

A SZULFANILSAV BIOLÓGIAI LEBONTÁSA

Doktori disszertáció

Készítette:

Perei Katalin

MTA Szegedi Biológiai Központ

Biofizikai Intézet

1999

TARTALOMJEGYZÉK

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
II. BEVEZETÉS.....	4
III. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
III.1 BIOREMEDIÁCIÓ.....	7
III.1.1 A szulfanilsav.....	8
III.1.2 A <i>Pseudomonas paucimobilis</i>	11
III.2 IMMOBILIZÁLÁS.....	12
III.2.1 Immobilizálás felületi rögzítéssel.....	13
III.2.2 Immobilizálás bezárással.....	14
III.2.3 Immobilizált mikroorganizmusok bioremediációs alkalmazása.....	16
IV. CÉLKITŰZÉS.....	18
V. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	19
V.1 ANYAGOK.....	19
V.2 MÓDSZEREK.....	19
V.2.1 Szulfanilsav bontó <i>P. paucimobilis</i> sejtek izolálása.....	19
V.2.1.1 A kísérletek során felhasznált tápoldatok, táptalajok, pufferek.....	19
V.2.1.2 Az izolálás menete.....	20
V.2.1.3 Az izolátum meghatározása.....	21
V.2.1.4 A sejtek tárolása.....	21
V.2.2 A szulfanilsav bontás hatékonyságának optimalizálása szabadsejtes kultúrával.....	22
V.2.3 Immobilizálási eljárások.....	22
V.2.4 Ipari szennyvizes kísérletek.....	23
V.2.5 HPLC mérések.....	23
V.2.6 Sejtextraktum készítése.....	24
V.2.7 Fehérje meghatározás.....	24
V.2.8 Enzimaktivitás mérés.....	24
V.2.9 SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE).....	25
VI. EREDMÉNYEK.....	26
VI.1 Szulfanilsav bontó mikroorganizmus izolálása.....	26
VI.2 A tápoldat összetevőinek és a pH hatása a lebontó aktivitásra.....	27

VI.2.1	<i>Az optimális pH kiválasztása</i>	27
VI.2.2	<i>A megfelelő foszfát koncentráció megkeresése</i>	27
VI.2.3	<i>A kétértékű kationok jelenléte</i>	28
VI.3	<i>A szulfanilsav bontás koncentráció függése</i>	28
VI.4	<i>A vas és egyéb összetevők jelenlétének hatása</i>	28
VI.5	<i>Ipari szennyvízben oldott szulfanilsav lebontása</i>	29
VI.6	<i>Rögzítéssel kísérletek</i>	30
VI.6.1	<i>Adszorpció</i>	31
VI.6.2	<i>Bezáráson alapuló sejtrögzítés</i>	31
VI.7	<i>A lebontó folyamat kulcsenzimeit, lehetséges intermedierjeit</i>	33
VI.7.1	<i>P. paucimobilis növesztése különböző aromás vegyületeken</i>	33
VI.7.2	<i>Dioxigenáz aktivitás mérések</i>	33
VI.7.3	<i>A P. paucimobilis szubsztrát indukált fehérjéinek SDS-PAGE analízise</i>	34
VII.	EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	35
VIII.	ÖSSZEFOGLALÁS	40
IX.	IRODALOMJEGYZÉK	42

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

4-aminobenzolszulfonsav = szulfanilsav, SA

3-aminobenzolszulfonsav = metanilsav

4-aminobenzoésav = PABA

3,4-dihidroxibenzoésav = protokatekol, PC

etiléndiamin-tetraecetsav nátrium sója = Na₂EDTA

Tris-(hidroximetil)-amino-metán = Tris

nagy nyomású folyadékkromatográfia = HPLC

nátrium-dodecil szulfát - poliakrilamid gélelektroforézis = SDS-PAGE

II. BEVEZETÉS

Az elmúlt évtizedekben a növekvő gazdasági aktivitásnak köszönhetően egyre nagyobb mennyiségű szennyező anyag került ki a természetbe, melyek nagymértékben károsíthatják az élővilágot. Éveken keresztül állítottak elő olyan szintetikus anyagokat, melyek lebomlását, toxicitását meg sem vizsgálták.

Ha nem következik be változás a vegyszerek előállítási eljárásaiban, vagy a környezetbe jutott hulladékok gyors és hatékony lebontásában, vagy újra hasznosításában, visszafordíthatatlan környezeti károsodások keletkezhetnek szerte a világon, mely döntően kihathat az emberi tevékenységre és egészségre. Az ipari cégek többsége pl. égetéssel oldja meg a szennyező anyagok, hulladékok eltávolítását. Ez azonban sokszor nem jelent megoldást, mivel az égetés során keletkező anyagok gáz illetve hamu formájában továbbra is szennyezik a környezetet, és számos szennyező anyagot el sem lehet égetni (pl. szennyvíz).

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

Világszerte felismerték, hogy a környezet védelme minden ország közös érdeke, és csak összefogva, együttműködve lehet a problémát megoldani. Hiszen a levegőben, folyókban található szennyeződések nem állnak meg az országok határainál.

Így hazánkban is felerősödött a környezetvédő mozgalom, és az ipari cégeknek is be kell látniuk, hogy a technológiáik kifejlesztésénél a környezet védelme kiemelt fontosságú szempont. Ezért az összes új technológiát környezetbaráttá kell tenni, és a környezetre veszélyes vegyületek ártalmatlanítását meg kell oldani. Többféle stratégiát dolgoztak ki a hulladékok környezetbe jutásának megelőzésére illetve a szennyeződések eltávolítására a környezetből. Módosították a termelési eljárásokat (pl. a keletkező sók, savak, gázok feldolgozása; a reakciók specifikitásának növelése; a termék kinyerésének egyszerűsítése; stb.), modernizálták a berendezéseket, mely által csökkent a hulladék mennyisége. Gyakran alkalmaznak kémiai hidrolízist (pl. észterek esetén), égetést, levegőztetést, szűrést, és nem utolsósorban biológiai módszereket a hulladékok

lebontására, eltávolítására. A kémiai-fizikai eljárásoknak általában igen nagy a költség igénye.

A nemzetközi szabványok bevezetése következtében az értékhatárok változtak, és olyan koncentrációban is el kell távolítani a vegyületeket a környezetből, melyeket az eddigi technológiákkal már nem tudnak megoldani. Erre a feladatra a legalkalmasabb módszerek a biológiai eljárások, melyek során a mikroorganizmusok nyomnyi mennyiségű szerves anyagot is képesek felhasználni. Komoly hátráltatója a bioremediációs technológiák elterjedésének a felvevő ipar kételkedése a folyamatok hatékonyságában, és tisztaságában.

A szerves molekulák spontán átalakulása, semlegesítése, vagy teljes lebontása a természetes vizekben és a talajban leggyakrabban mikrobiális aktivitás eredménye. Általában az egyedi fajok a kialakult mikrobiális ökoszisztémában nem képesek az egyes szennyező anyagokat bontani, hanem együttesen, egymást segítve maradnak fenn a toxikus környezetben, és így már tudják használni, saját anyagcsere folyamataikba be tudják építeni a jelenlévő szerves anyagokat. E folyamatokat főleg aerob mikroorganizmusok végzik, melyek a szerves vegyületek oxidatív lebontásakor felszabaduló energiát saját fenntartásukra, szaporodásukra használják fel. Részben szervetlen termékek (pl. szén-dioxid, víz, szulfát), részben szerves anyagok keletkeznek. A szervetlen molekulák kijutnak a környezetbe, míg a szerves vegyületeket a sejtek hasznosítják. Ezt felismerve a bioremediációs eljárásokban gyakran alkalmazzák az egymással szimbiotikusan együttélő mikrobák irányított keverékét. Az egy komponensű szennyeződések esetén hosszabb adaptációs idő alatt szelektált egy, vagy több mikroorganizmus kultúrát használnak a szerves anyag lebontására.

Irányított eljárással, mikroorganizmusok segítségével az évek során számos vegyületet lehetett semlegesíteni, illetve átalakítani nem veszélyes terméké. Az első kísérleteket a klór tartalmú erősen mérgező hatású peszticidek, valamint szénhidrogének lebontására, átalakítására dolgozták ki. Az újabb és újabb vegyületek megjelenése a piacon, és így a természetben is, sok évre adott feladatot a mikrobiológusoknak, biotechnológusoknak. A lebontó folyamatok tervezésekor, fejlesztésekor át kell gondolni az általános kritériumokat: a végtermék kinyerését, melléktermékek toxicitás vizsgálatát, bomlékonyságukat, a lebontó utakban résztvevő enzimeket, a mikroorganizmus toxicitását a környezetre. A nagy nyomású folyadékkromatográfia (HPLC), a tömegspektrometria, és egyéb technikák kifejlesztése nagy előrelépést jelentett a vegyületek, keverék oldatok, szennyvizek analitikai vizsgálatában.

Alkalmazásuk lehetővé teszi a lebontó folyamatok nyomon követését, a nyomnyi mennyiségben jelenlévő szennyezések kimutatását.

A bioremediációs megoldásokban, elsősorban gazdasági megfontolások alapján, élő mikroorganizmusokat szokás alkalmazni. Ezek felhalmozódása a környezetet gyakran hátrányosan megterheli. A sejtek természetbe jutásának megakadályozása érdekében többféle módszert dolgoztak ki. A bioreaktorokban szűrőket alkalmaznak, melyek a tápanyagok, egyéb kisebb molekulák számára átjárható, de a mikroorganizmusokat visszatartja. Hátránya, hogy könnyen eltömődhet a szűrő. Egy újabb és egyre elterjedtebb módszer a sejtek rögzítése, hordozóba zárása. Az immobilizált mikroorganizmusok jó hatékonysággal alakítják át a szerves vegyületeket megfelelő szellőztetés mellett anélkül, hogy a sejtek kijutnának a környezetbe, vagy elzárnák a tisztított víz útját. Az immobilizálás biztosítja, hogy a sejtek olyan közel kerüljenek egymáshoz, mely lehetővé teszi a sejtek közötti anyagcsere forgalmat, mely döntően befolyásolhatja a lebontó folyamat sebességét.

A balatonfűzfői Nitrokémia RT gyártási folyamatainak melléktermékeként viszonylag nagy mennyiségű szulfanilsav keletkezett. Ennek a vegyületnek a hatástalanítására dolgoztunk ki a gyárral közösen egy biotechnológiai módszert.

A dolgozatban ismeretjük

- olyan mikroorganizmus izolálását, jellemzését, amely nagy hatékonysággal képes a szulfanilsavat bontani
- a biodegradációs folyamat optimalizálását mind laboratóriumi mind ipari szinten,
- a rendszer hatékony működését immobilizált sejtekkel,
- azokat az előzetes biokémiai vizsgálódásokat, amely a lebontási útvonal pontosabb felderítését célozzák.

III. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A környezetvédelmi problémákat a természet egyensúlyát megbontó emberi beavatkozás okozza [Moser 1992]. A fő szennyező források az ipar, a mezőgazdaság, a közlekedés, és ezektől függően változik a szennyezés mértéke, veszélye. Vannak olyan hulladék fajták, amelyek lokálisak, nem terjednek, ezek kontrollálása, lebontása az egyszerűbb feladat. Sokkal komolyabb problémát jelentenek a terjedő szennyeződések, melyek pl. a talajvízbe, természetes vizekbe jutva nagy ökoszisztémákat érintve beláthatatlan környezeti hatással járnak. A környezetvédelem feladata, hogy felismerje ezt a veszélyt, és elhárítsa vagy megelőzze azt.

Nem lehet azonban elítélni az ipar tevékenységét, hiszen gondoljunk csak arra, hogy ezek a természetben megjelenő új, szintetikus vegyületek jelentős mértékben hozzájárultak bizonyos betegségek gyógyításához, a növényi táplálékunk megóvásához a kártevőkkel szemben. A következményekkel azonban számolni kell. Minthogy az első kibocsátott vegyszerek utóhatására nem fordítottak figyelmet elődeink, ezért ma kell a jelenlevő problémát megoldanunk a természetbe jutott vegyszerek semlegesítésével.

A környezeti szennyeződések általában magukat a szennyező anyagokat és azok - esetenként ártalmas - bomlástermékeit tartalmazzák [Alexander 1981, Head 1998, Timmis 1994]. A mikroorganizmusok rendkívüli adaptációs képességének következményeként a szennyezett környezetben is megjelennek mikrobiális közösségek, melyek képesek a szennyező vegyületeket szén- és/vagy energiaforrásként felhasználni [Timmis 1994, Head 1998]. Az egyedi fajok általában nem képesek túlélni e toxikus környezetben, viszont a közösségek tagjai egymást segítve fennmaradnak és szaporodnak [Timmis 1994]. A biotechnológiai eljárásokban gyakran olyan irányított kultúrákat alkalmaznak, melyek egyes tagjait külön-külön ismerik, és önálló, vagy együttes működésük következménye egy hatékony lebontó folyamat.

III.1 BIOREMEDIÁCIÓ

Az elmúlt években rengeteg mikroorganizmust izoláltak, melyek képesek egyik vagy másik toxikus vegyületet bontani, ami előzőleg nem volt bontható [Timmis 1999]. Legtöbbször hosszú adaptációs folyamat során bekövetkező mutációk eredményeként, vagy a már elterjedten alkalmazott géntechnológiák segítségével sikerült előállítani olyan egyedeket [Head 1998, Timmis 1994], melyek a "vad" típusú testvéreikhez

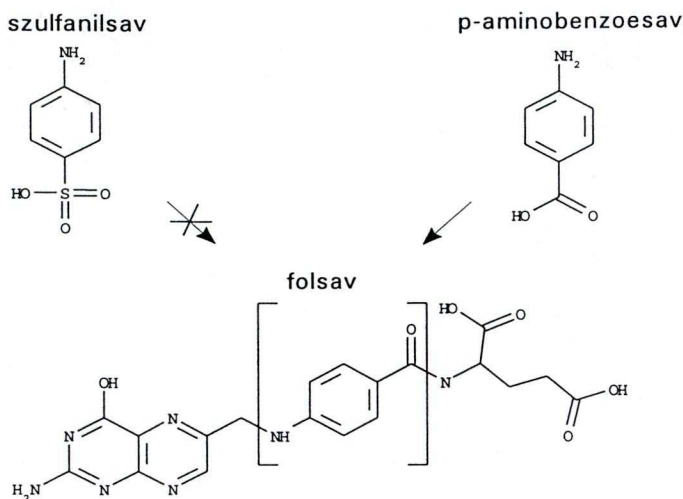
képest egyes folyamatokban sokkal hatékonyabban vesznek részt. Ha egy mikroorganizmust, mely nem életképes az adott környezetben, olyan plazmiddal transzformálják, amely tartalmazza a lebontási folyamat kulcsenzimeit kódoló géneket, képessé tehető a vegyület bontására, így szaporodni tud a toxikus körülmények között [Timmis 1994]. Ennek főleg akkor van jelentősége, amikor a lebontási folyamatot katalizáló enzimek patogén törzsekben fordulnak elő.

A bioremediációval foglalkozó kutatók érdeklődése az utóbbi egy-két évben a biológiai lebontó potenciállal rendelkező mikroorganizmusok izolálásáról áthelyeződött a szennyező anyagok transzformációját korlátozó tényezők vizsgálatára [Head 1998]. Hiszen hiába állítunk elő laboratóriumi körülmények között hatékonyan dolgozó lebontó eljárást, ha az a terepkísérletekben inaktív marad a laboratóriumban nem reprodukálható környezeti hatások következtében.

A gyógyszeripar és a textilipar nagy mennyiségben alkalmaz szintetikus aromás vegyületeket termékeik előállításában. A gyártás során keletkező szennyvizet gyakran tározó tavakba gyűjtik, vagy folyóvizeinkbe ürítik. Ennek köszönhetően az üzemek környékén gyakori szennyező komponensek a szulfonált aromás vegyületek [Locher 1989; Kuhm 1991; Thurnheer 1986], mint pl a szulfanilsav.

III.1.1 A szulfanilsav

A szulfanilsav gyakorlati jelentősége igen nagy, mert azo festékek, növényvédőszernek előállításában nagy mennyiségben használják, komoly jelentőségűek a gyógyászatban alkalmazott származékai, a szulfonamid készítmények. A szulfonamidok (pl a szulfanilamid, mely a szulfanilsav amidja) erős baktericid hatást mutatnak. Úgy bénítják a mikroorganizmusok szaporodását, hogy a folsav bioszintézishez szükséges para-amino benzoésavat kiszorítják az enzim komplexéből, és ily módon blokkolják a reakciót [Bruckner 1979].



A szulfanilsav szintetikus vegyület, az anilin közvetlen szulfonálásával nyerhető úgy, hogy az anilint tömény kénsavval 200°C-ra hevítik [Bruckner 1979]. Hideg vízben igen rosszul, alkoholban nem oldódó vegyület. Ásványi savakkal nem képez sókat, mivel erősen savas szulfonsavcsoportja intramolekulárisan közömbösíti a gyengén bázisos aminocsoportot. Lúgokkal viszont alkáli sói képződése közben reagál. A szulfanilsav vízből 2 mól kristályvízzel lemezekben kristályosodik [Bruckner 1979]. Két izomerje ismert, a metanilsav és az orthanilsav, melyek ipari alkalmazása csekély.

Számos tanulmány foglalkozik a szulfonált aromás vegyületek lebontásával [Feigel 1988; Thurnheer 1990; Jahnke 1990; Kuhm 1991; Paszczyński 1992; Locher 1993; Junker 1994; Goszczyński 1994; Blümel 1998;]. A nyolcvanas évek elejéig szulfonált aromás vegyületeket bontó szerkezetet még nem sikerült izolálni a természetből [Zimmermann 1982]. Hosszú adaptációs kísérletekkel sikerült egy *Pseudomonas* fajt rábírní, hogy az Orange II azofestéket kettéhasítsa azoreduktáz enzimével, miközben szulfanilsav és 1-amino-2-naftol keletkezik [Zimmermann 1982].

1986-ban Thurnheer arról számolt be, hogy sikeresen izolált több, szulfonált aromás vegyületeket bontó mikroorganizmust. Az orthanilsavat, mely összegképlete megegyezik a szulfanilsav összegképletével, képesek voltak egy *Pseudomonas* faj segítségével lebontani [Thurnheer 1986], a sejtvonalat később *Alcaligenes* törzsként pontosították [Jahnke 1990]. Azonban a két vegyület szulfo- és amino csoportjainak helyzete eltérő, mely a lebontás szempontjából jelentős, ezért nem meglepő, hogy az orthanilsavat bontó mikroorganizmus nem képes megtámadni a szulfanilsav gyűrűjét [Thurnheer, 1990.]. További tanulmányaikban orthanilsav bontásával, a lebontó folyamattal, és a résztvevő enzimekkel foglalkoztak részletesen [Junker 1994].

A p-toluénszulfonsavat és p-szulfobenzooesavat egy *Comamonas* (*Pseudomonas*) törzs segítségével semlegesítették sikeresen [Locher 1989]. Úgy találták, hogy a bontó szervezet először deszulfonálja a vegyületet, majd oxigenáz enzimrendszere segítségével hasítja az aromás gyűrűt. Megfigyelték, hogy egy toxikus vegyület bontását jelentősen befolyásolhatja a mikroorganizmus sejtfalának átjárhatósága [Thurnheer 1990; Locher 1993]. Izolátumuk sejtextraktumával képesek voltak deszulfonálni több szulfonált aromás vegyületet, míg az intakt sejt csak néhány vegyületről hasította le a szulfon csoportot, ami a sejtmembrán szelektív permeabilitására utal [Thurnheer 1990; Locher 1993].

Egy másik kutató csoport, Paszczyński és mtsai [Paszczyński 1992; Goszczyński 1994], azo festékek lebontásával foglalkoztak, melynek során összehasonlító vegyületként a szulfanilsavat is alkalmazták szubsztrátként, mint az azo festékek kiindulási vegyületét. Kísérleteikhez a lignin bontó *Phanerochaete chrysosporium*-ot használták, mely számos környezeti szennyeződést képes részlegesen, vagy teljesen semlegesíteni. A szulfanilsavat csak csekély mértékben bontotta (a huszadik napra 17%-a fogyott el a kiindulási mennyiségnek).

Az 1990-es évektől az érdeklődés a lebontó utak tanulmányozása irányába fordult [Locher 1991; Kuhm 1991; Junker 1994; Hammer 1996; Blümel 1998].

E kutatások egyik fő bázisa, a szulfonált vegyületek és a szulfanilsav lebontását vizsgáló, H.-J. Knackmuss és csoportja. Az 1980-as években egy *Pseudomonas* faj segítségével naftalénszulfonsav részleges lebontását tanulmányozták [Nörtemann 1986; Kuhm 1991]. A szulfanilsav lebontásában elért eredményeikről először 1988-ban számoltak be [Feigel 1988], amely tanulmányban két baktérium törzset kooperatívan használtak. A *Hydrogenophaga palleroni* a szulfanilsavat képes katekol-4-szulfonsavvá alakítani, mely vegyület szubsztrátja lesz az *Agrobacterium radiobacter*-nek [Feigel 1993]. Ez utóbbi baktérium enzimrendszere segítségével a katekol-4-szulfonsavat több lépésben maleil-ecetsavvá alakítja. Ezzel a rendszerrel 1-2 g/l (~10 mM) töménységű szulfanilsav oldatot tudtak hatékonyan kezelni. A hipotetikus lebontó útvonal egyes lépéseiben résztvevő enzimek egy részét azonosították, és kitisztították [Hammer 1996; Dangmann 1996]. Megállapították, hogy a folyamat kulcsenzime a protokatekol 3,4-dioxigenáz (EC 1.13.11.3), mely felelős a szulfanilsav gyűrűjének felhasításáért [Hammer 1996]. Ez az enzim számos aromás vegyület lebontásában játszik központi szerepet [Hammer 1996]. Legújabb tanulmányukban arról számolnak be, hogy a *Hydrogenophaga palleroni* faj egy adaptációs folyamat végén képes volt a 4-karboxi-4-

szulfoazobenzolt szén és energia forrásként felhasználni és TCA ciklusába építeni [Blümel 1998].

A kilencvenes évek elején megjelent néhány tanulmány, melyben megállapították, hogy a lebontó folyamatokra jelentős hatással vannak a különböző sók és ionok jelenléte, aránya a környezetben. A foszfát korlátozhatja egyes szintetikus vegyületek heterotróf szervezetekkel történő lebontását [Robertson 1992]. Foszfát hozzáadása növelheti a lebontás sebességét, de ezt jelentősen befolyásolhatják di- és trivalens kationok, valamint a pH. Megfigyelték, hogy egy *Pseudomonas* faj 5-10 mM koncentrációjú foszfát oldatban gyorsan szaporodik, de 10 mM foszfát 0,2 mM Fe^{3+} jelenlétében sárga csapadékot képez, ugyanezt tapasztalták 5 mM Ca^{2+} esetén pH=8,0-nál. Egy másik vizsgálatban a Mn^{2+} és Mg^{2+} hatásának tanulmányozása kapcsán felismerték, hogy két gyakori talajlakó baktérium, a *Pseudomonas fluorescens* és az *Azotobacter chroococcum* NH_4^+ felvételére hatással van a két kation [McCarty 1993]. Míg a Mn^{2+} gátolja az NH_4^+ felvételét, a Mg^{2+} ezt a hatást közömbösíti.

III.1.2 A *Pseudomonas paucimobilis*

A biológiai lebontó folyamatokban a *Pseudomonas* nemzetség fő szerepet játszik. Ezt igazolja több, fent említett tanulmány is.

A *Pseudomonas paucimobilis* [Bergey's 1994] szigorúan aerob, nem fermentatív, Gram negatív, kemolitotróf baktérium. A *Pseudomonas paucimobilis*-t először egy orvosi légzőkészületről izolálták [Bergey's 1994]. Gyakran *Sphingomonas paucimobilis* néven említik [Nagata 1994]. Gyakori lakója a talajnak és víznek, ami a baktérium fiziológiai változékonyságának, és széles táplálkozási szubsztrát spektrumának köszönhető. Kórházakban vizes blokkokban, légzőkészülékeken is előfordulhat [Smalley 1982; Minnick 1993]. A sejt kissé ovális 0.7-2.0 μm pálca alakú, sárga, nem fluoreszcens karotenoid pigmentjei vannak. Egy poláris flagellummal hajtja magát előre, és esetenként párosával is előfordulhatnak. A mozgást gyakran nehéz detektálni, minthogy a sejtek egy része egy populációban flagellum nélküli, így kapta a paucimobilis nevet (paucity=csekély volta valaminek). Néha előfordul, hogy tévesen Flavobacteriumnak határozzák meg a mozgás hiánya miatt. A sejtek 37°C-on nem mozognak, és 5°C alatt valamint 42°C fölött nincs sejtszaporodás. A poli- β -hidroxibutirátot halmoz fel széntartalék anyagként. A keményítőt képes hidrolizálni,

emellett több oxidázt tartalmaz, s mint aerob mikróbának molekuláris oxigén az általános elektron akceptora.

A *Pseudomonas paucimobilis* közismert baktérium a környezetvédelemmel foglalkozó kutatók körében. Ismertek xilol, toluol, klórozott aromás vegyületeket, lignint bontó változatai e fajnak. A *P. paucimobilis* UT26 izolátumban a γ -hexaklórciklohexán (inszekticid) jelenlétében egy deklorináz enzim indukálódik, mely képes a klór ionokat lehasítani a molekuláról, az így kapott köztiterméket ezután egy dehidrogenáz oxidálja tovább [Taira 1988; Imai 1991; Nagata 1994]. A *P. paucimobilis* Q1 izolátumban azonosították egy 2,3-dihidroxi-bifenil-dioxigenáz nevű enzimet, amely képes poliklórozott bifenil vegyületek gyűrűinek oxidatív hasítására. Kimutatták, hogy az enzim vastartalmú, és az aktív enzim képződéséhez elengedhetetlen Fe^{2+} ionok jelenléte [Taira 1988]. Magától értetődően találunk példát xilol, toluol, és bifenilek katabolizmusára is *Pseudomonas paucimobilis* Q1 segítségével [Furukawa 1983].

A lignin a fő szerkezeti eleme a fás növényeknek, így nagy mennyiségben fordul elő a természetben. Természetes lebontása lassú, rendkívül stabil szerkezetének köszönhetően. A *P. paucimobilis* SYK6 izolátum protokatekol 4,5-dioxigenáza segítségével képesek voltak bontani a lignin szerkezeti elemeit, és reakció termékei az aromás gyűrű felhasadása után a trikarbonsav ciklusba lépnek be [Katayama 1988; Noda 1990; Masai 1991]. Megvizsgálták a különböző szubsztrátokon nőtt sejtek enzimösszetételét, és a lebontás közben keletkező intermediereket. Azt tapasztalták, hogy míg a benzol szubsztráton nőtt sejtekben csak az "orto-útvonal" enzimeit indukálódhatnak, addig a bifenil, xilol/toluol, szalicilát szubsztrátok esetén a "meta-útvonal" enzimeit jelennek meg. Mint a legtöbb esetben, itt is plazmidon kódolt enzimek vesznek részt a bontó folyamatokban. Biokémiai háttéréről egyre többet tudunk, számos - a folyamatban résztvevő - enzimet jellemeztek [Furukawa 1983; Noda 1990; Masai 1991; Kamoda 1993; Nagata 1994], illetve a fehérjéket kódoló géneket azonosították [Noda 1990, Masai 1991, Imai 1991, Nagata 1994].

III.2 IMMOBILIZÁLÁS

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 granulummokként) [Sanchez 1994]. 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.

III.2.1 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 adszorpciójára. Kialakíthatunk keresztkötéseket a sejt és egy hordozó, és sejt-sejt között is, hisz a sejtek fala tartalmaz olyan funkciócsoportokat ($-NH_2$, $-OH$, $-COOH$), melyek alkalmasak kovalens kötések kialakítására. Ezen az alapon hoztak létre keresztkötéseket sejtek és különféle hordozók (ioncserélő 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 Magyar Viscosa 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 adszorpció és a bezáráson alapuló immobilizációs technikák között, mert a sejtek nemcsak a cellulóz gyöngy felületén, hanem a belsejében is kitapadnak a cellulóz szálakhoz.

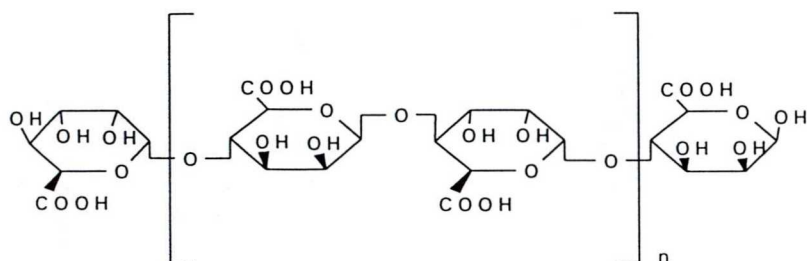
III.2.1 Immobilizálás bezárással

Alkalmazhatunk olyan üreges szerkezeteket, a mikroorganizmusok fizikai retenciójára, 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, poliazetidín, polihidroxi-etilmetakrilát, stb.) mind alkalmazhatók sejtek immobilizálására, bezárására [Akin 1987; Phillips 1988].

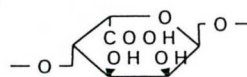
Természetes polimereket alkalmaznak mikrobiális, növényi és állati sejtek bezárására, enzimek, sejtalkotók rögzítésére [Phillips 1988, Stormo 1992]. A sejtek, enzimek természetétől, és a kísérletek céljától nagymértékben függ, hogy melyik: felületi rögzítésen vagy bezáráson alapuló eljárás a célszerűbb [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. 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.

Az alginát a legnépszerűbb olyan természetes polimer [Protan 1977; Akin 1987], melyet immobilizálásra használnak. Ebben a lineáris kopolimerben β -D-mannuronsav és α -L-guluronsav molekulák 1,4-glikozid kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. A polimerláncon belül mind a két fajta monomerből homopolimer blokkok találhatóak, és a blokkokat mindkét molekulát tartalmazó kevert szakaszok választják el. A polimer viszkozitását a molekulák átlagos méretén kívül a guluronsav tartalom határozza meg. A guluronsav molekulák képesek Ca^{2+} ionon keresztül egymással kapcsolódnak, ez az oka, hogy a guluronsav blokk tartalom a fő meghatározója a gél szilárdságának, pórusméretének és stabilitásának [Martinsen 1989]. 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 kezeléssel mennek keresztül, mert szerkezete kompatibilis a legtöbb élő sejt falával, kémiai módosításra egyáltalán nincs szükség.



Alginsav (D-mannuronsav egységekkel) illetve L-guluronsav egységekkel:

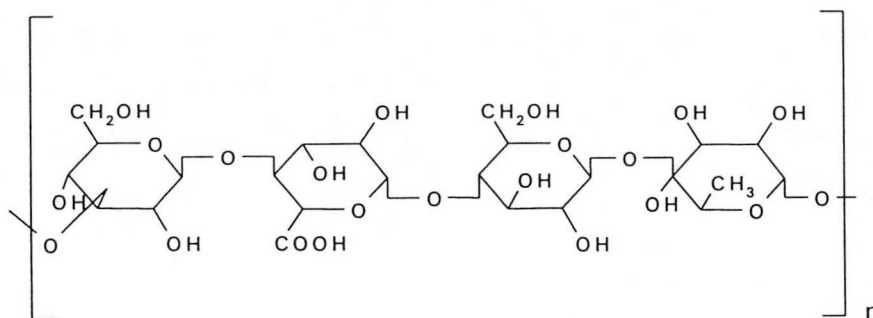


Az alginát szerkezeti képlete

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].

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].

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.



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.

III.2.3 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, mellyel a sejtek túlélését biztosította. Másrészt az aktív szénszemcsék 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.

IV. CÉLKITŰZÉS

Hatékony és stabil biológiai hulladék kezelési eljárások csak úgy érhetők el, ha a biológiai illetve mérnöki tudományok és a gyakorlati kutatások optimális kombinációját hozzuk létre. A kezelési eljárások biológiai részét gyakran mellőzték a múltban, noha ez jelenti a megoldás kulcsát.

Felismerve a mikroorganizmusok rendkívüli adaptációs képességét, valamint a természetes körülmények között élő mikroorganizmusok azon képességét, hogy a környezetükben tartósan jelenlevő szerves vegyületeket fel tudják használni, megnövekedett az érdeklődés a szennyeződések biológiai módszerekkel történő lebontása iránt.

A Nitrokémia Rt-vel közösen célul tűztük ki az ipari szennyvizek szennyező, néhány aromás komponensének, elsősorban a szulfanilsav biológiai módszerekkel történő lebontását egy egyszerű eljárással, rögzített sejtes körülmények között átfolyós rendszerben.

Munkám további célja, hogy szulfanilsav bontó izolátumunkat jellemezzem, a lebontási hatékonyságát optimalizáljam. A különböző aromás szerves vegyületeken, potenciális intermediereken való aktivitásának tesztelésével és biokémiai vizsgálatokkal a lebontási útvonalról, és a folyamatban résztvevő enzimek mibenlétéről kívántunk információkat kapni.

V. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

V.1 ANYAGOK

A kísérletekhez felhasznált vegyszerek nagy része a Reanal Vegyszergyár (Magyarország), a Merck (Németország) és a Sigma (USA) cégek terméke. A szulfanilsavat és a szennyvizet a Nitrokémia Rt. biztosította. A pepton a Difco cég gyártmánya, az alginát HF250-et a Protanal svéd cégtől, a gelrite-et a Scott Kaliforniai cégtől rendeltük. A Mavicell-Si cellulóz gyöngyöket a magyar Viscosa cégtől vásároltuk. A HPLC mérések során felhasznált nagy tisztaságú vegyszereket szintén a Reanal Vegyszergyárból szereztük be, a reverz fázisú C18 típusú kromatográfiás oszlop a Waters (USA) cég gyártmánya.

V.2 MÓDSZEREK

V.2.1 Szulfanilsav bontó *P. paucimobilis* sejtek izolálása és tárolása

V.2.1.1 A kísérletek során felhasznált tápoldatok, táptalajok, pufferek:

DSM1 táptalaj (a DSM katalógus alapján):

Húskivonat	3,0 g
Pepton	5,0 g
Agar	20,0 g

1000 ml desztillált vízben oldva; pH=7,0

SL-6 mikroelem oldat (a DSM katalógus alapján):

0,1 g $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,03 g $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$; 0,3 g H_3BO_3 ;
0,2 g $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0,02 g $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$;
0,03 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 1000 ml desztillált vízben oldva.

Szelektív tápoldat

Három törzsoldat sterilizálás utáni elegyítésével készítettem:

A törzsoldat: 10 mM KH_2PO_4
10 mM K_2HPO_4
20 mM NaCl
(15 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ csak PC és PABA szubsztrátok esetén)
pH=7,0 NaOH-val beállítva.

B törzsoldat: 1,0 mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
0,6 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$

Az A és B oldatokat sterilizálás után 1:1 arányban összeöntöttem, és kiegészítettem 2:1000 arányban a fentebb leírt SL-6 nyomelemoldattal. Ezzel az utólagos keveréssel a sók kicsapódása megakadályozható.

C törzsoldat: 14 mg/ml FeSO_4
7 mg/ml Na_2EDTA , pH=7,0

Az A és B oldatok összekeverése után csak közvetlen a felhasználás előtt mérjük a tápoldatba 1:1000 arányban a C oldatot.

A szulfanilsav (4-aminobenzolszulfonsav), protokatekol (3,4-dihidroxibenzoésav), PABA (4-aminobenzoésav) szubsztrátokat a kísérleteknél feltüntetett mennyiségben mértem a tápoldathoz 0,5 M törzsoldatokból (pH=7,0).

Szelektív táptalaj

A szelektív tápoldat, mely 1,8% agarózt tartalmaz.

V.2.1.2 Az izolálás menete

A talaj- és vakolatmintákat, melyekből a szulfanilsav bontó törzset izoláltam, a Nitrokémia Rt. szulfanilsav gyártó üzemének területéről, az anyalúg tároló faláról, az üzem faláról és az üzem környéki földből gyűjtöttem.

Az üzem területéről származó mintákat először DSM1 táptalajra szélesztettem, és szobahőmérsékleten inkubáltam 3-4 napig. Ezen, az aminosavakban és vitaminokban gazdag táptalajon számos telep nőtt, melyeket ezután szulfanilsav bontó képességre

szelektáltam. A telepeket 35 mM szulfanilsavat tartalmazó DSM1 táptalajra oltottam. Ezen a táptalajon már csak a szulfanilsav jelenlétet toleráló mikroorganizmusok tudtak szaporodni. A további szelekciós lépésben megvontam az egyéb szénforrásokat, és a felnőtt telepeket szelektív táptalajra oltottam át. Agar helyett agarózt használtam, ezzel kiküszöböltem az agar szerves szennyeződésén szaporodni képes egyedeket, melyek téves eredményt adhattak volna.

A szelektív táptalajon is növekedni képes telepeket a továbbiakban 35 mM szulfanilsavat tartalmazó folyadék kultúrákban vizsgáltam.

A folyadék kultúrákat 24-30°C-on 100 rpm sebességgel kevertetem New Brunswick (USA) rázógépen a kísérletek során. Napi mintavételekkel ellenőriztem a sejtek szaporodását, és a szulfanilfanilsav tartalom változását. A sejteket Bürker-kamra segítségével számoltam.

V.2.1.3 Az izolátum meghatározása

A kísérletekben alkalmazott baktérium saját izolátumunk. A szakszerű meghatározás érdekében izolátumunkat elküldtük a Nemzetközi Törzsgyűjtemény Magyar Lerakathoz, a Budapesti Kertészeti Egyetemre, melynek eredményét az 1. számú melléklet tartalmazza. Izolátumunkat *Pseudomonas paucimobilis*nek határozták meg az API 20 NE rendszer alapján.

V.2.1.4 A sejtek tárolása

A szulfanilsavat aktívan bontó törzset tiszta, egyéb mikroorganizmusoktól mentes állapotban a hosszabb eltarthatóság érdekében liofileztem. A szelektív táptalajon felnőtt tenyészetet 15% steril tej és 5% inozitol elegyében felszuszpendáltam, fiolákba szétosztottam, és liofilező berendezés segítségével beszárítottam. E lépéssel csökkentettem a mutáció veszélyét is, és a sejtek így egy év múlva is jó hatékonysággal bontották a szulfanilsavat. A gyorsabb felhasználás érdekében -80°C-on is tárolok sejteket, melyeket intenzív növekedési periódusukban fagyasztottam le glicerin jelenlétében (0,85 ml intenzív növekedési szakaszában lévő sejtszuszpenzióhoz - $OD_{600}=1,0$ - mértem 0,15 ml steril glicerint, és folyékony nitrogénben hirtelen lefagyasztottam).

V.2.2 A szulfanilsav bontás hatékonyságának optimalizálása szabadsejtes kultúrával

Az irodalomból ismert, hogy a mikroorganizmusok környezetében levő sók és ionok jelentős hatással vannak a sejtek metabolikus tulajdonságaira [Robertson 1992, McCarty 1993], ezért előzetesen megvizsgáltam a szelektív tápoldat összetevőit. A 20-20 ml 35 mM szulfanilsav tartalmú, különböző összetételű tápoldatot tartalmazó Erlenmeyer lombikokba frissen felnövesztett sejteket inokuláltam úgy, hogy a sejtkoncentráció $\approx 10^5$ sejt/ml legyen. A tápoldatokban egyszerre csak egy komponens koncentrációját változtattam meg, és lépésről lépésre állítottam össze az optimális oldatösszetételt.

A tápsókon kívül létfontosságú nyomelemekkel (SL-6), Fe-EDTA-val is kiegészítettem az oldatot. Egyes kísérletekben 0,01% peptont adtam indukciós tápanyagként a tápoldathoz, így rövidült a sejtek nyugvó fázisa.

V.2.3 Immobilizálási eljárások

A biológiai lebontást folyamatos rendszerben üzemelő bioreaktorokban kellett megoldanom, ezért a sejteket hordozóhoz kellett kötni, hogy megakadályozzam a kimosódásukat. Kétféle rögzítő eljárással kísérleteztem.

Első esetben a sejteket porózus hordókhöz kapcsoltam. A sejtek kitapadtak a hordozók felszínére és pórusaiba. Nagy felületű, cellulóz alapú, szilícium-dioxid tartalmú gyöngyöket (Mavicell-Si), aktív szenet (Filtrisorb 200) és SDAM-17 polimer gyöngyöket (Nitrokémia Rt. gyártmánya) használtam. 20 ml, 35 mM szulfanilsavat tartalmazó szelektív tápoldathoz 1 g gyöngyöt adagoltam, majd az előzőleg szelektív táptalajon felnevelt sejtekből készített szuszpenzióból 10^6 sejtet pipettáztam a hordozókat tartalmazó oldatokba. Az összeállított elegyeket 24°C hőmérsékleten, 100 rpm sebességgel kevertetve rázógépen inkubáltam, miután a szulfanilsav elfogyott a tápoldatból, a sejtekkel alaposan telített hordozókat friss oldatba raktam, és tovább inkubáltam.

A második esetben a sejteket olyan térhálóba zártam [Kovács 1991], mely az 0,01 μm -nél nagyobb molekulákat nem, míg a kis molekulákat (pl. oxigén, szerves anyagok) átengedi a pórusain.

Az előzőleg szelektív tápoldaton felnevelt sejteket 3000 rpm fordulatszámmal 20 percen át centrifugáltam. 1.5% alginát HF250 (100 mg/l Na₂EDTA oldatban oldva) és 1.5% gelrite (100 mg/l Na₂EDTA oldatban oldva) 1:1 arányú elegyítésével elkészítettem a kompozit gélt. A két alkotót sterilizálásuk után, még forró állapotban öntöttem össze. Az elegyhez 5:1 gél:sejt térfogat-arányban hozzákevertem a lecentrifugált sejtszuszpenziót úgy, hogy a végső sejtkoncentráció mintegy 10⁶ sejt/ml legyen. Az alaposan összekevert elegyet 50 mM CaCl₂ oldatba csepegtettem 1 mm átmérőjű kapilláris segítségével. Az így létrehozott gyöngyöket két órán át inkubáltam 50 mM CaCl₂ oldatban szobahőmérsékleten állandó, lassú keverés mellett. A kész gyöngyöket ezután 150 mM NaCl és 5 mM CaCl₂ tartalmú oldatban kétszer átmostam eltávolítva ezzel a felületre kitapadt sejteket. 20 ml 35 mM SA-t tartalmazó szelektív tápoldatba 1 g nedves súlyú gyöngyöt mértem, és 24°C-on 100 rpm sebességgel rázatva inkubáltam.

V.2.4 Ipari szennyvízes kísérletek

A szulfanilsav tartalmú szennyvíz tisztításához a szelektív tápoldat helyett a sejteket 0.1% szulfanilsavat (5.8 mM) tartalmazó szennyvíz oldatba oltottam, és 24°C-on 100 rpm sebességgel rázatva inkubáltam. A szennyvizet kiegészítettem peptonnal és Fe-EDTA-val, ha a csak szulfanilsavat tartalmazó szennyvízben nem szaporodott a sejt.

V.2.5 HPLC mérések

A szubsztrát tartalom változását a tápoldatban nagy nyomású folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel Gynkotek (Németország) típusú berendezésen határoztam meg. Általában 10 µl mintát vittem Rheodyne injektor segítségével reverz fázisú C18 oszlopra. Az anyagokat 40% metanol és 60% 0.05 M KH₂PO₄ (pH=6.5) oldatok elegyével eluáltam 0.3 ml/perc átfolyási sebesség mellett. Az eluálódó anyagokat UV detektorral 254 nm hullámhossznál mértem.

V.2.6 Sejt extraktum készítése

A sejtek feltárását Sambrook és mtsai (1989) alapján készítettem. A megfelelő szubsztrátot tartalmazó szelektív tápoldatban felnövesztett sejteket centrifugáltam 13000 rpm sebességgel 10 percig 4°C-on, majd mostam 50 mM Tris-HCl (pH=8,0) pufferrel az aktivitás méréshez, és 50 mM Tris-HCl (pH=8,0); 2mM Na₂EDTA pufferrel az SDS gélelektroforézis kísérletekhez. Az ismételt centrifugálás után a csapadékot -20°C-on tároltam további felhasználásukig.

V.2.7 Fehérje meghatározás

A minták fehérje tartalmát Bradford módszerével határoztam meg [Bradford 1976]. 100 µl fehérjeoldathoz 5 ml Bradford reagenst (0,01% Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma); 4,7% etanol; 8,5% foszforsav) adtam és 2 perc után Unicam UV 500 spektrofotométeren (Anglia) mértem az elnyelést 595 nm-en. A kalibrációt ismert mennyiségű marha szérum albuminnal végeztem.

V.2.8 Enzim aktivitás mérés

Az enzim aktivitás méréshez a reakció elegyet Stanier és Ingraham [Stanier 1954] alapján állítottam össze: 100 µM Tris-HCl (pH=8,0); 0,1 µM Fe(NH₄)₂SO₄; 100 µM szubsztrát és 0,1 mg/ml fehérje.

A sejteket DSM1, szulfanilsav és protokatekol tartalmú tápoldatokban növesztettem fel, és a késői log fázisban leállítottam a folyamatot. A sejtek feltárása után spektrofotométerben 288 nm-en mértem a protokatekol bontó aktivitást. A mérés kezdetén és végén felvett spektrum segítségével az átmenetileg megjelenő közti termékeket kívántam detektálni 200-500 nm tartományban. Az aktivitás méréshez *Agrobacterium radiobacter* (NCAIM B 01302) sejt kivonatot használtam pozitív kontrollként. Az irodalomban leírták, hogy protokatekol 3,4-dioxigenáz enzime van, mely hatékonyan bontja a protokatekolt. Az *A. radiobacter* sejteket saját izolátumomhoz hasonlóan növesztettem 10 mM protokatekol tartalmú szelektív tápoldatban, majd a sejtextraktum készítése pont alatt leírtak szerint sejt kivonatot készítettem.

V.2.9 SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

A feltárt sejtek fehérje összetételének vizsgálatát SDS-PAGE gélelektroforézissel végeztem Sambrook és mtsai [1989] alapján.

A *P. paucimobilis* sejteket a fentebb leírt módon felnövesztettem különböző szubsztrátok jelenlétében: 10 mM PABA; 10 mM SA; 10 mM PC; és DSM1 tápoldaton, mely részben tartalmazott 10 mM SA-t, illetve SA mentes változatban is. A kultúrát $OD_{600} = 0,8-1,2$ értékig növesztettem, majd feltártam a sejteket a sejtextraktum készítése cím alatt leírt módon. 50 μ l sejtkivonathoz 25 μ l steril vizet és 25 μ l 4x tömény felvivő puffert adtam. 5 percig forraltam 95°C-on, majd 30 μ l mennyiségeket vittem az előzőleg elkészített 12% 1,5 mm vastag SDS poliakrilamid gél [Sambrook 1989] zsebeibe. A fehérjék méretének meghatározásához 12000-96000 dalton molekulásúly tartományt felölelő fehérje molekulásúly standardot (mixture IV; Merck, Németország) használtam.



VI. EREDMÉNYEK

A talaj- és folyóvizekben, mezőgazdasági és más talajokban a szintetikus vegyszerek nagy változatosságban fordulnak elő. Számos közülük toxikus, vagy veszélyes terméké alakulhat át a természetben. Ezért rendkívül fontos, hogy gyors és irányított eljárást alkalmazzanak e molekulák eltávolítására a természetből.

VI.1 Szulfanilsav bontó mikroorganizmus izolálása

A szerves vegyületek semlegesítése vagy teljes lebontása a vizekben és a talajban legtöbbször mikrobiális aktivitás eredménye. Ezt felismerve gyűjtöttünk talajmintákat a szulfanilsavgyártó üzem területén. Az üzem környéke óhatatlanul szennyezett, így feltételeztük, hogy találunk szulfanilsavra adaptálódott mikroorganizmust.

Az izolálást több lépésben végeztem. Először az üzem területéről gyűjtött mintákat általános táptalajra (DSM1) oltottam, melyen a szennyezett területen élő mikroorganizmusok nagy része szaporodott. A következő lépésben az általános táptalajon nőtt sejteket szulfanilsavra szelektáltam az V.2.1.2 pontban leírtak szerint. Szulfanilsavas közegben 9 féle mikroorganizmust tudtam szaporítani, melyekből a folyadék kultúrák kísérletekben csak egy bizonyult szulfanilsav bontónak.

Izolátumom, mely a szulfanilsavat, mint egyedüli szén, nitrogén és kénforrást felhasználja, beépíti anyagcsere folyamataiba a *Pseudomonas* nemzetség tagja. E csoportba számos olyan baktérium tartozik, melyeket jól ismernek, és használnak a szerves vegyületek, főleg aromások biológiai lebontásában.

Gram-negatív, kemolitotróf baktérium, pálca formájú, egy flagellummal mozog, sárga nem fluorescens pigmentje van. Az API 20 NE rendszer alapján az általam izolált törzs *Pseudomonas paucimobilis*, mely a klórozott aromás vegyületek lebontásában, valamint lignin típusú molekulák lebontásában már ismert [Masai 1991; Nagata 1994] baktérium. A szulfanilsav bontó eljárásra, és a baktériumra szabadalmi védeltséget kértem. A szabadalmi eljárás folyamatban van a Magyar Szabadalmi Hivatalnál P 98 00077 ügyiratszámom. Kértem SA bontó izolátum felvételét a NCAIM törzsgyűjteménybe, ahol a NCAIM (P) B 001265 számon hozzáférhető lesz (a szabadalmi eljárás befejezésével).

VI.2 A tápoldat összetevőinek és a pH hatása a lebontó aktivitásra

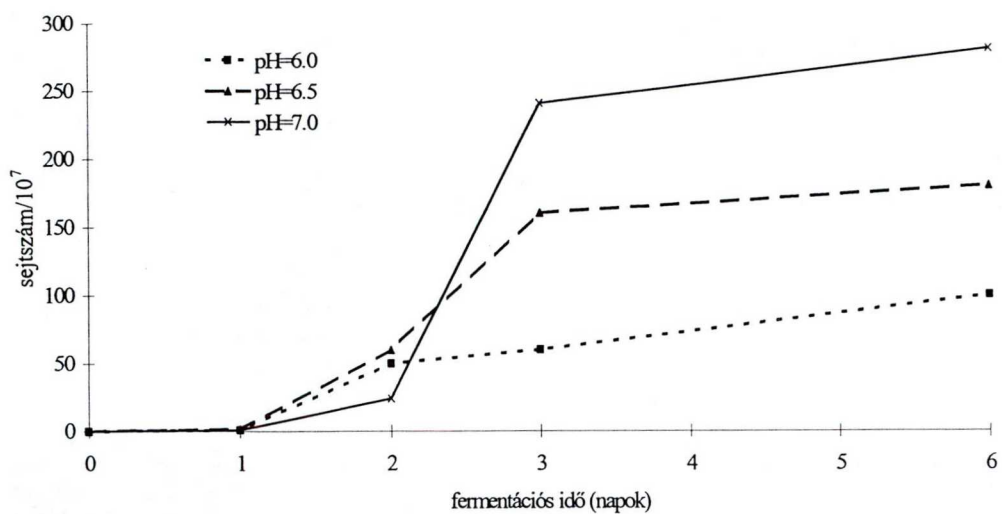
A sikeres izolálás után megvizsgáltam hogyan befolyásolja a sejtek növekedését illetve bontó kapacitását a tápoldat összetételének változtatása. Optimalizáltam a pH-t, a foszfát-, ammónium ion-, vas- és a kétértékű kationok mennyiségét. Kerestem induktív tápanyagokat, melyek gyorsítják a sejtek szaporodását, de nem rontják a lebontó aktivitást.

VI.2.1 Az optimális pH kiválasztása

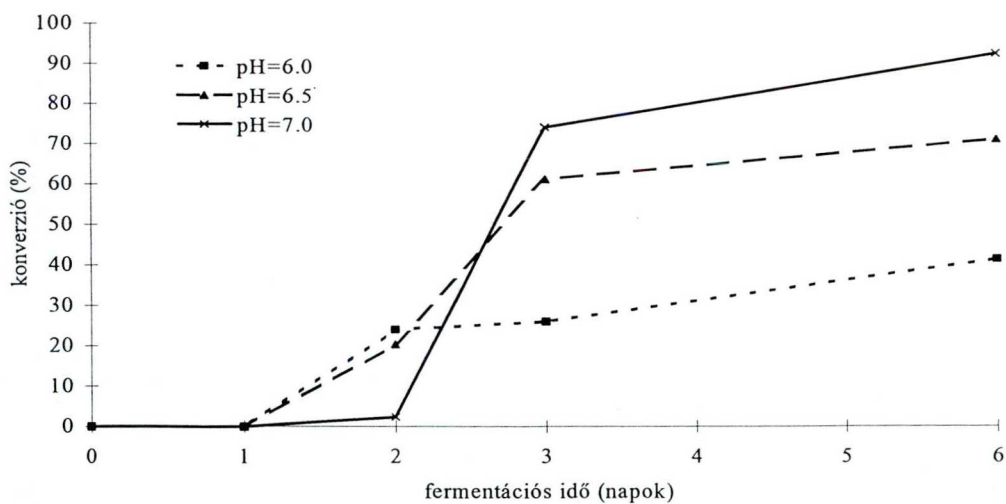
A *Pseudomonas* sejtek általában pH 4.5 és 8.0 között életképesek [Bergey's 1994] (természetesen vannak kivételek), ezért e tartományban vizsgáltam a sejtek aktivitását. A szelektív tápoldat pH-ját hét Erlenmeyer lombikban 5.0-5.5-6.0-6.5-7.0-7.5-8.0-ra állítottam, és a szokásos módon inkubáltam. pH=5,5 alatt és pH=7.5 felett a sejtek nem szaporodtak. A pH=8.0-as tápoldat bezavarosodott a tápoldat összetevőinek kicsapódása következtében. Az optimális sejszaporodást és SA bontó aktivitást pH=6,5-7,0 tartományban értem el (1., 2. ábra). Megfigyeltem, hogy az első nap végére a pH jelentősen emelkedett (a pH=7.0-en induló tápoldatban pH=7,5-ig) (3. ábra), majd a második napon a folyamat megfordult, és a pH csökkenés hatására a sejszaporodás is megindult (2., 3. ábra). A savanyú (pH=4,5) közeg a sejtek számára nem kedvező, így aktivitásuk a harmadik naptól romlott (4. ábra). A különböző pH-jú tápoldatokban a sejszaporodást és a pH alakulását összevetve (1., 3. ábra), azt figyelhetjük meg, hogy a pH= 7,0 oldatban a tápoldat lúgosodása miatt a másik két tenyészethez (pH= 6,0 és 6,5) képest a sejszaporodás lemaradt, majd a pH csökkenés hatására erőteljesen beindult, és túlnőtte azokat. S míg a két másik oldatban az aktivitás a második naptól lecseng (4. ábra), a pH=7,0-en induló oldatban a harmadik napon még határozottan nő a sejtek SA bontó aktivitása. Az eredmények egyértelműen arra utalnak, hogy a sejtek viszonylag szűk pH tartományban szaporodnak és működnek optimálisan.

VI.2.2 A megfelelő foszfát koncentráció megkeresése

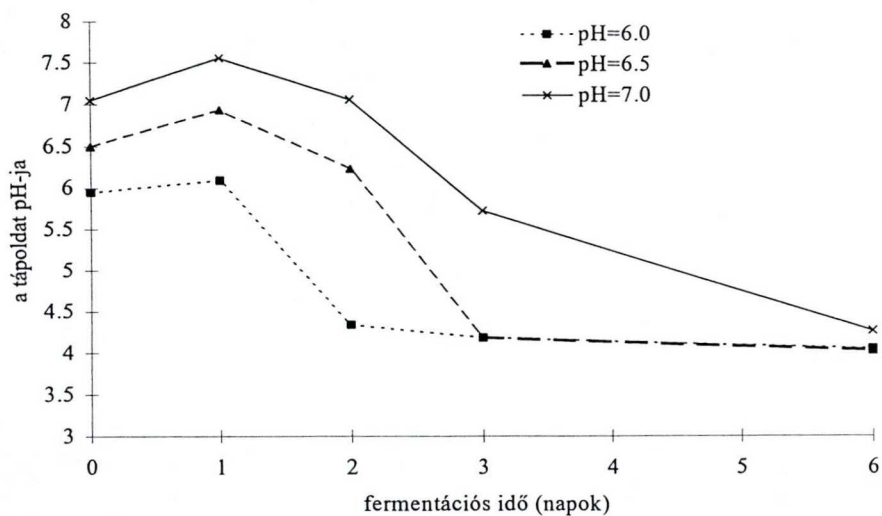
A foszfát sejnövekedésre kifejtett hatása ismert, tehát a biodegradációs folyamatokban is korlátozó tényező lehet [Robertson 1992]. Ezért megvizsgáltam a foszfát hatását 0,1-20,0 mM koncentrációk esetén. Az 5. ábrán bemutatott eredmények alapján a 10 mM foszfáttartalom a legoptimálisabb a lebontó folyamatban. Meg kell



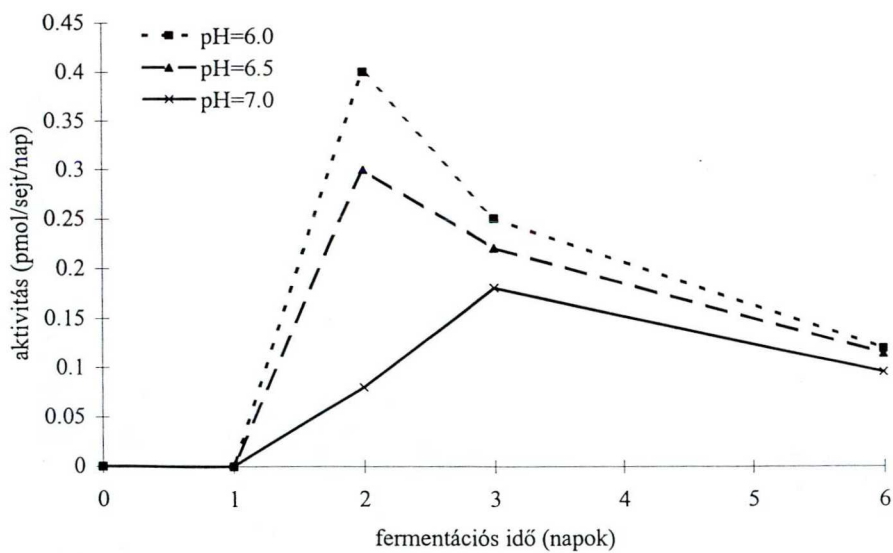
1. ábra A *P. paucimobilis* sejtek növekedése 35 mM SA tartalmú szelektív tápoldatokban különböző kiindulási pH értékek esetén.



2. ábra A szulfanilsav konverziójának időfüggése különböző kémhatású szelektív tápoldatokban 35 mM kiindulási SA koncentráció esetén.



3. ábra A szelektív tápoldatok (35mM SA) pH értékeinek változása a napok során különböző kiindulási pH-k esetén.



4. ábra A *P. paucimobilis* sejtek SA bontó aktivitásának időbeli változása szelektív tápoldatban különböző kiindulási pH értékek esetén.

jegyezni, hogy a 20 mM foszfátot tartalmazó oldatból a kétértékű kationok hatására csapadékképződés volt megfigyelhető, és ez a sajnálatos tény határt szab a tápoldat pufferkapacitás növelésének.

Megállapítottam, hogy a szulfanilsav aminocsoportja beépül a sejtek alkotóelemeibe, hisz más, további nitrogén forrás adagolása (pl. NH_4Cl) nem volt hatással sem a sejtek növekedésére sem a metabolikus sajátságokra.

VI.2.3A kétértékű kationok jelenléte

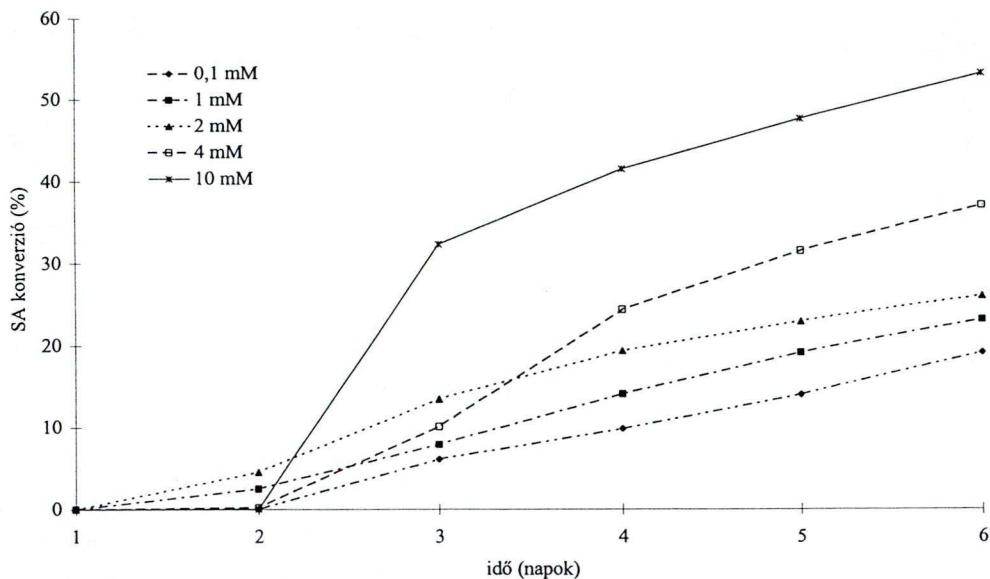
A kétértékű kationok gyakran okoznak problémát a kísérletek során, mert mind a szulfanilsavat, mind a foszfátot kicsaphatják [Robertson 1992], ezért óvatosan kell az oldat készítésénél eljárni. Mindazonáltal a tapasztalataim szerint mind a kalcium mind a magnézium jelenléte a tápoldatban elengedhetetlen, mert nélkülük jelentősen romlik a sejtek aktivitása, és a sejtek két napon belül összecsapódtak.

VI.3 A szulfanilsav bontás koncentráció függése

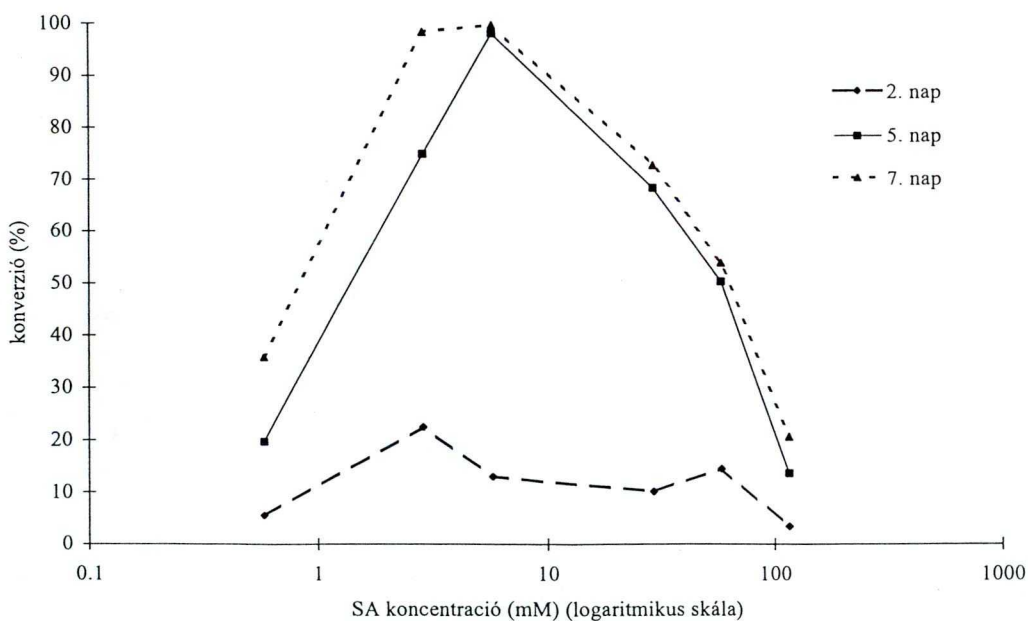
Egy biodegradációs rendszer esetén alapvető kérdés, hogy a kérdéses szubsztrátot a sejtek milyen töménységben képesek még hatékonyan bontani. Ezért a következő lépésként arra kerestem választ, hogy vajon izolátumunk mely koncentráció tartományban képes aktívan bontani a szulfanilsavat. Szelektív tápoldatban 0,6-116 mM-os szulfanilsav tartalom mellett vizsgáltam, hogy a szubsztrát koncentráció hogyan befolyásolja a sejtek aktivitását (6.ábra). A szulfanilsavat 0,6-6 mM koncentrációban alkalmazva a *P. paucimobilis* viszonylag gyorsan, teljesen lebontotta a vegyületet két nap alatt. A sejtek 30 mM koncentrációban jelenlévő SA mellett is hatékonyan működtek, és a szubsztrát 50-70%-át eliminálták egy hetes inkubáció után. Bár még a 100 mM feletti szulfanilsav koncentráció mellett is képesek voltak a sejtek kifejteni bontó aktivitásukat, de ez esetben jelentősen lassult a folyamat és a sejtsszaporodás is később indult meg.

VI.4 A vas és egyéb összetevők jelenlétének hatása

Számos munka foglalkozik az aromás vegyületek lebontásában résztvevő enzimek, a lebontás során képződő intermedierek vizsgálatával [Hammer 1996, Heiss 1997]. Bebizonyították, hogy a lebontásban az oxigenáz enzimek játszanak



5. ábra A SA konverziójának időfüggése szelektív tápoldatokban különböző foszfát koncentrációk mellett (pH=6.8).



6. ábra A SA konverzió függése a kiindulási SA koncentrációtól a fermentáció 2., 5. és 7. napján. A sejteket 0,58, 2,9, 5,8, 29, 58 és 116 mM SA-t tartalmazó szelektív tápoldalon növesztettem (pH=6,8) és meghatároztam a szubsztrát konverzióját különböző időpontokban.

kulcsszerepet [Meer 1992]. Ezek az enzimek vas-kén típusú fehérjék, melyek optimális működéséhez szükséges a tápoldatban Fe^{2+} ionok jelenléte. Az egyes tanulmányok eltérő mennyiségben alkalmazták e komponenst, ezért megvizsgáltam a mi esetünkben milyen vas koncentráció mellett bontanak a sejtek optimálisan. A vas-EDTA hatását 0,01-0,2 mM tartományban vizsgáltam, és a 0,05 mM Fe^{2+} koncentráció tűnt optimálisnak. A vas elhagyása felére csökkentette a szulfanilsav bontó aktivitást.

Egyéb összetevők jelenlétének hatását is vizsgáltam az optimalizálási lépésekben a tápsókon kívül. Bebizonyosodott, hogy a szulfanilsavat bontó törzs bontóképessége jelentősen javul, ha olyan mikroelem elegyet, mely létfontosságú nyomelemeket tartalmaz, mérek a tápoldathoz (SL-6 mikroelem oldat ld. Anyagok és Módszerek).

Indukciós tápanyagként minimális mennyiségű, 0.01% **pepton** szintén adagoltam a tápoldathoz, mely segítségével rövidült a sejtek nyugvó fázisa, gyorsabban megindult a logaritmikus sejtszaporodás. A sejtek a pepton összetevőit igen gyorsan elfogyasztják és a rohamosan meginduló sejtszaporulat ellátásához kénytelenek a továbbiakban az egyetlen szénforrásként jelenlévő szulfanilsavat hasznosítani. A **glükóz** a legtöbb mikroorganizmus számára optimális tápanyag, az irodalomban leírták, hogy a *P. paucimobilis* is hasznosítja [Bergey's 1994], izolátumom azonban nem szaporodott gyorsabban glükóz jelenlétében. A **p-amino benzoésav** adagolása, mely szerkezete nagyon hasonlít a szulfanilsavéhoz nem változtatta meg alapvetően az összképet.

VI.5 Ipari szennyvízben oldott szulfanilsav lebontása

Ahhoz, hogy egy biodegradációs eljárás a mindennapi életben is használható legyen szükséges, hogy a lebontás ne csak vegytiszta laboratóriumi kísérletekben, hanem valós, ipari körülmények között is jól működjön. Ezért a folyamatokat a Nitrokémia Rt elfolyó szennyvizében is tanulmányoztam. A szennyvízben esetlegesen előforduló anilin és orto-diklór-benzol - melyek a kémiai szintézis során alacsony koncentrációban visszamaradnak a szennyvízben - erősen gátló hatásúak a sejtek szaporodására. Kezdeti sikertelen kísérletek után megfigyeltem, hogy a sejtek képesek tolerálni a szennyvizes körülményeket, ha az oldatot kihígítottam valamint kiegészítettem peptonnal és vas(II) ionokkal, és a pH-t közel semlegesre állítottam. Ezt követően laboratóriumi körülmények között vizsgáltam a sejtek szaporodását o-diklór-

benzol (mint egyedüli szénforrás) és anilin tartalmú tápoldatokban, sejtszaporodást nem tapasztaltam.

A kihígított szennyvízben azonban olyan kicsi koncentrációban van jelen az erősen mérgező hatású anilin és az o-diklór-benzol, hogy nem befolyásolták a sejtszaporodást. A hígított szennyvíz szulfanilsav tartalma a kromatográfiás mérések alapján 0,1 %-nak (5,8 mM) bizonyult.

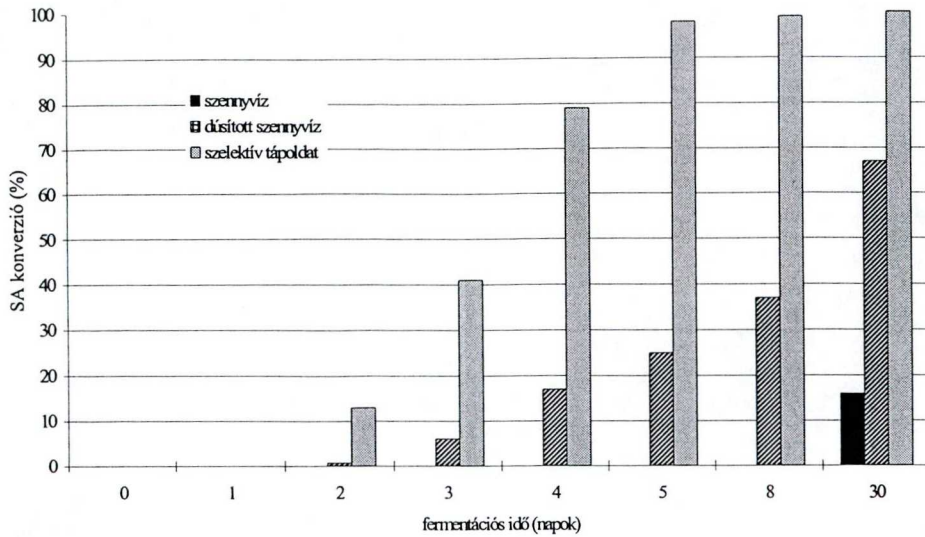
A szelektív tápoldaton előnevelt sejteket oltottam a szennyvizet tartalmazó lombikokba úgy, hogy a sejt koncentráció $\approx 10^5$ sejt/ml legyen. 24 °C-on 8 napig 100 rpm sebességgel rázatott folyadékkultúrákban az 5,8 mM szulfanilsav tartalmú szennyvizet a tiszta szulfanilsavas kísérleteknél megállapított indukciós anyagokkal kiegészítettem, egyéb sókat (foszfát, NaCl, stb.) azonban nem adtam az oldatokhoz. A szennyvíz pH-ját NaOH-val 6,8-ra állítottam.

A kísérlet eredményét a 7. ábra mutatja. A csak szennyvizet tartalmazó lombikban sejtnövekedés nincs, természetesen szulfanilsav bontás sem történik. A peptonnal kiegészített szennyvízből sem fogyott szulfanilsav. A 0,01% peptonnal és 0,05 mM Fe(II)-EDTA-val dúsított szennyvíz esetén viszont az ötödik napra már 26 %-os konverziót értem el. Ekkor a sejtszám 1.7×10^9 sejt/ml volt, s ez alapján a sejtaktivitás 0,176 pM/nap/sejt. Csak az indukciós anyagok jelenlétében volt konverzió egy hét után. A kultúrákat egy hónapig tartottam fenn, és a kísérlet végére a pepton tartalmú szennyvízben is volt némi SA koncentráció csökkenés, 16%, míg a vassal és peptonnal kiegészített szennyvízből a szulfanilsav 67%-át lebontotta a *P. paucimobilis*. A sejtek aktivitása a hígított szennyvízben elérte a 35 mM szulfanilsav tartalmú tápoldatban mért aktivitást, ha a kiegészítő komponensek jelen voltak a szennyvízben, azonban a sejtszaporodás mértéke elmaradt attól.

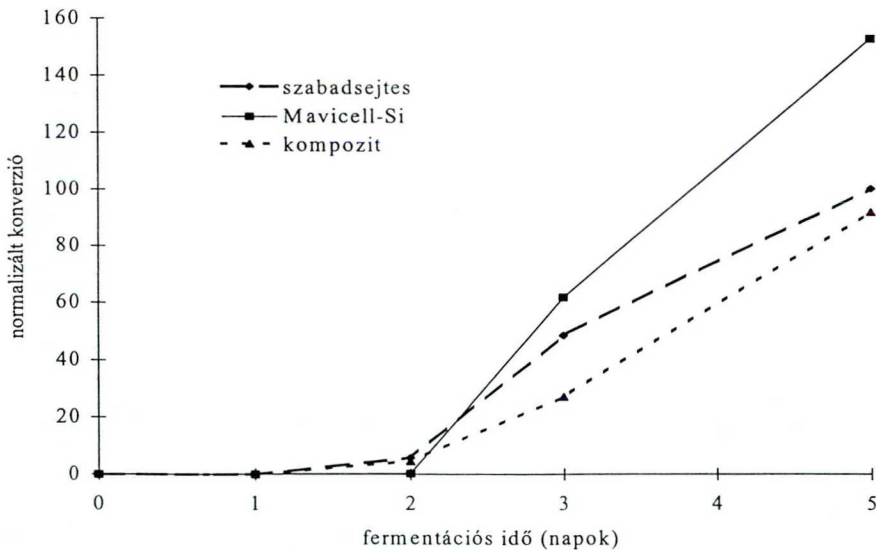
VI.6 Rögzítéses kísérletek

Az előző példák azt igazolták, hogy a *Pseudomonas paucimobilis* sejtek laboratóriumi körülmények között, szabadsejtes kultúrában igen jó hatékonysággal képesek bontani a szulfanilsavat. Célunk azonban a keletkező szulfanilsavas szennyvíz folyamatos tisztítása. Ezt célszerűbb átfolyásos bioreaktorban megoldani, de ebben az esetben a sejteket hordozóhoz kell rögzíteni.

Mivel a lebontási folyamat oxidatív típusú, sejteknek jelentős oxigén igénye van. Emiatt olyan bioreaktor és sejtrögzítési módszer alkalmazása látszik célravezetőnek, amelyben



7. ábra A szulfanilsav konverziójának időbeli alakulása szennyvízes fermentációs kísérletekben. 1. oszlop (tömött): csak szennyvízben; 2. oszlop (ferde csíkozott): szennyvíz kiegészítve 14mg/ml FeSO_4 oldattal illetve 0,01% peptonnal; 3. oszlop (pöttyös): 5,8 mM SA-t tartalmazó szelektív táptalaj (laboratóriumi kontroll). Minden oldat közelítőleg 5,8 mM koncentrációban tartalmazott szulfanilsavat.



8. ábra A szulfanilsav biodegradációja rögzített sejtekkel.

A *P. paucimobilis* sejteket Mavicell gyöngyökre adszorbeáltam illetve gelrite-alginát kompozit gélbe zártam, és szelektív, 35 mM SA-t tartalmazó oldatban időben követtem a szubsztrát konverzióját. Kontrollként a szabadsejtes kultúrát használtam azonos körülmények között, és a konverzió értékeket a szabadsejtes kultúra 5. napon mért értékére normáltam a könnyebb áttekinthetőség kedvéért.

a sejtek magas oxigénellátottsága biztosítható. Ilyen az MTA Veszprémi Műszaki Kutató Intézete és a Reanal Finomvegyszergyár közös fejlesztésében készült air-lift típusú rögzített sejtes töltetek kezelésére is alkalmas bioreaktor típus (9. ábra).

VI.6.1 Adszorpció

A fenti reaktor típus paramétereire illeszkedően a következő, felületi adszorpción alapuló sejtrögzítéshez alkalmas mátrixokat választottam ki:

1. Mavicell-Si cellulóz gyöngy; 2. Aktív szén (Filtratorb 200); 3. SDAM-17 polimer gyöngy.

A Mavicell-Si hazai fejlesztésű termék. Fajsúlyát szilícium dioxid adalékkal növelték, így ideális hordozó az air-lift bioreaktorokhoz.

Minthogy a rögzítő anyagok a szulfanilsavat is köthetik, sejtmentes, de hordozót tartalmazó oldatot is alkalmaztunk negatív kontrollként. A pozitív kontroll szabadsejtes kultúra volt. A rögzítő anyagok önmagukban nem kötötték a szulfanilsavat.

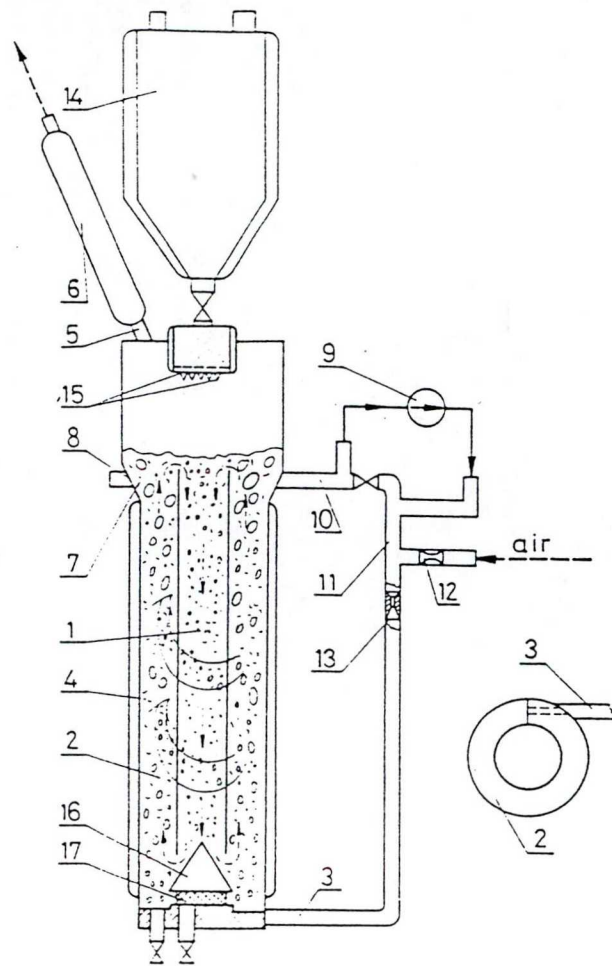
A Mavicell gyöngyök és SDAM-17 gyöngyök jelenlétében a sejtek jó hatékonysággal bontották a 35 mM koncentrációban jelenlévő szulfanilsavat (60-70 %), míg az aktív szén esetén csak 40 % fogyott öt nap alatt. Az aktív szén esetén nagyon megnövekedett az oldat pH-ja (pH=7,8), ami a sejtek működése szempontjából kedvezőtlen, ezért ez lehet az oka az alacsonyabb konverciónak. A SDAM 17 polimer gyöngy a tápoldat felszínén úszik, ezért nem volt alkalmas rögzítő anyagként.

Az eredmények alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a Mavicell-Si cellulóz gyöngy a legalkalmasabb a sejtek felületi adszorpciójára, mivel nagy felületén és pórusaiban sok sejt tud megtapadni, valamint maga a rögzítő anyag nem módosítja az optimális lebontó körülményeket.

A felületi adszorpció eljárás Mavicell-Si cellulóz gyöngyöt használva nagyon hatékonyan bizonyult. Amennyiben a sejtek nem szaporodnak ki az effluensbe ez a módszer a legalkalmasabb a szulfanilsav gyors és hatékony eltávolítására a szennyezett vízből.

VI.6.2 Bezáráson alapuló sejtrögzítés

Amennyiben a sejtek a szaporodás során leválnak a gyöngy felszínéről, és megjelennek az effluensben, hátrányosan befolyásolhatják a folyamatos rendszerben működő bioreaktor üzemelését. Szűrő közbeiktatásával a probléma nem oldható meg,



9. ábra A Veszprémi MTA Műszaki Kémiai Kutató Intézet és a Reanal Finomvegyszergyár közös fejlesztésében készült rögzített sejtes bioreaktor

- 1. betétcső; 2. reakciózóna; 3. fermentlé bevezető cső; 4. gyűrű alakú reaktor rész;
- 5. gázcsonk; 6. hűtő; 7. fázisszétválasztó zóna; 8. csonkakúppalást alakú szűrőfelület;
- 9. szivattyú; 10-11 csővezeték; 12. levegőbevezetés; 13. diszpergáló elem;
- 14. géltartály; 15. cseppképző fej; 16. áramlómódosító kúp; 17. szűrő

mert a nagyszámú kiszaporodott sejt a szűrőt eldugítja. Ilyen esetben a bezárásos módszerek alkalmasabbak.

Az optimalizálás során azt tapasztaltam, hogy a 2 % alginát gél önmagában nem képes visszatartani a sejteket, mivel a tápoldatba kevesebb Ca^{2+} vihető (a sókicsapódás elkerülése miatt), így a pórus mérete nem bizonyult megfelelőnek. Ezért módosított, úgynevezett kompozit gélt készítettem [Kovács 1991], mely 1,5 % alginát és 1,5 % Gelrite 1:1 arányú elegye. A kompozit gélben a Gelrite komponens megakadályozta, hogy a szaporodó sejtek a gyöngyöket szétfeszítsék, és a kétértékű kationok alacsony koncentrációja sem módosította a szilárdságát. Ez a gélelegy már megfelelő szilárdságúnak bizonyult a sejtek bezárására. Az immobilizálási eljárás során figyelembe kellett vennem, hogy a 2 mm-t meghaladó gyöngyátmérő akadályozza az oxigén és a tápanyagok gyors diffundálását. A gyöngyök átmérőjét a csepegtető kapilláris átmérőjének változtatásával könnyen tudjuk változtatni. Az 1 mm átmérőjű kapillárisal előállított gyöngyöket 35 mM szulfanilsavat tartalmazó szelektív tápoldatba helyeztem, és mértem a szulfanilsav tartalom változását.

A 8. ábrán összehasonlítottam a szabadon úszó, a Mavicell-Si gyöngyökre kitapadó és kompozitgélbe immobilizált sejtek szulfanilsav bontó aktivitását. Az ábrán azt látjuk, hogy százalékosan a legjobb konverziót a Mavicell-Si gyöngyökre rögzített sejtekkel értem el. Azonban meg kell jegyezni, hogy ezekben a lombikokban a sejtszám sokkal magasabb volt, mint a másik két kísérletben mert a sejtek kiszaporodtak a tápoldatba is. A legkisebb sejtkoncentráció a kompozit gél esetén volt, mivel a gyöngyök belsejében a sejtek csak korlátozott mértékben tudtak szaporodni. A gélgöngyökben a maximális sejtszám nem haladta meg a 10^7 - 10^8 sejt/ml értéket az inkubáció harmadik napja után sem. Így a kapott eredmény más értelmezést nyer, azaz nem a sejtek aktivitása kisebb a kompozit gél esetén, hanem csak a mennyiségük.

Kompozit gél alkalmazásával optimális körülményeket tudtam biztosítani a sejteknek a szulfanilsav lebontásához átfolyásos rendszerű reaktorban, mivel a sejtek nem tudtak kiszaporodni a környezetbe, és lebontó aktivitásuk gélbe zárva is megfelelő.

VI.7 A lebontó folyamat kulcsenzimei, lehetséges intermedierjei

VI.7.1 *P. paucimobilis* növesztése különböző aromás vegyületeken

Az irodalomban több környezetszennyező vegyületről mutatták ki, hogy a *P. paucimobilis* el tudja bontani [Furukawa 1983; Katayama 1988; Taira 1988; Imai 1991]. Ezeket az ismereteket felhasználva néhány hasonló vegyületen saját izolátumunk képességét teszteltem. Az ezekből a kísérletekből kapott adatok információkkal szolgálnak a lebontó út lehetséges közti termékeit illetően is. Az 1. táblázatban összefoglalt eredmények azt mutatják, hogy a baktérium jól hasznosította a p-aminobenzoésavat, a protokatekolt, alig-alig nőtt metanilsavon, és egyáltalán nem indult meg a sejtszaporodás anilin, o-diklórbenzol, trinitro-benzolszulfonsav, szulfoszalicilsav és naftalin-diszulfonsav szubsztrátokon. A *P. paucimobilis* tehát nem reagál gyorsan a változó szubsztrát jelenlétre, csak viszonylag kevés vegyületet képes az adaptációs folyamat kihagyásával bontani.

VI.7.2 Dioxigenáz aktivitás mérések

Az aromás vegyületek metabolizmusában a mono- és dioxigenázok a lebontás legvalószínűbb kulcsenzimei [Taira 1988; Noda 1990; Locher 1991; Kuhm 1991; Meer 1992; Hammer 1996]. Leggyakrabban dioxigenázok vesznek részt a gyűrűhasításban [Meer], melyek először két hidroxil csoportot visznek a molekulára kizszorítva a vegyület egyik funkciós csoportját, majd a két hidroxil csoport között (orto-) vagy mellett (meta-) hasítják az aromás gyűrűt. Feltételeztem, hogy mi esetünkben is ebbe a csoportba tartozó enzim játszik szerepet a lebontó folyamat kezdetén. Az enzimaktivitás kimutatásához a szulfanilsav mellett protokatekolt használtam, melyet a legtöbb dioxigenáz enzim képes oxidálni. Pozitív kontrollként az *Agrobacterium radiobacter* törzset használtam fel, melyről ismeretes, hogy tartalmaz aktív protokatekol 3,4-dioxigenáz enzimet [Feigel 1993].

A sejteket DSM1, szulfanilsav és protokatekol tartalmú tápoldatokban növesztettem fel. A DSM1 tápoldatban növesztett sejtek nem tartalmaztak mérhető dioxigenáz aktivitást egyik törzs esetén sem. Mind PC-t, mind SA-t tartalmazó közegben történt növesztés után jól mérhető enzim aktivitást tapasztaltam a *P. paucimobilis* sejtek esetén. Habár ezekben a kísérletekben az *A. radiobacter* protokatekol oxidáló aktivitása lényegesen magasabbnak bizonyult, a *P. paucimobilis* is

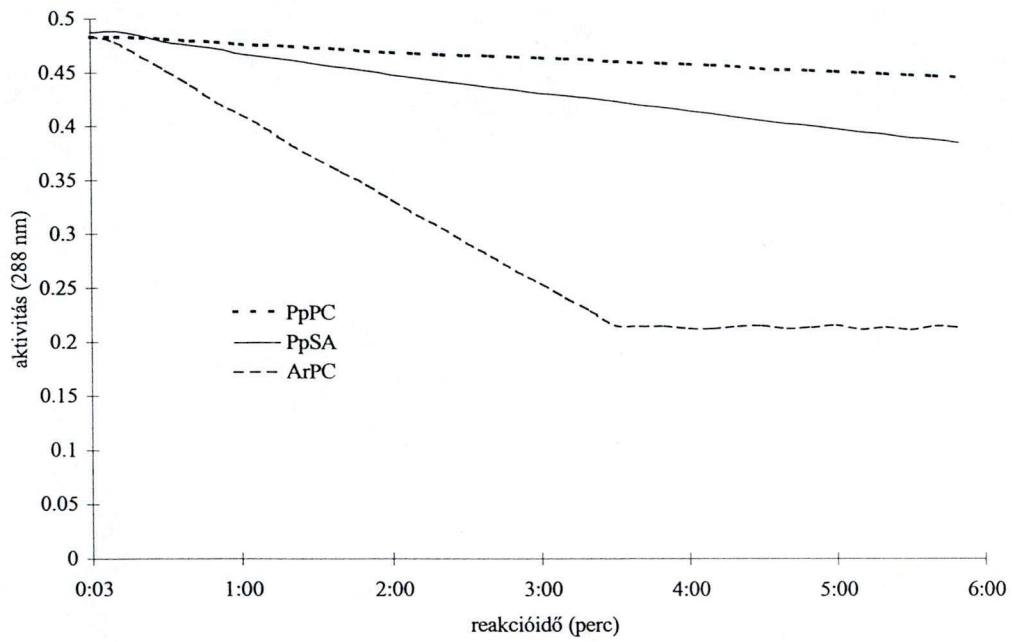
Szubsztrátok	növekedés
4-amino benzolszulfonsav	+++
3-amino benzolszulfonsav	+
4-amino benzoészav	+++
3,4-dihydroxy benzoészav	++
szulfoszalicilsav	-
2,7-naftalindiszulfonsav	-
2,4,6-trinitrobenzolszulfonsav	-
anilin	-
o-diklórbenzol	-

1. táblázat *Pseudomonas paucimobilis* sejtek szaporodása különböző szubsztrátokon
 +++ jól szaporodik, ++ szaporodik, + alig szaporodik, - nem szaporodik

jó hatékonysággal oxidálta a PC-t (10. ábra). Mindenesetre megállapítható, hogy a protokatekol lebontásában szerepet játszó enzimek indukálhatóak mind protokatekollal mind szulfanilsavval. Érdekes módon a szulfanilsavval történt indukció esetén mintegy négyszer akkora aktivitást lehetett mérni, mint a PC indukált mintán. Az enzim aktivitás mérése során 200-500 nm tartományban figyeltem a reakcióelegy spektrumának változását. Ebben a tartományban található a protokatekol enzimatis hasítása eredményeként megjelenő intermedier vegyületek elnyelési maximuma, mely feltehetően eltér a PC abszorpciós maximumától, így várhatóan egy új csúcs jelenik meg a spektrumon az idő előrehaladtával. Valóban 268 nm-nél megjelent egy átmeneti csúcs, mely a reakció végére eltűnt. Ezért a jelért felelős molekula potenciális intermedier lehet a szulfanilsav lebontó folyamatban. A vegyület azonosítása folyamatban van.

VI.7.3 *A. P. paucimobilis* szubsztrát indukált fehérjéinek SDS-PAGE analízise

A fenti eredmények azt sugallják, hogy a reakcióban valóban résztvesz legalább egy dioxigenáz enzim. A lebontó folyamatokban szereplő enzimek további vizsgálatához a különböző szubsztrátokon (PABA, SA, PC) és DSM1 tápoldaton nőtt *Pseudomonas paucimobilis* sejtek összfehérjéinek SDS-gélelektroforézis képét hasonlítottam össze (11. ábra). A 10 mM szulfanilsav tartalmú szelektív tápoldaton nőtt sejtek fehérje mintázatából ki kell emelni a 48, 39, 30 kDa-nál megjelenő erős sávokat, és a 40 és 19 kDa-nál megjelenő halványabb sávokat. Úgy tűnik, hogy a 39 kDa fehérje csak a SA-on nőtt sejtekben indukálódik, a többi említett fehérje a PABA-n nőtt sejtekben is kifejeződik. Meglepő, hogy a protokatekolon szaporított sejtek fehérje képe sokkal jobban hasonlít a nem induktív DSM1 tápoldaton nevelt sejtek fehérje összetételére. Erős sávok jelentek meg mindkét esetben 32, 27 és 17 kDa-nak megfelelő mérettartományban, melyek a PABA vagy SA tartalmú mintákból hiányoznak. A protokatekol indukálta sejtek fehérje mintázatában gyenge sáv látszik még 23 és 30 kDa-nál. A nem indukált sejtek termelnek egy 35 kDa-os fehérjét, mely a többi esetben nem látható. Az ábra 5. oszlopa 10 mM szulfanilsavat tartalmazó DSM1 tápoldaton nevelt sejtek fehérje kivonata, mely vegyesen tartalmaz több fontos fehérjét, úgy az indukált (2. minta), mint a nem indukált (4. minta) sejtek fehérjéiből. A különböző szubsztrátokon nőtt sejtek fehérje tartalmának összehasonlítása alapján úgy tűnik, hogy a *P. paucimobilis* más-más fehérjekészletet használ, ezáltal más-más lebontó utat választ a különböző szénforrások metabolizmusára.

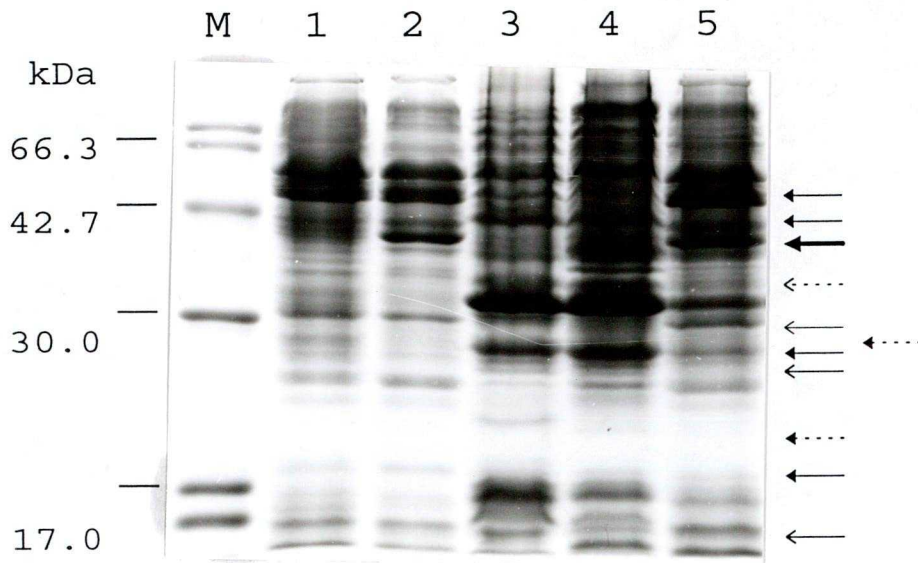


10. ábra *P. paucimobilis* és *A. radiobacter* sejt kivonatának protokatekol hasító aktivitása

10 mM protokatekol szubsztráton nőtt *P. paucimobilis* enzimaktivitása: PpPC

10 mM szulfanilsavon szubsztráton nőtt *P. paucimobilis* PC bontó aktivitása: PpSA

10 mM protokatekol szubsztráton nőtt *A. radiobacter* dioxigenáz enzimaktivitása (pozitív kontrol): ArPC



11. ábra A különböző szubsztrátokon nőtt *P. paucimobilis* sejtek fehérje készletének összehasonlítása SDS-gélelektroforézis segítségével
 Az 1.oszlopban a 10 mM PABA szubsztráton, 2. oszlopban 10 mM SA-n, 3. oszlopban 10 mM PC-n, 4. oszlopban DSM1 tápoldaton, 5. oszlopban 10 mM SA tartalmú DSM1 tápoldaton nőtt *P. paucimobilis* sejtek fehérjéinek összetételét látjuk

VII. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A szulfanilsav fontos építőkö azofestékek, növényvédőszer és gyógyszerek gyártásában [Hammer 1996]. Számos baktericid szulfonamid gyógyszer kiindulási vegyülete, melyek hatása azon alapszik, hogy gátolni képesek a nukleotid bioszintézist. Xenobiotikus szulfoncsoportja és erős negatív töltése miatt a mikroorganizmusok sejtfalán nehezen jut át. A szulfon-csoportot hordozó aromás vegyületek általában ellenállnak a mikrobiális lebontásnak [Hammer 1996], ennek ellenére néhány baktérium törzset sikerült adaptáltatni e toxikus anyagok semlegesítésére [Nörtemann 1986; Kuhm 1991; Locher 1993; Thurner 1990; Junker 1994; Paszczynski 1992; Dangmann 1996; Blümel 1998]. A szulfanilsav bontásával rajtunk kívül egy laboratórium, Prof. Knackmuss munkacsoportja foglalkozott. Ők két baktérium törzs kevert populációját használták kísérleteikben, felismerve a két faj egymást segítő hatását [Feigel 1988, Hammer 1996].

A szulfanilsav gyártó üzem (Nitrokémia Rt.) környékéről gyűjtött talaj mintákból izoláltam egy baktériumot, mely egyedül képes volt a szulfanilsavat, mint kizárólagos szén, nitrogén és kénforrást hasznosítani, és a toxikus vegyületet teljesen felhasználni szaporodásához. A lebontó folyamat során káros melléktermékek nem keletkeztek. Az API 20 NE rendszer alapján izolátumomat *Pseudomonas paucimobilis*-ként azonosították. E baktérium ismert mikroorganizmus a biológiai lebontó folyamatokkal foglalkozó kutatók körében.

A sejtek tenyésztése során megfigyeltem, hogy a szulfanilsav jelenlétében növesztett sejtek nyákszerű anyagot vontak maguk köré (ez elsősorban a sejtek centrifugálása során tűnt fel), míg protokatekol, PABA és DSM1 szubsztrátok esetén ezt nem tapasztaltam. Ez a védőréteg hozzásegítheti a sejtet, hogy maga körül elfogadható környezetben, esetleg egy extracelluláris enzim segítségével indítsa el az SA lebontását. Az extracelluláris enzimatikus lebontás megmagyarázná azt az ellentmondást, hogy az ilyen típusú vegyületeket a sejtek nem tudják felvenni erős negatív töltésük miatt, lebontásuk mégis megtörténik. Ilyen enzimaktivitást azonban még nem sikerült kimutatni az extracelluláris térből.

Optimalizáltam laboratóriumi körülmények között a baktérium szulfanilsav bontását. Megvizsgálva egyes sók, ionok a sejtek lebontó aktivitására gyakorolt hatását, megállapítottam, hogy a tápoldat foszfáttartalma nem haladhatja meg a 10 mM koncentrációt, mivel magasabb koncentrációnál a kétértékű kationokkal a foszfát só formájában kicsapódik. Kimutattam, hogy Ca^{2+} , és Mg^{2+} esszenciálisak a sejtek növekedéséhez, hiányukban a sejtek két napon belül összezsugorodnak, és jelentősen romlik biológiai aktivitásuk. Méréseim szerint a Ca^{2+} 0,6 mM, míg a Mg^{2+} 1 mM koncentrációban szükséges és elegendő a sejtek szaporodásához és aktivitásához. A szelektív tápoldat általában nem tartalmazott a szulfanilsavon kívül egyéb kén és nitrogén forrást, és ilyen elemeket tartalmazó vegyületek adagolása nem változtatott lényegesen a növekedési sajátságokon. Ebből arra következtettem, hogy a szulfanilsav kén- és a nitrogén atomját a baktérium asszimilálja.

Noha az irodalmi adatok azt jelzik, hogy a *Pseudomonas* sejtek széles pH=4,5-8,0 tartományban életképesek, izolátumom csak meglehetősen szűk, a pH=6,5-7,0 tartományban volt aktív, és pH=5,0 alatt és pH=7,5 fölött az adott környezetben egyáltalán nem szaporodott. Az inkubáció során előforduló pH változás szélső értékei már nem kedveznek a sejt szaporodásnak, így megmagyarázható, hogy a pH=7,0 tápoldatban miért indult meg késve a sejtek osztódása, és a pH=6,0 tápoldatban miért nem kaptam jobb konverziós eredményt. A lehetséges lebontó út lépéseit összevetve a pH optimalizálás során kapott eredményekkel, elképzelhető, hogy egy kezdeti NH_4 képződés okozza a pH emelkedést, majd a szulfon csoport lehasadása, valamint CO_2 felszabadulása miatt indul meg a tápoldat pH-jának csökkenése. (Meg kell jegyezni, hogy egyéb kísérletekben is megfigyeltünk pH csökkenést a sejtek szaporítása során, ami azonban valószínűleg a sejtek egyéb anyagcsere folyamataiban keletkező anyagoknak következménye). A lebontó folyamat optimalizálásához tehát állandó pH-n kell tartanunk a tenyészetet. Olyan bioreaktorban, melyben a fermentációs körülményeket folyamatosan szabályozni lehet a fenti probléma elméletileg kiküszöbölhető, és optimális pH=6,5-7,0 mellett a sejtek maximális aktivitásra bírhatók.

Az ásványi anyagok és a pH mellett fontos a Fe^{2+} jelenléte a lebontó folyamatban. Vas hiányos tápoldatban jelentősen gyengült a sejtek bontó aktivitása, a szennyvizes kísérletekben pedig egyáltalán nem volt kimutatható szulfanilsav fogyás a vas mentes oldatban. A lebontó folyamatokban résztvevő sejtek vasigényére más kutató

csoportok is felfigyeltek [Feigel 1993, Hammer 1996, Heiss 1997], és bizonyították, hogy a vas-kén kockákat tartalmazó dioxigenázok bioszintéziséhez szükséges a Fe^{2+} ionok jelenléte. Ezekkel a megfigyelésekkel összhangba hozható az általam mért eredmény, mely szerint $0,05 \text{ Fe}^{2+} \text{ mM}$ koncentráció mellett jó hatékonysággal bontotta izolátumom a szulfanilsavat, míg vas hiányában jelentősen romlott az aktivitás. Ez a megfigyelés összhangban van azzal a feltételezéssel, hogy szulfanilsav lebontásában fontos szerepet játszik egy mono- vagy dioxigenáz enzim.

Az indukciós anyagok vizsgálata során megfigyeltem, hogy a legjobb konverzió a vas, pepton és SL-6 mikroelem elegy együttes alkalmazásával érhető el izolátumunk esetében. A sejtszám változása azt mutatja, hogy a pepton tartalmú tápoldatban volt a legtöbb sejt. Úgy tűnik, hogy a sejtek jól fel tudják használni a peptonban lévő szerves vegyületeket, de a megnövekedett baktérium populáció vas hiányában természetesen nem bontja jobb határfokkal a szulfanilsavat. Tehát a pepton valóban alkalmas a szaporodás gyors beindítására, ami a szennyvizes kísérletekben fontos. A glükóz hozzáadása a tápoldathoz nem hozott pozitív eredményt. A p-aminobenzoésav alkalmazása estén valószínűleg olyan erős a szulfanilsav kompetíció, hogy a sejtek nem férnek hozzá az alacsony koncentrációban jelenlévő PABA-hoz.

A *P. paucimobilis* hatékonyan metabolizálta a szulfanilsavat széles koncentráció tartományban. A 116 mM koncentrációban jelenlévő szulfanilsavat is képes volt tolerálni, és kicsit hosszabb adaptációs fázis után ebben a környezetben is elkezdte metabolizálni a szubsztrátot. A szulfanilsav koncentráció csökkenésével egyre inkább javult az aktivitás (a sejtek koncentrációja sosem haladta meg a 2×10^9 sejt/ml határt). Az alacsony koncentrációban jelenlévő szulfanilsavat három napon belül elbontotta. A *P. paucimobilis* e rendkívüli képessége miatt potenciálisan alkalmas az ipari léptékű hasznosításra.

Megállapítottam, hogy a *P. paucimobilis* rendkívül kedvezőtlen körülmények között, a szulfanilsav gyártó üzem elfolyó szennyvizében is tud szaporodni (még ha lassabb mértékben is) és a szulfanilsavat bontani, amennyiben az anilin és o-diklórbenzol koncentrációt csökkentettem, amit a szennyvíz kihígításával értem el, tehát izolátumom felhasználható a ipari léptékű szulfanilsavas szennyvíz tisztítási eljárásában.

Megvizsgáltam, hogy izolátumom szaporodását más vegyületek hogyan befolyásolják. Bevezető adaptációs kísérletek nélkül a p-aminobenzoésavat, és a protokatekolt fel tudta használni szénforrásként, amennyiben a tápoldatot kiegészítettem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oldattal, és a szulfanilsavhoz hasonlóan két-három nap alatt metabolizálta a 10 mM koncentrációban jelenlévő anyagokat. A metanilsav (3-aminobenzolszulfonsav) lebontása már nehezebb feladat volt, feltehetően a szerkezeti eltérés miatt csak csekély mértékben bontotta. Kísérleteket végeztem még több aromás, szulfonált aromás vegyülettel is (ezek: anilin, o-diklórbenzol, trinitrobenzolszulfonsav, szulfoszalicilsav és naftalin-diszulfonsav), de sejtszaporodást nem tapasztaltam. Hosszabb adaptációs folyamat után valószínűleg pontosabb információt kapok arról, hogy ezek a vegyületek vajon metabolizálhatóak-e *P. paucimobilis* sejtekkel vagy sem. A PABA bontása nem volt meglepő, minthogy a sejtek létfontosságú folyamatainak alkotó eleme, viszont a protokatekol bontása már nem ennyire egyértelmű. A dioxigenázok katalizálta lebontó utakban a protokatekol, illetve a katekol központi intermediereként szerepel, ezért vizsgáltam, hogy izolátumom elfogadja-e tápanyagnak.

Miután intakt sejtekkel kimutattuk a *P. paucimobilis* PC bontását, sejtkivonattal is ellenőriztük feltételezett oxigenáz enzimünk aktivitását. A fotometriás mérések alapján a DSM1 tápoldaton nőtt sejtek kivonata nem tartalmazott protokatekolt oxidáló enzimet, míg mind a PC mind a SA szubsztrátokon nőtt sejtek kivonata a reakció elegy PC tartalmát percek alatt jelentősen csökkentette, bár az enzimaktivitás nem érte el a pozitív kontrollként vizsgált *Agrobacterium radiobacter* PC bontó dioxigenázának aktivitását. A kísérletek eredményei azt bizonyítják, hogy a *P. paucimobilis*-ban indukálható egy PC molekulát hasító enzim (feltehetőleg egy dioxigenáz), mely szintén alátámasztja alaphipotézisemet, miszerint izolátumom esetén is oxigenáz katalizálta lebontó utak indukálódnak a sejtekben.

Feltételezésem megerősítésére a feltárt sejtek fehérje összetételét SDS-gélelektroforézis módszerrel vizsgáltam. Azt tapasztaltam, hogy a különböző szubsztrátokon nőtt sejtek fehérje mintázata jelentősen eltér. A szulfanilsavon nőtt sejtek fehérje összetétele egy sáv kivételével nagyon hasonlít a PABA-n nőtt sejtek fehérje mintázatához. Ezt az extra sávot a szulfoncsoport hasításával hozhatjuk összefüggésbe. A protokatekolon nőtt sejtek fehérje mintázata azonban határozottan

eltér ezektől, és inkább a nem indukciós tápoldaton nőtt sejtek fehérje összetételéhez hasonlít. Ez az eredmény azt sugallja, hogy a PC és SA lebontására más-más enzimmészletet használ a *P. paucimobilis*. A jelenség nem ismeretlen az irodalomban, hisz a szulfanilsav lebontását vizsgáló német kutatócsoport az *Agrobacterium radiobacter*-ben is két protokatekol 3,4-dioxigenázt azonosított [Hammer 1996]. Az elektroforézis kép alapján esetemben is feltételezhető hasonló jelenség. Egy baktériumban több lebontó folyamat is indukálódhat különböző szubsztrátok esetén, amit Furukawa és mtsai is megfigyeltek a *P. paucimobilis* Q1 izolátumban [Furukawa 1983]. Az különféle lebontási folyamatokban szerepet játszó enzimek szubsztrátspecifitása azonban részlegesen átfedhet. Ez adhat magyarázatot arra a tényre, hogy a szulfanilsavon növesztett *P. paucimobilis* sejtek képesek voltak a PC oxidációjára (sőt jobban, mint a PC felnövesztett sejtek), holott az SDS-PAGE gélkép alapján más-más fehérjék indukálódtak a két vegyület hatására.

A folyamatos üzemű átfolyásos rendszerű reaktorban való lebontási eljárás előnyös, ha a sejteket a reakció közegben tartjuk, ehhez immobilizálni kellett őket. A felületi adszorpción alapuló sejtrögzítési technika a sejtek aktivitása és a gyors lebontás szempontjából nagyon előnyösnek bizonyult, hatékonyan alkalmazható olyan esetekben, amikor nincs sejtkiszaporodás. A sejtek túlszaporodása egyes esetekben potenciális bakteriális szennyezést jelenthet a terepkísérletekben. Olyan esetekben, ahol a sejtek túlszaporodása nem jelent gondot, ez a módszer előnyösen használható a nagyobb konverziós sebessége miatt. Abban a rendszerben, melyben a sejteket alginát-gelrite kompozit gélbe zártuk, a gyöngyök mechanikai szilárdsága megfelelőnek bizonyult, sejtek nem szaporodtak ki, s a gyöngyökbe immobilizált sejtek aktivitása nem romlott. Ez a sejteket visszatartó eljárás jól felhasználható a méretnövelő kísérletekben, átfolyásos reaktorokban mivel a gyöngyök elkészítése egyszerű, és a sejtek hosszabb időn át képesek megőrizni bontó aktivitásukat.

A méretnövelő kísérleteket egy másik kutató csoporttal kooperációban a Veszprémi Egyetemen végeztük. Eredményeink alapján izolátumunk jól alkalmazkodott a méretnövelés során némileg megváltoztatott körülményekhez. Egy kaszkád rendszerű immobilizált sejt bioreaktorban igen jó, 90%-os bontó aktivitást értünk el. Eredményeink ipari felhasználása érdekében az eljárás és az izolátum szabadalmaztatása folyamatban van.

VIII. ÖSSZEFOGLALÁS

A szulfanilsav és rokon vegyületek a növényvédőszer, festék, és gyógyszergyárak aktivitásának köszönhetően megjelentek a környezetben, ám lebontásuk természetes körülmények között lassú, vagy nem történik meg. A szulfanilsav szulfoncsoportja erős negatív töltést ad a molekulának, mely felvételét nagymértékben gátolja.

- A szulfanilsav gyártó üzem (Nitrokémia Rt.) területéről gyűjtött talajmintákból izoláltam egy baktériumot, mely képes a szulfanilsavat, mint egyedüli szénforrást hasznosítani anyagcsere folyamataiban.

- A baktérium az API 20 NE rendszer szerinti meghatározás alapján *Pseudomonas paucimobilis*.

- Optimalizáltam a lebontó folyamatot befolyásoló tényezőket laboratóriumi körülmények között. Megállapítottam, hogy a pH, a foszfáttartalom, valamint a Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} ionok jelentős hatással vannak a sejtek aktivitására.

- Megállapítottam, hogy a sejtek igen széles 0,5-120 mM koncentráció tartományban életképesek, és aktívak. A gyakorlati felhasználás során előforduló 10-20 mM szulfanilsavat tartalmazó oldatot három nap alatt 100%-ban képesek bontani. A 30-70 mM szubsztrátot öt nap alatt 50-60%-ban bontja, 100 mM felett a sejtszaporodás lassul, és csak késve indul meg a lebontás.

- Szennyvíz oldatban, melyet peptonnal és vas(II)-ionokkal kiegészítettem a sejtek bontották a szulfanilsavat. Öt nap alatt 30%-os konverziót értünk el, egy hónapos inkubáció után a szulfanilsav 67%-a elbomlott.

- Eljárásokat dolgoztam ki a sejtek immobilizálására folyamatos, átfolyó reaktorban való üzemeltetéshez. A leoptimalisabb megoldásként a sejteket kompozit, alginát/gelrite gélyöngyöcskébe zártam. Így könnyen kezelhető rendszert kaptam, melyből a sejtek nem szaporodnak ki, a gyöngyökön belül pedig megtartják metabolikus aktivitásukat. A felületi adszorpción alapuló eljárás szintén hatékony, a legjobb SA konverziót adó módszer, mely felhasználható olyan rendszerekben, ahol a sejtek megjelenése a tisztított oldatban nem jelent problémát.

- A *P. paucimobilis* protokatekol és p-amino-benzoésav szubsztrátokon is képes jól szaporodni, míg metanilsavon a lebontás hatékonysága lényegesen alacsonyabb.

- Az optimális lebontó folyamathoz a sejteknek szükségük van Fe^{2+} ionokra, ami vas-kén típusú enzim aktivitására utalhat.

- A szulfanilsav lebontás biokémiai hátterét vizsgálva megállapítottam, hogy eltérő szubsztrátokon a sejt más-más enzimekészlete indukálódik. A feltárt sejtek fehérjéinek indukciós mintázata alapján úgy tűnik, hogy a szulfanilsavat és a PABA-t hasonló, míg a protokatekolt egy alternatív enzimszisztéma segítségével metabolizálja az izolátumunk.

- Az eredmények alapján, az irodalmi adatokkal összhangban feltételezem, hogy a *Pseudomonas paucimobilis* több metabolikus lebontási úttal rendelkezik, melyek a szubsztrátoktól függően alternatívan indukálódnak, de ezek mindegyikében valószínűleg valamilyen mono- vagy dioxigenáz enzim felelős az aromás gyűrű felnyitásáért. A különböző lebontási útvonalak közös enzimeket is tartalmaznak (ld. aktivitás mérés, gélelektroforézis kép).

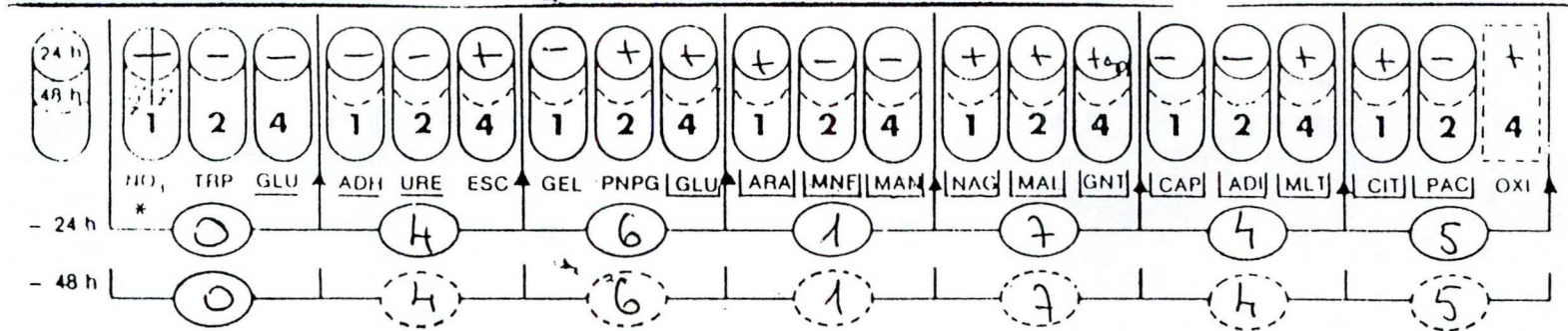
IX. IRODALOMJEGYZÉK

1. Akin C. (1987) *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **5**, 319-367
2. Alexander M. (1981) *Science*, **211**, 132-138
3. Anselmo A. M.; Novais J.M. (1992) *Biotechnol. Letters*, **14**, 239-244
4. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1994) Ed. Wilkins W.
5. Blümel S.; Contzen M.; Lutz M.; Stolz A.; Knackmuss H-J. (1998) *Appl. Env. Microbiol.*, **64**, 2315-2317
6. Bradford M. M. (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254
7. Bruckner Gyözö: *Szerves kémia II-1*; (1979) Tankönykiadó, Budapest; 528-531
8. Caldwell S. R.; Raushel F. M. (1991) *Biotech. Bioeng.*, **37**, 103-109
9. Dangmann E., Stolz A., Kuhm A. E., Hammer A., Feigel B., Noisommit-Rizzi N., Rizzi M., Reuss M., Knackmuss H-J. (1996) *Biodegradation*, **7**, 223-229
10. Doerr R. C.; Parris N.; Parks O. W. (1980) *J. of Chromat.*, **196**, 498-500
11. Catalogue of strains 1993. fifth edition, **DSM - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH**, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany. pp. 353-354
12. Feigel B. J.; Knackmuss, H-J. (1988) *FEMS Microbiol. Letters*, **55**, 113-118
13. Feigel B. J.; Knackmuss H-J. (1993) *Arch. Microbiol.*, **159**, 124-130
14. Furukawa K.; Simon J. R.; Chakrabarty A. M. (1983) *J. of Bact.*, **154**, 1356-1362
15. Goszczyński S.; Paszczyński A.; Pasti-Grigsby M. B.; Crawford R. L.; Crawford D. L. (1994) *J. of Bact.*, **176**, 1339-1347
16. Grossenbacher H.; Thurnheer T.; Zürrer D.; Cook A. M. (1986) *J. of Chromat.*, **360**, 219-223
17. Hallas L. E.; Adams W. J.; Heitkamp M. A. (1992) *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1215-1219
18. Hammer A.; Stolz A.; Knackmuss H-J. (1996) *Arch. Microbiol.*, **166**, 92-100
19. Head I. M. (1998) *Microbiology*, **144**, 599-608

20. Heiss G.; Muller C.; Altenbuchner J.; Stolz A. (1997) *Microbiology*, **143**, 1691-1699
21. Heitkamp M. A.; Camel V.; Reuter T. J.; Adams W. J. (1990) *Appl. Env. Microbiol.*, **56**, 2967-2973
22. Imai R.; Nagata Y.; Fukuda M.; Takagi M.; Yano K. (1991) *J. of Bact.*, **173**, 6811-6819
23. Jahnke M.; El-Banna T.; Klintworth R.; Auling G. (1990) *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 2241-2249
24. Junker F.; Field J. A.; Bangerter F.; Ramsteiner K.; Kohler H.; Joannou C. L.; Mason J. R.; Leisinger T.; Cook A. M. (1994) *Biochem. J.*, **300**, 429-436
25. Katayama Y.; Nishikawa S.; Murayama A.; Yamasaki M.; Morohoshi N.; Haraguchi T.; (1988) *FEBS Letters*, **233**, 129-133
26. Kovács K. L.; Polyák B. (1991) *Proceedings of the 4th IGT Symposium*, Chapter 5, 1-16, Colorado Springs
27. Kuhm A. E.; Stolz A.; Ngai K.; Knackmuss H-J.; (1991) *J. of Bact.*, **173**, 3795-3802
28. Kurosawa H.; Matsumura M.; Tanaka H. (1989) *Biotech. Bioeng.*, **34**, 926-932
29. Locher H. H.; Leisinger T.; Cook A. M. (1989) *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 1969-1978
30. Locher H. H.; Leisinger T.; Cook A. M. (1991) *Biochem. J.*, **274**, 833-842
31. Locher H. H.; Poolman B.; Cook A. M.; Konings W. N. (1993) *J. of Bact.*, **175**, 1075-1080
32. Martinsen A.; Skjak-Braek G.; Smidsrod O. (1989) *Biotech. Bioeng.*, **33**, 79-89
33. Martinsen A.; Storro I.; Skjak-Braek G. (1992) *Biotech. Bioeng.*, **39**, 186-194
34. Masai E.; Katayama Y.; Kawai S.; Nishikawa S.; Yamasaki M.; Morohoshi N. (1991) *J. of Bact.*, **173**, 7950-7955
35. McCarty G. W.; Bremner J. M. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 9403-9407
36. McDowell R. H. (1977) *Properties of alginates*, Alginate I. Ltd., (London, Anglia)

37. van der Meer J. R.; de Vos W. M.; Harayama S.; Zehnder A. J. B. (1992) *Microbiol. Rev.*, **56**, 677-694
38. Minnick M. F.; Scherer D. C. (1993) *Gene*, **130**, 57-63
39. Moser M.; Pálmai Gy. (1992) *A környezetvédelem alapjai*, Tankönyvk., Budapest
40. Nagata Y.; Ohtomo R.; Miyauchi K.; Fukuda M.; Yano K.; Takagi M. (1994) *J. of Bact.*, **76**, 3117-3125
41. Noda Y.; Nishikawa S.; Shiozuka K.; Kadokura H.; Nakajima H.; Yoda K.; Katayama Y.; Morohoshi N.; Haraguchi T.; Yamasaki M. (1990) *J. of Bact.*, **172**, 2704-2709
42. Nörtemann B.; Baumgarten J.; Rast H. G.; Knackmuss H.-J. (1986) *Appl. Env. Microbiol.*, **52**, 1195-1202
43. Paszczyński A.; Pasti-Grigsby M. B.; Goszczyński S.; Crawford R. L.; Crawford D. L. (1992) *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3598-3604
44. Perei K., Polyák B., Kovács L. K., Kiss I., Rákhely G. Eljárás szulfonált aromás vegyületek lebontására. Magyar Szabadalmi Hiv., szabadalmi ügyszám P 98 00077.
45. Phillips C. R.; Poon Y. C. (1988) *Immobilization of Cells*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg (ISBN 3-540-18637-9)
46. Robertson B. K.; Alexander M. (1992) *Appl. Env. Microbiol.*, **58**, 38-41
47. Sambrook J., Maniatis T.; Fritsch E. F. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
48. Sanchez J. M.; Arijo S.; Munoz M. A.; Morinigo M. A.; Borrego J. J. (1994) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 480-486
49. Shungu D.; Valiant M.; Tutlane V.; Weinberg E.; Weissberger B.; Koupal L.; Gadebusch H.; Stapley E. (1983) *Appl. Env. Microbiol.*, **46**, 840-845
50. Siahpush A. R.; Lin J.-E.; Wang H. Y. (1992) *Biotech. Bioeng.*, **39**, 619-628
51. Smalley D. L. (1982) *Experientia*, **38**, 1483-1484
52. Stanier R. Y.; Ingraham J. I. (1954) *J. Biol. Chem.*, **210**, 799-808

53. Stormo K. E.; Crawford R. L. (1992) *Appl. Env. Microbiol.*, **58**, 727-730
54. Taira K.; Hayase N.; Arimura N.; Yamashita S.; Miyazaki T.; Furukawa K. (1988) *Biochemistry*, **27**, 3990-3996
55. Thurnheer T.; Köhler T.; Cook A. M.; Leisinger T. (1986) *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 1215-1220
56. Thurnheer T.; Zürrer D.; Höglinger O.; Leisinger T.; Cook A. M. (1990) *Biodegradation*, **1**, 55-64
57. Timmis K. N., Steffan R. J., Unterman R. (1994) *Annu. Rev. Microbiol.*, **48**, 525-557
58. Timmis K. N., Pieper D. H. (1999) *TIBTECH*, **17**, 201-204
59. Zimmermann T.; Kulla H. G.; Leisinger T. (1982) *Eur. J. Biochem.*, **129**, 197-203



Papi 20 NE

* NO₃ → NO₂ → N₂
 Voir notice technique
 See instruction leaflet

- Morph./Gram
- Pigmentation
- Mobilité/Motility
- Flagelles/Flagella

G-
Simp.

REF.: 9.104 Patient:

Date: 1993. V.04. Origine/Source:

Dr: Service/Dept:

Identification :

P. paucimobilitas
 99.9-1.

410029 A

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni **Prof. Kovács Kornélnak**, aki munkámat állandó figyelemmel kísérte, hasznos tanácsai, segítőkészsége döntően befolyásolta disszertációm elkészítését.

Megköszönöm **Dr. Rákhely Gábornak** szakmai tanácsait, kritikai megjegyzéseit, és azt hogy a magánéletben is maximálisan hozzásegített, ahhoz, hogy e dolgozatot elkészíthessem.

Dr. Polyák Bélának szeretném megköszönni, hogylehetőséget adott olyan téma feldolgozására, melynek a biokémiai megközelítésen túl környezetvédelmi haszna is van.

Köszönöm **Kiss Istvánnak** a HPLC-s mérések során tanúsított segítőkészségét.

Az MTA Szegedi Biológiai Központ Biofizikai Intézet jelenlegi igazgatójának, **Prof. Ormos Pálnak** hálás köszönetem, amiért lehetővé tette számomra, hogy a Biofizika Intézetben munkám befejezhessem.

Biodegradation of sulfanilic acid by *Pseudomonas paucimobilis*

Introduction

Hazardous chemicals are produced in large quantities by the chemical and pharmaceutical industries. The appearance of these materials in the environment causes public health concern. Many chemicals are decomposed poorly by the microorganisms. Sulfonated aromatic compounds and derivatives are synthesized for various industries (Feigel & Knackmuss 1988). The material is released into the environment in abundant quantities at the manufacturing sites and also accumulates in industrial and household waste. Sulfonate group substituent on the aromatic ring is a rare and alien structure in Nature, therefore compounds bearing this functional group are toxic and/or resist biodegradation. These recalcitrant substances are thus considered especially hazardous, the their removal from waste water is of great public health importance.

Biodegradation of sulfonated aromatic compounds has been studied for many years (Feigel & Knackmuss 1988, 1991, Locher et al. 1991, Goszczynski et al. 1994). When sulfonated aromatics are degraded by microbes, the low substrate specificity of oxygenases present in various aerobic organisms is usually exploited. The common element in this enzymatic strategy includes an attack on the chemically inert target molecule by enzymatic incorporation of oxygen. Oxygenated derivatives loose stability and, therefore, become amenable to further chemical and/or biological degradation into products that are easily metabolized (Locher et al. 1991, Goszczynski et al. 1994, Hammer et al. 1996).

Sulfanilic acid (4-aminobenzenesulfonic acid) is a typical representative of aromatic sulfonated amines. The compound is manufactured as an intermediate in the production of azo dyes, plant protectives, and detergents (Feigel & Knackmuss 1993). Sulfanilic acid is an intermediary in the synthesis of various sulfonamid drugs, noted for their strong bactericid effect. Its degradation is difficult as the sulfonic acid group is a xenobiotic structural element and the strongly charged anionic moiety prevents the penetration of the compound through the bacterial membranes. Hence, an active uptake system may exist for arylsulfonates in the cells capable of degrading them (Feigel & Knackmuss 1993).

Immobilization of cells and macromolecules is a widely used technique to increase the active biomass concentration. In addition, immobilization can provide an

advantageous environment for the biocatalyst, increasing its bioconversion activity and resistance to environmental damage (Anselmo & Novais 1992, Hallas et al. 1992, Stormo & Crawford 1992, Sanchez et al. 1994). A number of immobilization supports and matrices have been recommended and their characteristics tested under diverse conditions (Akin 1987, Phillips & Poon 1988). Currently, the most popular cell entrapment matrix is Ca-alginate, a biopolymer having a structure similar to bacterial cell walls (Akin 1987, Phillips & Poon 1988).

In the Ph.D. thesis an effective method for biodegradation of sulfanilic acid by a single Gram-negative bacterium is presented. A single bacterium strain, identified as *Pseudomonas paucimobilis* has been isolated from a contaminated site near a chemical plant and is able to degrade sulfanilic acid as its sole carbon source. The conditions for biodegradation, by free cell culture and bacteria entrapped in Ca-alginate, have been optimized and efficient degradation has been demonstrated both at laboratory and industrial scale.

Results and Discussion

Isolation of the sulfanilic acid degrading bacterium. A single bacterium strain was isolated on mineral medium supplemented with 35 mM sulfanilic acid. On the basis of the API 20 NE system, the isolate was identified as *Pseudomonas paucimobilis* strain XS, and was deposited in the National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms of Hungary. Additional details on isolation and performance characteristics of this strain are the subject of a patent application submitted to the Hungarian Patent Office (ID number: P 98 00077).

Effect of pH on growth and biodegradation. The optimum growth was found at pH values between 6.5 - 7.0. It should be noted the pH of the cultures changed in the time, and the conversion of sulfanilic acid was primarily governed by the pH. The fairly narrow pH range suitable for high sulfanilic acid degradation and extensive biomass formation was found between pH=6.0 and 7.0.

Sulfanilic acid concentration dependence of biodegradation. *P. paucimobilis* tolerated high sulfanilic acid concentrations. All SA was degraded within two days, when the compound was present in 2 - 6 mM concentration, within the 22-30°C temperature range. Remarkably, even at 29 mM SA concentration, more than 70 % of the target compound was degraded after a week. In the presence of up to 100 mM sulfanilic acid

P. paucimobilis grows, but its degradation activity slowed down at contaminant concentrations higher than 110 mM. The bacteria needed an extended adaptation period (up to 5-6 days) at or above 30 mM SA, but it was quickly metabolized at low concentrations.

Metal requirement. Degradation of 4-sulfocatechol, and related compounds of sulfanilic acid decomposition, takes place via iron containing dioxygenases (Hammer 1996, Heiss 1997). The physiological effect of various metal ions was therefore tested. Without Fe^{2+} in the growth medium, the cells had negligible sulfanilic acid degradation activity. Variation of the iron concentration between 0.01 and 0.2 mM showed a clear dependence of degradation efficiency with iron concentration, with an optimum at 0.05 mM. Ca^{2+} and Mg^{2+} were required by the *P. paucimobilis* cells, as in the absence of these ions aggregated clumps of cells were formed with low biological activity (Fig. not shown).

Immobilization of the cells. For large scale waste water purification, immobilization of the bacteria on a solid support would be advantageous. Two immobilization methods have been compared in this study. In one system, cells were adsorbed onto the surface of porous cellulose beads (Mavicell-Si). As an alternative approach, the cells were entrapped into Ca-alginate-phytagel composite beads. A combination of alginate with phytagel (in 1:1 volumetric ratio) was chosen because *P. paucimobilis* cells escaped from the Ca-alginate matrix at a high rate. The composite matrix adequately adhered the cells to the immobilization material and fugitive cells were not detectable for several days. Moreover, addition of phytagel to the alginate increased the physical stability of the beads considerably.

Experiments with industrial waste water. Following the optimization experiments described above, the performance of *P. paucimobilis* was tested using the waste water effluent of a chemical plant producing sulfanilic acid. The effluent contained 0.6 % (35 mM) of sulfanilic acid and trace contaminants, mainly 1,2-dichlorobenzene (o-DCB) and aniline. Since the presence of o-DCB and aniline strongly inhibited cell growth. The waste water was deluted to containing 5.8 mM of sulfanilic acid and was supplemented with Fe-EDTA. The pH was adjusted to pH=7.0 with NaOH prior to the biological treatment. Under these conditions *P. paucimobilis* was able to grow and degrade the sulfanilic acid in the waste water effluent. The conversion of sulfanilic acid was 37% after one week and 67% after a month .

Potential degradation intermediates. To establish a possible pathway of the degradation, several substituted aromatic compounds were tested as potential substrates for *P. paucimobilis*. The cells could grow on 4-amino-benzoic acid as well as on sulfanilic acid. Similarly, the bacterium could utilize protocatechuate (3,4-dihydroxy-benzoic acid) if the medium was supplemented with 1g/l ammonium-sulfate as nitrogen and sulfur source. Slightly weaker growth was observed on 3-amino-benzene-sulfonic acid. *P. paucimobilis* could not metabolize trinitro-benzene-sulfonic acid, sulfosalicylic acid, 2,7-naphthalene disulfonic acid, anilin and o-dichloro-benzoic acid.

Protocatechuate dioxygenase assay. To characterise the oxygenase activity that was likely involved in sulfanic acid biodegradation, the crude extracts of *P. paucimobilis* cells, cultivated in DSM1 or in minimal medium containing sulfanilic acid, or protocatechuate were assayed for protocatechuate 3,4-dioxygenase activity. *Agrobacterium radiobacter* was known to contain protocatechuate dioxygenase (Feigel & Knackmuss 1993), so this strain was included as the control. No or very low level of PC degradation activity was detectable in the crude extracts of the *P. paucimobilis* cells cultivated on DSM1 without the target compound. However when protocatechuate and sulfanilic acid served as the sole carbon source, significant enzyme activities could be measured for *P. paucimobilis* although much higher activity was detectable in *A. radiobacter* crude extracts. The data presented above suggested that oxygenase(s) were involved in the biodegradation mechanism.

Induction of specific proteins by different growth conditions. The protein pattern of the crude extracts from *P. paucimobilis* cells, cultivated under various conditions, were investigated by SDS-PAGE to know whether or not these enzymes were inducible by specific substrate. In mineral medium, containing 10 mM sulfanilic acid as sole carbon source, strong protein bands at 48, 39, 30 kDa and weaker bands at 40 and 19 kDa appeared. The 39 kDa protein band became visible only if the cells were exposed to sulfanilic acid during growth. The other bands could also be observed when PABA served as carbon source. The distinct protein pattern was shown by the cells cultivated in either DSM1 or in PC containing mineral medium. From the rather complex changes in protein patterns, it could be concluded that *P. paucimobilis* used distinct metabolic pathways for various substrates and under growth conditions but in any cases mono- or dioxygenases might be involved in the processes.