, ezáltal gyorsabb az oxigénredukció, ez mérhető az elektróddal

Mikrobiális üzemanyagcella alapú BOI bioszenzort is fejlesztettek [Chang és mtsai 2004], melyben az anód és a katód egy kationcserélő gyantával van elválasztva, és elektródok grafit érzékelő típusúak. A kamrát aktivált iszappal töltötték meg mindkét oldalon, és az anód felől szennyvizet, a katód oldalon levegővel telített csapvizet áramoltattak (V.5. ábra). A keletkező áramerősséget mérték, mely a szennyvíz BOI értékével arányos.

Peszticid jelenlétet kimutató bioszenzorok pl. kolin oxidázzal kombinált acetilkolin észteráz enzim alapúak lehetnek. Úgy működnek, hogy az acetilkolinészteráz az acetilkolint kolinná alakítja, és a kolin oxidáz továbbalakítja azt betainná és hidrogén peroxiddá. A H_2O_2 képződés detektálható oxigénelektroddal. Mivel a peszticidek gátolják az acetilkolinészteráz enzim aktivitását, így kevesebb peroxid keletkezik, ami kisebb jelet ad, ezáltal becsülhető a toxikus hatás, illetve a peszticid koncentráció.

A fenol bioszenzorok a fenol oxidációján alapulnak, melyekben pl. tirozináz v. más oxigenázok segítségével a fenol katekollá, ill. kinonná alakul. Az oxigenáz enzimek katalizálta reakcióhoz oxigénre van szükség. Ha a rendszerbe oxigénelektrodot kapcsolunk, mérhető az oxigén felhasználás. Az enzim aktivitást toxikus anyagok gátolhatják ezáltal csökken az oxigén felhasználás, ami detektálható (már 50 ppb konc. szint csökkenést mérni lehet). Fémzennyezés kimutatására is használható, mivel a fémek inaktíválják az oxidázokat, dehidrogenázokat. Baktérium kultúrával és egyszerhasználatos képernyőmásoló elektróddal kombinálva létrehozható egy fémdetektáló bioszenzor.

Gázok kimutatására még nem fejlesztettek ki megfelelő bioszenzorokat, csak a CO₂-ra, melyben szintén oxigénelektrodot használtak, mely baktérium-kapcsolt.



V.5. ábra
Mikrobiális üzemanyagcellán alapuló BOI bioszenzor

A bioszenzorok olcsó, megbízható, precíz környezeti monitorozást tesznek lehetővé, ráadásul valós-idejű analízissel.

V.2.3.4.Toxicitás tesztek

A toxicitás tesztek általában egyféle szennyezővel kivitelezett biotesztek, melyekben azt vizsgáljuk mekkora egy anyag letális dózisa egy specifikus biológiai rendszerre.

Az egy fajt alkalmazó tesztek között nagy számban találhatók rövid ideig tartó vizsgálatok, melyek válasza a szennyezőanyag akut toxikus hatását mutatja, és csak kevésbé képesek a hosszú távú hatások jelzésére. Az akut hatások jelzőszámául az **LC50**-et (Lethal Concentration 50 - amely a vizsgált faj 50 %-ának elpusztulását eredményező koncentráció) használják.

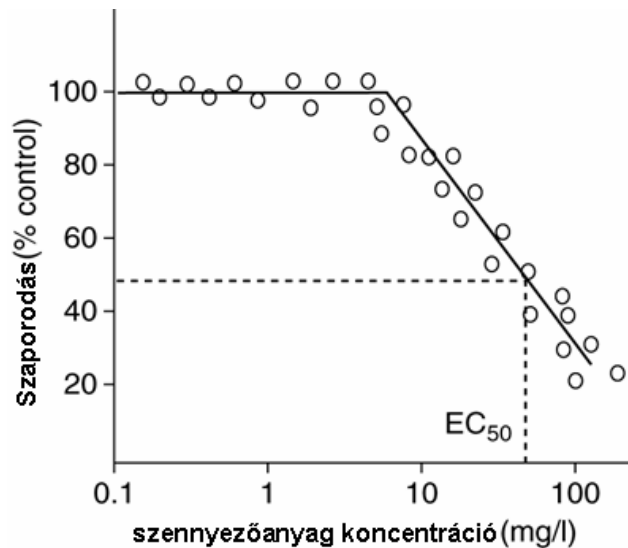
A **tesztorganizmust** körültekintően kell kiválasztani, hogy a kapott eredmény alapján következtetéseket vonhassunk le a magasabb trófikus szintek élőlényekre. A különböző tesztorganizmusok érzékenysége egy adott szennyezőanyagra nagy változatosságot mutat. Egy ökoszisztéma érzékenységét a legérzékenyebb fajok érzékenysége határozza meg. Ezért gyakran a szennyezőanyagra legérzékenyebb fajt választjuk tesztelésre. Természetesen ezen elv megvalósíthatósága csekély, hiszen az ökotoxikológiai tesztelést erősen bonyolítaná az esetről esetre történő tesztorganizmus választás. Ezért biotesztelésre olyan tesztorganizmust célszerű használni, amelynek már ismerjük az érzékenységét különböző szennyezőanyagokra (Gruiz K.: BM jegyzet).

Az egy fajt alkalmazó tesztek többnyire egyszerű laboratóriumi vizsgálatok, így az abiotikus viszonyokat (hőmérséklet, páratartalom, minta állaga) állandó értéken tartják. Ez azt jelenti, hogy a szennyező-anyagokat természetes viszonyaikból kiemelve, vagy azokat megváltoztatva hozzák kapcsolatba a tesztorganizmussal, ami módosíthatja a szennyezőanyag hozzáférhetőségét és ezáltal aktuális toxicitását.

Toxicitás teszteket már régóta használnak, az elsők egyike egy algateszt, melyet 1964-ben fejlesztettek ki vízminőség vizsgálatokra (Skulberg 1964). Azóta is a legnépszerűbbek az alga (főleg édesvízi algákat használó) tesztek. A legtöbb alga tesztben 3-4 nap alatt megjelenik a tesztorganizmus válasza az adott szennyezőanyagra, csökken a szaporodás mértéke, melyet az un. EC_{50} számmal jellemeznek (Effective Concentration 50 – a vizsgált anyag tesztorganizmusra gyakorolt maximális hatásának a fele) (V.6. ábra). A toxicitás teszt eredményét

befolyásolják az adott körülmények, pl. teszthez felhasznált fajok, térfogat, fényintenzitás, stb.

Az édesvízi algák mellett más vízi lényeket is lehet használni tesztorganizmusként, pl. mikroalgák, perifitonok, fitoplanktonok, és a tengeri algák a tengervizek minőségének tesztelésére. Magasabb rendűek szintén szerepelnek a listán, az izeltlábúak közül a vízi bolha, vagy a garnélarák, gerincesek közül leggyakrabban halakat használnak. Végül a táplálkozási lánc legmagasabb szintjén is választottak tesztállatokat, elsősorban madarakat.



V.6. ábra

EC₅₀ érték meghatározása

(a vizsgált szennyezőanyag hatása a tesztorganizmus szaporodására)

A következő néhány sorban egy-két ismertebb toxicitás tesztet mutatunk be. A legkedveltebbek és leglátványosabbak a „világító” tesztek, lumineszkáló szervezetekkel (*Photobacterium fischeri*, *Photobacterium phosphoreum*). Ezekben a tesztekben 15 perc az expozíciós idő, amíg a tesztorganizmus a vizsgálandó anyaggal találkozik. A fényintenzitás csökkenése jelzi a toxikus hatás mértékét. Pl.: MICROTOX, BIOTOX, ToxAlert, stb.

Az Ames tesztet szinte mindenki ismeri, a gyógyászatban leggyakrabban alkalmazott teszt. Olyan vegyületek vizsgálatára fejlesztették ki, melyek a tesztorganizmusokban mutációkat képesek létrehozni. A teszt tartalmaz egy hisztidin

mutáns *Salmonella typhimurium* baktériumot, melynek szaporodásához hisztidinre is szüksége van, valamint a teszt vegyületet patkánymáj kivonattal együtt. A patkánymájra azért van szükség, mert vannak olyan vegyületek, melyek bizonyos enzimek hatására válnak mutagénné, és ezen enzimek nincsenek meg baktériumokban, csak emlősökben. Ha a vizsgált vegyület mutagén, akkor reverz mutáció lép fel a *Salmonella*-ban, és így képes lesz szaporodni hisztidin nélkül is. A megjelenő baktériumtelepek számából lehet következtetni a mutagén hatás mértékére.

Számos új toxicitás teszttel találkozunk ma már, egyre több a molekuláris biológiai markereken alapuló teszt.

Összefoglalva a környezet monitorozására a molekuláris biológiai és rekombináns technológiák pozitív hatással vannak. Lehetővé vált a mikroba populáció vizsgálata *in situ* a mikroorganizmusok szaporítása nélkül. Ráadásul új fajokat lehet felfedezni, és a rekombináns technológia bevetésével egyre jobb bioindikátorok, biomarkerek hozhatók létre.

V.3. Mikrobiális diverzitás

A hagyományos mikrobiológiai technikákkal (izolálás, tiszta tenyészet fenntartása laboratóriumban) tanulmányozható prokarióták aránya a vizsgált környezeti mintáktól függően 0.01 és 15 % között mozog, a teljes prokarióta élővilágra kivetítve ez az érték 0.2-0.5 % lehet (1. táblázat). A környezeti mikrobiológia, a prokarióták ökológiája gyakorlatilag kizárólag a 16S rRNS szekvenciákon alapuló technikákkal tanulmányozható a teljesség igényének feladása nélkül.

Group	Number (times thousands) of validly described species	Estimated number (times thousands) of species	% known species
Micro-organisms			
Prokaryotes	5	>1000	<0.5
Fungi	72	1500	4.8
Protozoa	40	200	20
Algae	40	400	10
Plants	270	320	84
Animals			
Nematodes	25	400	6
Crustaceae	40	150	26
Insects	950	8000	12
Vertebrates	45	45	90

V.1. táblázat

A Földön előforduló fajok becsült száma

Habitat	% cultivatable
Soil	0.3
Sediment	0.25
Fresh Water	0.1-0.5
Ocean	<0.1
Activated Sludge	3-15

V.2. táblázat

A szaporítható mikroorganizmusok aránya a különböző élőhelyeken

Noha a mikróbák központi szerepet játszanak a biotikus folyamatokban, nagyon keveset tudunk valós sokféleségükről. Jelenleg kb 5000 prokarióta fajt ismerünk, de a becsült számuk több mint 10^6 ! A molekuláris technikák fejlődésével új lehetőségek nyíltak a laboratóriumi körülmények között nem szaporítható mikroorganizmusok megismerésére, izolációjára. Ezek genetikai és biotechnológiai jelentősége hatalmas, főleg, ha arra gondolunk, hogy az ismert mikroorganizmusokkal mennyi mindent el tudunk érni.

Mostanában egyre több tanulmány foglalkozik a biodiverzitással, és úgy tűnik, hogy a prokarióták sejtszáma meghaladja az eukarióta sejtszámot a Földön, sőt egyes szerzők kiszámolták, hogy az össz prokarióta biomassza is nagyobb, mint az eukarióta biomassza (azaz nemcsak többen vannak, de összsúlyuk is nagyobb). Természetesen ezek a vélemények becsült értékeken alapulnak, hiszen fentebb említettük, hogy még az 1%-át sem ismerjük a tényleges prokarióta fajok mennyiségének.

Miért fontos számunkra, hogy megismerjük a lehető legtöbb mikroba fajt?

- Alapvető szerepet játszottak a bioszféra kialakulásában. Az első élőlények voltak a Földön és uralmuk kb 3,5 milliárd évig tartott. Az aerob körülmények kialakulásában is döntő jelentőségük volt.

- A biogeokémiai ciklusok a mikrobák közreműködésével teljesek. Különösen a N és S ciklusok, valamint a fémek redukció-/oxidációja a prokarióták aktivitása nélkül elképzelhetetlen volna (ma már ismerünk olyan mikrobákat, melyek veszélyes, radioaktív fémek elektrontranszferjéből nyernek energiát).

- Meglepően nagy fiziológiai és biokémiai változatosságot mutatnak. Pl. lépések redukált szervetlen vegyületeket energiaforrásként (elektron donorként) hasznosítani kemolitotróf metabolizmusukhoz, vagy oxidált szervetlen vegyületeket elektronakceptorként anaerob légzésükhöz. Bizonyos metabolikus utakat csak prokariótáknál figyeltek meg (a prokarióták metabolikus, fiziológiai és genetikai diverzitása sokkal nagyobb, mint a magasabbrendű szervezeteké)

- képesek túlélni extrém körülményeket (pl. 121°C-os hőforrásokban, mélytengerekben nagy nyomás alatt; jégben; extrém alacsony pH környezetben; telített sós oldatban). Mindenhol megtaláljuk őket, ahol a fizikai-kémiai feltételek lehetővé teszik az életet. Gyorsan adaptálódnak a megváltozott környezethez, olyan vegyületeket is bontani képesek, melyek természetidegenek.

- Endoszimbiótikus kapcsolatot képesek létrehozni magasabb rendű szervezetekkel, mely kapcsolat eszenciális, mivel a mikrobák olyan biokémiai folyamatokat katalizálnak, mint pl. eszenciális aminosavak, vitaminok szintézise, stb.

A fentiek alapján egyértelmű, hogy a prokarióták központi szerepet játszanak az életünkben, a Földön, ennek ellenére nagyon kevés ismerettel rendelkezünk róluk. Ennek fő oka, hogy a mai napig csak nagyon kis százalékát lehet tisztán kinyerni, szaporítani az összmikróba fajnak. Ha nincs tiszta kultúra, nincs megismerhető/jellemzhető egyedi tulajdonság.

A molekuláris technikák fejlődése következtében a mikrobiális taxonómia reneszánszát éli. Rekonstruálni lehet a filogenetikai összefüggéseket. A nem szaporítható mikroorganizmusokról is számos információt nyerhetünk.

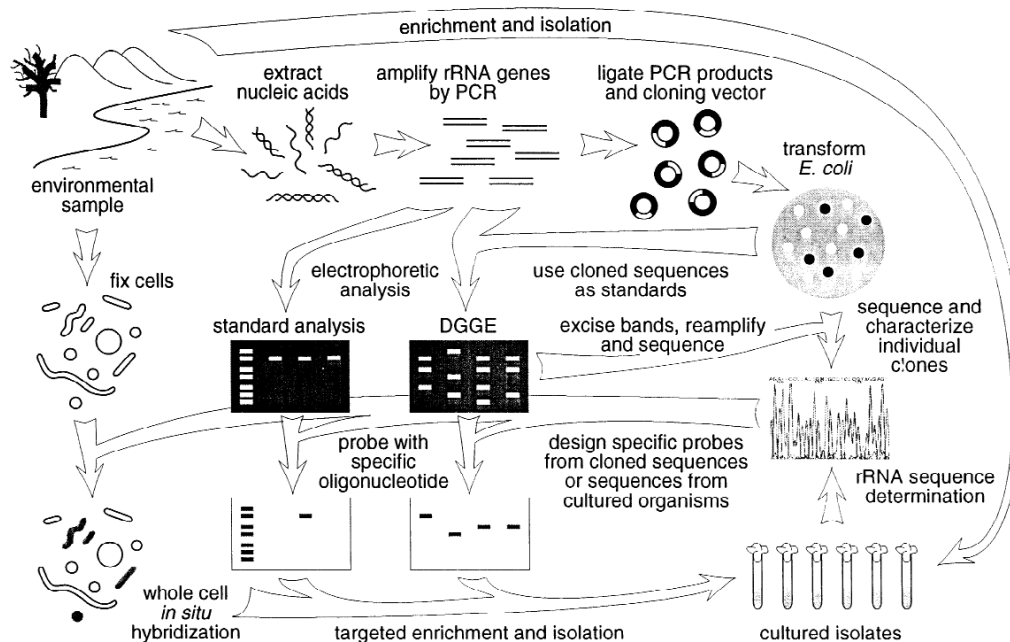
A legjobban a rRNS analízis terjedt el, de sok más módszert is alkalmazhatunk a molekuláris mikrobiális ökológiában (V.7. ábra). Miért is jó az

rRNS technika? A riboszómális RNS-ek mindenhol jelen vannak az élővilágban, szekvenciájuk összehasonlító analízise univerzálisan alkalmazható, melyből következtetni tudunk a szervezetek közötti kapcsolatokra/rokonságra. Az RNS molekulák erősen konzervált szekvencia szakaszai variábilis régiókkal kombinálódnak. A konzervált régiók miatt lehet univerzálisan használni, míg a variábilis régiók a faj, család szintű megkülönböztetést teszik lehetővé.

A különböző élőhelyek mikrobiális sokféleségét akkor tudjuk analizálni, ha a teljes genomot kinyerjük a vizsgálandó élőhelyről gyűjtött mintából. A következő részben a talajból kinyert genetikai anyaggal foglalkozunk.

V.4. Talaj metagenom

A talaj nagyon összetett élőhely. A talaj mikroorganizmusai általában a talajmátrixhoz kapcsolódnak. A sejtek lehetnek egyedül, vagy mikrokolóniát alkotnak, gyakran poliszaharid burokba ágyazva. A mikrokörnyezet jelentősen befolyásolja a sejtek szaporodását, aktivitását. Két egészen közeli mikrokörnyezet is nagyon eltérhet egymástól. Ez a heterogenitás eredményezi a mikrobiális élőhelyek nagy változatosságát és a mikrobák sokféleségét. A mikrobiális heterogenitás a talajban felülmúl minden más környezetet, kimutatták, hogy 1 g talaj több ezer faj akár 10 milliárd egyedét is tartalmazhatja! Jogos tehát a várakozás, hogy a talaj metagenom genetikai sokfélesége még tartogat meglepetéseket, és gazdag forrása lehet ipari jelentőségű enzimek, bioaktív anyagok felfedezésének.



V.7. ábra

Általánosan használt technikák a molekuláris mikrobiális ökológiában

V.4.1. DNS kinyerése a környezeti mintából

Komoly problémát jelent, hogy az *in situ* megfigyelhető mikróba sokféleség, és a szaporító tápon *in vitro* számolható telepszámok (számlálási anomáliák) között eltérés mutatkozik. Torsvik és Goksoyr az 1970-es évek végén rámutatott a mikrobiális DNS közvetlen izolációjának lehetőségére környezeti mintákból. Később Pace és mtsai ezt meg is valósították: a metagenomot egy körny-i mintából extrahálták, részlegesen emésztették, a fragmenteket vektorba ligálták, *E. coli*-ba klónozták, és az rRNS-ket kódoló géneket vizsgálták.

A talaj a legjobb környezet a mikrobiális sokféleség vizsgálatára, de komoly hátránya, hogy a DNS kinyerése során huminsavak is extrahálódnak, melyek gátolják a molekuláris munkákat.

Kétféle extrakciós módszer lehetséges:

- **Közvetlen lizis**, melyet a DNS tisztítása követ

A sejtek lizisére gyakran magas hőmérsékletet, erős detergenset, és mechanikai törést vagy fagyasztás-olvasztás módszert alkalmaznak. Egyszerű

extrakciós eljárás. Jobban reprezentálja a minta valós mikrobiális diverzitását. Leggyakrabban ezt használják, mivel sokféle talajra alkalmazható, kevésbé laborigényes, több DNS nyerhető. Hátránya, hogy kisebb DNS fragmentek keletkeznek.

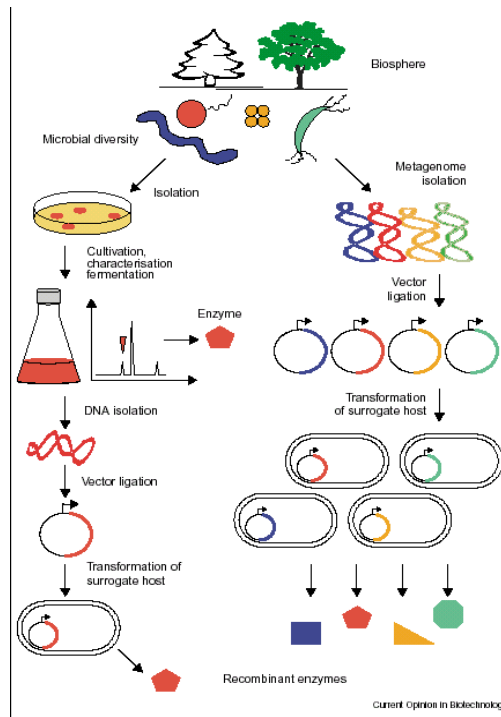
- **Frakcionálás alapú (közvetett):** a baktérium sejteket először kinyerjük tisztán, (esetleg felszaporítjuk), majd ezt követi a sejtek lizise, a DNS kinyerése. Olyan talajminták esetén előnyös, ahol nagy mennyiségű olyan anyagot találunk, amelyek zavarják a DNS izolációt (pl. huminsavak). Tiszta, nagyobb, jó integritású DNS fragmentek nyerhetők, nagy-inszert könyvtár készítésére alkalmas.

Attól függően, hogy mi a célunk használhatjuk a két módszer egyikét, pl. egy egyedi enzimet kódoló gén kinyeréséhez alkalmazható az első megoldás, míg multifunkcionális enzimeket kódoló géncsoportok izolálásához célszerű a második módszert használni.

A genetikai anyag önmagában azonban nem elegendő a mikrobiális környezet megismeréséhez, hiszen bennünket elsősorban az érdekel, hogy mit tudnak ezek a mikrobák. Milyen számunkra, és a környezet számára fontos tulajdonságot hordoznak, milyen fehérjéket képesek szintetizálni, stb. Hogyan juthatunk ezekhez a fontos „termékekhez”:

A szaporítás alapú és metagenom alapú **biokatalitikus termék kinyerés** összehasonlítása (V.8.ábra):

- A szaporítás alapú megközelítéssel a jelenlévő mikrobáknak csak egy részét lehet szelektálni és szaporítani tiszta kultúrában. A szaporítható mikroorganizmusok jellemezhetők, fermentálhatók, és a termék közvetlenül kinyerhető, vagy a gének további tisztítása, klónozása és expressziója szükséges.
- A nem szaporított/szaporítható mikroorganizmusok viszont csak genomjuk extrakciójával hozzáférhetők. Ez esetben az adott környezet összes mikroorganizmusának teljes genomját izoláljuk és klónozzuk egy gazdába (pl. *E. coli*) a további vizsgálatokhoz és termék termeltetéshez.

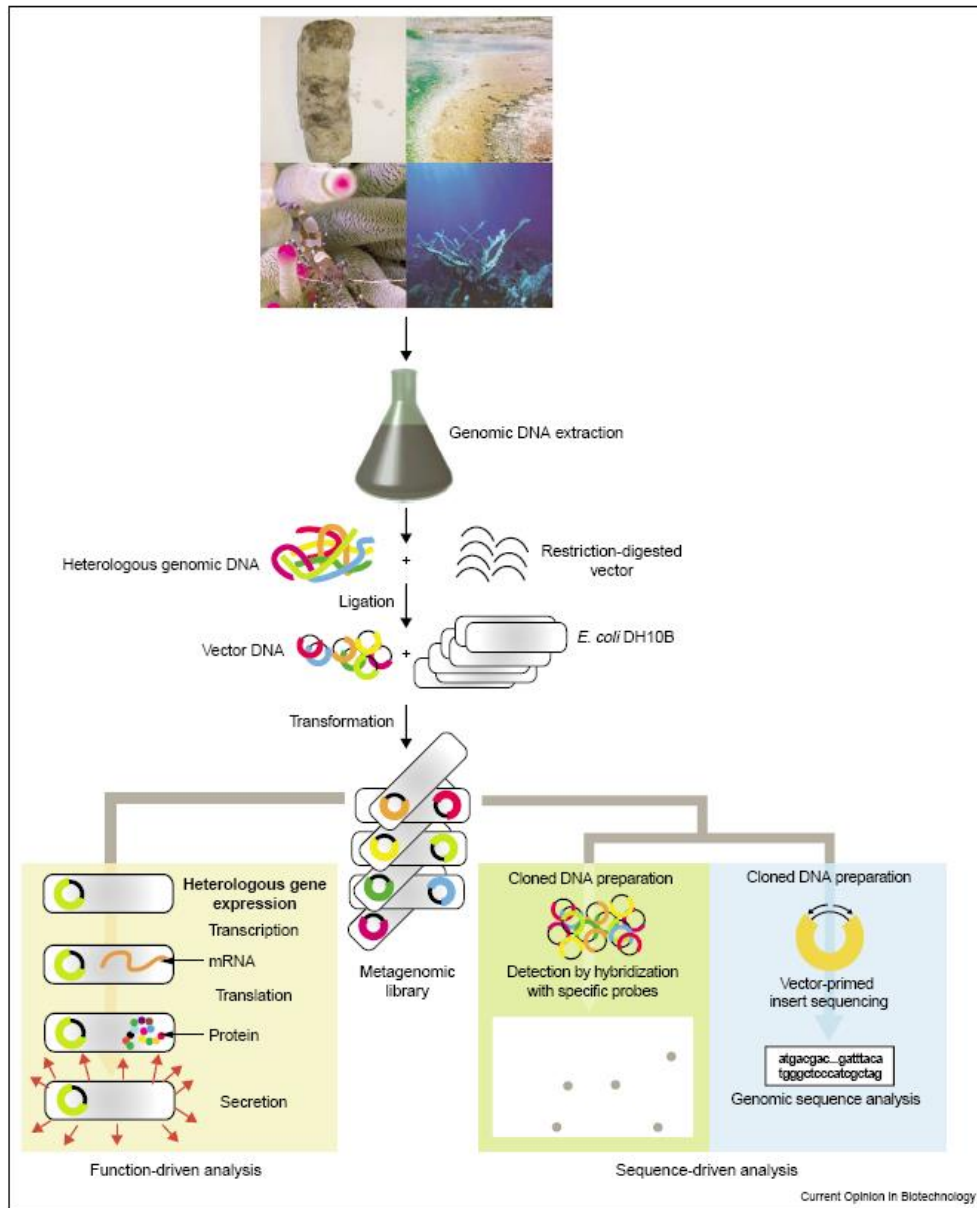


V.8. ábra
Biokatalitikus termék kinyerésének két útja

V.4.2. Metagenom analízis

Az a felismerés, hogy a környezetben élő mikroorganizmusok nagy többsége nem szaporítható standard módszerekkel ösztönzőleg hatott a metagenomika fejlődésére, melyet úgy definiálhatunk, hogy a mikroorganizmusok szaporítása nélküli genom analízis. Két típusát különböztetjük meg (V.9. ábra):

1. Funkció-alapú analízis, melyben eredendően a kifejeződő tulajdonságokra keresünk
2. szekvencia alapú analízis, mely esetben a könyvtárat egyedi DNS szekvenciák keresésével hozzák létre



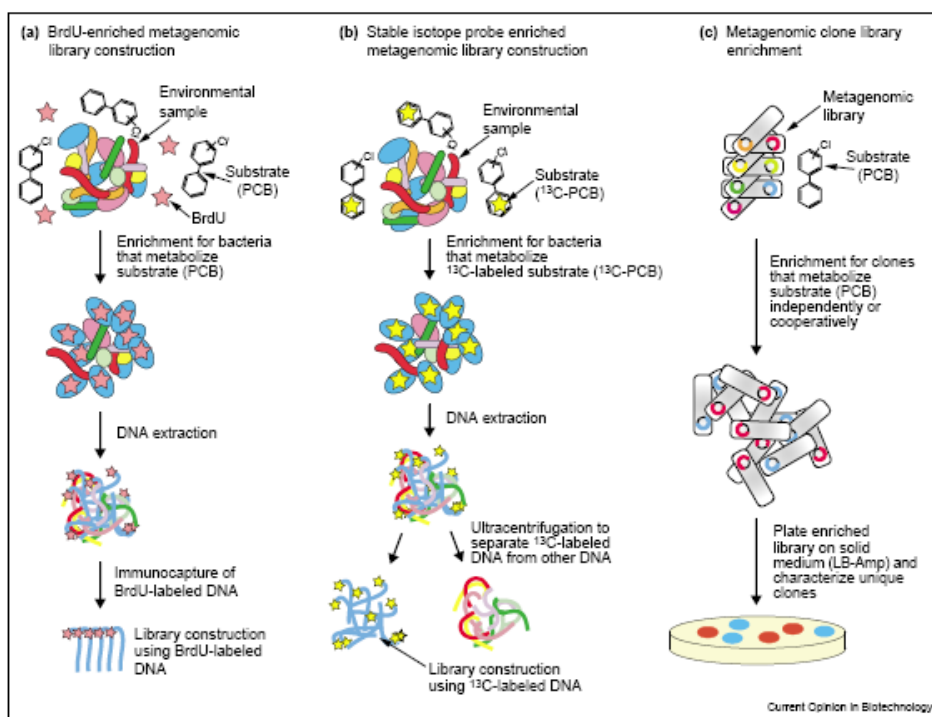
V.9. ábra
Metagenom analízis lehetőségei

Amikor egy környezeti mintából kifejezetten egy bizonyos funkciót szeretnénk megtalálni, akkor alkalmazhatóak az alábbi kísérletek. Pl. egy bizonyos enzim aktivitását szeretnénk kimutatni, nyomonkövetni. Több megközelítés is lehetséges (V.10. ábra):

1. Bróm-jelölt uracilt juttatunk a vizsgált mintába. Amennyiben van metabolikus aktivitása a mintában megbújó sejteknek, az adott szervesanyagot képesek

átalakítani, akkor a reakciót katalizáló enzimek transzkripciója, transzlációja is megtörténik. Mivel az uracil az RNS-ekbe épül be, ha képződik RNS a vizsgált mintában a RNS kinyerése után a bróm segítségével kimutatható, és meghatározható a szekvencia analízise alapján milyen enzim volt aktív.

2. Izotóp jelölt szubsztrátot (^{13}C -mal) juttatunk a mintába, amennyiben van metabolikus aktivitás, az izotóp jelölt szén molekula beépül a sejtanyagba, és az izoláció után izotópos méréssel kimutatható
3. A mintából kinyert DNS darabokat vektorokba építjük, melyeket gazdasejtbe (pl. *E. coli*) juttatunk. A felszaporított klónok enzimaktivitását vizsgáljuk az adott szervesanyagon. Amelyik klón képes szaporodni, az hordozza a lebontásért felelős enzim(ek) génszekvenciáját.



V.10. ábra

Specifikus DNS dúsítása környezeti mintából különböző technikákat alkalmazva

A fent felsorolt technikákon kívül még nagyon sokféle lehetőség van a genomok vizsgálatára, azonban azok megértéséhez komoly molekuláris biológiai alapok szükségesek, ezért ezeken a lapokon erre nem térünk ki.

V.5. Irodalomjegyzék

- Amman, R., W. Ludwig, K-H. Schleifer (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169
- Daniel, R. (2004) The soil metagenome – a rich resource for the discovery of novel natural products. *Curr. Op. Biotechnol.* 15:199-204
- Handelsman, J. (2004) Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:669-685
- Lorenz, P. K. Liebeton, F. Niehaus, J. Eck (2002) Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Curr. Op. Biotechnol.* 13:572-577
- Rieger, P.-G., H.-M. Meier, M. Gerle, U. Vogt, T. Groth, H.-J. Knackmuss (2002) Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence. *J. Biotechnol.* 94: 101-123
- Schloss, P.D., J. Handelsman (2003) Biotechnological prospect from metagenomics. *Curr. Op. Biotechnol.* 14: 303-310
- Scragg, A. (2005) *Environmental Biotechnology*. Oxford University Press, ISBN 0-19-926867-3. 73-111 o.
- Sharkey, F.H., I.M. Banat, R. Marchant (2004) detection and quantification of gene expression in environmental bacteriology. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3795-3806
- Widada, J., H. Nojiri, T. Omori (2002) Recent developments in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotic-degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:45-59

VI. IMMOBILIZÁLÁS

Dr. Perei Katalin

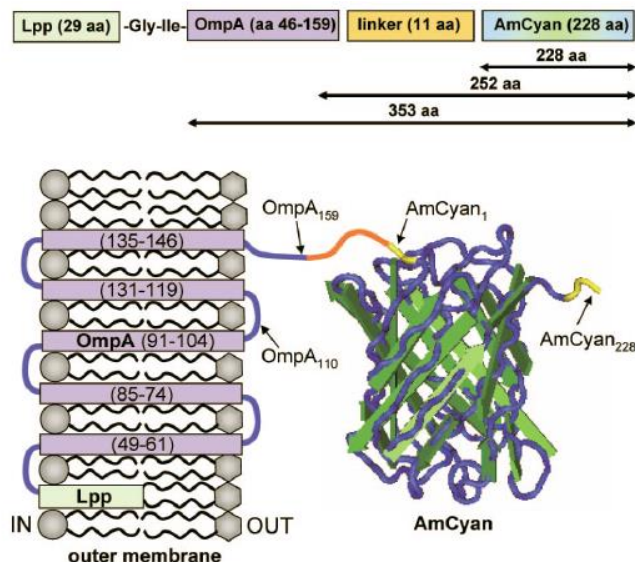
Tartalomjegyzék

VI. IMMOBILIZÁLÁS	243
VI.1. Az immobilizálás jelentősége, előnyei, hátrányai	245
VI.2. Immobilizálási stratégiák (VI.2.ábra)	246
VI.2.1. Hordozók	246
VI.2.2. Immobilizálás felületi rögzítéssel	246
VI.2.3. Immobilizálás bezárással	247
VI.2.3.1. Alginát	248
VI.2.3.2. Gelrite	250
VI.2.3.3. Karrageenan	251
VI.2.3.4. Kitozán (és kitin)	252
VI.2.3.5. Ciklodextrin	254
VI.2.3.6. Poliakrilamid	254
VI.2.3.7. Polisztirol	255
VI.2.3.8. Poliuretán	256
VI.3. Immobilizált mikroorganizmusok bioremediációs alkalmazása	256
VI.3.1. Példák:	257
VI.3.1.1. Herbicidek, peszticidek biodegradációja immobilizált sejtes rendszerben	257
VI.3.1.1.1. Szerves-foszfát peszticidek bontása:	257
VI.3.1.1.2. Glifozát bontása:	258
VI.3.1.1.3. Alachlor, propachlor biodegradációja	259
VI.3.1.2. Fenolos hulladékok bontása	259
VI.3.1.2.1. Fenol bontása gombával	259
VI.3.1.2.2. Fenol bontás kevert kultúrával	259
VI.3.1.2.3. Klórfenolok bontása immobilizált sejtek tiszta kultúráival	260
VI.3.1.2.4. Pentaklórfenol bontása	261
VI.3.1.2.5. p-nitrofenol (PNP) bontása	262
VI.3.1.3. Poliklórozott bifenilek bontása	263
VI.3.1.4. Morfolin bontás	264
VI.3.1.5. Nikkel - ötvözet szálakon létrehozott Thiobacillus ferrooxidans biofilm vas-szulfát oxidációja	266
VI.3.1.6. Higany biotranszformáció fluid-ágyas bioreaktorban	267
VI.3.1.7. Felületaktív anyag bontása alginát/pektát gélbe immobilizált <i>Comamonas terrigena</i> baktériummal	269
VI.3.1.8. Kadmium eltávolítása bioszorbens segítségével	270
VI.3.2. Biokompozitok	271
VI.4. Összefoglalás	273
VI.5. Irodalomjegyzék	273

Bevezető

Bár sok mikroba előfordul talajban, természetes vizekben, a lebontó folyamat során használt sejtek esetén törekednünk kell arra, hogy a sejtek ne távozzanak el a reakciótérből, egyrészt, hogy a bontó aktivitás ne híguljon, ne vesszen el, másrészt, hogy ne szennyezzük a tisztított környezetet.

A mikroorganizmusok többsége életciklusa bizonyos szakaszában igyekszik egy szilárd felülethez kötődni [Akin 1987], vagy egymással kapcsolódni (mint biofilm vagy granulumokként) [Sanchez 1994] (VI.1. ábra). Erre a tulajdonságukra alapozva az 1980-as évek elején intenzív kutató munka folyt enzimek, sejtek immobilizálását megoldó eljárások kidolgozására. Az élő sejtek polimer gélbe zárását és gélen belüli növekedését először Updike és mtsai írták le 1969-ben [Phillips 1988]. Azóta számos szellemes módszert kísérleteztek ki a világ több kutató laboratóriumában [Phillips 1988]. Elterjedtek ezek a rögzítő eljárások a fermentáló folyamatokban, a bioreaktorokban egyaránt kiszorítva a hagyományos szabadsejtes műveleteket. Az immobilizációs technikák előnye, hogy nagy sejtsűrűséget lehet elérni a lebontó vagy átalakító folyamatokban, és a művelet végén olcsón és hatékonyan el lehet távolítani a sejteket.



VI.1. ábra

A sejtek a szilárd felszínhez egy/több fehérjén keresztül kapcsolódnak

VI.1. Az immobilizálás jelentősége, előnyei, hátrányai

Az immobilizálás a sejtek, szövetek, fehérjék kötődésének vagy bezárásának különböző formáit összefoglaló fogalom a biotechnológiában.

Tudományos és ipari jelentősége pl. aminosavak, szerves savak, antibiotikumok, szteroidok, enzimek előállítása, környezeti alkalmazásuk is egyre jobban terjed.

Előnyei:

- Védjük a rögzített sejteket a külső behatásoktól, valamint megakadályozzuk eltávozásukat a reakciótérből
- Állati és növényi sejteket, szöveteket is lehet immobilizálni
- Számos biokatalitikus rendszer számára előnyös
- Javul a metabolikus aktivitása a sejteknek
- Plazmid stabilitás nő
- Kisebb a fertőzés veszélye
- Könnyebben tárolható

Milyen paramétereknek kell megfelelnie egy jó hordozónak:

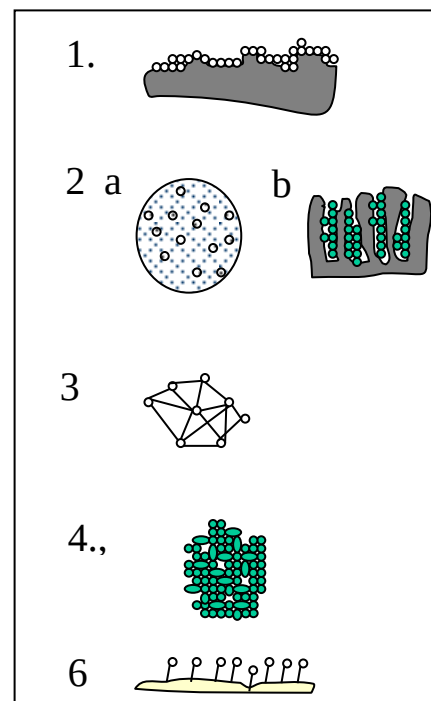
- Nem-toxikus
- Nem szennyező
- Jó minőségű, hosszú élettartam
- Biztosított legyen a sejtaktivitás és denzitás
- Biztosított legyen a sejtek kijutása a célhelyre (ha szükséges)

Hátrányok:

- A szaporodó sejtek kiszabadulhatnak az immobilizáló anyagból, ha szétfeszítik azt
- A diffúziós barrier a mátrix, vagy a nagy sejtsűrűség miatt növekedhet
- Aerob rdsz-knél az oxigénhez gátolt lehet a hozzáférés

VI.2. Immobilizálási stratégiák (VI.2. ábra)

1. felületi adszorpció
2. bezárás (2a: encapsulation, 2b: entrapment)
3. keresztkötés
4. biofilm képzés
5. aggregátum képzés, flokkuláció
6. hordozóhoz kötés (ionos, kovalens)



VI.2. ábra

Immobilizálási stratégiák

VI.2.1. Hordozók

Természetes polimerek:

agar, agaróz, alginát, karragenan, cellulóz,
kollagén,

Szintetikus polimerek:

poliakrilamid, polisztiirén, poliuretán

Egyéb:

üveg, kerámia, agyag, apatit, alginit,
ioncserelő gyanták

VI.2.2. Immobilizálás felületi rögzítéssel

A sejtrögzítési eljárások különféle fizikai/kémiai kölcsönhatáson alapulhatnak [Akin 1987, Phillips 1988]. A sejtek természetétől és a környezettől függően használhatunk szilárd hordozókat (pl.: granulátumokat: zeolit, üveggyöngy, égetett agyag, stb.) a sejtek adhéziójára, vagy adszorbcijára. Kialakíthatunk keresztkötéseket a sejt és egy hordozó, és sejt-sejt között is, hisz a sejtek fala tartalmaz olyan funkciós csoportokat ($-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$), melyek alkalmasak kovalens kötések kialakítására. Ezen az alapon hoztak létre keresztkötéseket sejtek és különféle hordozók (ioncserelő gyanta, szilika gél) között [Akin 1987]. Ezekben a módszerekben a sejteket alapvetően a hordozó anyagok felületén rögzítették.

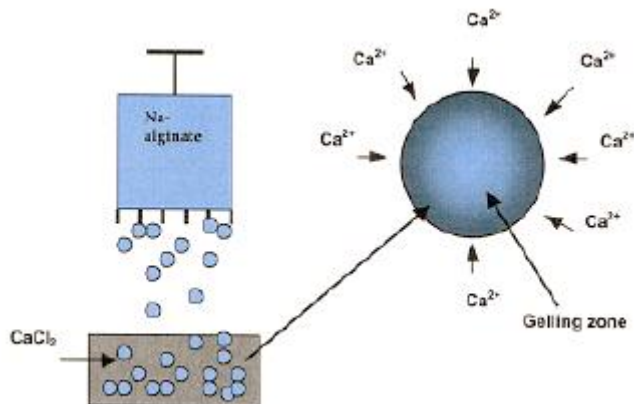
A Mavicell-Si szilíciummal nehezített, cellulóz alapú, gyöngy formájú hordozó (a Zoltek Rt. cég gyártmánya), melynek rendkívül nagy felülete előnyösen

használható sejtek adszorpciójára. Szerkezeténél fogva igen kiterjedt makro- és mikropórus rendszert tartalmaz. Rögzítés szempontjából átmenetet képez a felületi adszorpciós és a bezáráson alapuló immobilizációs technikák között, mert a sejtek nemcsak a cellulóz gyöngy felületén, hanem a belsejében is kitapadnak a cellulóz szálakhoz.

VI.2.3. Immobilizálás bezárással

Alkalmazhatunk olyan üreges szerkezeteket, melyek kis molekulák számára átjárhatóak, viszont a sejteket egy térrészen belül rögzítik. Az egyik legalkalmasabb rögzítés típus olyan gél kialakítása, melybe a sejteket különböző polimerek *in situ* térhálósítása segítségével zárjuk be. Az ilyen térhálós polimerek egyaránt lehetnek egy- és többkomponensűek. Természetes gélek (mint pl.: az agar, agaróz, alginát, karrageenan, kollagén, glükán, zselatin), kémiaiilag módosított természetes polimerek (pl.: cellulóz- acetát) és szintetikus gélek és polimerek (poliakrilamid, poliazetidin, polihidroxi-etilmetakrilát, stb.) mind alkalmazhatók sejtek immobilizálására, bezárására [Akin 1987; Phillips 1988].

Természetes polimereket alkalmaznak mikrobiális, növényi és állati sejtek bezárására, enzimek, sejtalkotók rögzítésére [Phillips 1988, Stormo 1992]. A sejtek, enzimek természetétől, és a kísérletek céljától nagymértékben függ, hogy melyik: felületi rögzítésen vagy bezáráson alapuló eljárás a célszerűbb [Akin 1987]. A sejtek bezáráson alapuló immobilizálása esetén néhány fontos paraméterre oda kell figyelni, pl. a gél gyöngyök átmérője, rugalmassága, permeabilitása az alkalmazott pufferrel, vegyszerrel szembeni stabilitása. Stormo és mtsai olyan immobilizáló készüléket állítottak össze [Stormo 1992], mely egy lyukacsos csövön keresztül, alacsony nyomáson a sejtekkel elkevert monomer oldatot átspricceli a polimerizáló folyadékba (VI.3. ábra). Ezzel a módszerrel rendkívül apró 2-50 μM átmérőjű gyöngyöket tudtak készíteni, melyek teljesen átjárhatóak voltak az oxigén számára. Míg a 2-3 mm átmérőjű gyöngyök esetén az immobilizált sejtek aktivitása elmaradt a szabadsejtes aktivitástól, a mikrokapszulákban ez az érték közel azonos maradt.

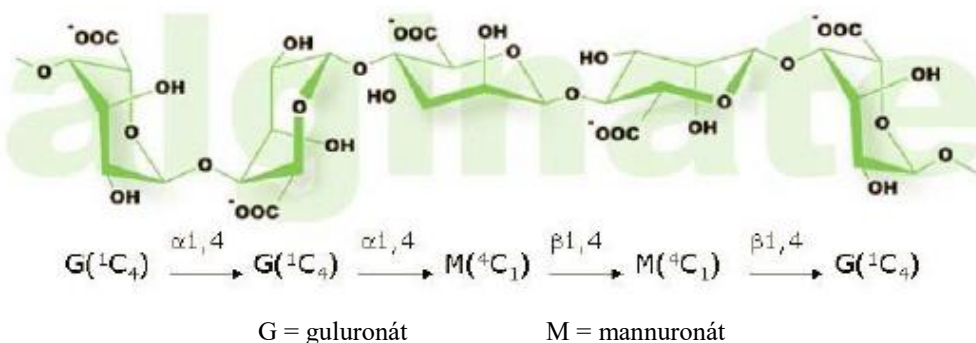


VI.3. ábra

Alginát gyöngyök képzése, ez esetben a gélesítő oldat CaCl_2 -ot tartalmaz (más polimerek esetén más gélesítő folyadékot használnak)

VI.2.3.1. Alginát

Az alginát a legnépszerűbb olyan természetes polimer [Protan 1977; Akin 1987], melyet immobilizálásra használnak. Barna algából nyerik. Ebben a lineáris kopolimerben β -D-mannuronsav és α -L-guluronsav molekulák 1,4-glikozid kötéssel kapcsolódnak egymáshoz (VI.4. ábra).

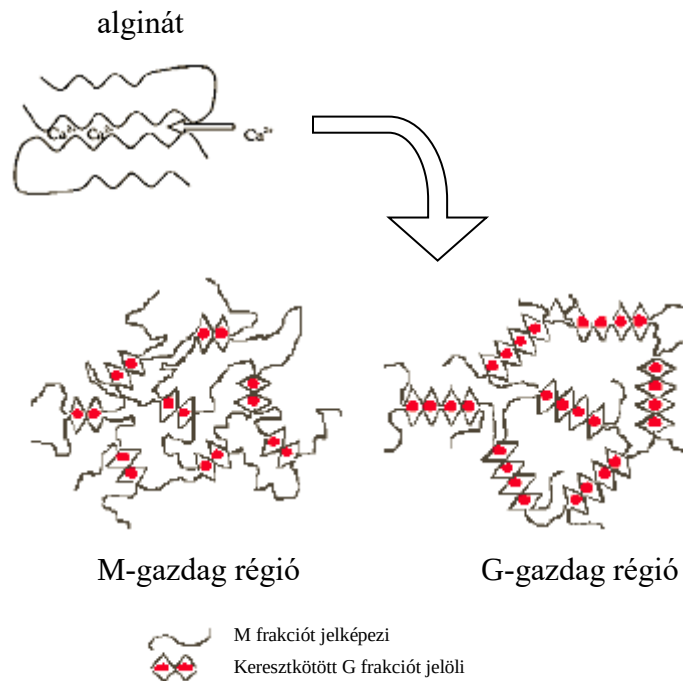


VI.4. ábra

Az alginát szerkezeti képlete

A polimerláncon belül mind a két fajta monomerből homopolimer blokkok találhatóak, és a blokkokat mindkét molekulát tartalmazó kevert szakaszok választják el (VI.5. ábra). A polimer viszkozitását a molekulák átlagos méretén kívül a guluronsav tartalom határozza meg. A guluronsav molekulák képesek Ca^{2+} ionon

keresztül egymással kapcsolódni, ez az oka, hogy a guluronsav blokk tartalom a fő meghatározója a gél szilárdságának, pórusméretének és stabilitásának [Martinsen 1989].

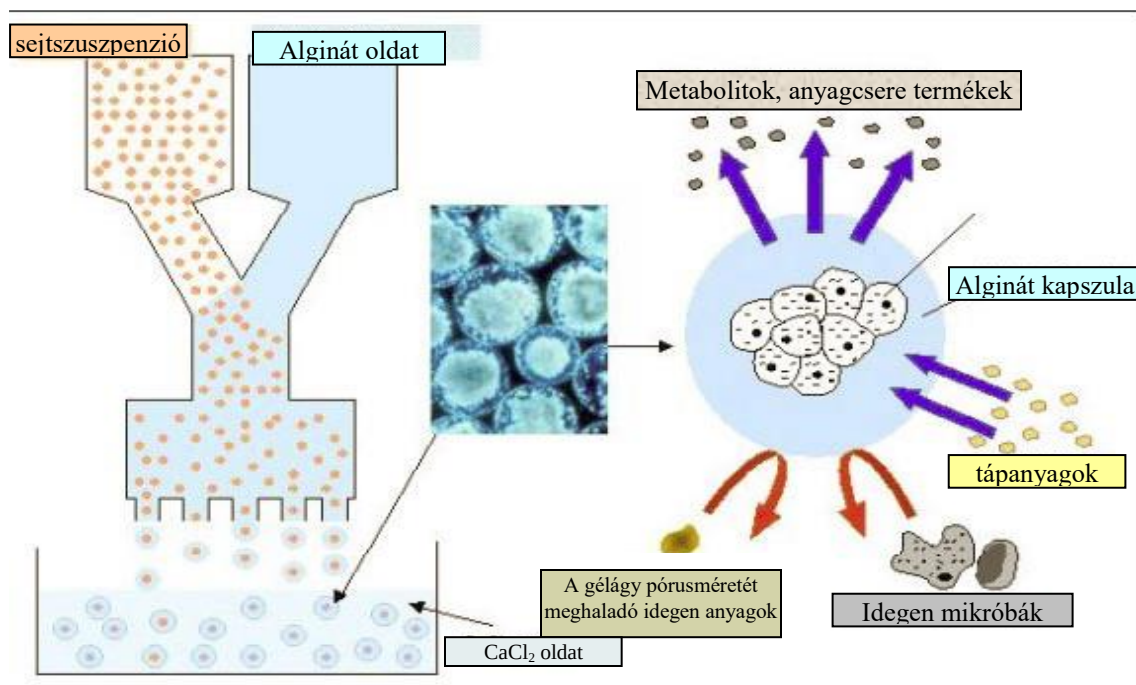


VI.5. ábra

Az alginát polimer térhálós szerkezetének kialakulása

Az alginát nagy előnye, hogy nem toxikus, könnyen kezelhető, semleges körülmények között stabil, és a környezetbe kerülve lebomlik [Protan 1977; Akin 1987]. Alkalmazásával a sejtek csak viszonylag enyhe kezelésen mennek keresztül (VI.6. ábra), mert szerkezete kompatibilis a legtöbb élő sejt falával, kémiai módosításra egyáltalán nincs szükség.

Megfigyelték, hogy a gélgyöngyök nagysága jelentősen befolyásolja a sejtek anyagcseréjét [Kurosawa 1989; Martinsen 1991]. Megállapították, hogy 0,1-0,2 mm átmérőjű gyöngyök esetén optimális az oxigén diffúzió [Kurosawa 1989], ugyanakkor figyelembe kell venni azt is, hogy az egészen apró gyöngyöket nehéz kezelni, ezért a legtöbb eljárásban 0,8-5,0 mm átmérőjű gyöngyöket használnak [Akin 1987].



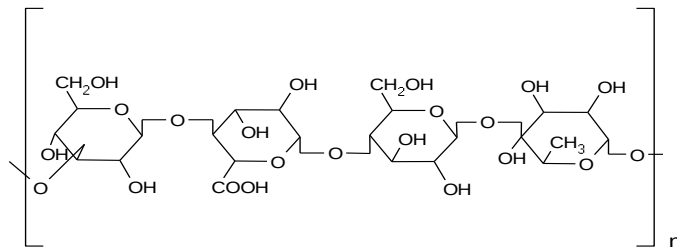
VI.6. ábra

Az alginát gélágy kialakítása egyszerű, sejt- és környezetbarát módszer

Önmagában az alginát gél nem képes tökéletesen visszatartani a sejteket, (pórusméretét jelentősen befolyásolja a Ca^{2+} koncentráció). Az eljárást tovább fejlesztettük, minthogy környezetvédelmi szempontból fontos, hogy a sejtek ne jussanak a környezetbe. Az alginát mellett gelrite polimert alkalmaztunk, mely segítségével meg tudtuk akadályozni a gyöngyök szétesését [Kovács 1991, Perei 1998].

VI.2.3.2. Gelrite

A gelrite természetes anionos heteropoliszacharid, mely rigid, törékeny, agar-szerű gél [Shungu 1983]. Egy ismétlődő tetraszacharid egységből felépülő polimer, glükóz, glükuronsav és rhamnóz molekulák építik fel (VI.7. ábra).



VI.7. ábra
A gelrite szerkezeti képlete

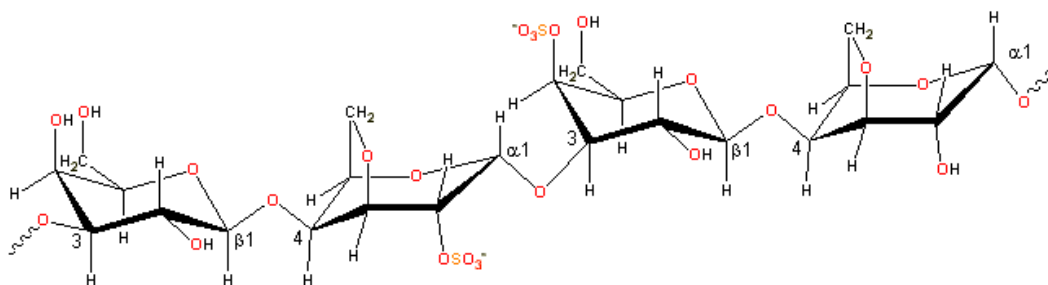
A gelrite egy- és kétértékű ionokkal is gélesedik, de a kétértékű kationok sokkal alkalmasabbak a térháló kialakítására alacsonyabb koncentrációban is. Ezek a tulajdonságok hasonlítanak a széles körben használt agar-agarhoz. Előnye az agarral szemben, hogy kevesebb anyagot kell használni, és nagyobb tisztaságú. Magas hőmérsékleten stabil, ellenáll az enzimes lebontásnak, nem toxikus. Közelítőleg 100°C-ra kell melegíteni, hogy a kationok jelenlétében teljesen feloldódjon, és homogén oldatot kapjunk. Ha már lehűlt és a gélképződés végbement, újramelegítve még 80°C-on is stabil, szilárd marad több napon át. Ezért a gelrite-nak nagy jelentősége van termofil szervezetek táptalajon növesztésében, valamint magas hőmérsékleten zajló fermentációs eljárásokban.

VI.2.3.3. Karrageenan

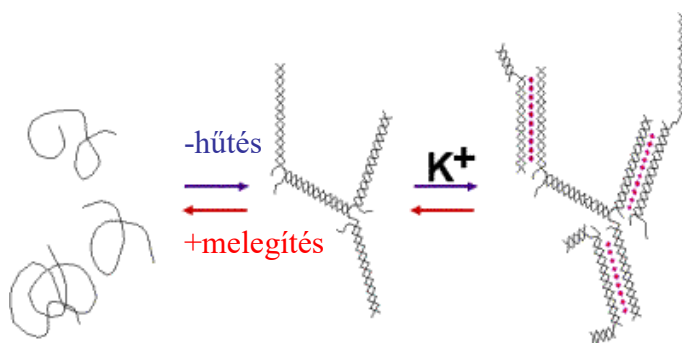
Vörös algák (*Rhodophyceae*) termelik (VI.8. ábra). A különböző vörös alga fajok különböző típusú karrageenant termelnek, melynek 3 alaptípusát különböztetjük meg ι -, λ -, és κ -karrageenan (VI.9. ábra). Nagyon sokféle formában megtaláljuk, de az alapváz közös: $\beta(1,3)$ -D-galaktóz és $\alpha(1,4)$ -D-galaktóz molekulák váltják egymást, viszont eltérnek abban, hogy a két cukor melyik pozícióban hordoz szulfoncsoportot, és mennyi szulfoncsoportot tartalmaz. A gélesedés hőmérsékletfüggő folyamat, K^+ ionok jelenlétében (VI.10. ábra). Hátránya, hogy a folyadék állapothoz legalább 40°C szükséges, mely az immobilizálandó mikrobák többségének kedvezőtlen.



VI.8. ábra
Eucheuma sp. (vörös alga)



VI.9. ábra
κ-karrageenan szerkezete

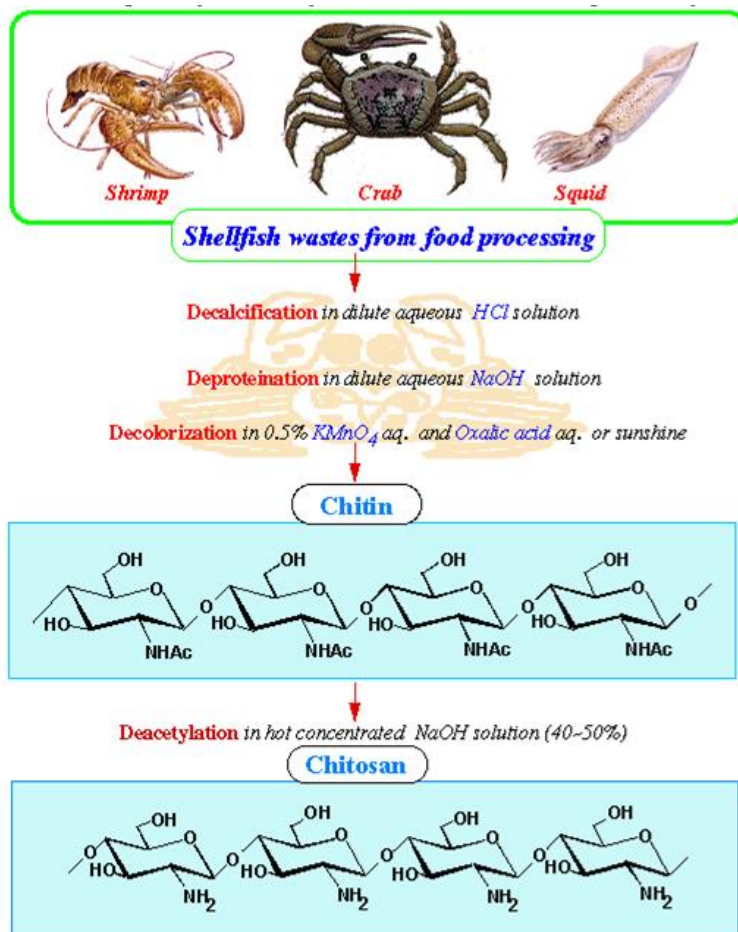


VI.10. ábra
A karrageenan kálium jelenlétében hideg vízben nem oldódik, melegítés hatására azonban oldékonnyá válik

VI.2.3.4. Kitozán (és kitin)

A kitozán kationos polimer, D-glükózamin egységekből épül fel, melyet a kitin deacetilálásával nyernek (VI.11. ábra). A legtöbb savban, főleg szerves savakban oldható. Nem toxikus, biológiai úton lebontható. Kozmetikai, orvosi, élelmiszeripari jelentősége is van. A többi természetes polimerhez hasonlóan a kitozán is gélesíthető,

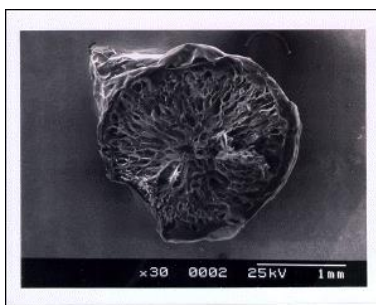
immobilizálási eljárásokban használható (VI.12. ábra). Gyakran alkalmazzák a gelrite-hez hasonlóan kompozit gélek előállítására.



VI.11. ábra

A kitin és kitozán szerkezete

Tengeri herkentyűk páncéljának/vázának alkotó eleme a kitin, acetilált szénhidrát polimer, melynek deacetilálásával nyerik a kitozánt



VI.12. ábra

Kitozán gyöngy

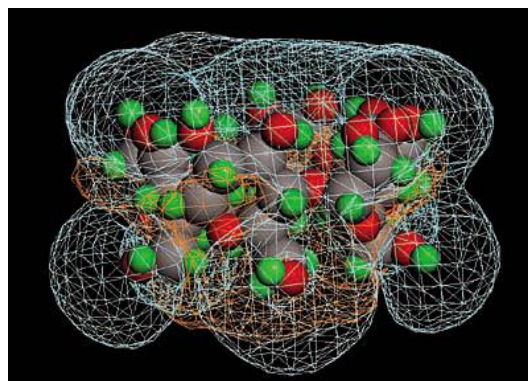
VI.2.3.5. Ciklodextrin

A ciklodextrin keményítőből előállítható, belül üreges, henger alakú molekula, amelybe, mint egy kapszulába, bezárhatók más anyagok molekulái (VI.13. ábra). A keményítőben a kötéseket a térállású hidroxilcsoportok hozzák létre, minden kötés ugyanolyan irányba fordul, ezért a keményítő molekulája úgy csavarodik, mint egy spirálrugó, vagyis hélixszerkezetű (VI.14. ábra). A *Bacillus macerans* (és néhány egyéb mikroorganizmus) által termelt enzim ezt a spirálrugó alakú szerkezetet úgy hasítja el egyszerre két helyen, hogy egyúttal össze is zárja a keletkező két szabad végcsoportot, s így alakul ki a ciklodextrin-szerkezet. E molekuláris „csomagolóanyag” lehetővé teszi, hogy új, a meglevőknél hatékonyabb gyógyszereket gyártsunk, illetve környezeti alkalmazhatósága is bizonyított, mivel immobilizálja a szennyeződések, vagy akár a remediációhoz használandó mikrobákat.



VI.13.ábra

A „csomagolóanyag” sematikus ábrázolása

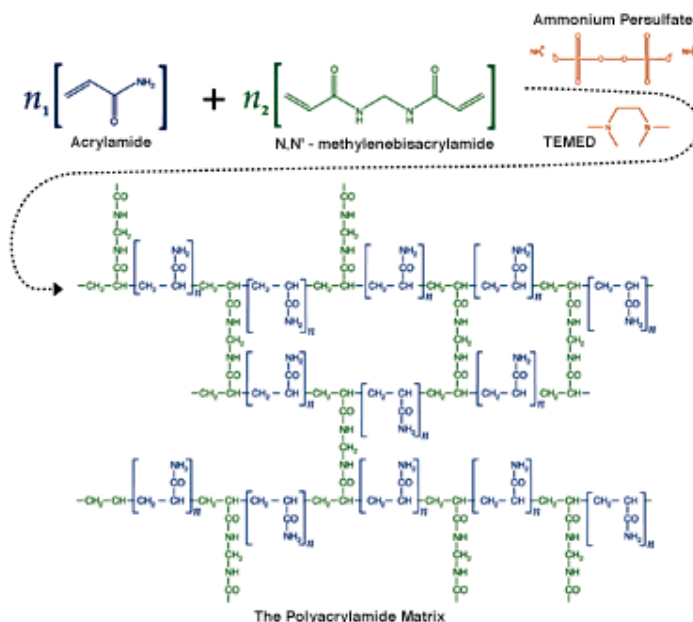


VI.14. ábra

Alfa-ciklodextrin (a hidrogénatomokat zöld, az oxigént piros, a szén szürke színű gömbök jelölik)

VI.2.3.6. Poliakrilamid

Az akrilamid gyökképző (ammónium perszulfát) hatására lineáris polimert képez, s ezt a polimerizációs folyamatot katalizátorral (TEMED) lehet gyorsítani. A térhálós polimer szerkezet kialakítása bis-akrilamid alkalmazásával oldható meg (VI.15. ábra). Ilyen térhálós szerkezet nemcsak makromolekulák, fehérjék, nukleinsavak elválasztását, de immobilizálását is lehetővé teszi.

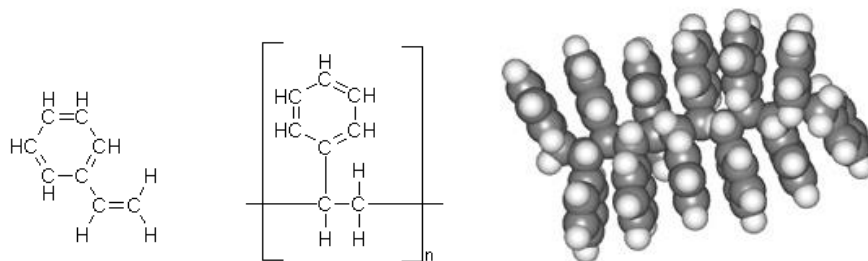


VI.15. ábra

A poliakrilamid polimer kialakulása

VI.2.3.7. Polisztirol

Polisztirollal mindenhol találkozunk környezetünkben. A polisztirol a stírol polimerizációs terméke, policiklusos aromás szénhidrogén (VI.16. ábra). Monomerje, a stírol, mely a kőolaj feldolgozás egyik mellékterméke, normál hőmérsékleten meglehetősen állandó (az Egészségügyi Világszervezet (WHO) szabványa szerint azonban mérgező, és rákkeltőként is figyelembe kell venni). Könnyen polimerizálódik. A polisztirol ellenáll a savaknak, lúgoknak, de a legtöbb szerves oldószer megtámadja, és érzékeny a fényre is. Az 1930-as évektől használják intenzíven, először szintetikus gumit állítottak elő belőle.

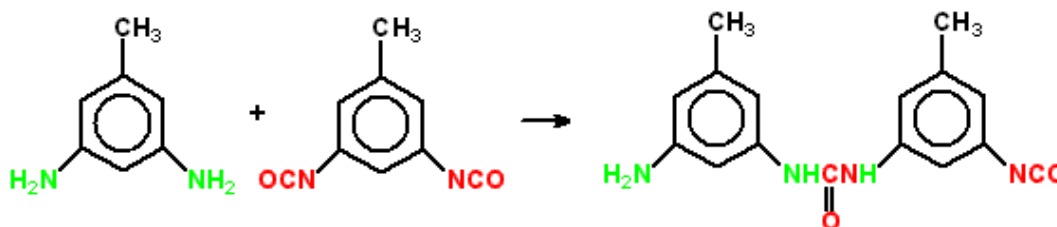


VI.16. ábra

A stírol és a polisztirol szerkezete

VI.2.3.8. Poliuretán

A poliuretán (PUR) csaknem korlátlan lehetőségekkel bíró termoplasztikus műanyag. Régóta alkotóeleme mindennapi életünknek. Két, speciális receptúra szerint előállított komponensből (A - poliol, B - izocianát) áll (VI.17. ábra), melyből az adalékok mennyisége és minősége, valamint a komponensek keverési aránya alapján kemény, félkemény és lágy habanyagok, öntőmasszák, lágy vagy kemény elasztomerek gyárthatók a legkülönbözőbb felhasználási célokra.



VI.17. ábra
A poliuretánok szintézise

VI.3. Immobilizált mikroorganizmusok bioremediációs alkalmazása

Az immobilizációs módszerek előnyeit hamar felismerték a toxikus vegyületek lebontásával foglalkozó biotechnológusok. Számos lebontó eljárásban alkalmaznak sejtrögzítő módszereket a reakcióidő és a hatékonyság növelése érdekében [Heitkamp 1990; Caldwell 1991; Stormo 1992; Hallas 1992; Anselmo 1992; Siahpush 1992; Sanchez 1994]. Heitkamp és mtsai a p-nitrofenol lebontását optimalizálták három *Pseudomonas* faj egy speciális kovaföldre rögzítését követően bioreaktorban [Heitkamp 1990]. Hasonló immobilizáló felületet találtak alkalmasnak Hallas és mtsai a glifozát (N-foszfometilglicin) bontására szennyvízből [Hallas 1992]. A glifozát bontó baktérium populáció e hordozóhoz kötődve bioreaktorban 99%-ban eltávolította a szubsztrátot a szennyvízből megfelelő előkezelés után. A rendszert 60 napig folyamatosan működtették eredményesen. Anselmo és mtsai fenolos szennyvíz kezelésére dolgoztak ki poliuretán habba történő bezáráson alapuló módszert [Anselmo 1992]. Egy érdekes **koimmobilizálási** eljárásban [Siahpush 1992] a

pentaklórfenol lebontására Ca-alginát gélbe *Arthrobacter* sejtekkel együtt aktív szénport zártak. Az aktív szénpor adszorbensként megkötve a lebontandó anyagot, a sejtek körül alacsonyabb szubsztrát koncentrációt biztosított, mely a sejtek túlélését segítette. Másrészt az aktív szén szemcsék a sejtek extracelluláris enzimeit, melyek a lebontó folyamatban fontos szerepet tölthetnek be, szintén adszorbeálták, ezzel biztosítva, hogy az enzimek ne mosódjanak ki, és a biodegradáció hosszú ideig működjön a bioreaktorban. További előnye az eljárásnak, hogy az adszorbens segítségével gyorsabban eltávolítható a szennyező komponens, így nagyobb átfolyási sebesség alkalmazható a bioreaktorban.

VI.3.1. Példák:

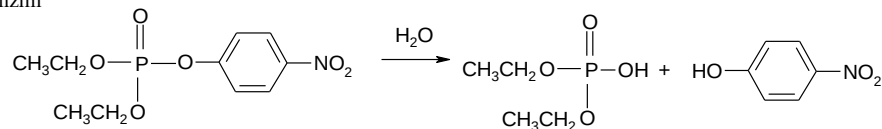
VI.3.1.1. Herbicidek, peszticidek biodegradációja immobilizált sejtes rendszerben

VI.3.1.1.1. Szerves-foszfát peszticidek bontása:

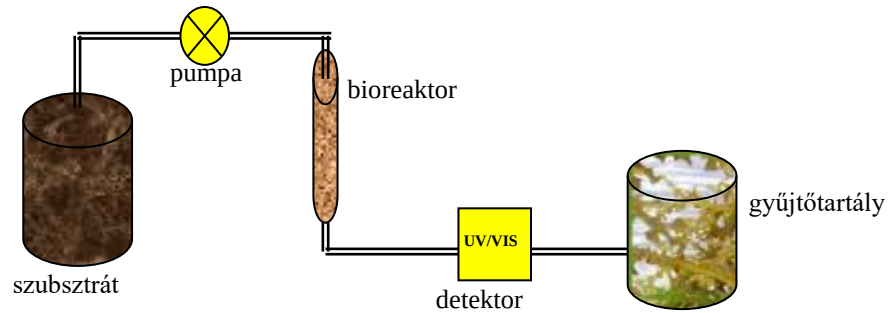
Pseudomonas diminuta sejtek foszfortriészteráz enzime igen széles szubsztrát specifikással bír.

paraoxon hidrolízis:

foszfortriészteráz enzim



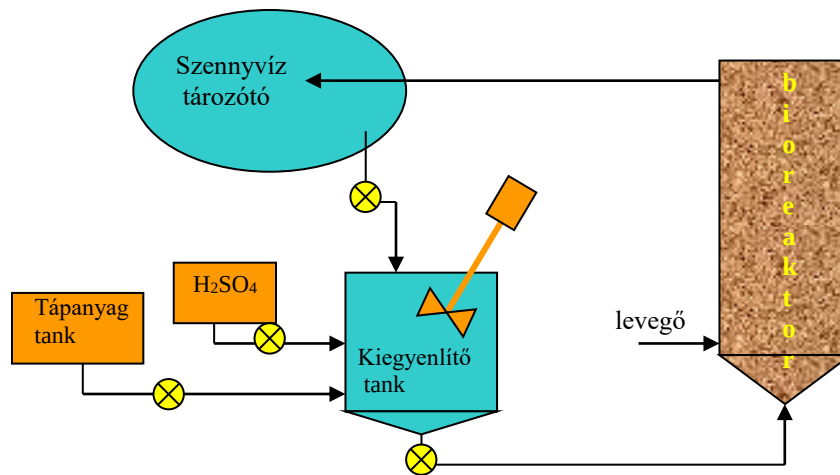
A foszfortriészteráz enzim képes hidrolizálni számos peszticidet pl. metil-, etil parathion stb, sőt idegrendszerre ható toxinok bontására is képes pl. sarin, soman. Az enzim immobilizációja előnyös az enzim stabilitása, aktivitása szempontjából. Választhatunk porózus szilikagél, tritil agaróz vagy nylon membrán hordozót. A fizikai adszorpció a legegyszerűbben kivitelezhető eljárás, azonban az enzim és hordozó között a hidrofób kölcsönhatás előnyösebb. A tritil agaróz az enzimaktivitás szempontjából nagyon jó, azonban kicsit költséges, a nylon membrán olcsóbb, és hatékonyság szempontjából nem marad el az agarózos verziótól. A biodegradáció kivitelezésére egyszerű fix-ágyas csőreaktor eljárást fejlesztettek ki (VI.18. ábra).



VI.18. ábra
Fix-ágyas csőreaktor

VI.3.1.1.2. Glifozát bontása:

A glifozát, a Monsanto Co. amerikai herbicid gyártó cég terméke, széles spektrumú herbicid, előszeretettel alkalmazzák. Az üzem szennyvize a megnövekedett termelés következtében oly mértékben elszennyeződött, hogy szükségessé vált egy, a meglévőnél hatékonyabb szennyvízkezelési eljárás kidolgozása. Bioreaktorba kovaföldre immobilizált mikroba konzorciumot juttattak, és ezen cirkuláltatták át a szennyvizet. A tisztított vizet a tározótóba engedték vissza (VI.19. ábra).



VI.19. ábra
Herbicid tartalmú szennyvíz kezelése

A bioreaktorba pH, és hőmérséklet beállítás után juttatják be a szennyvizet alulról táplálva be, és a bioreaktor felső régiójából vezetik el az elfolyó tisztított vizet vissza a tározó tóba

VI.3.1.1.3. Alachlor, propachlor biodegradációja

E két leggyakrabban használt acilanilid herbicid mikrobiális bontása során ugyanolyan veszélyes metabolit keletkezik - anilin származék, mint a kiindulási vegyület. Így a biodegradáció sikeréhez szükséges a keletkező metabolitok folyamatos eltávolítása, melyet átfolyós rendszerű bioreaktorban immobilizált sejtekkel lehet megoldani. Az égetett agyagok megfelelő hordozók mechanikai tulajdonságaik miatt, és mert kémiaiilag inerteek. A sepiolit (egy agyag fajta) kis kockákra vágható (monolith) és autoklávozható. Immobilizált *Pseudomonas* sejtekkel izotóp jelölt szubsztrátot használva igazolták a lebontást.

VI.3.1.2. Fenolos hulladékok bontása

VI.3.1.2.1. Fenol bontása gombával

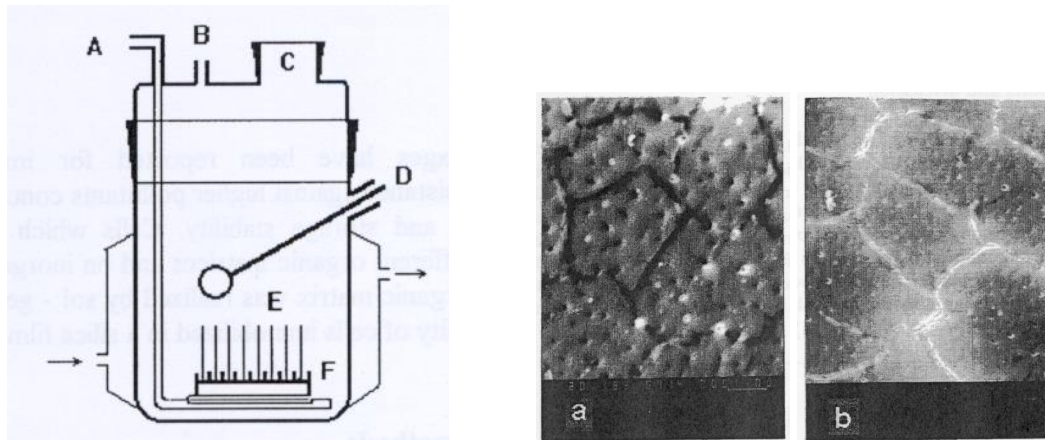
Egyre gyakrabban találkozunk olyan lebontási folyamatokkal, ahol a baktériumok helyett gombákat használnak. A *Fusarium flocciferum* kemosztátban poliuretán habra immobilizálva hatékonyan bontotta a fenolt, amennyiben nem volt több annak koncentrációja 1 g/l-nél a szennyvízben. A sejteket poliuretánnal és felületaktív anyaggal keverték el és szobahőmérsékleten hagyták polimerizálódni, majd megszilárdulás után feldarabolták kis darabokra, ezt alkalmazták a kemosztátban, mely 4 hónapon keresztül stabilan működött.

VI.3.1.2.2. Fenol bontás kevert kultúrával

Kolloidális szilícium-dioxid vizes oldatába szénhidrogénekkal szennyezett talajból izolált mikroorganizmus konzorciumot keverték. Az elegyet salétromsavval előkezelt üveglapra rögzítették, melyet újabb szilika réteggel fedtek be (VI.20. ábra). Az üveglapokat batch típusú reaktorba helyezték (VI.20. ábra), és fenolt tartalmazó szennyvizet engedtek rá.

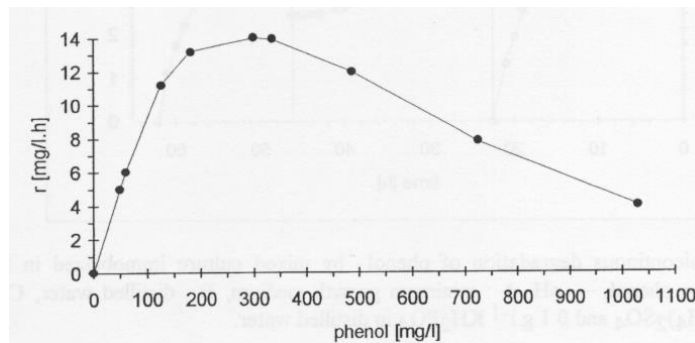
A hosszú élettartam és magas enzimaktivitás megtartásához meg kell határozni az optimális kiindulási szubsztrát koncentrációt. E konkrét esetben azt tapasztalták, hogy 200-300 mg/l fenol tartalom mellett maximális a fenol felhasználás (VI.21. ábra).

Meglepő, de ebben a drasztikusnak tűnő immobilizálási eljárásban is képesek voltak a sejtek megőrizni aktivitásukat.



VI.20. ábra

Batch reaktor szilikával kevert sejt-szuszpenzióval rétegzett üveglapokkal
 (A reaktor felépítése: A=levegőztető cső, B=mintavételi nyílás, C= kapcsolódás a hűtőrendszerrel,
 D=pH elektród, E= az immobilizált sejteket hordozó üveglapok)
a, szilikaréteg a sejtekkel; **b**, sejtmentes szilikaréteggel fedett sejteket tartalmazó szilikaréteg

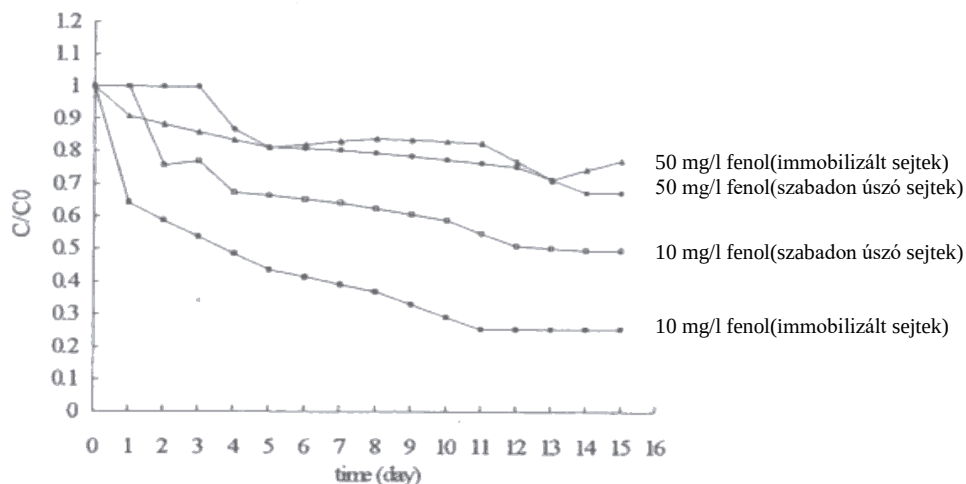


VI.21. ábra

A kiindulási fenol koncentráció hatása az átlagos szubsztrát felhasználás mértékére

VI.3.1.2.3. Klórffénolok bontása immobilizált sejtek tiszta kultúráival

Több fajt is ismerünk, mely képes a klórozott vegyületeket bontani - klórffénolokat pl. *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Flavobacterium* fajok. A sejtek Na-alginát gélbe zárva stabilabban, hatékonyabban bontották a fenol, klórffénol vegyületeket, illetve nagyobb koncentrációban tolerálták a szennyező anyagot a szabadon úszó sejtekkel szemben.



VI.22. ábra

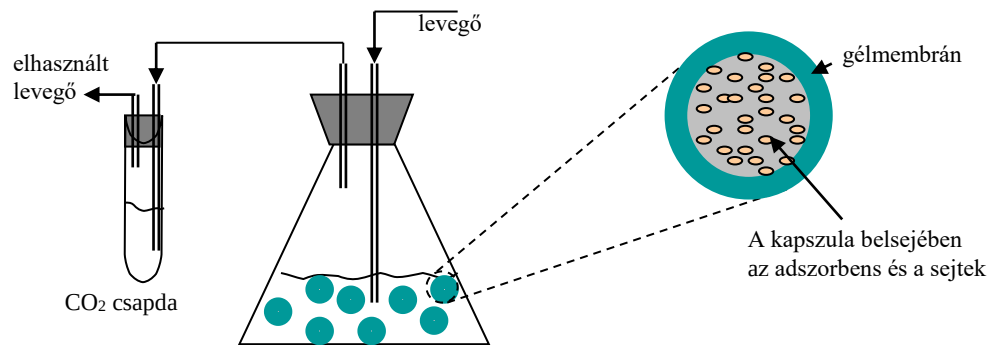
Szabadon úszó és alginátba immobilizált *P. putida* sejtek klórfenol bontása (a kiindulási és az aktuális szubsztrát koncentráció aránya az idő függvényében ábrázolva)

A VI.22. ábrán jól látható, hogy az alacsonyabb koncentrációban (10 mg/l) jelenlévő szubsztrátot az immobilizált sejtek gyorsabban, és hatékonyabban bontották, mint a szabadon úszó sejtek. A magasabb koncentrációban (50 mg/l) alkalmazott szubsztrát nem kedvezett egyik formának sem, a lebontás mértéke hasonlóan gyenge volt mindkét (szabad és rögzített sejtek) esetben.

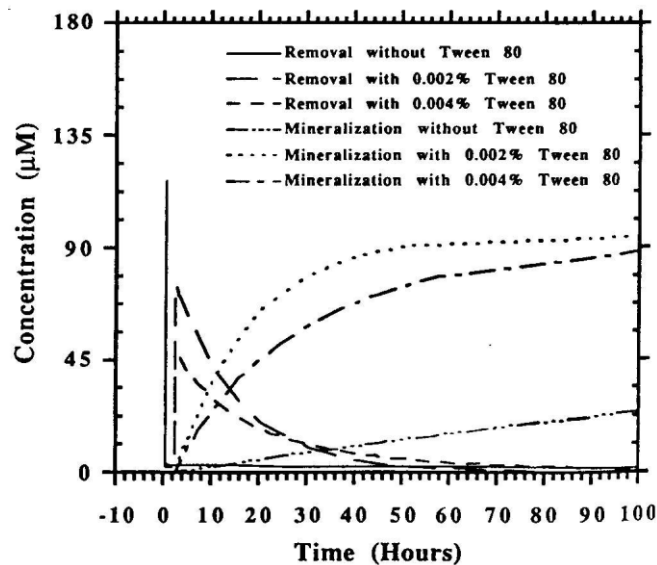
VI.3.1.2.4. Pentaklórfenol bontása

Arthrobacter sp. baktériumot felhasználva létrehoztak egy koimmobilizált rendszert, melynek lényege, hogy a baktérium sejteket aktív szénrel együtt alginát gélbe zárták (VI.23. ábra). Az aktív szén a gélbe diffundáló pentaklórfenolt képes gyorsan adszorbeálni, ami lehetővé teszi nagyobb átfolyási sebesség alkalmazását, valamint a sejtek alacsonyabb koncentrációban kapják a szubsztrátot, de mégis könnyebben hozzájutnak. A rendszer az extracelluláris enzimeket visszatartja, és védett a külső behatásokkal szemben. Felületaktív anyag jelenléte (pl. Tween 80) segíti a PCP adszorpciót és mineralizációt (VI.24. ábra). Az ábrán láthatjuk, hogy a szennyvízből detergens nélkül gyorsan eltávolítható a PCP, gyors az adszorpciója az aktív szén szemcsékre, a Tween 80 hatására a folyamat lassabban megy végbe. A sejtek az

adszorbeált PCP-t használják fel, és detergens jelenlétében ez a mineralizáció gyorsabb, mint Tween 80 nélkül, viszont 0,002%-nál nagyobb koncentrációban már a felületaktív anyag is gátló hatással van a mineralizáció sebességére. Fontos paraméterek: az adszorbens mennyisége, az alginát gél porozitása, a pH.



VI.23. ábra
Koimmobilizált rendszer sematikus rajza



VI.24. ábra
PCP eltávolítása a szennyvízből, illetve mineralizációja felületaktív anyag jelenlétében és anélkül (pH=7,0)

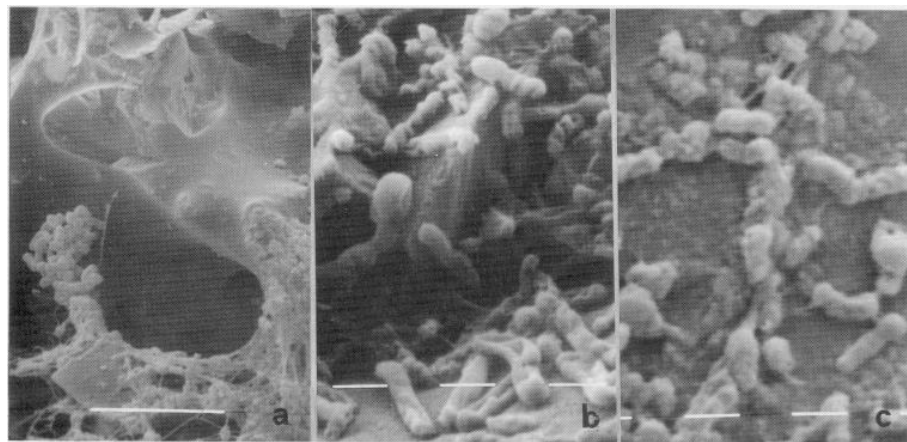
VI.3.1.2.5. p-nitrofenol (PNP) bontása

A PNP-vel pl. peszticid- és gyógyszergyártásban találkozunk. Több *Pseudomonas* törzs együttesen (*P. putida*, *P. fluorescens*, *P. mendonica*)

kovaföld hordozóhoz kötötte, levegőztetett oszlop bioreaktorban, képes tolerálni az 1800 mg/L PNP koncentrációt is! Természetesen számukra azért érdekes e kísérlet, mert nemcsak elviselik a sejtek ezt a koncentrációt, de bontják is a vegyületet.

VI.3.1.3. Poliklórozott bifenilek bontása

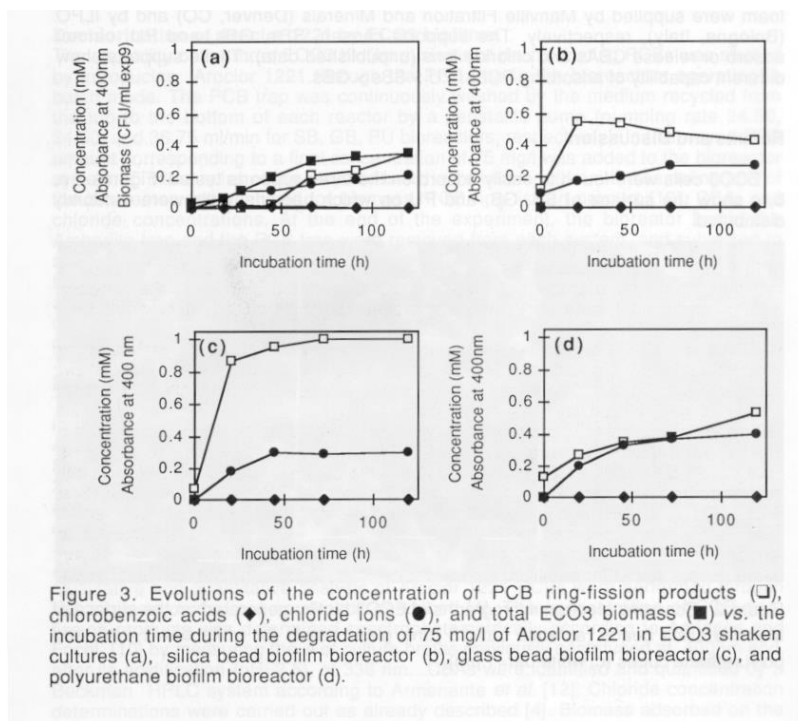
Két *Pseudomonas* és egy *Alcaligenes* faj ko-kultúrában bontott többféle PCB-t adott körülmények között aerob biofilm bioreaktorban. A kísérletek azt bizonyították, hogy pl. Aroclort az immobilizált sejtek jobban bontották, mint a szabadon úszó társaik. Háromféle hordozót próbáltak ki: Manville szilika gyöngy, üveggyöngy, poliuretán hab kockák. A sejtek könnyedén adszorbeálódtak mindhárom hordozóhoz (VI.25. ábra).



VI.25. ábra

Sejtek a hordozók felületén (pásztázó elektron mikrógráffal)

a, mikroorganizmusok szilikagyöngy felületén (fehér vonal = 10 μm); **b**, üveggyöngy felszínén (fehér vonal = 1 μm); **c**, poliuretán kockákon (fehér vonal = 1 μm);



VI.26. ábra

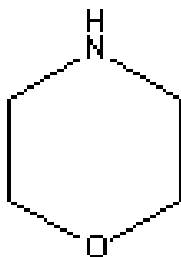
PCB bontás során mért paraméterek különböző feltételek mellett

Aroclor tartalmú szennyvizet cirkuláltattak a bioreaktoron át, a levegő áramba bifenilt juttattak, mely indukálja a PCB bontást. A bioreaktorban folyamatosan ellenőrizték a fontosabb paramétereket (VI.26. ábra): biomassza- és szubsztrát koncentráció, gyűrű hasítási termék, klorid tartalom, egyéb paraméterek (pH, hőmérséklet, stb). A VI.26. ábra alapján azt mondhatjuk, hogy a rázatott kultúrában a szabadon úszó sejtek degradációs és klórmentesítő aktivitása elmarad a bioreaktorba helyezett immobilizált sejtek aktivitásától. A legjobb eredményeket az üveggyöngyre immobilizált sejtekkel érték el.

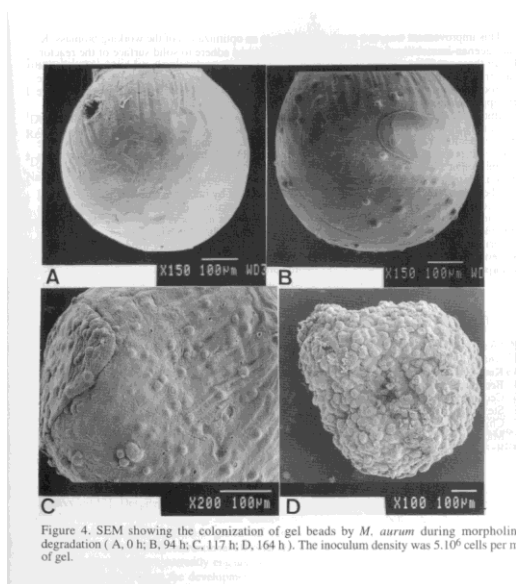
VI.3.1.4. Morfolin bontás

A morfolin (1,4-tetrahidro-oxazin, C_4H_9NO), egy egyszerű heterociklusos vegyület (VI.27. ábra). A morfolint és származékait adalékanyagokként, oldószerekként, antioxidáns anyagokként, valamint gyógyszer és herbicid gyártás során is találkozunk velük. A gyártási folyamatok során az effluensben morfolin jelenhet meg. Nitrit

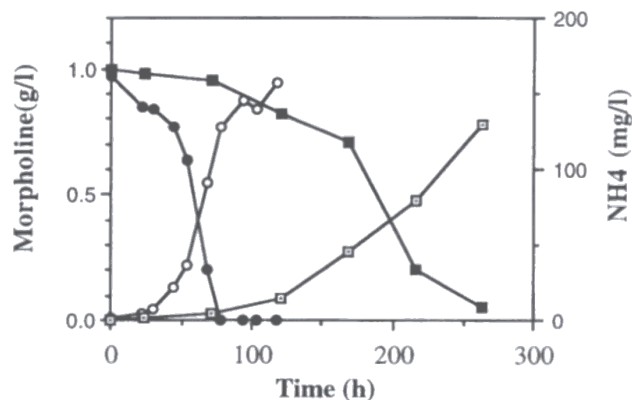
jelenlétében N-nitrosomorfolin keletkezik, mely potenciális mutagén. Ezek alapján érthető, hogy a morfolin és származékainak lebontásával is foglalkozunk. Az 1990-es években találtak rá egy G⁺ mikroorganizmusra - *Mycobacterium aurum*, mely egyedi szén-, nitrogén- és energiaforrásként hasznosította a morfolint. Megfigyelték, hogy az immobilizált baktériumok jobb hatásfokkal hasznosították a szubsztrátot. Az immobilizáláshoz κ -karrageenant használtak. Bár a *Mycobacterium aurum* mezofil, a sejtek a 42°C-ot és magas sókoncentrációt igénylő gyöngyképzési körülményeket túléltek, és aktivitásuk sem veszett el. A VI.28. ábrán látható, hogy szaporodási készségüket is megtartották a sejtek, mivel az idő előrehaladtával a gyöngyök a növekvő sejttömeg hatására eldeformálódtak (a megjelenő dudorokat a szaporodó sejtek okozták). A morfolin bontása során ammónia szabadul fel, ennek mérésével nyomon követhető a bontás hatékonysága (VI.29. ábra).



VI.27. ábra A morfolin szerkezeti képlete



VI.28. ábra Az immobilizált sejtek napról napra szaporodnak, ezáltal a gélágy kezdeti gömbölyű formája deformálódik



VI.29. ábra

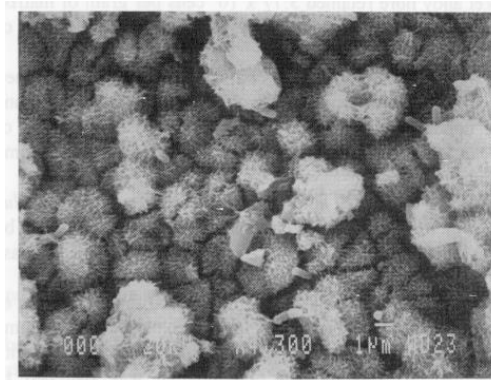
A morfolin degradáció mértéke és az ammónia megjelenése szabad illetve immobilizált sejtes rendszerben. Morfolin bontás: szabadsejtes rendszerben ■, immobilizált sejtekkel ●. Ammónia képződés: szabadsejtes rendszerben □, immobilizált sejtekkel ○.

A VI.29. ábrán láthatjuk, hogy mennyivel hatékonyabban működik az immobilizált sejtes rendszer a szabadon úszó sejtekkel szemben, gyakorlatilag fel annyi idő alatt zajlik le a lebontás.

VI.3.1.5. Nikkel - ötvözet szálakon létrehozott *Thiobacillus ferrooxidans* biofilm vas-szulfát oxidációja

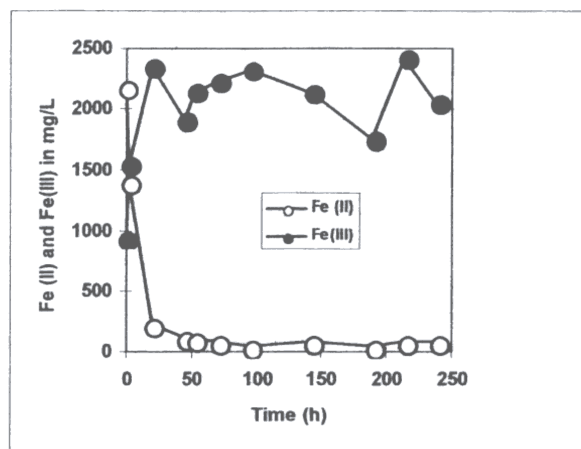
A fémalkatrészek, csövek korrodeálódásának elkerülése érdekében a vas(II) ionokat oxidálni kell vas(III) formára. Évek óta kísérleteznek különböző eljárásokkal, melyekben egy acidofil, aerob kemolitotróf baktériumot, a *Thiobacillus ferrooxidans*-t használják immobilizált formában (VI.30. ábra). Nevéből is kiolvasható, hogy képes a vas(II) ionokat oxidálni. A baktérium igyekszik hozzátapadni szilárd felszínhez, így nem könnyen mosódik ki. Gomez és mtsai [1996] nikkel ötvözet szálakat használtak a sejtek passzív immobilizációjához, melynek fizikai tulajdonságai (felülete, porozitása) előnyösek. A keletkező vas(III)-szulfát kicsapódásának elkerülése érdekében extrém alacsony pH-t (< 2,0) kellett alkalmazniuk. A sejtekkel teli fémszálakat reaktorba tették, az egyensúly kialakulásáig „batch” típusú, majd ezután folyamatos működést biztosítottak. A VI.31. ábrán látható a folyamatos üzemű

eljárás eredménye, a reakcióelegyben a vas(II) ionok alig, míg a vas(III) ionok folyamatosan magas koncentrációban voltak kimutathatók kis kilengésekkel.



VI.30. ábra

SEM (scanning electron microscopy) fotó fémötvözet szálon immobilizált *Thiobacillus ferrooxidans* sejtekről 260 óra inkubáció elteltével. A sejtek mellett Fe(III) csapadékot is láthatunk a hordozón



VI.31. ábra

A folyamatos üzemű reaktorban az immobilizált *Thiobacillus ferrooxidans* sejtek folyamatosan oxidálták a vas(II) ionokat  vas(III) ionokká 

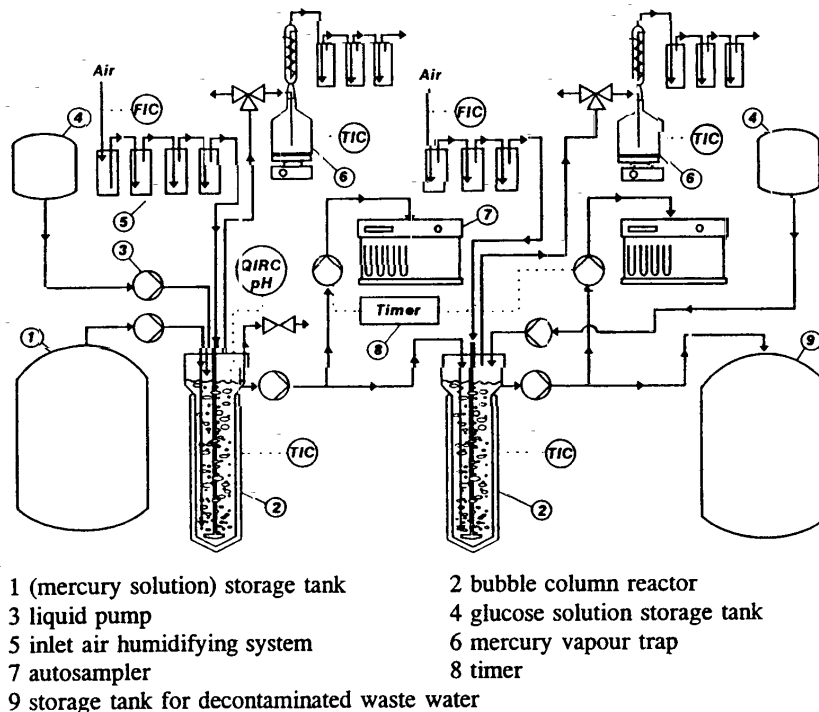
VI.3.1.6. Higany biotranszformáció fluid-ágyas bioreaktorban

Bár ipari és mezőgazdasági felhasználása a higany tartalmú vegyületeknek ma már korlátozott, de az eddigi felhasználásukból eredően tartósan ott maradtak a

környezetben. Különösen a szerves higany vegyületek veszélyesek. Ivóvízben a koncentrációjuk nem haladhatja meg az 1 µg/l értéket.

Mikrobiálisan az oxidációs állapotuk változtatható, illetve a szerves higany vegyületek átalakíthatók. A mikrobiális detoxifikáció a redukció elemi higannyá, mely kevésbé toxikus.

Az 1990-es évek elején izoláltak egy törzset, az *Aeromonas hydrophilia*-át, melynek kofaktor függő higany reduktáz enzimrendszere képes részt venni a Hg redukcióban. Szilika és alumínium porózus hordozóra rögzített sejtekkel dolgoztak fix-ágyas reaktorban, de több probléma is adódott, pl. az elemi higany akkumulálódott a bioágyban, illetve az effluensben magas volt az eredeti higany vegyület koncentrációja. A fix ágyas reaktort fluid ágyasra cserélték, és levegőztetéssel némileg javítottak a párologtatáson, a Hg-gőzt kondenzálták, majd a tisztított gázt reciklizálták. A problémák kiküszöbölésére, és a biokatalizátor hatékonyságának javítására másik eljárást dolgoztak ki. *Pseudomonas putida* KT2442 törzset használva, random mutagenézissel létrehoztak egy Hg(II) redukáló törzset, mely nagyobb koncentrációban jelenlévő higany vegyületeket is hatékonyan redukált. Ezt a tulajdonságát benzol lebontó képességgel kombinálták, azért, hogy elkerüljék a fenilhigany vegyület átalakítása során keletkező benzol környezetbe jutását. Bár első kísérleteikben a fluid-ágyas reaktorokban legjobban bevált polivinilalkohol hidrogél alkalmazták hordozóként, de jelentősebb anyagtranszfer gátlása miatt lecserélték alginát gélre (VI.32.ábra). Az új eljárás igen jó eredménnyel működött folyamatos rendszerben. A folyadék fázisban átalakított higany 95%-a a gázfázisban volt megtalálható.

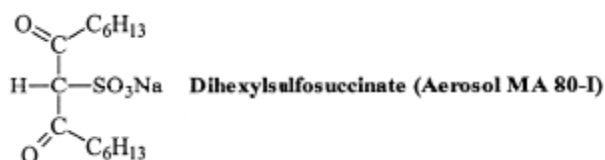


VI.32. ábra

Folyamatos üzemű reaktor kaszkád a higany biotranszformációra alginát gélbe immobilizált genetikailag módosított *P. putida* sejtekkel

VI.3.1.7. Felületaktív anyag bontása alginát/pektát gélbe immobilizált *Comamonas terrigena* baktériummal

Felületaktív anyagokat a vegyipar, gyógyszeripar, élelmiszeripar is használ, ennek következményeként megjelenik a természetben, szennyvizekben, természetes vizekben, talajban. Negatívan hatnak a természetre, többek között a mikrobiális életre, mivel megbontják a membrán stabilitását és szerkezetét, habképzésük által befolyásolják az oxigén diffúziót. Bár bizonyos esetekben előnyös a jelenlétük (szénhidrogének bontása).



VI.33. ábra

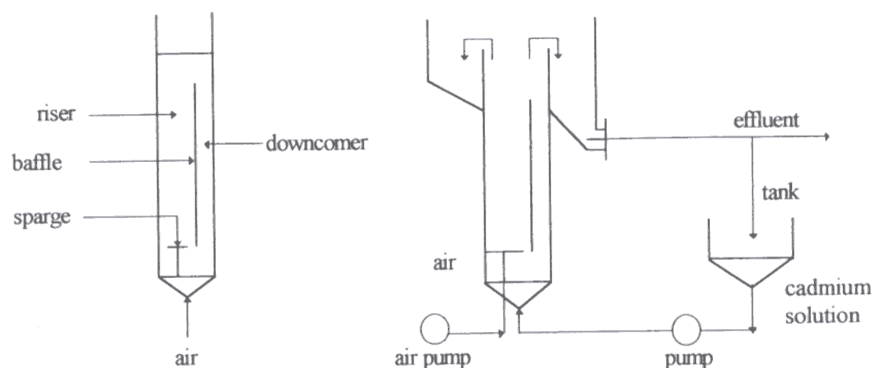
Anion-aktív felületaktív anyag

Gélágyba immobilizálva a felületaktív anyagokat bontó sejteket megvédjük a közvetlen káros hatásoktól. Egy anion aktív anyag – dihexilszulfoszukcinát (DHSS) (VI.33. ábra) bontását immobilizált *Comamonas terrigena* törzsszel végezték [Huska és mtsai 1996]. Többféle hordozót vizsgáltak, a poliuretán hab nagyon erős kötő affinitást mutatott a DHSS molekula felé, ezért ezt nem használták, az alginát esetében jelentős adszorpciót nem tapasztaltak, az alginát szerkezeténél fogva 'baktérium barát', így ezzel végezték a kísérleteket. Alginát/pektát kevert gélágyba immobilizálták a sejteket. Az aktivitás hosszabb ideig megmaradt, azonban a gélágy stabilitása nem volt megfelelő, ezért glutáraldehiddel erősítették, de ennek a biodegradációs aktivitásra negatív hatása volt. Polietiléniminnel kezelt gyöngyök esetén pedig lassult a rendszer valószínűleg a lassabb szubsztrát diffúzió miatt. Megoldás apróbb gyöngyök képzése.

(SDS (Na-dodecil szulfát) detergens bontását *Pseudomonas* sp. C12B törzsszel végezték sikeresen.)

VI.3.1.8. Kadmium eltávolítása bioszorbens segítségével

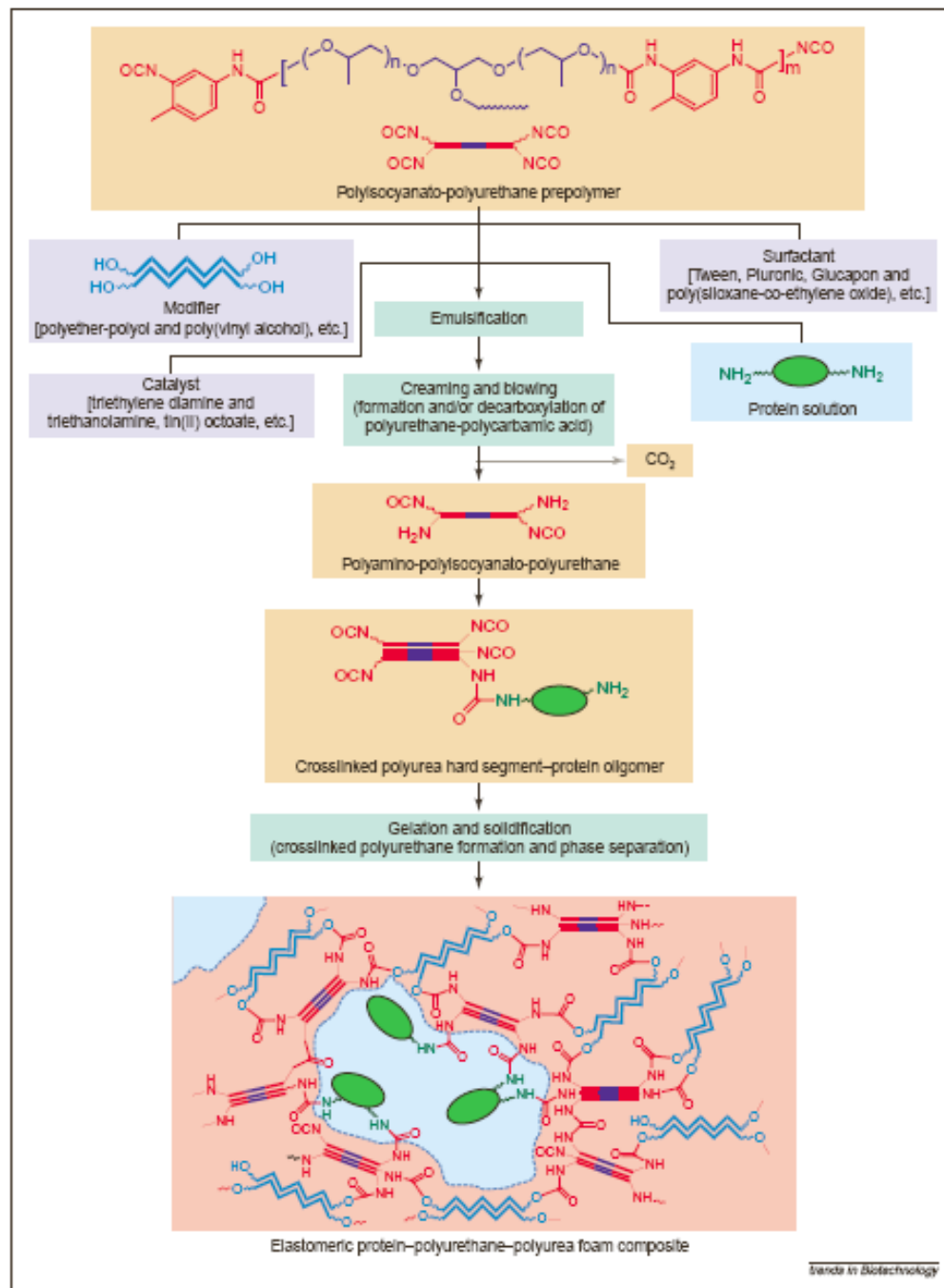
Bár ebben a kísérletben aktív mikrobák illetve enzimek nem játszanak szerepet, de az immobilizálás sokoldalúsága szempontjából érdekes eljárás. Kidolgozói abból indultak ki, hogy a poliszaharidok kötődnek fémekhez. Ezt a tulajdonságot fordították meg, és kadmiumot immobilizáltak cukor polimerhez, ez esetben algináthoz, mint szorbenshez air-lift reaktorban (VI.34. ábra). A rendszer hatékonysága az időtől és a kadmium koncentrációtól függ. A telítődött szorbensből megfelelő eljárással kivonható a kadmium.



VI.34. ábra
Air-lift osztott reaktor

VI.3.2. Biokompozitok

Számos példát láttunk az előbbieken a sejtek immobilizálására, azonban enzimeket is lehet immobilizálni, sőt néha előnyös ha a sejtmentes enzimrendszerrel dolgozunk. Az ipari biokonverziós eljárások gyakran igényelnek nagy-sűrűségű, heterogén biokatalizátorokat, melyek specifikus formában előállíthatók, és jelentős aktivitást mutatnak hosszabb működési feltételek mellett is. A hagyományos enzim immobilizálási eljárás mellett mostanában új módszereket is alkalmaznak úgynevezett 'sol-gel' kapszulák, biokompozitok létrehozására (VI.35. ábra). Ekkor nem a hagyományos polimerizációs folyamatokat vagy kovalens kötésű rögzítéseket alkalmazzák, hanem addíciós, kondenzációs reakciókat.



VI.35. ábra
Biokompozit előállítására példa

VI.4. Összefoglalás

Az utóbbi években az immobilizált sejtek, enzimek felhasználása egyre széleskörűbb. Nemcsak bioremediációs, biodegradációs célokra tudjuk használni, de biokatalízis, biokonverziós folyamatokban is, pl. alkohol gyártás élesztő sejtekkel, ecetgyártás *Acetobacter*-ekkel, tejsav, almasav, citromsav, antibiotikum, szteroid, stb. előállítás. Számos hordozót lehet használni a célnak megfelelően, bioreaktorokba szilárd szerves-, és szervetlen hordozókat, míg terepkísérletekben lebontható szerves polimereket (pl. alginát), esetleg talajjavító ásványi anyagokat (pl. perlit) célszerű alkalmazni.

A mikroorganizmusok sejtfelszíni tulajdonságai, a szubsztrátum kémiai tulajdonságai mind befolyásolják, hogy milyen hordozót választunk ki a megvalósításhoz.

VI.5. Irodalomjegyzék

- Akin, C. 1987. Biocatalysis with immobilized cells. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 5: 319-367
- Anselmo, A.M., J.M. Novais 1992. Biological treatment of phenolic wastes: comparison between free and immobilized cell systems. *Biotechnol. Lett.* 14:239-244
- Caldwell, S.R., F.M. Raushel 1991. Detoxification of organophosphate pesticides using an immobilized phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Biotechn. Bioeng.* 37: 103-109
- Fukui, S., A. Tanaka 1982. Immobilized microbial cells. *Ann. Rev. Microbiol.* 36:145-172
- Gill, I., A. Ballesteros 2000. Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol-gel encapsulated biologicals. *TIBTECH* 18: 282-296
- Gill, I., A. Ballesteros 2000. Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 2): non-sol-gel protein-polymer biocomposites. *TIBTECH* 18: 469-479
- Hallas, L.E., W.J. Adams, M.A. Heitkamp 1992. Glyphosate degradation by immobilized bacteria: field studies with industrial wastewater effluent. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1215-1219

- Heitkamp, M.A., V. Camel, T.J. Reuter, W.J. Adams 1990. Biodegradation of p-nitrophenol in an aqueous waste stream by immobilized bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2967-2973
- Lower, B.H., R. Yongsunthon, F.P. Vellano III, S.K. Lower 2005. Simultaneous Force and Fluorescence Measurements of a Protein That Forms a Bond between a Living Bacterium and a Solid Surface. *J. Bact.* 187:2127–2137
- McDowell, R.H. 1977. Properties of Alginates. Alginate Industries Limited, London
- Mima, S., M. Miya, R. Iwamoto, S. Yoshikawa 1983. Highly deacetylated Chitosan and its properties. *J. of Appl. Polymer Sci.* 28:1909-1917
- Phillips, C.R., Y.C. Poon 1988. Immobilization of Cells. Springer-Verlag ISBN 0-387-18637-9
- Sanchez, J.M., S. Arijó, M.A. Munoz, M.A. Morinigo, J.J. Borrego 1994. Microbial colonization of different support materials used to enhance the methanogenic process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41:480-486
- Shungu, D., M. Valiant, V. Tutlane, E. Weinberg, B. Weissberger, L. Koupal, H. Gadebusch, E. Stapley 1983. Gelrite as an agar substitute in bacteriological media. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:840-845
- Siahpush A.R., J-E. Lin, H.Y. Wang 1992. *Biotechn. Bioeng.* 39:619-628
- Wijffels, R.H., R.M. Buitelaar, C. Bucke, J. Tramper (Eds) 1996. *Immobilized Cells: Basics and Applications.* Elsevier kiadó.

VII. Nitrátmentesítés

Dr. Kesserű Péter, Dr. Perei Katalin

Tartalomjegyzék

VII. Nitrátmentesítés	275
VII.1. Kémiai nitrátmentesítő technológiák	278
VII.2. Mikrobiális nitrátmentesítés	279
VII.3. Kombinált eljárások	280
VII.4. A biológiai denitrifikáció	281
VII.4.1. nitrát – nitrit átalakulás	282
VII.4.2. nitrit- nitrogén oxid átalakulás	283
VII.4.3. nitrogén oxid – dinitrogén oxid átalakulás	283
VII.4.4. dinitrogén oxid – nitrogén átalakulás	284
VII.5. A nitrát jelentősége a bioremediációban	284
VII.6. Irodalomjegyzék	285

Bevezető

Az egyes szennyezők közül napjainkban egyre nagyobb problémát jelent a vizek, különösen pedig a talajvíz nitráttartalmának növekedése. A vizek természetes nitráttartalma közel $10 \text{ mg NO}_3^-/\text{dm}^3$, amelyet különböző tényezők növelhetnek [EPA 1990]. A talajvízbe a nitrát leggyakrabban a talajon keresztül jut. A talajra kiszórt trágyából (hígtrágya, műtrágya) a nitrát ugyanis - ha sem a növények, sem a mikroorganizmusok nem építik be vagy nem denitrifikálják, - akkor a talaj mélyebb rétegeibe, így a talajvízhez is eljuthat. Mivel az oxigénben gazdag talajvízben a nitrát nem bomlik le, ezért a talajvízből nyert ivóvíz nitráttartalma is emelkedik. A vizekbe kerülő nitrát a csatornázatlan területeken még a kommunális szennyvizek helytelen kezelésétől és a hulladéklerakó-helyekről történő bemosódásból származhat. Ugyanakkor a műtrágyázás hatására a növények beltartalmában, minőségében kedvezőtlen hatások is jelentkezhetnek, pl. a spenótban megnő a nitráttartalom. A nitrátok koncentrációjának dúsulása idővel a táplálékláncban is komoly veszélyt fog jelenteni az annak csúcsán időző emberiség egészségére nézve. Az már most tisztán látható, hogy az eddig talajba került, egyre dúsuló szerves és kémiai szennyező anyagok hosszú távon problémát fognak okozni az ivóvízellátásban. A

nitrátszennyezés Magyarországon is komoly gondokat okoz főleg a mezőgazdasági területeken lakók ivóvízellátásában. A nitritek és nitrátok ha fölös mennyiségben jutnak a szervezetbe a vörösvérsejtek szerkezetét hemoglobinból methemoglobinná alakítják, így az nem képes az oxigén szállítására (methaemoglobinaemia). Ez a csecsemőknél már egész kis mennyiségben is fulladásos halálhoz vezet. Általános probléma hogy a belvizek egyre telítettebbek lesznek a mezőgazdaságból eredő foszfát vegyületekkel is ami tavaink pusztulását vonja maga után. A vizek bő foszfát és nitrogéntartalma kedvez a mikroszkópikus algák, pl. a kékalga elszaporodásának amelyek aztán mintegy "elszívják" a többi vízi élőlénytől az oxigént. A lassan folyó, vagy állóvizek oxigéntartalma így gyorsan kimerül és ennek következtében az ott élő vízínövények és a belőlük táplálkozó állatok elpusztulnak. A vízi ökoszisztémák károsodása már önmagában is csökkenti a víz öntisztulási képességét ami költséges technikai helyettesítő megoldások alkalmazására kényszerít.

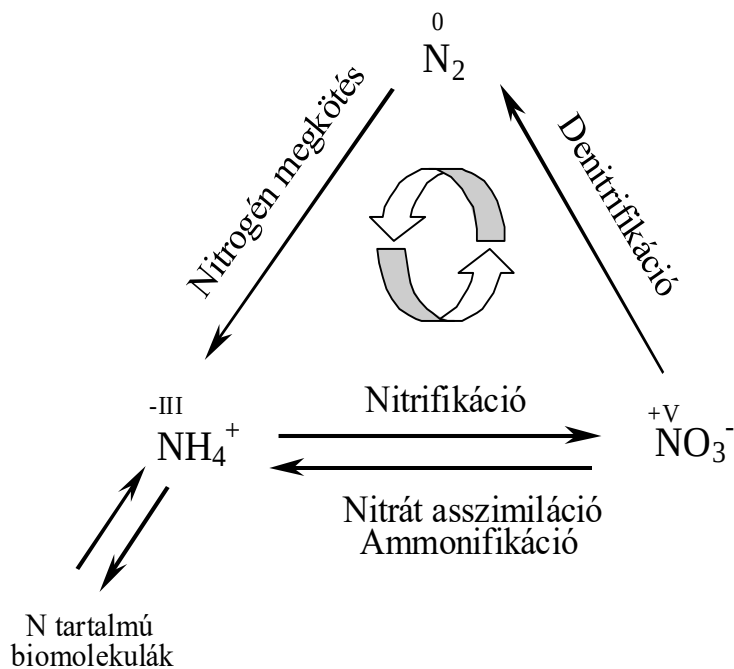
A környezetre elsősorban a talajból kimosódott és a talajvízbe vándorló nitrogén hat károsan, egyrészt a felszíni vizek eutrofizálását okozva, másrészt a kutak és az ivóvíz nitráttartalmát növelve. Sajnos ma elsősorban a szennyezés megszüntetésére kell koncentrálnunk, és a megelőzésre így kevesebb lehetőség/ idő marad. A biológiai alapokon nyugvó nitrátmentesítés kulcsát a denitrifikáló mikroorganizmusok jelentik.

A nitrogén a növényekben a fehérjék alapját képezi. A nitrogénnel túltrágyázott növények nagyok, vastag a száruk, levelük, színük haragoszöld, az egész növény nagy, buja. Az ilyen növény kevesebbet virágzik, kevesebbet és rosszabb minőségű termést ad, fogékonyabb a betegségekre. Hiányában a növények hitványak, sárgák, gyengék, kicsik, keveset — vagy egyáltalán nem virágoznak, nem teremnek. A növény gyökereivel elsősorban a talajból veszi fel, de felveheti a levelekre kijuttatott tápoldatból is. A nitrogén zöme a talajban a szerves anyagokban, kötött formában fordul elő. A növények részére felvehető formába a talajlakó baktériumok alakítják át. Ez a talajrészecskékhez már nem kötődik, ezért a talajvízzel mozog a talajban.

A levegőből az esővízzel szintén kerül némi nitrogén a talajba. Nagyobb mennyiséget kötnek meg az ún. nitrifikáló baktériumok, amelyek a pillangósvirágú

növények gyökerein élnek. így pl. a borsó után 1 m²-en 4 g nitrogént, a lucerna után 20 g nitrogént képesek megkötni. Ez 1 ha-ra átszámítva 40-200 kg N-t jelent. A talajban ún. aerob baktériumok is élnek, amelyek szintén megkötik a levegő nitrogénjét. Megfelelő körülmények között (25-37°C, pH=6,2-7,2, kellő nedvességtartalom és oxigén jelenlétében) jelentős mennyiséget képesek megkötni.

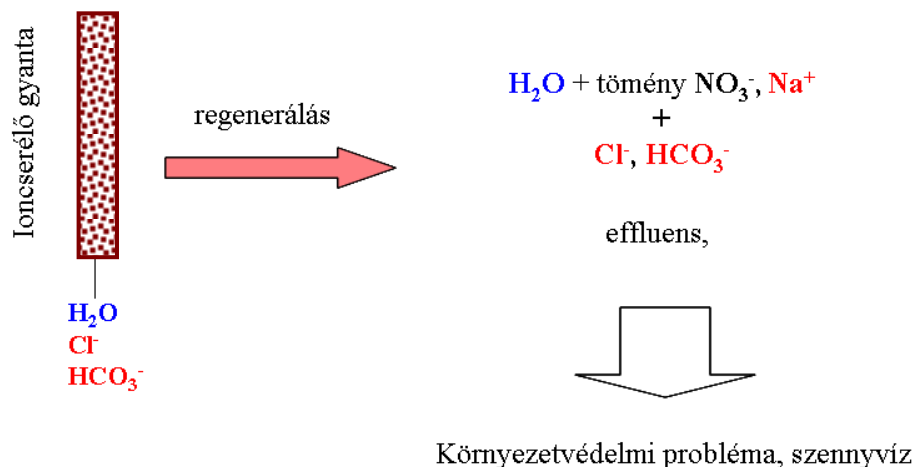
A talajban zajló mikrobiális tevékenység egyik folyamata a denitrifikáció, amelynek következménye a nitrogénsók csökkenése. A nitrogénsók jelentős mennyiségű oxigént tartalmaznak, amit a mikroorganizmusok az életfolyamataik fenntartásához használnak fel, így gáz alakban tiszta nitrogén szabadul fel. Ez a folyamat főleg levegőtlen, magas pH értékű és sok lebomlatlan szerves anyagot tartalmazó talajokra jellemző (nitrogén körforgása: VII.1. ábra).



VII.1. ábra
A nitrogén természetes körforgása

VII.1. Kémiai nitrátmentesítő technológiák

A nitrát egészségkárosító hatásának felismerése után számos új kutatás-fejlesztési projekt indult el, melyek fő célja a gyors kármentesítés, melynek érdekében először kémiai rendszereket dolgoztak ki. Ioncserélő gyanták segítségével hatékonyan “fogták ki” a szennyezett vízből a nitrátot (VII.2. ábra). Hátránya, hogy a nitrát koncentráltan továbbra is jelen lesz, további kezelés nélkül nem kerül vissza a N körforgásba.

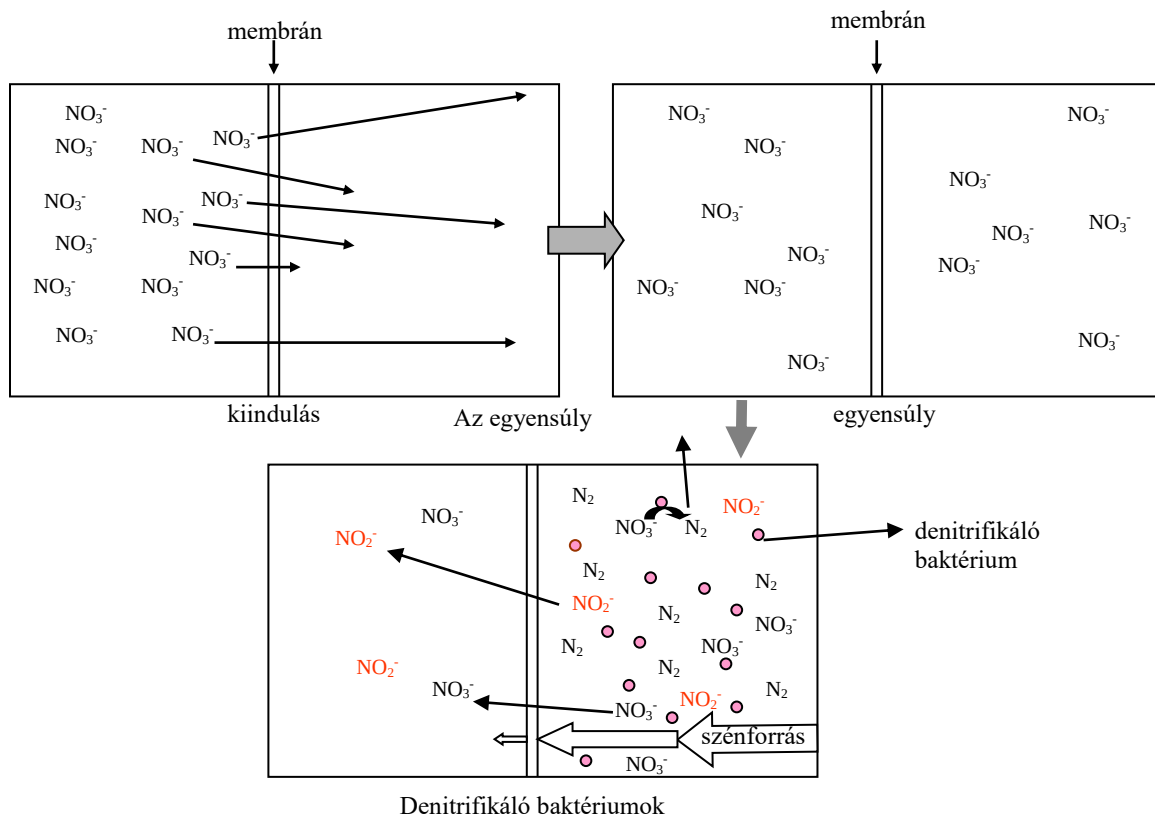


VII.2. ábra

Kémiai nitrátmentesítés ioncserélő gyantát alkalmazva

Szennyvíz illetve ivóvíz nitrátmentesítésére membrántechnológiát is kifejlesztettek [Fuchs 1997]. Ennek hátránya, hogy a membrán átengedi a kationokat is, ezáltal a tisztított víz ihatatlanná válik (lágú víz keletkezik), ráadásul a nitrátot sem vonja ki teljesen, csak kihígul (VII.3. ábra). Ennek továbbfejlesztett változatában denitrifikáló mikroorganizmusokat tettek a membrán egyik oldalára, így aktívan is csökkentették a nitrát (nitrit) tartalmat.

Számos kémiai technológiai változatot említ a szakirodalom, de úgy tűnik, hogy legtöbb esetben az eredmény nem kielégítő.



VII.3. ábra

Kémiai nitrát mentesítés membrántechnológiát alkalmazva, melyet biológiai rendszerrel egészíthetünk ki

VII.2. Mikrobiális nitrátmentesítés

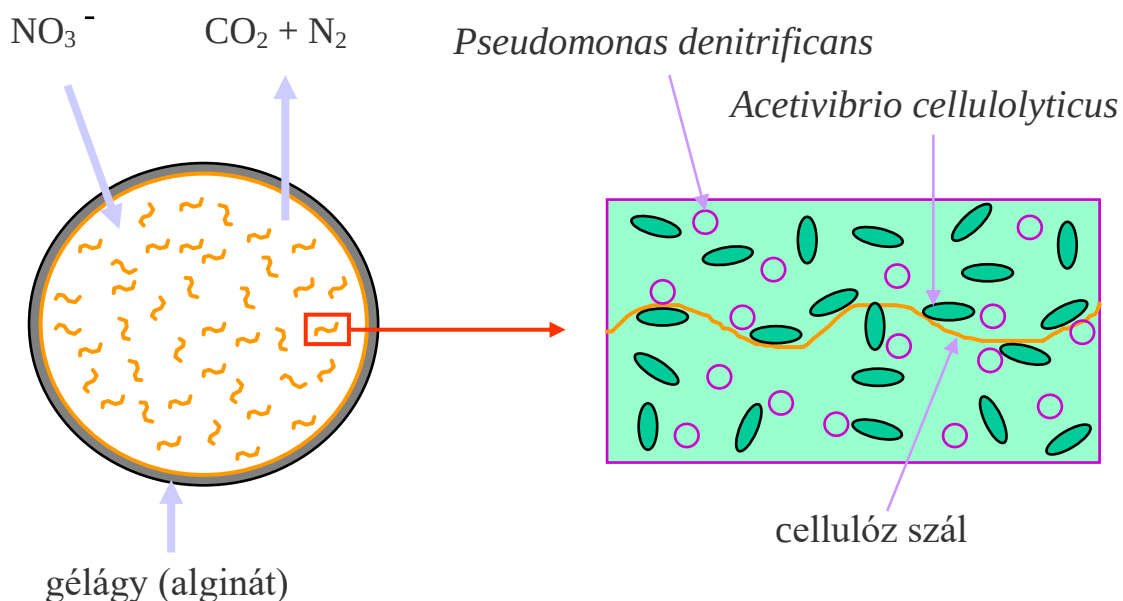
A biológiai, illetve kevert nitrátmentesítő eljárások (VII.3. ábra) megfelelő megoldásnak tűnnek. A rendszerben denitrifikáló baktériumok redukálják a nitrátot nitritté, a reakció végén nitrogén gáz keletkezik.

Heterotróf denitrifikáló rendszerekben elektrondonorként szervesanyagot használunk. E szervesanyag származhat pl. ipari, vagy kommunális szennyvízből, ezáltal a denitrifikáció szennyvíztisztítással párosul. Hátránya azonban, hogy nagy mennyiségű biomassa képződik, valamint az elfolyó tisztított víz szervesanyaggal szennyeződhet. Ekkor utótisztítást kell alkalmazni.

Autotróf denitrifikáló rendszereknek előnye, hogy nem igényel szerves szénforrást, így az effluens szervesanyag terhelése szinte nulla. Hátránya, hogy az

elektron donor a H_2 , amit kellő körültekintéssel kell a rendszerbe juttatni, valamint a hatékonysága elmarad a heterotróf rendszertől.

Szennyvizek kezelésére a biológiai denitrifikációs rendszereket úgy tudjuk hatékonyan alkalmazni, ha bioreaktort használunk [Csry 1998]. A baktériumok reakciótérben tartásához, azokat rögzíteni kell egy hordozó anyaghoz, illetve a bezárásos eljárást alkalmazva gélágyat használhatunk (VII.4. ábra). A felületi rögzítés nem ideális, mivel a sejtek könnyen leszakadnak a felületről, illetve a környezeti feltételek változásainak jobban kitettek, mint egy gélágyba zárt baktériumtenyészet. A bezárásos rendszer előnye, hogy megvédi a sejteket a külső körülmények változásaitól, a hatás késleltetve és enyhébben jeletkezik, valamint a sejtek nem tudnak eltávozni a reakciótérből.



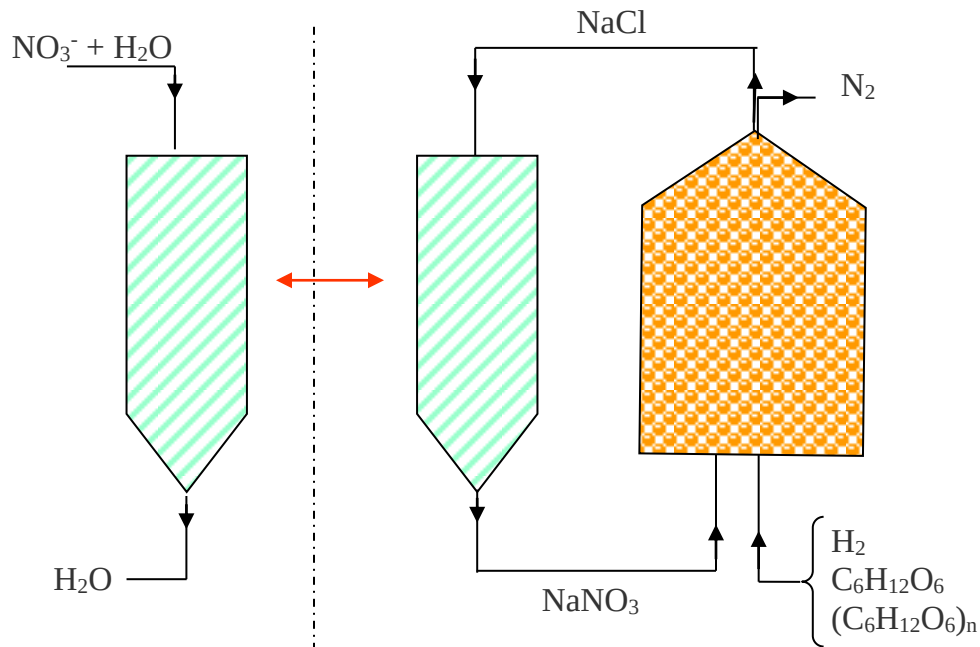
VII.4. ábra

Alginát gélágyba immobilizált, összetett biológiai denitrifikáló rendszer

VII.3. Kombinált eljárások

A kémiai nitrátmentesítés ioncserélő gyanta segítségével kombinálva biológiai denitrifikációval jelenti a leghatékonyabb megoldást. Az eljárás lényege, hogy az ioncserélő gyantán átáramoltatott nitrátos víz, a nitráttól megtisztul, és a tisztított víz további kezelés nélkül felhasználható ivó-, vagy öntöző vízként. Az ioncserélő

gyantáról sós vízzel lemoszuk a nitrátot, és a nitrátos sós szennyvizet áramoltatjuk át a bioreaktoron, mely tartalmazza az immobilizált denitrifikáló baktériumokat (VII.5. ábra). Az elfolyó vizet addig recirkuláltatjuk a bioreaktoron, amíg teljesen el nem fogy a nitrát, nitrit belőle.

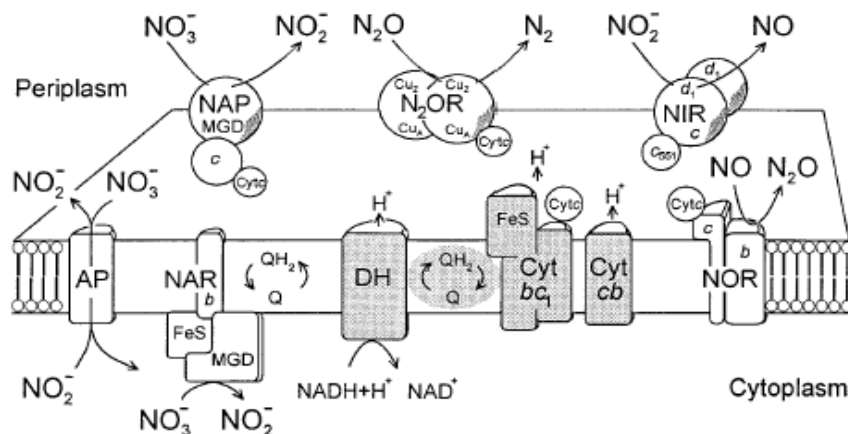


VII.5. ábra

Kombinált denitrifikáció: a nitráttal telített ioncserélő gyantát regenerálják: nagy sótartalmú vízzel mossák, majd az effluentet denitrifikáló bioreaktoron áramoltatják át

VII.4. A biológiai denitrifikáció

A denitrifikáló mikrobák közül a *Pseudomonas*ok a legdominánsabbak, de találunk köztük *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Xanthomonas*, *Bacillus* és *Streptomyces* fajokat is. A folyamatban általában négy kulcsenzim vesz részt nitrát-reduktáz, nitrit-reduktáz, NO-reduktáz, N_2O -reduktáz (VII.6. ábra).



VII.6. ábra

A *P. stutzeri* denitrifikációs enzimszere Zumft szerint (1997) AP: nitrát nitrit anioporter; NAR: nitrát-reduktáz (légzési); NIR: nitrit- reduktáz; NOR: NO-reduktáz; N2OR: N2O-reduktáz; NAP: periplazmatikus nitrát-reduktáz. A konstitutív aerob anyagcsere elektrontranszport lánc szürkével jelölve.

A folyamat kulcsenzime a nitrit-reduktáz, melyre számos paraméter hatással van: nitrát, intermedierek mennyisége/jelenléte, hőmérséklet, pH, sókoncentráció. A denitrifikáció egyes lépéseinek (VII.7. ábra) sebessége eltérhet egymástól, ilyenkor átmeneti intermedier feldúsulás következik be, ami gátolhatja a reakciósor teljes lefolyását. Optimális esetben a nitrát/nitrit reduktázok azonos sebességgel alakítják át a szubsztrátokat, így nem keletkezik fölösleges nitrit, megfelelő reakciólánc esetén, nitrit nem mutatható ki a rendszerben.



VII.7. ábra

A nitrát redukció lépései

VII.4.1. nitrát – nitrit átalakulás

Nagyon sok élőlény képes e reakciót katalizálni nitrát reduktáz enzimeikkel, melyek legtöbbször membrán kötöttek, és Mo^{2+} -t tartalmaznak. Azon mikroorganizmusok esetében, ahol periplazmatikus nitrát reduktáz (NAP) nincs, kialakult egy „kapu”, mely egy transzmembrán antiporter fehérje, és a nitrát-nitrit forgalomban van nagy szerepe. A kapun bejutó nitrátot a membrán kötött, de aktív

centrumával a citoplazmatikus tér felé forduló nitrát reduktáz enzim (NAR) képes redukálni. Megfigyelték, hogy a nitrát bejutással egyidőben nem történik töltésváltozás a membrán két oldalán, ami arra utal, hogy egyúttal nitrit távozik a kapun, ezt későbbi kísérletekkel igazolta Zumft [1997]. Általában a denitrifikáló baktériumok csak membrán kötött nitrát reduktázzal rendelkeznek, de előfordul egyes mikrobákban, hogy egy oxigénre kevésbé érzékeny nem membrán kötött, a periplazmatikus térben található nitrát reduktáz (NAP) is jelen van (VII.6. ábra).

VII.4.2. nitrit- nitrogén oxid átalakulás

A citoplazmatikus térben keletkező nitrit toxikus a sejtek számára, ezért gyors eltávolítása létfontosságú. Az antiporter fehérjén keresztül a periplazmatikus térbe jutó nitritet a nitrit reduktáz alakítja tovább nitrogén oxiddá. Sokáig vitatták e lépés valóságát, mivel a nitrogén oxid rendkívül instabil molekula, így a mérések során csak a következő intermediert a dinitrogén oxidot tudták kimutatni. Később sikerült jelenlétét kimutatni (Goretski 1988). Az eddigi vizsgálatok szerint a denitrifikáló baktériumokban két eltérő nitrit reduktáz lehet jelen. Az egyik csoport az un. *Cd1* típusú, mely prosztetikus csoportként hem *c*-t és hem *d1*-et tartalmaz, főleg *Pseudomonas*okban találták meg, a másik csoport, melyek prosztetikus csoportként Cu^{2+} -kat tartalmaznak, pl. *Achromobacter*-ek.

A *cd1* típusú enzimek érdekessége, hogy kettős funkcióval rendelkeznek. Katalitikus centrumában hem (*d1*) nemcsak nitritet képes redukálni, hanem citokróm-oxidáz funkcióval oxigént is elfogad, mint elektronakceptor (Fülöp és mtsai 1995), bár ez a folyamat sokkal lassabb. Ha oxigén jelenik meg a környezetben az enzimfunkció azonnal vált, és a redukációs folyamatok gátlódnak, amíg az oxigén jelenlét fennáll, mivel az oxigén irányába jóval nagyobb az enzim affinitása.

VII.4.3. nitrogén oxid – dinitrogén oxid átalakulás

Miután bizonyították a nitrogén oxid intermedier jelenlétét, azonosították a redukáló enzimet (NO-reduktáz) is, mely segítségével dinitrogén oxid keletkezik. Ez az enzim csak anaerob körülmények között szintetizálódik, membránba épülő fehérje, viszont aktív centruma a periplazmatikus tér felé néz, így az itt keletkező nitrogén oxidot könnyen „megfogja”, és átalakítja dinitrogén oxiddá. Bár ez az enzim is

tartalmaz hem *b* és hem *c* prosztetikus csoportokat oxidáz aktivitása nem ismert, sőt oxigén érzékeny. Érdekessége, hogy képes N-N kötések kialakítására.

VII.4.4. dinitrogén oxid – nitrogén átalakulás

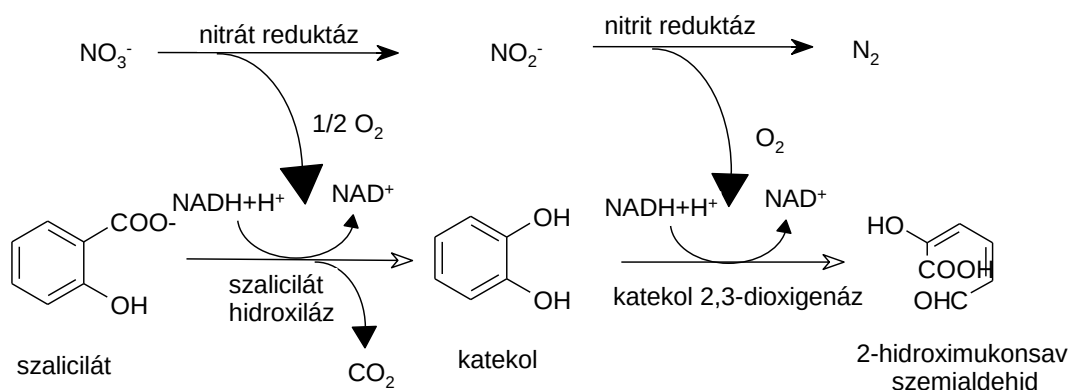
Az utolsó redukciós lépést a N₂O-reduktáz enzim katalizálja, mely általában 4 Cu²⁺ -t tartalmaz, csak anaerob körülmények között termelődik. Érdekessége, hogy nem függ a többi enzimtől, azaz önmagában is működőképes, és segítségével a denitrifikáló mikroorganizmus átalakítja a kívülről kapott N₂O-t is szerves szénforrás jelenlétében.

Általában a denitrifikálókra jellemző, hogy enzimbizetük egymástól függően működik, termelődik, elsősorban anoxiás körülmények között. Pl. *Pseudomonas stutzeri* esetében aerob környezetben sem a nitrát-, sem a nitrit-reduktáz nem termelődött, csak a N₂O-reduktáz volt kimutatható. Azonban vannak olyan mikroorganizmusok, melyek aerob körülmények között is redukálják a nitrátot pl. *Thiosphaera pantotropha* [Robertson 1984]. Természetesen az enzimtermelésre a szubsztátok mennyisége is hatással van az intermedier molekulák felszaporodása gátolja az enzimrendszer egyes elemeit vagy egészét [Körner 1989]. Az enzimrendszer talán legkritikusabb enzime a nitrit reduktáz, mely a környezeti faktorokra rendkívül érzékeny, pl. hőmérséklet, sótartalom, pH, oxigén szint [Katie 1994].

VII.5. A nitrát jelentősége a bioremediációban

A biológiai eljárások egyre népszerűbbek a környezetet ért szennyezések megszüntetésében használt technológiák között. Előnye a fizikai-kémiai rendszerekkel szemben, hogy költségkímélőek, bár tény, hogy a folyamat lassab. Mellette szól azonban, hogy még olyan kis koncentrációban is hatékonyan alkalmazható, ahol az egyéb eljárások szóba sem jöhetnek. Ráadásul kombinálható a pl. talajremediáció szennyvíztisztítással, amikor is a szennyvizek víz, só és szervesanyag tartalmát előnyösen hasznosítják a talajban jelenlévő szennyeződések eltávolításához „segédanyagokként”. A nitrát szennyezett vizek pl. így

hasznosíthatók. Számos talajremediációs eljárás nagy hátránya, hogy nem tudnak elegendő oxigént juttatni a környezetbe az aerob mikroorganizmusoknak, ezáltal a biodegradációs, biotranszformációs folyamatok gátoltak. Számos olyan mikroorganizmus képes a szennyezések elbontására, melyek alternatív elektronakceptorként elfogadják a nitrátot oxigén hiányában [Kuhn 1988, Bontig 1995]. Így a VII.8. ábrán látható reakciókban képesek hasznosítani a nitrát oxigénjét a szerves vegyületek bontásához egyes mikroorganizmusok, pl. *Pseudomonas*ok.



VII.8. ábra

A nitrát szerepe a biodegradációban oxigénhiányos környezetben

A fenti reakció sorból jól kivehető, hogy a nitrát oxigénje hogyan hasznosul egy, pl. aromás vegyület lebontása során [Cornelus 1996]. Bizonyított tehát az a feltételezés, hogy nitrátos szennyvizet hasznosítani lehet oxigénhiányos környezetben alkalmazott bioremediációs eljárásokban.

VII.6. Irodalomjegyzék

- Bontig C.F.C., S. Schneider, G. Schmidtberg, G. Fuchs (1995) Anaerob degradation of m-cresol via methyl oxidation to 3-hydroxybenzoate by a denitrifying bacterium. Arch. Microbiol. vol. 164: 63-69
- Cornelus F., C. Bontig, F. Georg (1996) Anaerob metabolism of 2-hydroxybenzoic acid (salicylic acid) by a denitrifying bacterium. Arch. Microbiol. vol. 165: 402-408

- Csry A., H. Rdegard, K. Bach, R. Pujol, M. Hamon (1998) denitrification in a packed bed biofilm reactor (BIOFOR)- experiments with different carbon sources. Water Res. vol. 32: 1463-1470
- Environmental Protection Agency: Criteria and Standards Division, Office of Drinking Water. 1990. Drinking water criteria document on nitrate/nitrite. Washington DC
- Fuchs W., G. Schatzmayr, R. Braun (1997) Nitrate removal from drinking water using a membrane-fixed biofilm reactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. vol. 48: 267-274
- Fülöp V., J.W.B. Moir, S.J. Ferguson, J. Hajdú (1995) The anatomy of a bifunctional enzyme: structural basis for reduction of oxygen to water and synthesis of nitric oxide by cytochrome cd1. Cell p.: 369-377
- GoretskiT., C. Hollocher (1988) Trapping of nitric oxide produced during denitrification by extracellular hemoglobin. J. Biol. Chem. Vol. 263: 2316-2323
- Katie L.T., D. Lloyd, L. Boddy (1994) Effects of oxygen, pH and nitrate concentration on denitrification by *Pseudomonas* species. FEMS Microbiol. Letters p.:181-186
- Kesserű P., I. Kiss, Z. Bihari, B. Polyák (2002) Investigation of the denitrification activity of immobilized *Pseudomonas butanovora* cells in the presence of different organic substrates. Water Res. vol. 36: 1565-1571
- Körner H., W.G. Zumft (1989) Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. Appl. Environ. Microbiol. p.: 1670-1676
- Kuhn E.P., J. Zeyer, P. Eicher, R.P. Shwarzenbach (1988) Anaerob degradation of alkylated benzenes in denitrifying laboratory aquifer columns. Appl. Environ. Microbiol. p.: 490-496
- Robertson L.A., J.G. Kuenen (1984) Aerobic denitrification: controversy revived. Arch. Microbiol. vol. 139: 351-354
- Zumft W.G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiol. Mol. Biol. Review p.: 533-616

VIII. Biogáztermelés

Bagi Zoltán, Dr. Kovács Kornél

Tartalomjegyzék

VIII. Biogáztermelés	287
VIII.1. A biogáz általános jellemzése	289
VIII.2. A biogáz előállításáért felelős mikroorganizmusok	289
VIII.3. A biogáz fermentációt befolyásoló paraméterek	294
VIII.4. Biogáz fermentáció anyagcsere útvonalai	295
VIII.4.1. Szénhidrátok	296
VIII.4.2. Zsírok	297
VIII.4.3. Fehérjék	299
VIII.5. Összegzés	301
VIII.6. Irodalomjegyzék	301

Bevezető

Napjainkban az egyre növekvő energiaigényt egyre nehezebben tudja kielégíteni az energiatermelő szektor. Az emberiség egyre növekvő létszáma, a fejlődő országok rohamos iparosodása egyre több energiát igényel. Ha a mai módon és ütemben folytatjuk az energia felhasználását, 30-40 éven belül válságos helyzet alakul ki a Földön. Jogosan merül fel bennünk a kérdés: Ki lehet-e elégíteni a XXI. század nagy energiaszükségletét? Jelenleg az igények túlnyomó részét, kb. nyolcvan százalékát a fosszilis ásványi tüzelőanyagokból (kőolaj, földgáz, szén) nyerik. A földtani kutatás új lehetőségeinek köszönhetően az ásványi tüzelőanyag közeli kimerülésétől még nem kell tartani. Manapság folyamatosan tárnak fel új előfordulásokat, de a fosszilis tüzelőanyagok végeessége nem vitatható, a gazdaságosan kinyerhető kőolaj és földgáz készletek kimerülőben vannak. Természetesen a Föld mélyében rengeteg kőolaj és földgáz található, de kitermelésüknél több energiát kellene befektetni, mint amennyi a kibányászott anyag hasznosítható energia tartalma. A szénből akár száz évre is elegendő ismert készletek vannak. A szén elégetésénél viszont sok olyan égéstermék keletkezik, ami az üvegházhatás és globális felmelegedés növekedésében játszik szerepet. Ezeknek a

hatásaival az „El Nino” jelenségcsoporton (tornádók, árvizek, szárazság) keresztül találkozhatunk.

A megújuló energiaforrások közül a legelterjedtebb felhasználása a biomasszának van. (Ahring B. K., 2003). A biomassa egy gyűjtőfogalom, az élő szervezetekből származó, folyamatosan termelődő energiatermelésre felhasználható anyagokat jelenti. Ez az emberiség legősibb energiaforrása. Ha visszatekintünk a történelemben láthatjuk, hogy a kis parasztgazdaságok számára igen nagy értéket jelentettek hőenergia forrásként. Máig legelterjedtebb biomassa a fa, de idetartoznak a mezőgazdasági melléktermékek, állati eredetű trágya, szennyvíziszap, kommunális hulladék és az energia növények (bagasse, kukorica cirok, csicsóka, manióka stb.). (Bai A., 2005)

A hagyományos biomassa hasznosítás a közvetlen égetés, ez hatékony, de környezetszennyező. (Bai A.- Lakner Z.-Marosvölgyi B.-Nábrádi, 2002) Anniből jobb a helyzet a fosszilis tüzelőanyagokhoz képest, hogy ha az elégetett biomassa mennyisége ugyannyi, mint a megtermelté, akkor a széndioxid gáz kibocsátása a fenntartható fejlődéssel abban az esetben összeegyeztethető, ha a felszabaduló széndioxid mennyisége pontosan annyi, amennyit az adott növény korábban megkötött.

A modern biomassa hasznosítás (komposztálás, bioetanol, biodiesel, biogáz előállítása) számos módszerét ismerjük. (Carruthers, 1986; Gibbons, W. R., Westby, C. A, 1984) A továbbiakban a biogáz előállítását fogjuk részletesen bemutatni. A biogáz anaerob fermentáció során keletkezik (Kacz K.-Neményi, 2003, Kaltwasser, B.J, 1983 Walsh, J. R. Jr. - Ross, C. C. - Smith, M. S. - Harper, S. R. - Wilkins, W. A.M., 1988, Bai A., 2005) Ez egy kiváló eljárás, mivel nemcsak úgy jutunk „zöld áramhoz”, hogy csak biomasszát hasznosítunk, hanem a környezetre káros anyagokat is felhasználjuk. Az anaerob kezelés ezáltal kulcsfontosságú lehet a szennyezések lebontásában, újrafelhasználásában, megújuló energia előállításában. Anaerob biogáz fermentorok a világ számos pontján működnek, legnagyobb hagyományokkal Nyugat-Európában rendelkeznek nagyüzemi fermentáció terén. (Baldwin, 1993) Magyarországon a technológia még gyerekcipőben jár, melynek oka a nem megfelelő állami támogatás, ennek ellenére hazánkban is találunk ipari méretű biogáz üzemeket,

sőt Európában az egyik legnagyobb kapacitással rendelkező üzem Nyírbátorban található.

VIII.1. A biogáz általános jellemzése

A biogáz szerves anyagok anaerob erjedése során képződő, a földgázhoz hasonló, rendkívül sokoldalúan felhasználható légnemű anyag. (Bai A., 2005, Olessák Dénes, Szabó László, 1984) Előállítására bármely, az élelmiszergazdaságban és a kommunális szférában képződött szerves anyag alkalmas. A folyamat spontán beindul olyan területeken, ahol nagy koncentrációban, oxigénmentes környezetben van jelen nedves szerves anyag. Ilyen területeket találhatunk mélyvízi tengeröblökben, mocsarakban, tőzeges területeken, hulladéktároló telepeken és állatok bélrendszerében. A spontán létrejövő biogáz fermentáció igen csekély hatékonyságú, azonban mesterséges beavatkozással a gáztermelés megsokszorozható. A mikrobák együttműködésével nyert gáz mintegy 50-70 % éghető metánt, 28-48 % égésre képtelen széndioxidot és 1-2 % egyéb gázt, elsősorban kénhidrogént és nitrogént tartalmaz. A földgáz, mint ismeretes, gyakorlatilag teljes egészében metánból áll, ezért a biogáz fűtőértéke a metán részarányától függően a földgáz fűtőértékének 50-70 %-át teszi ki, ez azonban növelhető sűrítéssel, illetve a széndioxidtól való megtisztítással. Legmagasabb a metántartalma a szennyvíziszapokból erjesztett biogáznak (70%), ezt követi a mezőgazdasági melléktermékekből (60-65%), majd a szilárd települési hulladékokból (50%) nyerhető gáz metántartalma.

VIII.2. A biogáz előállításáért felelős mikroorganizmusok

A biogáz előállításában számos baktérium csoport, populáció vesz részt. Ezen törzsek szimbiotikus kapcsolatban állnak egymással, egyes baktérium csoportok anyagszere termékeit más baktérium törzsek felhasználják, további átmeneti termékek keletkeznek (Bai A., 2005) (VIII.1. ábra). A folyamat során egy igen kényes

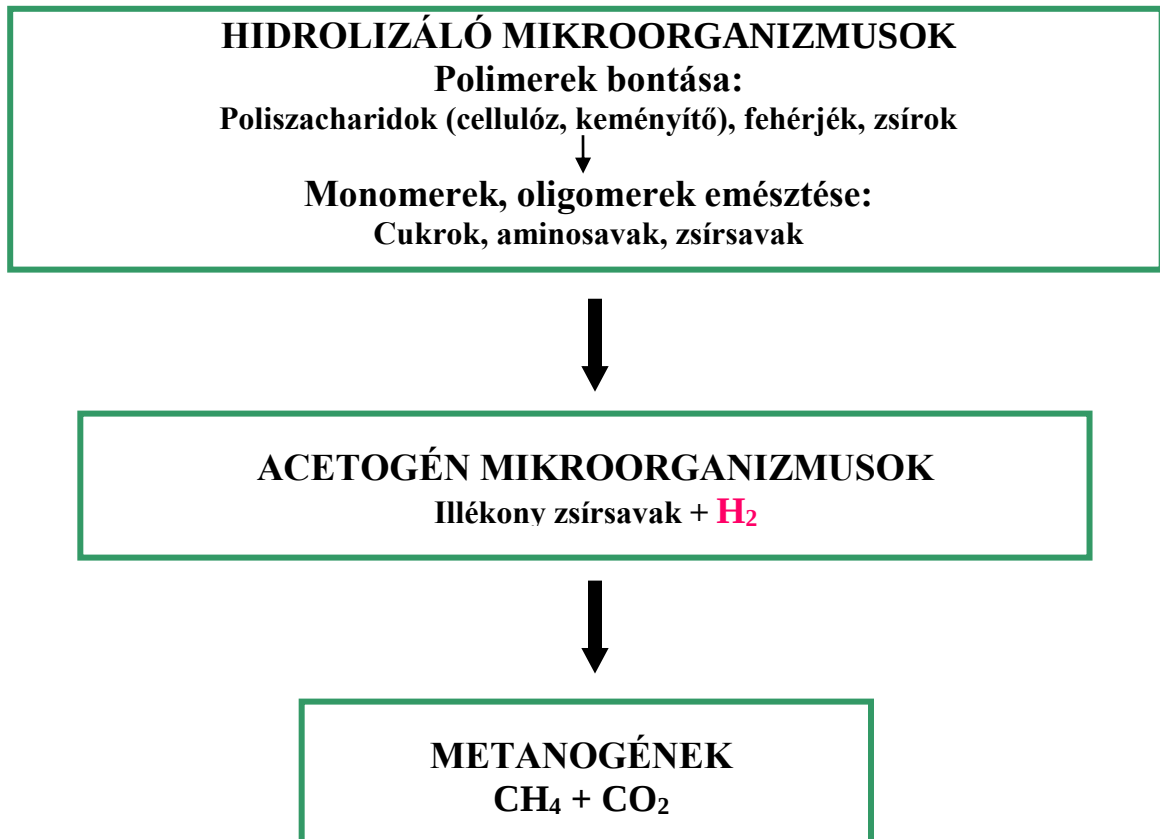
egyensúly alakul ki, melyet számos faktor befolyásol. A környezeti tényezők igen kis mértékű változása is felboríthatja ezen egyensúlyt, mely a biogáz képződés megszűnéséhez vezethet.

A folyamatban részt vevő baktérium törzsek első csoportja a fakultatív és obligát anaerob polimerbontó mikroorganizmusok. Ezen törzsek végzik a nagymolekulájú szerves vegyületek részegységekre való bontását, miközben melléktermékként szén-dioxid gáz keletkezik. A nagymolekulájú szerves vegyületek közül említhetjük például a cellulózt, mely a legáltalánosabban előforduló makromolekula. (Dague, R. R. - Chyi, Y. T., 1994) Működésük eredményeként olyan köztitermékek keletkeznek, melyeket a mikroorganizmusok következő csoportja, a savképző, vagy másnéven acetogén baktériumok használnak fel.

A hidrolizáló baktériumok által fel nem használt oligo- és monoszacharidokat, zsírsavakat, aminosavakat és főként a rengeteg illó szerves savat az acetogén mikroorganizmusok acetáttá (ecetsav sója) és hidrogénné alakítják tovább. A természetes úton képződő metán mennyiség kb. 70%-a acetátból keletkezik. Az acetogének nagyon sokfélék és a környezeti hatásoknak általában ellenállóak. Ez érthető is, hiszen mint látjuk sokféle tápanyagot tudnak hasznosítani, ami a túlélési esélyeiket lényegesen növeli. Mivel a következő csoportnak, a metanogéneknek redukálószerként hidrogént termelnek, az acetogének fontos szerepet kapnak a megfelelően alacsony redoxpotenciál kialakításában is. Ha a környezeti feltételek segítik ezen baktérium törzsek elszaporodását, és az általuk termelt vegyületeket a többi baktérium csoport nem tudja felhasználni az károsan hathat a biogáz képződésére, ugyanis a felszaporodott szerves savak a rendszer pH-ját savas irányba tolhatják el, mely nem kedvez a biogáz képződésnek. A fermentatív folyamatok legjelentősebb mikroorganizmusai a következők: *Lactobacillus sp.*, *Propionibacterium sp.*, *Salenomonassp.*, *Clostridium sp.*, *Proteus sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Enterobacter sp.* (Olessák Dénes, Szabó László, 1984)

A szerves savak felhasználásáért nagyrészt a mikróbák harmadik fő csoportja, az úgynevezett metánképző, vagy metanogén mikroorganizmusok a felelősek. A harmadik, szigorúan anaerob körülmények között megvalósuló lépés a

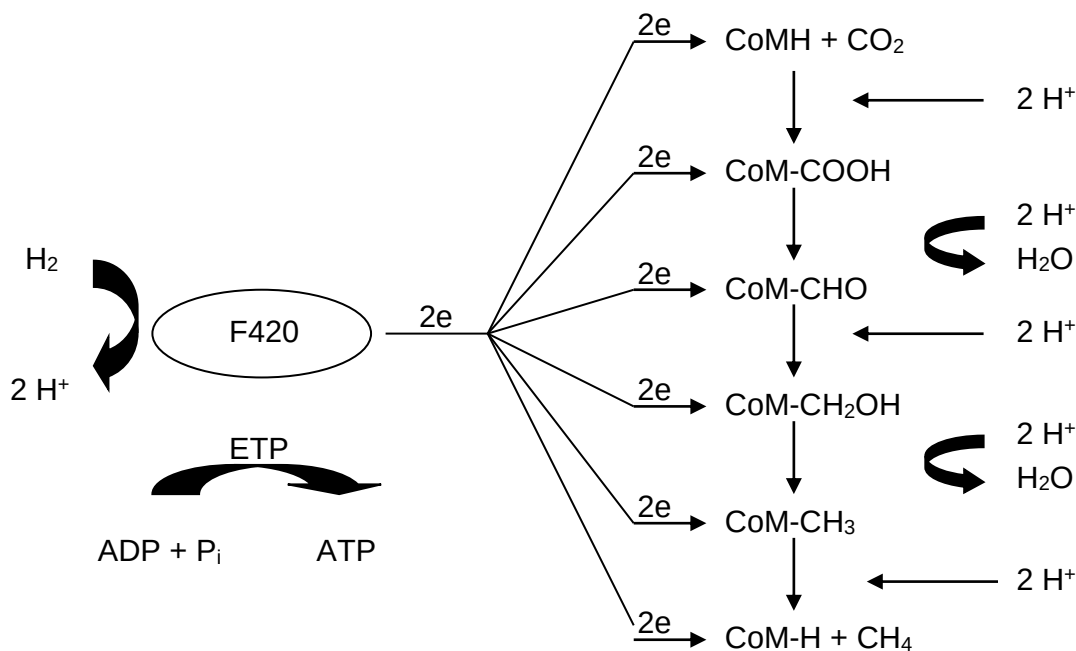
metanogenezis, amikor a metanogén mikroorganizmusok metán és széndioxid keverékét, biogázt állítanak elő.



VIII.1. ábra
Biogáz képződés folyamata

Néhány metanogén a hidrogént közvetlenül a széndioxid redukálásra tudja fordítani, mások az acetátot alakítják át széndioxiddá és metánná. Az egész biogáz termelési folyamat sebességét meghatározó mikrobiológiai folyamat a metanogenezis. A metanogének a mikroorganizmusok különleges, legősibb fejlődési vonalához tartoznak, amelyeket Archaea-nak nevezünk. Ezek a mikróbák sok különleges tulajdonsággal rendelkeznek, biokémiai reakcióik, membrán szerkezetük és szaporodásuk molekuláris mechanizmusa is több lényeges ponton eltér a ‘közönséges’ baktériumokétól. A bennük lezajló életfolyamatok nagy vonalakban hasonlóak a baktériumokéhoz, de a molekuláris részleteik jelentős eltérést mutatnak. A metanogének fontos tulajdonsága, hogy lassan szaporodnak és rendkívül

érzékenyek a környezeti feltételek változásaira. A metanogének aktivitásának csökkenése másrésről azt jelenti, hogy az acetogének által termelt szerves savak felhalmozódnak, ami az egész folyamat “elsavanyosodásához”, a biogáz termelés teljes leállításához vezet. A metanogén mikroorganizmusoknak igen sok törzse létezik, ezáltal lehetségessé válik, hogy az anaerob biodegradáció széles hőmérsékleti tartományban létrejöjjön, 15°C-tól 55°C-ig, 60-99% víztartalom esetében is. Az összes metánbaktérium képes a hidrogén hasznosítására, többségük a hangyasav felhasználására, de csak egy faj van, mely metanolból metán előállítására képes. A metánbaktériumok hidrogén feldolgozás közben, az elektrontranszfer-foszforiláció révén elvesztik energiájukat. A hidrogént oxidálják, nem szabad oxigénnel, hanem a széndioxid kötött oxigénjével. E folyamatban két biokémiai komponens játszik kulcsszerepet: az F420 és az M-koenzim. Az F420 egy fluoreszkáló komponens, elektrontranszferként működik. Az M-koenzim 2-merkaptó-etanolkénsav, amely metiltranszfer ágensként működik (VIII.2. ábra). A metanogének nagy hidrogénigénye és átalakítóképesége következtében az acetogén baktériumok számára a kis hidrogénkoncentrációt csak a metanogének jelenléte tudja biztosítani. Ezen ok miatt laboratóriumi körülmények között az acetogéneket tiszta tenyészetben nem lehet vizsgálni. A metánbaktériumoknak négy morfológiai típusát különböztetjük meg, melyek a metanobaktériumok, a metanococcusok, a metanosarcinák és a metanospirillumok. A mezofil metanogén mikroorganizmusok jellemző törzse a *Methanococcus Mezei* nevű, 0,001 mm-nél kisebb, spóramentes mozdulatlan, Gram-labilis baktérium. Alacsonyabb hőmérsékleten a *Methanosarcina methanica* szaporodik el legnagyobb mértékben, hőmérsékletingadozásra ez a legkevésbé érzékeny törzs, már 5°C felett életműködésre képes. Termofil tartományban a metánképzők jellemző törzsei a *Methanobacterium loehngeniei* és a *Methanobacterium omelianski*, Gram-negatívok, vékony pálcika alakúak, mozgásra képtelenek. (Bai A., 2005, Olessák Dénes, Szabó László, 1984)



VIII.2. ábra
Metánbaktériumok hidrogén-oxidációs tevékenysége

A fent említettek mellett szulfátredukáló baktériumok is megtalálhatóak a rendszerben, melyek szulfátból és egyéb különböző kén vegyületekből hidrogén-szulfidot állítanak elő. A hidrogén-szulfid reakcióba lép a vas és egyéb nehézfém sókkal, azokkal oldhatatlan szulfidokat képez, mindezek ellenére állandóan megtalálható egy kevés hidrogén-szulfid a biogázban.

A biogáz fermentációban szerepet játszó baktérium konzorcium laboratóriumi körülmények között nem szaporítható. Egyes törzsek tiszta kultúrája fenntartható, azonban a teljes komplex rendszer kontrolált körülmények közötti szaporítására nincs mód. A biogáz fermentorban kialakuló természetes mikroba populáció igen összetett, a fent leírtakból látható, hogy az egyes törzsek életben maradásához más törzsek anyagcsere termékeire van szükség. Ezen oknál fogva csak biogáz előállítására alkalmas fermentorokban szaporíthatók, tarthatók fenn.

VIII.3. A biogáz fermentációt befolyásoló paraméterek

(Olessák D., Szabó L. 1984)

- **Hőmérséklet**

Az anaerob biodegradáció alacsony hőmérsékleten, pszikrofi körülmények között is végbemegy (25°C alatt), mindezek ellenére a hagyományos anaerob fermentorok a legtöbb esetben mezofil hőmérsékleten (30-35°C) illetve termofil hőmérsékleten (50-55°C) működnek. Ezen ténynek két fő oka van: Magasabb hőmérsékleten a reakciók gyorsabban játszódnak le, ezáltal adott idő alatt nagyobb mennyiségű szerves anyag betáplálásra van lehetőség, tehát csökken a biomassza fermentorban való tartózkodási ideje, végeredményben növelhető a fermentor kapacitása. A másik ok pedig az, hogy magasabb hőmérsékleten a patogén mikroorganizmusok túlélési esélye jelentősen csökken.

- **pH**

A biogáz fermentáció semleges (pH=7,0) körülmények között jön létre, ettől egyes esetekben 1 egységgel el lehet térni savas vagy lúgos irányban (pH=6,0-8,0), ekkor azonban már felborulhat a mikrobiális egyensúly.

- **Oxigén**

A fermentáció kizárólag anaerob körülmények között játszódik le, melynek oka, hogy számos obligát anaerob törzs vesz részt a folyamatban.

- **C/N arány**

A fermentáció számára fontos, hogy a betáplált szervesanyag viszonylag állandó összetételű legyen, hogy abban kiegyensúlyozott mikroba populáció alakuljon ki. Az alapanyag jellemzőinél azonban a C/N arányt is figyelembe kell venni. A baktériumok sejtfehérjéinek felépítésére ugyanis nitrogénre van szükség. A kis nitrogéntartalom a nagy szénmennyiség feldolgozását akadályozza, míg a túl nagy nitrogéntartalom az ammónia felhalmozódásához vezet, mely a baktériumok növekedését és ezáltal a metánképződést akadályozza. Az optimális C/N arány 10-40 közé tehető.

- Toxikus anyagok

Az oxigént mérgező anyagnak tekinthetjük, ugyanis a metanogén baktériumok obligát anaerobok, így oxigén jelenlétében elpusztulnak. Ez azonban nem szokott nagy problémát jelenteni, mivel a rendszerben számos fakultatív anaerob baktérium is jelen van, mely a rendszerbe került oxigént gyorsan felhasználják.

Az alkálifém és alkáli földfém ionok csak nagy koncentrációban toxikusak a rendszerre. $5-10 \times 10^{-3} \text{ kg/dm}^3$ feletti Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} mennyiség jelenthet problémát.

A nehézfémek, mint például az ólom, réz, kadmium $5 \times 10^{-6} \text{ kg/dm}^3$ koncentráció esetén már károsan hat a metánképződés folyamatára. Szulfidionok jelenlétében ezek hatása jelentősen mérséklődik, ugyanis szulfidok képződése mellett kicsapódnak.

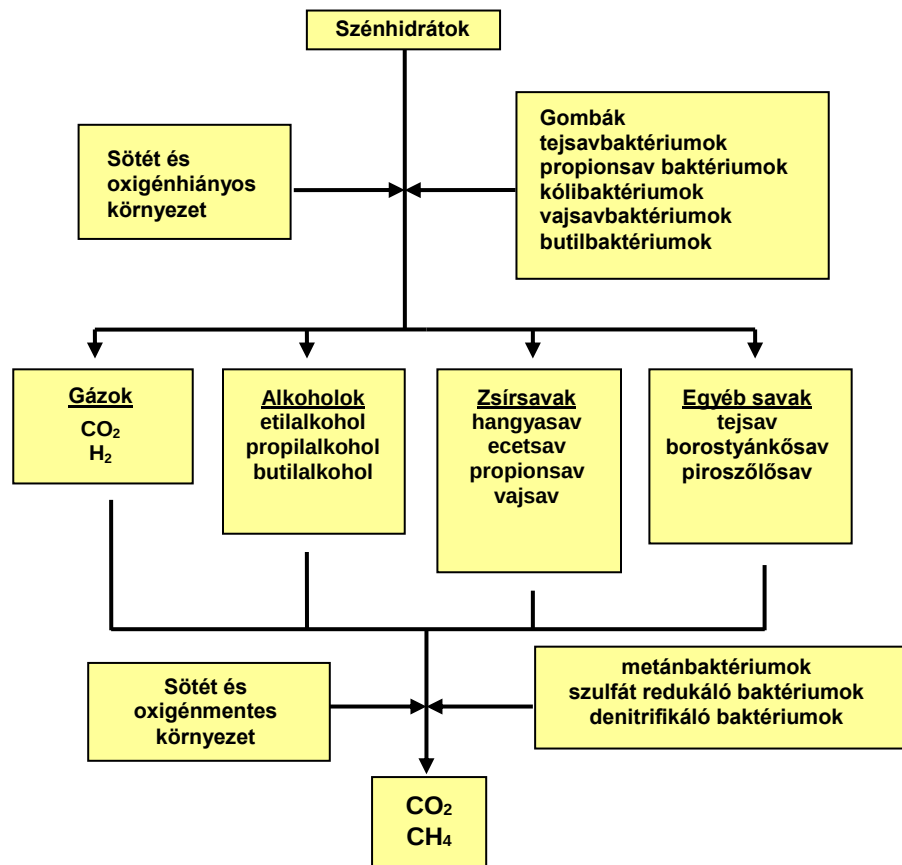
Különösen veszélyesek a klórozott szénhidrogének, melyek már $2 \times 10^{-6} \text{ kg/dm}^3$ koncentráció esetén is megszüntetik az erjedést. A cianid ionok jelenléte szintén nagyon veszélyes.

VIII.4. Biogáz fermentáció anyagcsere útvonalai

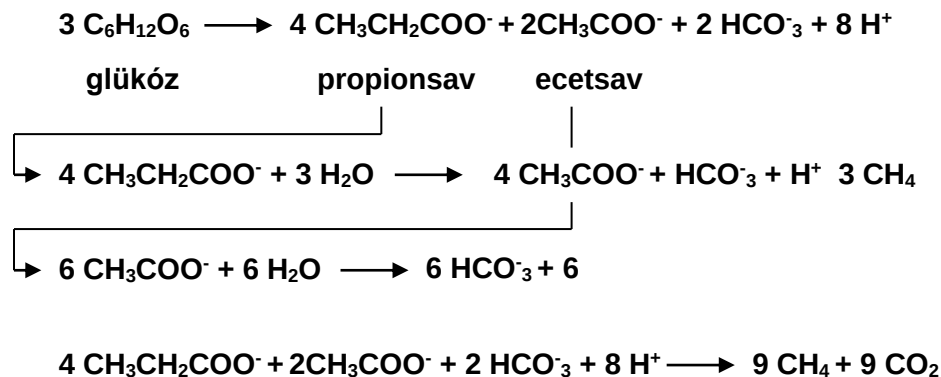
A biogáz fermentációra felhasznált szerves anyagok egy része fotoszintetikus eredetű növényi anyag, más része állati eredetű élelmiszerek maradékai és állati ürülék. (Department of Energy, 1995) Ezen anyagok pontos kémiai összetétele nem állapítható meg, azonban elmondható, hogy a növényi anyagok fő alkotója a cellulóz, különböző hemicellulózok, cellulózszármazékok, cukrok, melyeket összefoglalóan szénhidrátoknak nevezünk. Az állati eredetű hulladékokban főleg fehérjéket, peptideket, zsírokat és olajokat találunk. E fő alkotórészek mellett jelentéktelen mennyiségben találunk vitaminokat, hormonokat, enzimeket, valamint a fő alkotórészek bomlásából származó egyszerű szerves vegyületeket, mint pl. aldehidek, zsírsavak, glükóz. A biogáz előállítás biokémiai folyamatainak ismertetése során tehát három fő vegyületcsoportra kell koncentrálnunk, melyek a szénhidrátok, fehérjék és zsírok. (Bai A., 2005, Olessák Dénes, Szabó László, 1984)

VIII.4.1. Szénhidrátok

A biogáz fermentáció során legnagyobb mennyiségben különböző szénhidrátok állnak rendelkezésre szubsztrátként (VIII.3. ábra). Ezen vegyületeket a fermentatív törzsek (tejsavbaktériumok, propionsav baktériumok, kólibaktériumok, vajsavbaktériumok és butilbaktériumok) támadják meg enzimeik segítségével. A folyamat eredményeként különböző köztitermékek keletkeznek, melyek a következők: gázok (széndioxid, hidrogén), alkoholok (etilalkohol, propilalkohol, butilalkohol), zsírsavak (hangyasav, ecetsav, propionsav, vajsav) és egyéb savak (tejsav, borostyánkősav, piroszölősav). Ezen molekulákat hasznosítják a metánbaktériumok, melyek termelik a biogáz két fő komponensét, a metánt és a széndioxidot (Olessák Dénes, Szabó László, 1984). A VIII.4. ábrán a glükóz lebomlása látható, a folyamat eredményeként 1:1 arányban keletkezik metán és széndioxid.



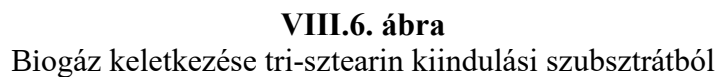
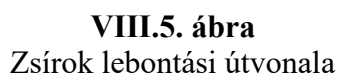
VIII.3. ábra
Szénhidrátok lebontási útvonala



VIII.4. ábra
A glükóz átalakítása biogázzá

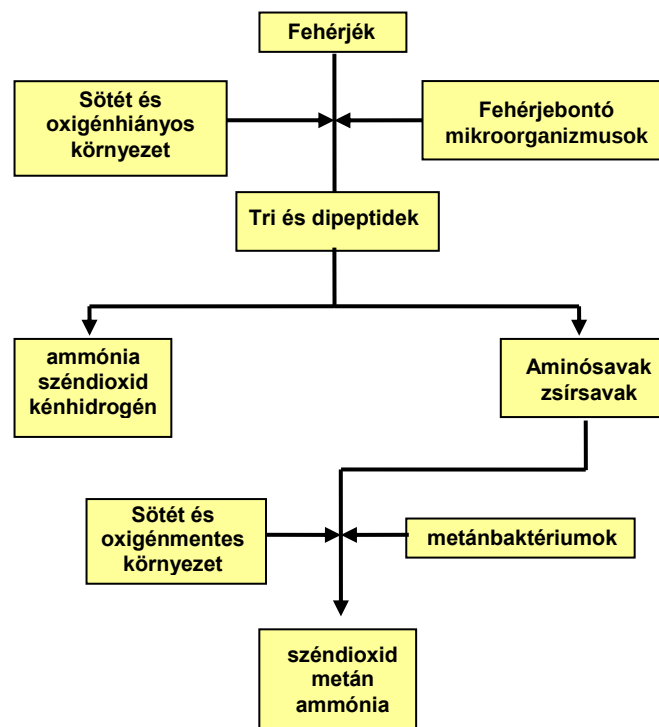
VIII.4.2. Zsírok

A zsírok lebontásában zsírbontó baktériumok játszanak szerepet, működésük eredményeként zsírsavak és glicerin keletkezik. A glicerint a kólibaktériumok, propionsav baktériumok, vajsav baktériumok hasznosítják, különböző gázokká (széndioxid, hidrogén), savakká (hangyasav, ecetsav, propionsav, vajsav, tejsav, borostyánkősav) és alkoholokká (etilalkohol, butilalkohol) alakítják. A folyamat utolsó lépésében a metánbaktériumok játszá a fő szerepet, állítják elő a biogázt (VIII.5. ábra). Példakét a tri-sztearin lebomlását mutatjuk be (VIII.6. ábra) (Olessák Dénes, Szabó László, 1984).



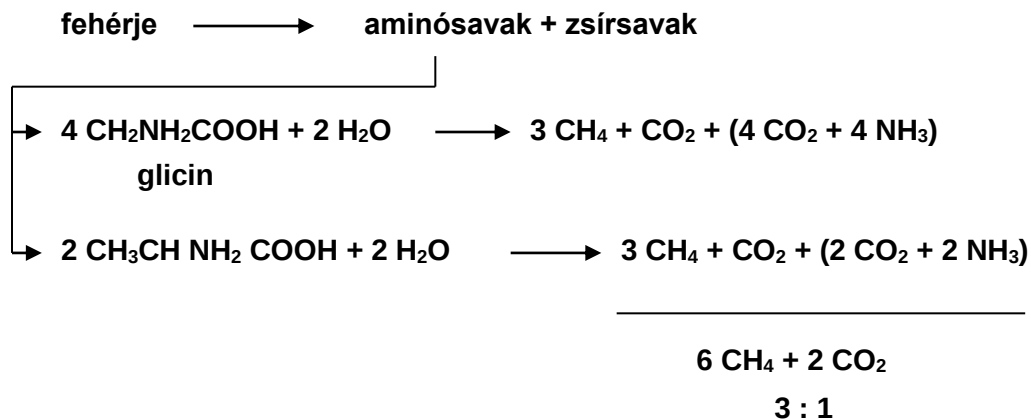
VIII.4.3. Fehérjék

A fehérjéket a fehérjebontó baktériumok kezdik el lebontani enzimeik segítségével, mely során rövidebb szénláncú peptidek (di és tripeptidek) keletkeznek. Ezen vegyületek alakulnak tovább gázokká (ammónia, széndioxid, kéndioxid), valamint szerves savakká (aminósavak, zsírsavak). A folyamat befejező lépésében a metánbaktériumok játszanak szerepet, biogázt állítanak elő (VIII.7. ábra). A részletes átalakulási folyamatokat a VIII.8. ábra szemlélteti (Olessák Dénes, Szabó László, 1984).

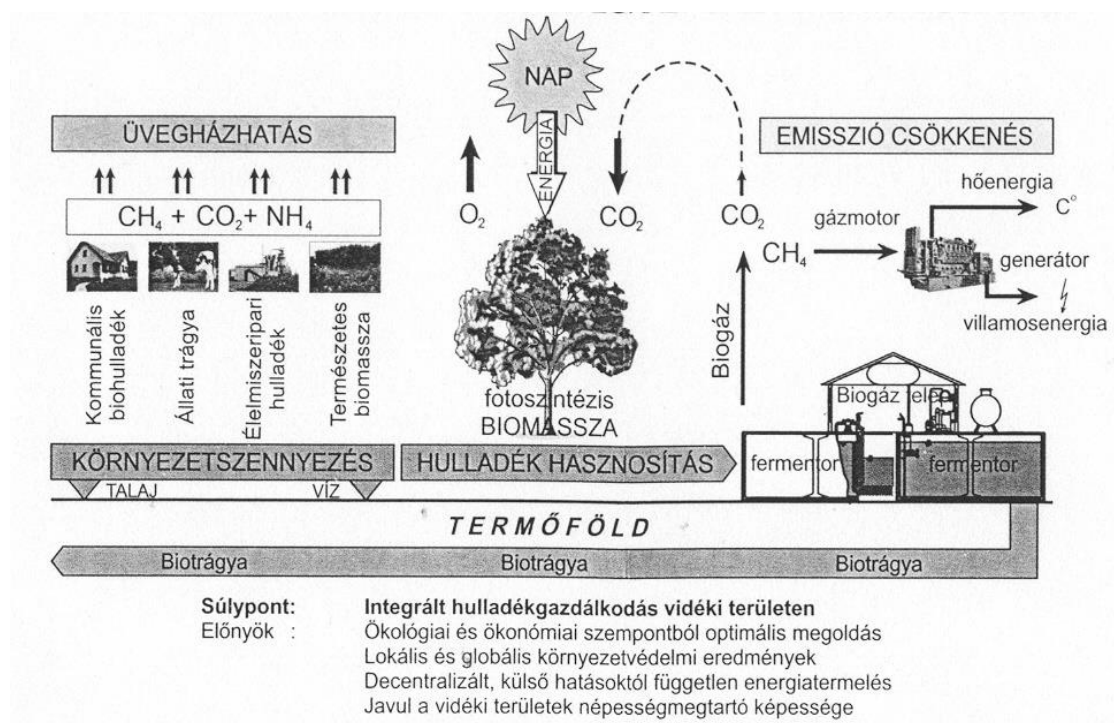


VIII.7. ábra

Fehérjék lebontási útvonala



VIII.8. ábra
 Biogáz képződés fehérje alapanyagból kiindulva



VIII.9. ábra

A biogáz felhasználásával, és a folyamatosan keletkező biomassza hasznosításával javíthatunk környezetünk állapotán

VIII.5. Összegzés

A biogáz mint megújuló energiaforrás a jövőben gazdaságosan kiválthatja a ma még általánosan elterjedt fosszilis energiahordozókat (VIII.9. ábra). A folyamat mikrobiális és biokémiai háttere már igen jól ismert, a jelenlegi kutatások a hatékonyság fokozását tűzték ki célul. A világ számos pontján működnek nagyüzemi méretű biogáz erjesztő fermentorok, számuk az elmúlt években megsokszorozódott, napjainkban egyre nagyobb mértékben hozzájárulnak a nagyvárosok energiaellátásához. Csökkenthető használatával a környezet szennyezése, a felszabaduló CO₂ visszakerül a körforgásba, azok a növények hasznosítják, melyeket később biomasszaként a biogáz előállításához felhasználunk. A fosszilis energiahordozókkal ellentétben a biomassa kimerülésétől nem kell tartanunk, így módon a megújuló energiaforrásokból nyert energia hosszú távra megoldhatja az emberiség ezen irányú problémáit.

VIII.6. Irodalomjegyzék

1. Ahring B. K. (szerk.): Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology. Vol. 83. Biomethanation I. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York. (2003)
2. Bai A.- Lakner Z.-Marosvölgyi B.-Nábrádi A.: A biomassa felhasználása. Szerkesztette: Bai A. Szakkönyv. Szaktudás Kiadó Ház. ISBN 963 9422 46 0. Budapest, 2002. pp. 1-230
3. Baldwin: Anaerobic Digestion in the UK. A Review of Current Practice. ETSU, 1993. No. B/FW/00239/REP
4. Carruthers, S. P. : Biofuels: past and future. Technologies and feedstocks, Journal of the Royal Agricultural Society of England, London, 1986. pp. 63-72
5. Dague, R. R. - Chyi, Y. T.: Effects of particulate size in anaerobic acidogenesis using cellulose as a sole carbon source. Water Environment Research, Washington, D.C., 1994-a., Vol. 66, No. 5, pp. 670-678

6. Department of Energy: Methane recovery from animal manures: a current opportunities casebook. USDOE, Washington, USA, 1995. pp. 2-12, 20-23
7. Gibbons, W. R., Westby, C. A. (1984): A Continuous farm-scale, solid-phase fermentation process for fuel ethanol and protein feed production from Fodder Beets. *Biotechnology and bioengineering*, vol. 24. p. 1098-1107.
8. Kacz K.-Neményi M.: Megújuló energiaforrások. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó. B Kalmár I.– Krizsán J.- Kovács K.-Bagi Z.: Biogáz-előállítás hígtrágyából. VI. Biomassza Konferencia, Sopron, 2003. március 6-8.
9. Kalmár I.– Krizsán J.- Kovács K.-Bagi Z.: Biogáz-előállítás hígtrágyából. VI. Biomassza Konferencia, Sopron, 2003. március 6-8.
10. Kaltwasser, B.J.: Biogáz-előállítás és hasznosítás. Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1983.
11. Kissné Quallich E.: A biogáz. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1983
12. Kovács K., L., Bodrossy L., Bagyinka Cs., Perei K., Polyák B.: On the microbial contribution to practical solutions in bioremediation. *OECD Documents on Wider Application and Diffusion of Bioremediation Technologies*. Amsterdam, The Netherlands. pp. 381-390. (1996)
13. Lindley, J. A. - Dahlberg, S. P. - Giles, J. F.: Effect of anaerobic digestion on nutrient availability from dairy manure. *American Society of Agricultural Engineers*, St. Joseph, Michigan 1988-b, Vol. 31., pp. 1211-1216
14. Mátyás L.: Large-scale biogas plants in Hungary. *Proceedings of the FAO/CEC Workshop*, Silsoe, U.K. 1985. ápr. Elsevier Applied Science Publishers, 1986., pp. 336-342.
15. Walsh, J. R. Jr. - Ross, C. C. - Smith, M. S. - Harper, S. R. - Wilkins, W. A.: *Biogas Utilization Handbook*. Georgia Tech Research Institute, Atlanta, USA. 1988
16. Olessák Dénes, Szabó László: *Energia Hulladékból* Műszaki Könyvkiadó, Budapest 1984
17. Bai A. Biogáz előállítás – Jelen és jövő, Szaktudás Kiadó Ház. 2005