



SZENT ISTVÁN EGYETEM

MEZŐGAZDASÁG- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR
KÖRNYEZET- ÉS TÁJGAZDÁLKODÁSI INTÉZET
KÖRNYEZETVÉDELMI ÉS KÖRNYEZETBIZTONSÁGI TANSZÉK

ATRAZIN BIOLÓGIAI LEBONTÁSÁRA ALKALMAS BAKTÉRIUMTÖRZSEK IMMOBILIZÁCIÓJA

Tanszékvezető:

Dr. Kriszt Balázs
egyetemi docens

Belső konzulens:

Háhn Judit
tanszéki mérnök

Készítette:

Hermán Boglárka
környezetgazdálkodási agrármérnöki MSc szak



Gödöllő
2012

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	3
2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
2.1. A NÖVÉNYVÉDŐSZEREKRŐL ÁLTALÁBAN.....	5
2.2. A SZIMMETRIKUS TRIAZINOK.....	6
2.2.1. Az atrazin.....	7
2.2.1.1. Az atrazin hatásmechanizmusa.....	9
2.2.1.2. Atrazin hatása élő szervezetekre	10
2.2.1.3. Atrazin a környezetben.....	12
2.2.1.4. Az atrazin mikrobiológiai lebontása.....	14
2.3. KÁRMENTESÍTÉSI TECHNOLÓGIÁK	17
2.3.1. Biológiai kármentesítési technológiák.....	17
2.4. IMMOBILIZÁCIÓ	18
2.4.1. A polivinil-alkohol	20
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	21
3.1. TÖRZSEK KIVÁLASZTÁSA	22
3.2. ATRAZINBONTÁSI KÍSÉRLET	24
3.2.1. Szabad sejtes vizsgálatok	24
3.2.1.1. Friss tenyészetek létrehozása, inokulumkészítés.....	24
3.2.1.2. OD mérés.....	24
3.2.1.3. A bontási rendszer	25
3.2.1.4. Atrazinbontás kevert tenyészet alkalmazásával	26
3.3. IMMOBILIZÁLÁS	26
3.3.1. Együttes szaporíthatóság	26
3.3.2. Az immobilizáció optimalizálása.....	28
3.3.3. Atrazinbontás immobilizált sejtekkel.....	29
3.3.3.1. Biomassza elkészítése	29
3.3.3.2. Mátrix elkészítése a felszaporított tenyészetből	29
3.3.3.3. A koaguláló és Na ₂ SO ₄ oldat elkészítése	30
3.3.3.4. Sejtbezárás.....	30
3.3.4. Atrazinbontás töltött oszloppal	30
4. EREDMÉNYEK	32
4.1. ATRAZINBONTÁSI KÍSÉRLET	32
4.1.1. Szabad sejtes vizsgálatok	32
4.1.2. A kevert tenyészetes bontási kísérlet eredményei.....	34
4.2. IMMOBILIZÁCIÓ	35
4.2.1. Immobilizáció optimalizálásának eredményei.....	35
4.2.2. Atrazinbontás oszloptöltetben – Eredmények.....	36
5. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	38
6. ÖSSZEFOGLALÁS	42
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	44
8. IRODALOMJEGYZÉK	45
9. MELLÉKLETEK	53
10. NYILATKOZAT	56

1. BEVEZETÉS

Környezetünket a fenntartható fejlődés elősegítésével kell a magunk és a jövő embere számára minél inkább eredeti formájában megőrizni, élhetőbbé tenni. Ma már elsődleges feladatunk a természeti- és a mesterséges környezet megóvása oly módon, hogy azok összhangban legyenek az ember gazdasági tevékenységeivel.

Az emberiség környezetre gyakorolt hatása az újkori igények és technológiák bővülésével egyre nagyobb jelentőséggel bír. A környezet védelme már csak a környezetkárosító folyamatok következményeinek hatására vált fontossá, melyekkel jelentősen beleavatkoztunk a környezet szabályozó folyamataiba.

A környezet eredeti állapotának megőrzése a különböző szennyezőanyagok nagymértékű kijuttatása miatt - mely folyamatban jelentős szerepet játszanak a növényvédőszeresek - egyre fontosabb és nehezebb feladattá válik. A Föld szárazföldjeinek 30%-a (ennek közel harmada szántó), Magyarország területének több mint 60%-a mezőgazdasági művelés alá vont terület, melyet legalább évente egyszer kezelnek valamilyen peszticiddel¹. Intenzív alkalmazásuk során számos vegyületről igazolódott be, hogy a környezetben perzisztensek, így rendszeresen előfordulnak a felszíni és felszín alatti vizekben, földtani közegben, illetve felhalmozódhatnak a táplálékláncban.

Használatuk következményeként a peszticidekkel szemben ellenálló fajok száma emelkedik, ezen kívül gyakran felelősek akut és krónikus mérgezések, egészségügyi problémák kialakulásáért. Évről-évre egyre több vegyületről bizonyosodik be mutagén, karcinogén, teratogén, illetve hormonháztartást zavaró hatása, így ezek a vegyületek kiemelt figyelmet kapnak egészségügyi és környezetvédelmi szempontból egyaránt.

Vizsgálataimat a növényvédőszeresek közül a szimmetrikus triazinok csoportjába tartozó atrazinra összpontosítottam. Az atrazin felhasználása csaknem ötven éves múltra tekint vissza. Miután több tanulmány és kutatás alátámasztotta, hogy a környezetbe kerülve a lebomlási folyamatoknak igen ellenálló, endokrin rendszert zavaró hatású vegyület, az Európai Unió 2004-ben visszavonta felhasználásának engedélyét. Ezek ellenére azonban számos országban, többek között az USA-ban még mindig közkedvelt gyomirtóként alkalmazzák, és több tízezer tonna hatóanyagot juttatnak ki évente.

A hazai adatokat tekintve a túlzott növényvédőszer felhasználás eredményeként a legtöbb területen kimutathatóak peszticid maradékok a felszíni és felszín alatti vizekben, földtani közegben.

¹ Növényvédelemre alkalmazott vegyi anyagok

A környezetbe kerülő növényvédőszer sorsa a mai napig nehezen feltérképezhető és koordinálható, annak ellenére, hogy folyamatosak a kutatások erre vonatkozóan. Mivel korunk mezőgazdasága a népesség növekedésével nem volna kielégítő növényvédőszer használata nélkül, ezért kiemelt fontosságúak a környezeti elemeket szennyező anyagok eliminálására a biológiai kármentesítés eszközei, melyek célja, hogy környezetkímélő módon, drasztikus fizikokémiai beavatkozás nélkül szüntessék meg, illetve csökkentsék a már kialakult szennyezés mértékét.

Az 1960-as évek óta a kutatási területek egyre intenzívebben irányulnak a mikroorganizmusok szennyezőanyag lebontó vagy átalakító képességének megismerésére, amely során egyes xenobiotikumok biodegradáció által lebomolhatnak.

A biológiai kármentesítés keretében az 1970-es évektől folynak kutatások a mikroorganizmusok atrazin bontó képességének megállapítására.

Munkám célja az atrazin biológiai degradációjának vizsgálata volt. A bontási vizsgálatok eredményei alapján jó degradációs potenciállal rendelkező törzseket egy vízdoldékony, nem toxikus műanyag polimer mátrixban kívántam rögzíteni (sejt immobilizáció), mely során fokozható a sejtek külső behatásokkal szembeni védettsége, valamint megnövekedhet a metabolikus aktivitásuk. Ennek megfelelően a célkitűzéseim a következők voltak:

- Szabad sejtes vizsgálatok keretében:
 - atrazin biológiai lebontására alkalmas baktériumtörzsek keresése korábban már faj szinten identifikált, szénhidrogéneket és mikotoxinokat jó hatásfokkal bontó törzsek vizsgálatával
 - jó bontási képességgel rendelkező törzsek párokba rendezése és a bontási kísérletbe vonása
- Immobilizáción belül:
 - az immobilizációs technika optimalizálása polivinil-alkohol (PVA) alapú hordozóval
 - az atrazin biodegradációjára képes sejtek rögzítése, valamint
 - a biológiai lebontás vizsgálata immobilizált sejtekkel, oszloptöltetben

Dolgozatomban a téma irodalmi hátterének bemutatása után ismertetem azokat a kísérleteket, valamint eredményeket, melyek az atrazin szabad sejtes és immobilizált baktériumtörzsek általi biológiai lebontására irányultak.

2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A NÖVÉNYVÉDŐSZEREKRŐL ÁLTALÁBAN

„A fokozódó és kiterjedt környezetszennyezés arra kényszeríti az embert, hogy újragondolja a természethez és gazdasághoz fűződő kapcsolatát” (Monostori, 2007). Az ember környezete a bennünket körülvevő világnak az a része, amelyben él és tevékenységét kifejti. Környezetünk élő és élettelen, természetes és mesterséges (ember által létrehozott) elemekkel együtt alkot rendszert. A környezet szennyezése azt jelenti, hogy az ember tevékenysége során a környezeti elemek tulajdonságait hátrányosan befolyásolja, ezáltal az ember természetes életkörülményeit rontja (http1).

A környezetvédelem jogszabályban meghatározott fogalma alapján olyan tevékenységek és intézkedések összessége, amelyeknek célja a környezet veszélyeztetésének, károsításának, szennyezésének megelőzése, a kialakult károk mérséklése vagy megszüntetése, a károsító tevékenységet megelőző állapot helyreállítása (1995. évi LIII. törvény a környezet védelmének általános szabályairól). Alapvető célja az emberiség fennmaradásának illetve egészségének biztosítása (http1). Ennek ellenére a mesterséges környezet által gerjesztett vegyi anyagok nagy része károsítja az emberi egészséget, nem bomlik le a környezetben (perzisztens), és felhalmozódik (bioakkumulálódik) a testszövetekben (Pethő, 2008).

Napjainkban a szennyező anyagok közül a peszticidek kapják a legtöbb figyelmet, mivel ezek a kémiai vegyületek okozzák a legtöbb gondot a környezetben, hiszen sok közülük potenciális emberi rákkeltő, és mérgezőek az élővilág számára (Stamer et al., 1995), valamint a környezetbe kikerülve akár évtizedekig is kifejthetik káros hatásait. Intenzív használatuk komoly problémát jelent, melyre első ízben Rachel Carson: *Néma Tavasz* című könyve világított rá.

A növényvédő szerek a kórokozók és kártevők megfékezésére alkalmazott vegyi anyagok - melyeket tudatosan alkalmaznak az élővilág különböző fajainak, fajcsoportjainak, populációinak pusztítására, - egyre inkább fordulnak elő a vizekben és talajokban egyaránt, emellett a vegyi anyagokkal szemben ellenálló fajok száma folyamatosan emelkedik (Márkus, 1993). Ezen kívül már többször jegyezték fel gyomirtószer-tartalmú (pl. alachor, metolachor) csapadékot Nyugat-Európától az Egyesült Államokig (Darvas & Székács, 2006).

A növényvédőszer alkalmazása a XVIII. századig nyúlik vissza, amikor is a nikotint, mint dohányextraktumot rovarölőszerként alkalmazták, a XIX. században pedig az akkori tapasztalatok alapján a kőszénkátrány bizonyult hatékony alapanyagnak. A múlt század közepén kezdték meg a

hírhedt DDT és a foszfoészterek alkalmazását, az 1970-es években fedezték fel a piretroidokat (http2).

A peszticidek specifikálásának célja, hogy intenzív biológiai hatást gyakoroljon célfajokra. Sajnos a szelektivitásuk korlátozott, mert nem célzott fajokat is gyakran érintenek, mivel azok fiziológiai vagy biokémiai hasonlósággal rendelkeznek a célszervezetekkel (Mladinica et al., 2009). A túlzott és egyoldalú peszticidfelhasználás miatt peszticidrezisztencia alakulhat ki különböző fajokban, így idővel a mutálódott szervezetekre hatástalanná válnak a hatóanyagok. Az emberiség a szükségesnél is több kémiai eredetű anyagot juttat a környezetbe, közöttük számos található, amelyek bizonyos idő után felhalmozódnak a környezetben, és ez által a táplálékláncban (Márkus, 1993). Jelenlétük és megmaradásuk (perzisztenciájuk), átalakulásuk (metabolizmusuk és degradációjuk) az élő szervezetekben nehezen nyomon követhető, a legtöbb esetben ismeretlen biológiai reakciót indít el, egyúttal különböző mértékű környezetterhelést vált ki (http2).

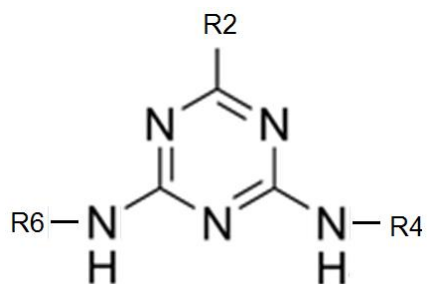
A vegyi anyagok túlzott felhasználása rámutat arra, hogy a kemikáliák által előidézett károsodásokat figyelmen kívül hagyták, hatásukat alábecsülték (Rády, 1982). Az előrehaladott környezetszennyezéssel sürgető feladattá válik a kijuttatott növényvédő szerek és bomlástermékeik sorsának tisztázása (Márkus, 1993).

2.2. A SZIMMETRIKUS TRIAZINOK

1952-ben a J. R. Geigy Kft. által Svájcban felfedezett szimmetrikus triazinokkal (továbbiakban s-triazinok) új, nagy hatású herbicid csoport került ki a piacra és jelentett nagy előrelépést a mezőgazdasági gyakorlat számára (LeBaron et al., 2008).

Fontosabb származékaiban a gyűrűben található 1,3,5- helyzetben lévő nitrogén atomok adják a szimmetrikus triazinok alapját (Rády, 1982), általános

szerkezeti képletük az 1. számú ábrán látható. Az s-triazin-származék herbicidek között nagyszámú, szerkezetükben hasonló vegyületet találunk. A helyettesítő-csoportoktól (R2, R4, vagy R6) függően tudjuk a vegyületcsalád tagjait tovább csoportosítani (Hong, 2003). Az s-triazinokat gyakran használják reagens gyanánt, könnyen képeznek származékokat, ezeket gyógyszerként és herbicidként alkalmazzák (Aksenov & Aksenova, 2009). Bár a csoportban számos gyomirtó hatóanyagot írtak le, a legjelentősebb képviselőiként a klórszubsztituált származékok között az atrazin, cianazin, és a terbutilazin említhetők meg elsősorban.



1. ábra - A szimmetrikus triazinok általános képlete (Kádár, 2005)

(R2=Cl vagy SCH₃ klóratom, alkoxi vagy alkiltiocsoport; R4, R6=alkilcsoport/ alkilszubsztituensek)

A s-triazin típusú gyomirtók (pl. atrazin, prometrin) kiemelkedően rossz hírnévre tettek szert az ivóvíz-készleteink szennyezése, illetve perzisztenciája okán, ezért Európa fejlett államaiban sorra kerültek betiltásra (Darvas & Székács, 2006), de például az USA-ban továbbra is több millió kilogramm kerül felhasználásra évente (http3). Az összes triazin tartalmú gyomirtószer felhasználásának mértéke 1996 és 2001 között a Magyarországi és Európai adatokkal összevetve az 1. számú táblázatban található.

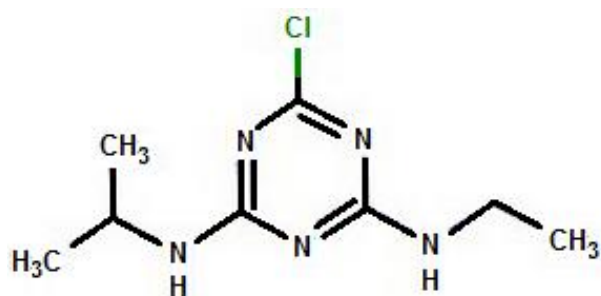
1. táblázat - Összes triazin tartalmú gyomirtószer használat 1996-2001-ig (a FAO statisztikái alapján)

év/tonna	AMERIKA	EURÓPA	MAGYARORSZÁG
1996	17976	9828	356
1997	27139	3424	356
1998	14342	3698	426
1999	9771	3493	508
2000	15249	7653	483
2001	15488	8673	621

Vízzennyező-képességük miatt a triazin típusú szerek gyártóinak európai piaca erőteljesen hanyatlik. Elsősorban a kukorica gyomirtását célzó triazinüzletágban (pl. atrazin, simazin, cianazin) az engedéllyel rendelkező országok triazintartalmú gyomirtók gyártásában, forgalmazásában a Syngenta vezető szerepét a Bayer és a DuPont vette át (Darvas & Székács, 2006), de a Monsanto valamint Scotts cégek is gyártják még (PPDB²).

2.2.1. AZ ATRAZIN

A szimmetrikus triazinok csoportjába tartozó atrazin nem illékony, kristályos vegyület (Kádár, 2005), vízben való oldhatósága 0,03 g/l (http4), szerkezeti képletét a 2. számú ábra szemlélteti.



2. ábra - A 2-klór-4 etilamino-6-izopropilamino-1,3,5-triazin (atrazin) szerkezeti képlete (http6)

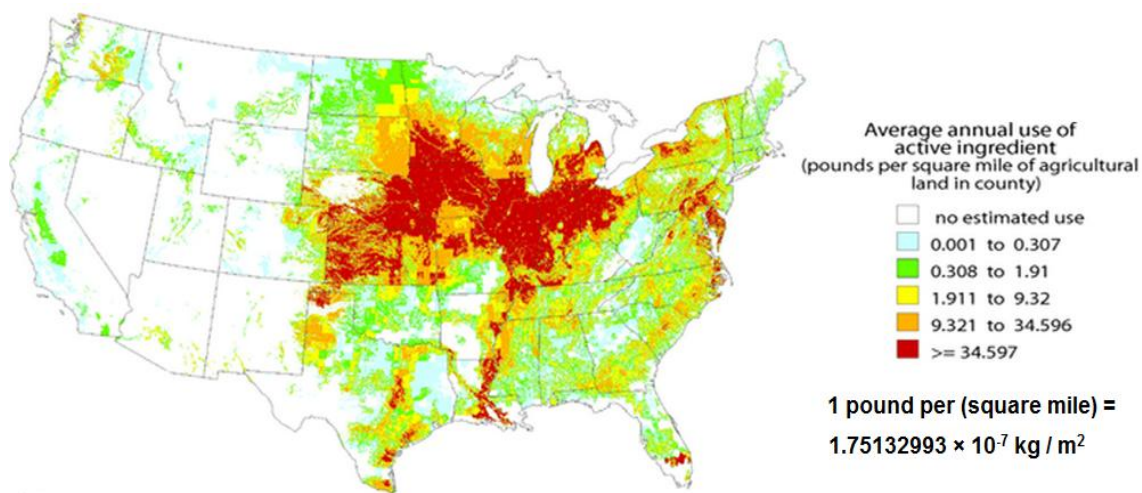
Lehetséges hatásainak köztudatba

kerülése előtt Magyarországon széles hatásspektruma, hosszú hatástartama és kedvező ára miatt volt közkedvelt a termelők körében, Amerikában legfőképp a kukorica, cirok, és a cukornád

² Növényvédőszer tulajdonságainak adatbázisa (http8)

vegetációkban használják pre³- és posztemergens⁴ herbicidként a gyomnövények fotoszintézisének gátlásán keresztül (Borbély, 2002; [http5](#)).

Noha használatát az Európai Unióban 2004-ben betiltották, többek között az Amerikai Egyesült Államokban, valamint Ausztráliában az atrazin továbbra is alkalmazható szer. Az USA peszticid eladási listáján 2005-ben az előkelő második helyen szerepelt, így természetesen komoly anyagi érdekek kapcsolódnak forgalmazásához ([http7](#)). Az Egyesült Államokban 1987 és 1989 között az atrazin volt a legnagyobb mennyiségben – csaknem 30 millió kg hatóanyag évente – felhasznált herbicid, a termésterületek 84%-án alkalmazták (Gianessi & Puffer, 1991). Az Amerikai Környezetvédelmi Hivatal (United States Environmental Protection Agency - US EPA) adatai szerint 1995-ben 31-33 millió kg hatóanyagot használtak fel az Egyesült Államok területén (Aspelin, 1996). A 2001. évi atrazin-felhasználást az Egyesült Államok területére vonatkoztatva a 3. ábrán látható.



3. ábra - Atrazin-felhasználás mértéke az Egyesült Államokban (USGS⁵, 2001)

A vegyületben levélherbicid hatást⁶ idéz elő az izopropil-csoport, de talajherbicidként⁷ is alkalmazták. Felhasználása ezért pre-, és posztemergensen is lehetséges a növény korai növekedési állapotában. Készítményeinek hatóanyagtartalmát az aktuális szabályozás, a gyártó cég, felhasználásának módja, valamint az adagolt segédanyagok határozzák meg (Rády, 1982). Ezekről függően Magyarországon számos márkaneven volt forgalomban, melyek 2007. június 30-ig

³ Premergens kezelés: a kultúrnövény vetése után, kelése előtt, gyommentes területre juttatják ki

⁴ Posztemergens kezelés: a kultúrnövény és a gyomok kelése után juttatják ki a területre. A kultúrnövény és a gyomok fejlettségére egyaránt tekintettel kell lenni. ([http9](#))

⁵ Amerikai Földmérő Hivatal (US Geological Survey - USGS)

⁶ A növény föld feletti, zöld részén keresztül szívódnak fel (Hong, 2003).

⁷ A talajherbicideket a talajra v. a talajba juttatják, míg a levélherbicidek a levél felületén (kontakt hatásúak) vagy a levélen keresztül felszívódva (szisztemikus hatásúak) aktívak. A kémiai szerkezet gyakran meghatározza a növényvédőszer biológiai hatás módját ([http11](#)).

rendelkeztek forgalomba hozatali engedéllyel, és 2007. december 31-ig lehetett felhasználni a türelmi időre vonatkozó jogszabályok értelmében.

Az atrazin a környezetben tartósan megmaradó szerves szennyező anyag, ennek ellenére még mindig széles körben használják a mezőgazdaságban és az erdőgazdálkodásban egyaránt majdnem ötven éve (Buttiglieri et al., 2011), ezáltal nagyszámú növényfaj vált rezisztensé: az atrazinrezisztens „szupergyomok” dokumentált száma több mint 80 ([http10](http://10)). A fő probléma, hogy minél több időt tölt a környezetben, ellenállva a természetes lebomlási folyamatoknak, annál biztosabb, hogy belekerül a biológiai rendszerekbe, hatást gyakorolva ezzel az emberre is (Barótfi, 2000).

2.2.1.1. AZ ATRAZIN HATÁSMECHANIZMUSA

A fotoszintetizáló növényekben - melyek rendelkeznek kloroplasztisszal - két fényindukálta elektrongerjesztési mechanizmus működik, ezekben fény hatására a klorofill gerjesztődik, majd a gerjesztési energiát átadja a kémiai reakciócentrumnak (a víz fotolíziséhez). Az egyik az ún. II. fotorendszer (PS II), a 670-680 nm hullámhosszú fény energiáját nyeli el, működése oxigén felszabadulásához vezet, valamint az ún. I. fotorendszer (PS I) - mely erősen redukáló tulajdonságú és 700 nm körüli fotonokat abszorbeál - működésének eredményeképpen a fényenergia ATP és NADPH formájában kémiai energiává alakul. A II. fotorendszerben keletkező elektron átadódik az I. fotorendszernek, ahol az a NADPH képzésén keresztül végső soron a szén-dioxid szénhidráttá történő alakítását eredményezi oxigén képződése mellett. Az elektronok a fotoszintetikus elektrontranszport alatt magasabb energiaszintre lépnek. A fotoszintézis-gátló herbicidek e két fotorendszer működését akadályozzák. A fotoszintézist a fényszakasz második fotorendszerét (PS II) gátló vegyületek (piridazinonok, fenil-karbamátok, triazinok és uracilok) az elektronátadási helyet szétkapcsolják (Darvas & Székács, 2006), ezáltal blokkolódik az elektrontranszportlánc, így az elektronok nem tudnak eljutni a PS I-re, nem keletkezik ATP és NADPH, amelyek szükségesek a CO₂ redukciójához (Hong, 2003). A triazin herbicidek a PS II folyamatrendszer az elektrontranszport gátlásával akadályozzák (Kádár, 2005) úgy, hogy a folyamatban gerjesztett elektron nem tud átjutni a plasztokinon kaszkádon keresztül és ez által nem jut el a PS I rendszerbe (Darvas & Székács, 2006). A szimmetrikus triazinok a növénybe kerülve a szállítószövetrendszerben transzlokálódnak, és a víz fotolízisét gátolják.

Magasabb koncentráció esetén a fotoszintézis gátlása mellett, fénytől függetlenül a növények enzim rendszerére is hatnak. A gyökerek nitrát-felvétele növekszik, mely a növényben magas N-tartalmat, illetve fehérje-szintnövekedést idéz elő. A kezelt növény leveleinek

keményítőtartalma csökken, mely szintén a szimmetrikus triazinok egyik mellékhatásaként említhető meg (Rády, 1982).

2.2.1.2. ATRAZIN HATÁSA ÉLŐ SZERVEZETEKRE

Az atrazin egészségügyi hatásait illetően eléggé megosztja a tudományos közönséget. 2000. június 27-én szakértői tanácsadó testület által bemutatott eredményssorozat hatására az EPA frissítette az atrazin becsült toxicitási értékét és az ivóvízben megengedett határértéket is. Az első mélyreható kutatás, amely a gyerekekre való káros hatásait vizsgálja, meggyőzte az ügynökséget, hogy az atrazin káros a magzatokra, csecsemőkre és a pubertás korú gyerekekre. Az ügynökség a vizsgálatok alapján arra a következtetésre jutott, hogy rövid távú atrazinnak való kitettség is számos reprodukciós hatást és fejlődési rendellenességet okozhat, beleértve a vetélést, és a késleltetett serdülő kori nemiszerv-fejlődést (EPA, 2000).

Szervezetünkben elsősorban a máj felelős a toxikus anyagok metabolizmusáért, beleértve az atrazinét is. Vizsgálatok ellenére azonban korlátozott információ áll rendelkezésre az atrazin emberi metabolizmusát illetően (Joo et al., 2010). Az atrazin könnyedén felszívódik az állatok gyomor-bél traktusán keresztül, eloszlik a májra és vesére, ezért hatással van a máj méregtelenítését végző lényeges enzimekre (Islam et al., 2002). A triazinderivátumok⁸ háziállatokban ritkán okoznak mérgezést, viszonylag magas dózis bevitele azonban bármely állatfaj egyedeit megbetegíthetik. Felszívódásuk után a májat és a vesét károsítják, illetve közvetlen, bénító jellegű idegrendszeri hatásuk is van. A mérgezett állatokon hasmenés, nyálzás, reszketés, hányás és izomgyengeség figyelhető meg, majd koordinálatlan mozgás, bénulás jelentkezik. Specifikus ellenszere nincsen, ezért csak tüneti kezeléshez folyamodhatunk: nyugtatókat, görcscsillapítókat, májvédőszereket, vérkeringést javító készítményeket alkalmazhatunk (Simon & Laczay, 1993).

Az EPA arra is talált bizonyítékot, hogy az atrazin „lépcsőzetes” biológiai eseményeket indít el, ami számos egészségügyi problémához vezet: az elváltozás a hipotalamusz hormonjainak elnyomásával kezdődik, amely gátolja az agyalapi mirigy hormonjainak felszabadulását. A hipotalamusz befolyásolja többek között az agyalapi mirigyet, amely szabályozza a növekedést, anyagcserét és a reprodukciós funkciókat, ezáltal az atrazin veszélyes hormonális egyensúlyzavart indukálhat (http12).

Az EPA hormonális hatásokkal kapcsolatos eredményei alapján az atrazint a „hormonrendszert zavaró” (EDC - Endocrine Disrupting Chemicals) kategóriába helyezte, ugyanis gerinceseknél erős endokrin rendszert zavaró hatással rendelkezik. Az atrazin foszfordiészteráz-

⁸ Származék

inhibitor⁹ tulajdonsága révén fokozza az aromataz aktivitást, melynek során a tesztoszteron ösztrogénné alakul át (Roberge et al., 2004). Megzavarja a kételtűek szexuális fejlődését és ezzel komoly ökológiai kockázatot jelent (Chunyu et al., 2009). Tyrone Hayes munkatársaival az atrazin afrikai karmosbékákra (*Xenopus laevis*) kiváltott hatását vizsgálták olyan koncentrációban, amely természetes környezetükben is előfordulhat. Ehhez karmosbéka lárvákat neveltek atrazint különböző koncentrációban tartalmazó vizekben, majd az észlelt változásokat összevetették a kontroll egyedekkel (atrazint nem tartalmazó vízben nevelkedett békákkal). A legalacsonyabb koncentrációt kivéve (0,01 ppb¹⁰) már 0,1 ppb nagyságrendnél azt tapasztalták, hogy az eredetileg hímnek született ebihalak ivarmirigyei többszöröződtek, előfordult hermafroditizmus, valamint a hímek tesztoszteron szintjének csökkenése volt kimutatható. Egyes egyedek feminizálódtak és más hímekkel párosodva utódokat hoztak létre (Hayes et al., 2002).

Kapcsolatban állhat továbbá a mezőgazdasági területeken élő férfiak termékenységevel, spermáinak minőségével (Swan et al., 2003), továbbá megállapításra került, hogy daganatok kialakulását segíti elő a hormonálisan érzékeny szövetekben, pl.: méh, emlők, valamint fokozódik a mellrák előfordulásának valószínűsége azon nők esetében, akik atrazinnal szennyezett vizet kénytelenek fogyasztani (Kettles et al., 1997). Ezen kívül összefüggésben állhat gyomor-, prosztatata-, emlődaganat és Non-Hodgkin-limfóma¹¹ kialakulásával is (Buttiglieri, 2011; Lazorko-Connon & Achari, 2009). Az EPA a karcinogenitási iránymutatások terminológiája alapján javaslatot tett a „C-kategóriába” való átsorolására a „valószínűleg emberi rákkeltő” vegyületek közé. Az EPA javaslatát a FIFRA (az USA rovarirtó, gombaölő és rágcsálóirtó szerekéről szóló rendelete - Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act) tudományos tanácsadó testület szakértői értékelésének hatására elutasították ([http5](http://5)).

Hayes és munkatársai (2010) kísérleteikkel egyrészt igazolták, hogy a kételtűek igen szenzitívek a vegyülettel szemben, másrészt kiderült, hogy egy érzékeny élőlénycsoporton már igen kis koncentrációban (0,1 ppb) is kifejti káros hatását a vegyület. Egy 1995. évi értékelés adatai szerint az Ohio, Illinois, valamint Iowa államok (USA) lakosainak több mint 90%-a 1 ppm atrazin koncentrációnak volt kitéve az ivóvíz által (IARC, 1990).

Széles körben tanulmányozták az atrazin ökotoxikológiai jelentőségét, hatását a vízi ökoszisztémákra, a különféle tengeri növények után a tengeri állatokra. Az utóbbi időben sok tanulmány foglalkozik az atrazin halakra gyakorolt káros hatásával is. 5µg/l-es (5 ppb) kitettség már jelentős változásokat okozott a zebrahal úszási magatartásában. Ezen kívül az atrazin

⁹ A foszfodiészteráz enzimsalád tagjai a cAMP 5'-AMP-vé alakulásáért felelősek. A foszfodiészteráz- inhibitorok (gátlók) hatására megemelkedik a cAMP szintje, amely az aromataz enzim expressziójának növekedését eredményezi

¹⁰ Parts per billion: µg/l vagy µg/kg (ppm: mg/l vagy mg/kg)

¹¹ A nyirokrendszer daganatos elváltozása

bizonyíthatóan hatással van a harcsák reprodukciójára, valamint csökkenti azok embrionális fejlődést (Xiaoli et al., 2009). Akut ökotoxikológiai tesztekben algákra nagyon toxikus (Ocskó et al., 2006). Egyes vízi szervezetekre vonatkozó LC₅₀¹² értékek a 2. táblázatban találhatók.

2. táblázat - Vízi szervezetekre vonatkozó értékek atrazin esetében (TERRABASE felhasználásával)

Érték	Szervezet		Mennyiség
LC ₅₀	alga	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	0.145 mg/l
		<i>Scenedesmus obliquus</i>	0.124 mg/l
		<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	0.051 mg/l
LC ₅₀	daphnia		0,415 mg/l
LC ₅₀	ponty		33,11 mg/l

2.2.1.3. ATRAZIN A KÖRNYEZETBEN

A triazinok egyik legfőbb környezeti problémát okozó tulajdonsága, hogy a talajokban hónapokon keresztül, vagy akár a vegetációs időn túl is megmaradnak (Darvas et al., 1999). Az atrazin akkor kapott igazán nagy figyelmet, amikor gyakorta észlelték felszíni és felszín alatti vizekben egyaránt. A felezési ideje¹³ termőtalajban mintegy 60 nap, illetve 3-12 hónap alatt bomlik le fele mennyiségűre a felső talajrétegben, de ez az érték jelentősen megnő felszíni és felszín alatti vizek esetében (US EPA, 1988; Gondos & Darvas, 2005). Hazánkban már 1972-ben rendeletben szabályozták az atrazin hatóanyag felhasználását, a legmagasabb kijuttatható mennyiséget két éves ciklusra 3 kg/ha dózisban határozták meg, melyet 1995-ben 0,7-1,4 kg/ha hatóanyagban maximalizáltak (Borbély, 2002). 1993-ban végzett felmérés szerint a felső talajrétegben a herbicidek közül az atrazin fordult elő legtöbb esetben (MTA, 2003). A csökkenő felhasználás miatt 1998-as adatok szerint felszín alatti vizeink 68%-ában nem detektálható atrazin, és csupán 1%-ában mutattak ki 2µg/l-nél nagyobb mennyiséget, ami a WHO által meghatározott akkori limit (Rakics, 2000; Kárpáti et al., 1998), azonban az Egyesült Államokban a herbicidek közül talajvízben az atrazin a leggyakrabban detektált vegyület (Borbély, 2002).

A modellek alapján készült statisztikákból kivehető, hogy az atrazin alacsonyban fekvő mezőgazdasági területeken fordul elő nagyobb gyakorisággal. Ezeken a területeken a viszonylag magas atrazin koncentráció végett a hidrológiai viszonyoktól függően nagyobb mértékben kerül a talajvizekbe (http12). Az atrazin talajvíz felé történő transzportja számos tényező függvénye,

¹²Az adott növényvédő szer hatóanyagának azon mennyiségét jelenti (mg hatóanyag / 1 l vízre megadva), amelytől a kísérleti állatok (pl. halak) 50%-a elpusztul. (http13)

¹³A bomláshoz szükséges idő jellemzésére vezették be a felezési idő fogalmát. A felezési idő alatt azt az időtartamot értjük, ami alatt egy adott pillanatban meglévő atommagok fele elbomlik (http15).

beleértve a vegyület és a talaj fizikai-kémiai tulajdonságait, a benne előforduló élőlények mennyiségét, összetételét, és tevékenységét, valamint a környezeti tényezőket. Bár a kijuttatott atrazin többnyire a felszíni talajrétegben marad és ott fejti ki hatását, meglepő, hogy helyenként kimutatták már esővízben is, melynek koncentrációja 2,19 µg/l (ppb) volt (Richards et al., 1987). A rendelkezésre álló adatok szerint a vegyület 57%-a származik szennyvíztisztítókból, és 43 %-a mezőgazdasági területről (Darvas et al., 1999). Ez a legfőbb oka annak, hogy mezőgazdasági területek közelében élők ivóvizében gyakran előfordul (http15), ugyanis a legtöbb esetben a mezőgazdasági területekről elfolyt vizekből származtatható atrazin az ivóvizekben (http5).

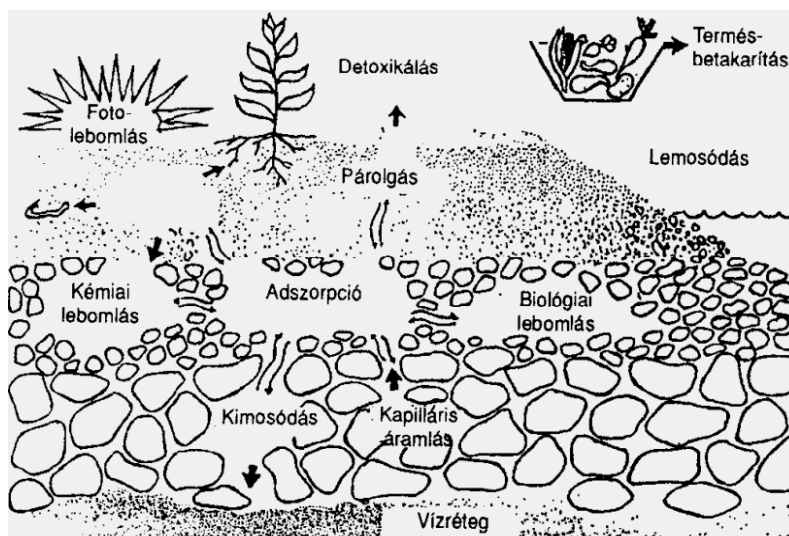
Az EPA szerint az elsődleges kockázatot az emberi egészségre az ivóvizek atrazin tartalma jelenti. Az Egyesült Államok túlzott mennyiségű atrazin használata miatt már a legtöbb felszíni és felszín alatti vízben kimutatható. Emiatt fennáll a fokozott veszélye a talajból és talajvízből az ivóvízkészletekbe kerülésének (Mulbry et al., 2002). Az Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala (US EPA) 1974-ben elfogadta a Biztonságos Ivóvíz Törvényt, amely az ivóvízben fellelhető szennyező anyagok mértékét írja elő egészségügyi kockázat nélkül (biztonsági határ). Az atrazin legnagyobb szennyezőanyag-szintjét (MCL¹⁴) ivóvizekre vonatkoztatva 3,0 ppb-ben (0,003 mg/l) határozta meg (http14), ezzel szemben Hayes és munkatársai 0,1 ppb-ben állapította meg azt a dózist, amely kétélűekben már negatívan befolyásolja a szervezet normális fejlődését. Egy nemrégiben az Egyesült Államok Mezőgazdasági Minisztériuma által készített tanulmány szerint azonban az atrazin éves átlagos koncentrációja több esetben haladta meg ivóvizekben az MCL-t. Több folyó, patak és ivóvíztározó esetében a legnagyobb szennyezőanyag szintet meghaladó atrazinkoncentrációt mértek (http15). Becslések szerint az USA-ban 2-3 millió ember van évente kitéve 0,2 µg/l szintű atrazin ivóvíz általi expozíciónak jelenleg (Kligerman et al., 2000a, b).

Az atrazin ivóvízben való szabályozása az államokban mai napig egy évi átlagos szinten alapszik, és nem veszi figyelembe a szezonális csúcsokat és maximumokat. Tervben volt egy új jogi értékhatár bevezetése, amely azon alapszik, hogy rövid távú, esetleg napi expozíciótól is megvédje a magzatokat, csecsemőket és fiatalokat. Ennek az új értékrendnek a bevezetése esetén az évente 4 alkalommal történő tesztelés helyett gyakrabban vizsgálták volna a csapvíz atrazinkoncentrációját, a szennyezés csúcsideszakában akár napi szinten- potenciálisan több mint százszor évente (http12).

Az atrazin a környezeti elemekben hosszú ideig fellelhető, az állatok és növények szervezetében akkumulálódik, ezáltal könnyen felhalmozódik a táplálékláncban is (http17). Kémiai lebomlása jelentősen függ a környezet kémhatásától, valamint a katalitikus anyagok

¹⁴ A víz minősítése az ún. maximális szennyezőanyag-szintek szabványa (MCLs) alapján történik, ezen határértékeket az egészségügyi dózis és expozíció figyelembevételével határozták meg. 1990-ig a tervbe vett 86-ból már 55 veszélyes szennyezőanyagra szabványosították az MCL-szinteket, határértékeket (http16).

jelenlététől. Oxigénszegény, anaerob viszonyok mellett a bomlás leáll, emiatt válik az atrazin a legjelentősebb talajvízszennyezővé (http18), redukzív viszonyok között pedig gyakorlatilag nem bomlik le. Németországban ez volt az egyik döntő ok, amiért betiltották a használatát (Darvas et al., 1999). A talajba kerülő atrazint érő folyamatokat szemléltető ábra a 4. ábrán látható.



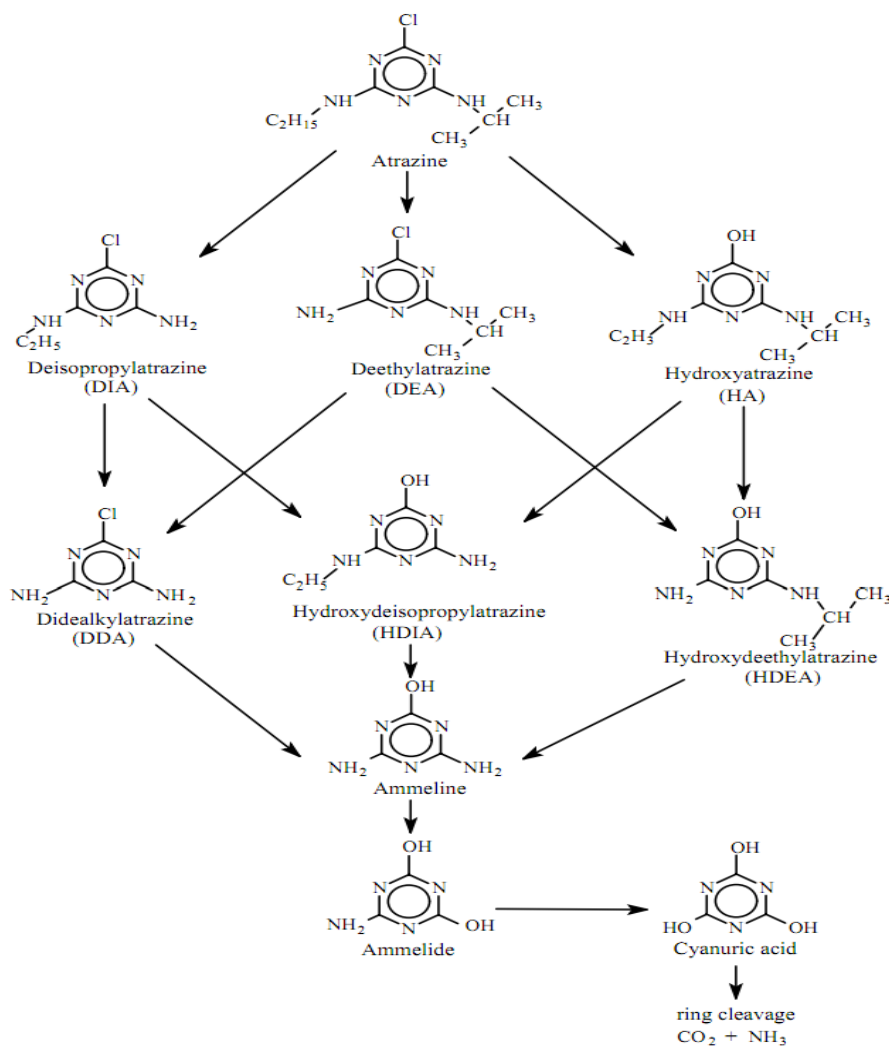
4. ábra - A talajra kerülő peszticideket érő folyamatok (Borbély, 2002)

A különböző élelmiszerek és takarmányok vizsgálatok tapasztaltak kimutatható atrazin maradékot, viszont az elmúlt években egyre inkább növekednek az aggályok az atrazin expozíció esetleges toxikológiai és fejlődési hatásaira vonatkozóan (Hayes et al., 2002).

2.2.1.4. AZ ATRAZIN MIKROBIOLÓGIAI LEBONTÁSA

A mikroorganizmusok többnyire oxidatív, redukzív vagy hidrolitikus enzimeikkel bontják le a herbicideket, ha azonban egy hatóanyagot (pl. triazinok, uracil-vagy karbamidszármazékok) olyan nagy dózisban alkalmaznak, hogy az a mikroorganizmusokra toxikus, s egyben megakadályozza azok szaporodását és újratelepülését, a szermaradékok évekig, akár évtizedekig is megmaradhatnak. A természetes környezetben a szerves vegyületek bontását gyakran vegyes mikrobális közösség végzi. Vizsgálati eredmények arra utalnak, hogy a szubsztrát hasznosítását vegyes kultúrák jobban végzik (Chunyu et al., 2009). A biodegradáció során a mikrobák különböző anyagcsere-folyamatain keresztül az aromás szennyező anyagok teljes lebontása érhető el, mely költséghatékony megoldás, így fontos szerepet játszik a környezet tisztításának folyamataiban. Bár a környezetben jelen levő sokféle baktérium hatékonyan csökkentheti a szennyezőanyagok jelenlétét, általában a biodegradációs folyamatok időben elhúzódnak, így a szennyezőanyagok nagyobb valószínűséggel halmozódnak fel a környezetben (Cao et al., 2009).

Sok atrazin bontására alkalmas mikroorganizmust izoláltak és vizsgálták azok atrazin degradációs képességeit, ilyenek a *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Ralstonia* és *Norcardioides* nemzetségek tagjai (Chunyu et al., 2009). Néhány ezek közül részben képes hasznosítani az atrazint, mások viszont teljes egészében elbontják azt. 1995-ben Mandelbaum és munkatársai herbicidekkel szennyezett talajból a *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó törzset izoláltak, mely képes volt laboratóriumi körülmények között az atrazin felhasználására, illetve teljes lebontására (Mandelbaum et al., 1995). Később további hat, atrazin bontásra képes mikroorganizmust izoláltak olyan mezőgazdasági területéről, melyek rendszeresen voltak atrazinnal kezelve. Ezek a törzsek Gram-pozitívak, a *Nocardioides* és *Arthrobacter* nemzetség tagjai. Mindegyik képes az atrazint kizárólagos szén- és nitrogén-forrásként hasznosítani (Vibber et al., 2007). Ezeket a folyamatokat valószínűleg a mikroorganizmusok igen nagyfokú adaptációs képességével lehet magyarázni, azaz évtizedek során mintegy hozzászokva a körülményekhez, képessé válhattak az ilyen típusú szennyezőanyagok, mint szén- és nitrogénforrás felhasználására. Az atrazin lehetséges lebomlási útvonalait az 5. számú ábra követi végig.



5. ábra - Az atrazin lebomlásának főbb útvonalai (http19)

Az atrazin mineralizációjában sok enzim vesz részt. A legjelentősebb, *atz* enzimeket kódoló géncsaládot először a fentiekben már említett *Pseudomonas* törzsben írták le. Az *atzA*, *B*, és *C* gének azok, melyek azokat az enzimeket kódolják, amik az atrazin cianursavvá történő lebontásáért felelősek. Ezeket a géneket egy ön-átvitelre képes plazmid kódolja, mely számos baktérium-izolátumban megtalálható, és amelyeket a tudósoknak már sikerült klónozni és szekvenálni (de Souza et al., 1998). Az *atzA* gén klorohidroláz enzimet kódol, mely első lépésben lehasítja a klór-szubsztituenst, majd az *atzB,C*, két aminoszénhidroláz aminoalkilcsoportokat hasít le a hidroxiatrazinról. Következő lépésben az *atzD* a cianursav hasítását katalizálja biuretté, végül az *atzE, F* a biuretet degradálja széndioxiddá és ammóniává. Ezeket az enzimeket kódoló géncsaládot a baktériumtörzsben a pADP1 nevű plazmidon mutatták ki először, melynek teljes szekvencia analízisét és géntérképét Martinez és munkatársai készítették el (Martinez et al., 2001), majd *E. coli*-ba transzformálva létrehoztak atrazin bontó szervezetet (de Souza et al., 1998). Az atrazin, mint szénforrás mineralizációját más *Pseudomonas* törzs esetében is leírták (Yanze-Kontchou & Gschwind, 1994). Az atrazin lebomlásában szerepet játszó géneket, illetve enzimeket az alábbi, 3. számú táblázat szemlélteti.

3. táblázat – Az atrazin biológia lebontásában szerepet játszó gének, illetve az általuk kódolt enzimek (saját gyűjtés)

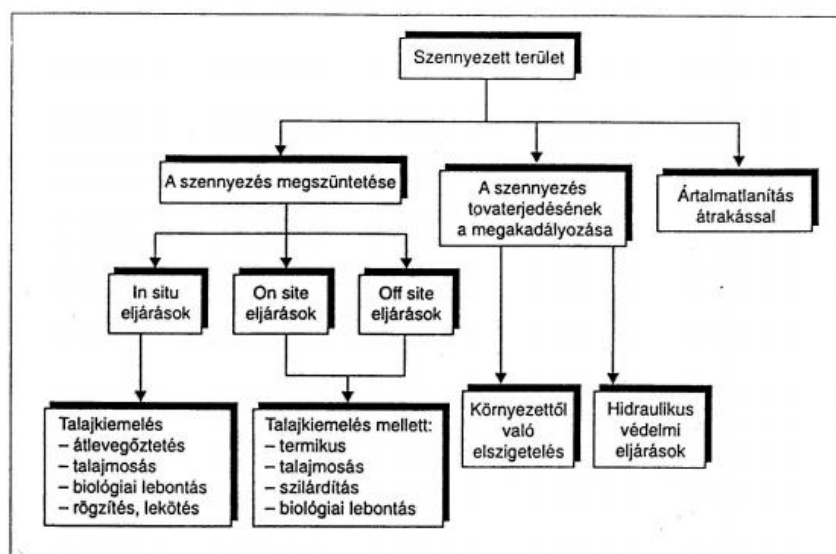
Gén	Enzim
atrA	atrazin monooxigenáz
atzA, trzA, trzN	klorohidroláz
atzB	etilamino-hidroláz
atzC	izpropilamino-hidroláz
atzD, trzD	cianursav amidohidroláz
atzE	biuret hidroláz
atzF	allofánsav hidroláz
trzB	ammelin aminoszénhidroláz
trzC	ammelid aminoszénhidroláz
triA	ammelin deamináz

Az elmúlt pár évben újabb fajokkal bővült az atrazin mineralizációjára képes törzsek listája, az *Aminobacter aminovorans*, az *Arthrobacter crystallopoietes*, a *Chelatobacter heintzii* és a *Stenotrophomonas maltophilia* törzsek esetében a *Pseudomonas* ADP törzshöz hasonló lebontási mechanizmust feltételeznek (Rousseaux et al., 2001).

Az atrazin (és egyéb triazin vegyületek) tehát szolgálhat mind szén- mind nitrogénforrásként a megfelelő enzimmérettel rendelkező mikroorganizmusok számára. A talajban a lebomlás a mikroorganizmusok segítségével hasonlóan megy végbe, mint a növényben (Rády, 1982).

2.3. KÁRMENTESÍTÉSI TECHNOLOGIÁK

A környezetbe kerülő különböző típusú szennyezőanyagok eltávolítására, a területek mentesítésére ma már sok technológia áll rendelkezésünkre. A kelet-európai államokban a '80-as évektől a talaj- illetve talajvíz szennyezések a szennyezett területek számbavételére, a kárfelmérések majd kármentesítések megkezdésére terelték a figyelmet (KvVM, 2001). A kármentesítésre használt módszerek lehetnek fizikai-kémiai, termikus, izolációs, illetve biológiai eljárásokon alapuló technológiák. A gyakorlatban általában ezeket egyszerre, több egymást követő technológia-együttesként alkalmazzák, így ezzel az ún. kevert technológiával nagyobb hatásfokú tisztítás érhető el (Nagy, 2009). A beavatkozást végezhetjük *in situ* vagy *ex situ* módszerekkel. *In situ* technológiáról akkor beszélünk, amikor az elszennyezett közeg kitermelésére nincs szükség, *ex situ* technológiák esetében a szennyeződött közeget illetve felszín alatti vizet kitermelik és csak kitermelés után mentesítik a szennyezőanyagoktól (Barótfi, 2000). A kármentesítés során alkalmazható technológiákat, illetve szennyezett területek kárelhárítási módszereit a 6. számú összefoglaló ábra mutatja be.



6. ábra - A szennyezett területek kárelhárítási módszerei (Kun-Szabó T., 1999)

2.3.1. BIOLÓGIAI KÁRMENTESÍTÉSI TECHNOLOGIÁK

Vizsgálataim szempontjából a biológiai kármentesítési technológiák alkalmazásának ismerete lényeges, ezért szakirodalmi adatok felhasználásával általánosságban ismertetem a (biológiai) bakteriális bioremediációval kapcsolatos kármentesítési technológiákat.

„Az 1960-as évek óta kutatási cél a mikroorganizmusok azon képességének megismerése, amivel a környezetet szennyező szerves anyagokat az emberré ártalmatlan végtermékké alakítják át” (KvVM, 2010). A kármentesítési eljárások közül a biológiai lebontás a leginkább természet

közele technológia, ennek következtében az ökoszisztéma, a talaj mikroközössége jobban tolerálja a beavatkozást. Ezen kívül az adott terület kismértékű bolygatásával jár, nagy területen is alkalmazható, valamint kíméletesek a talaj élővilágával. Nem elhanyagolható szempont, hogy a mikroszervezetek által történő szennyezőanyag lebontás során – optimális esetben - nagyrészt oxigén valamint szén-dioxid marad vissza, nem keletkezik további kémiai eredetű szennyezés (Szoboszlai & Kriszt, 2010). Az elmúlt évek során előszeretettel alkalmazott fizikai, kémiai remediációs technikák mellett egyre kedveltebbek a biológiai kármentesítési technológiák is. A bioremediáció során a mikrobák anyagcsere-folyamatain keresztül érik el a környezeti szennyezések detoxifikálását és lebontását.

A bioremediációs technológiák legfőbb alkalmazást gátló tényezője, hogy csak olyan mértékű szennyezőanyag koncentráció mellett alkalmazhatók, melyet még a mikroorganizmusok elviselnek. Időben lassan lejátsszódó folyamat, amely a környezeti hatásoktól függően megy végbe és érzékeny a környezeti állapotváltozásokra. Kivitelezésük speciális szakmai ismereteket, illetve állandó monitoring tevékenységet igényel (Nagy, 2009).

Biodegradáció, mely a szerves vegyületek biológiai lebonthatóságát jelenti, a faj-szinten azonosított (identifikált), ismert tulajdonságokkal rendelkező mikroorganizmusokkal végezhető (Quan et al., 2004). A mikrobiológiai eljárások célja, hogy optimális feltételeket teremtsenek a mikrobáknak és a szennyezőanyagok lebomlásának, ezért elsődleges fontosságú, hogy tisztában legyünk a lehetséges lebomlási folyamatokkal, a lebomlás anyagcsereútjaival, és az ezeket befolyásoló tényezőkkel (KvVM, 2010). A tudatos oltóanyag-használat (bioaugmentáció) szempontjából lényeges, hogy ismerjük az ilyen célokra szánt, nem patogén szervezet tulajdonságait, mint például a pH tűrési tartomány, hőmérsékleti optimum, bontási képesség, toxikus környezeti hatásokkal szembeni érzékenység (Weber & Corseuil, 1994).

2.4. IMMOBILIZÁCIÓ

A sejtrögzítés vagy immobilizáció általában a mozgás, mozgékonyság gátlását vagy megszüntetését jelenti a biotechnológiában az ép sejtek fizikai bezárásával vagy helyhez kötésével (Willaert et al., 1996). A technológia alkalmazásával élő sejtek, reagensek, enzimek, vegyi anyagok, szennyezőanyagok szilárd felülethez való kötődését vagy mátrixba ágyazását jelenti, a sejtek immobilizációjával elsősorban a mikroorganizmusok környezeti behatásoktól való védelme érhető el. (http20). Az elkülöníthető sejtrögzítési módszereket a 7. ábra tünteti fel.



7. ábra - Sejtrögzítési módszerek (Farkas, 2007)

Először Chibata és munkatársai végeztek vizsgálatokat a sejtek immobilizációjára 1973-ban, egy új technika segítségével sikerült *Escherichia coli* sejteket poliakrilamid gélbe zárni, és „mozgásképtelenné” tenni azokat a mátrixban (Chibata et al., 1985).

Ipari célokra, valamint biológiai szennyvíztisztításban már elterjedten alkalmaznak immobilizációs technikákat. Az élő sejtek bezárására, immobilizációjára széles körben használnak polimer mátrixokat, ez által a rögzített sejtek védelméen kívül azok metabolikus aktivitása növekszik, a tárolás könnyebbé válik (Chauhan & Lal, 2003).

Ma már számos természetes és szintetikus polimert alkalmaznak immobilizációra olyan kíméletes körülmények között, hogy a sejtkárosodás mértéke a lehető legkisebb legyen (Willaert et al., 1996; Bickerstaff, 1997; Kourkutas et al., 2004). Az immobilizálás nagy előnye a fokozott biológiai stabilitás, a sejtek rögzítve ellenállóbbak a pH változással és a gátlószerekkel szemben (Dervakos & Webb 1991; Pilkington et al., 1998; Willaert et al., 1996).

A természetes polimerek (agar, agaróz, alginát, kappa-carragenan) erős mechanikai szerkezettel rendelkeznek, tartósak, és nem mérgezőek a mikroorganizmusok számára. Ezzel szemben a szintetikus polimerek – nagy szilárdáguk és tartósságuk ellenére - sok esetben mérgezik a sejteket (Chang & Tseng, 1998). Néhány szintetikus polimer, mint a poliakrilamid, poliuretán, vagy polihidroxietil-metakrilát számos előnnyel rendelkezik, például nagyobb mechanikai szilárdság, ellenállás a vegyi anyagokkal szemben és lehetővé teszi egyéb komplexképző komponensek használatát (Uhlich et al., 1996).

2.4.1. A POLIVINIL-ALKOHOL

A sejtek bezárásához hordozóként nemrégiben a polivinil-alkoholt (PVA), mint ígéretes szintetikus polimert kezdték el alkalmazni, mert vízdékony, olcsó, nem toxikus és egyszerű lehetőséget nyújt a sejtek immobilizációjára (Chang & Tseng, 1998).

A polivinil-alkohol olyan polimer, amelyet gyakran használnak mátrixként a különböző enzimek és sejtek immobilizációja során, mivel könnyen hozzáférhető és nincs toxikus hatása az élő szervezetekre. Kémiai szerkezete lehetővé teszi a fehérjék megkötődését és stabilizációját a polimer láncok között (Uhlich et al., 1996).

A térhálós polivinil alkohol (PVA) hidrogélek fizikai-kémiai tulajdonságai a szintézis körülményeinek változtatásával széles határok között változtathatók (Cauich-Rodriguez et al., 1996). A kristályos állapotban réteges szerkezetű polimerben a molekuláris szerveződésű kettős réteget hidrogénhidak, a rétegeket pedig van der Waals kötések¹⁵ tartják össze. Az ún. PVA gélek pórusosak, ami elősegíti a gyors anyagcsere-folyamatokat. Az immobilizált sejtek módosult anyagcseréjével kapcsolatos tudományos kísérleti eredmények alapján a rögzítés hatással lehet a sejt működésének biokémiájára és a sejt növekedésére (Doran & Bailey, 1986).

A polimer alapú szorbenseknek igen gyakran előnye a biológiai lebonthatóság, illetve hogy szintetikus úton biológiailag lebontható szorbensek/membránok állíthatók elő. A PVA a vízdéható vinilpolimerek szűk körébe tartozik, ezért használata a környezetvédelmi rendszerekben különösen előnyös a biológiai lebonthatóság szempontjából. Chiellini és munkatársai a közelmúltban megjelent részletes összefoglalója számos heteroatomot is tartalmazó PVA polimer bomlási mechanizmusát tárgyalja baktérium törzsek, gombák és élesztők hatására. Kísérletükben megállapítást nyert a PVA kiemelkedő tulajdonsága, a mikrobiális kultúrákkal kialakuló szimbiotikus asszimiláló képessége (Chiellini, 2003). A legtöbb kísérlet során már nátrium-alginátot adnak a PVA gélhez, hogy javítsa a gyöngyök tulajdonságait, azok átjárhatóságát, megszüntetve ezzel az aggregációs problémát, valamint fokozva a gyöngyök felületi tulajdonságait, a szilárdságát, stabilitását, eltarthatóságát és keménységét (Kim, 2008).

¹⁵ A van der Waals kötés azonos vagy különböző molekulák és atomok között, részben a dipólus-hatás miatt jön létre. Gyenge kötés ([http21](http://21))

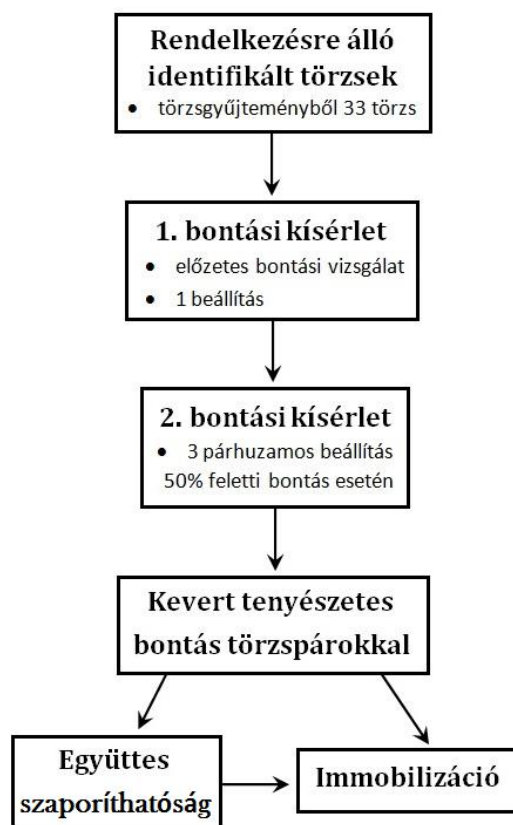
3. ANYAG ÉS MÓDSZER

Kísérleteim mikrobiológiai vizsgálatokra alapulnak, melyek jelentős hányadát lamináris bokszt alatt végeztem, biztosítva az aszeptikus körülményeket az egyes munkafolyamatok során.

Az atrazin biológiai lebontásra irányuló kísérleteimet, illetve az immobilizációt korábban már legalább nemzetség szinten identifikált törzsekkel kezdtem meg, melyek a Szent István Egyetem Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék laboratóriumában álltak rendelkezésemre. Az egymásra épülő vizsgálati lépéseket sematikusan a 8. számú ábra mutatja.

A törzsgyűjteményekből azokat a törzseket választottuk ki a kísérleteinkhez, melyek már más, többek között aromás szerkezeti elemeket tartalmazó szennyezőanyagok (szénhidrogének, mikotoxinok) lebontására bizonyos mértékben képesek. Első lépésben a

kijelölt törzsek atrazin degradáló képességét screeneltük (1. bontási kísérlet), majd az egy beállítás során jó eredményt (>50%) mutató törzsekkel a bontási kísérletet három párhuzamos beállításban is elvégeztük (2. bontási kísérlet). A több párhuzamos mérés során is jó lebontó képességgel rendelkező törzseket törzpárokba rendeztük, melyekkel szintén elvégeztük a kísérletet (kevert tenyészetes bontás). A legjobb páros esetében lemezöntéssel összcsíraszám-meghatározás alapján vizsgáltuk, hogy a pár tagjai egymás jelenlétében milyen élősejtszámot képesek elérni (együttes szaporíthatóság), majd polivinil-alkohol alapú polimer mátrixban immobilizáltuk a törzseket, melyekkel oszloptöltetet készítettünk és atrazinnal kontaminált tápoldat folyamatos átáramoltatása mellett vizsgáltuk a biodegradációt. Az alábbi fejezetekben az egyes munkafolyamatokat, kísérleti lépéseket ismertetem részletesen.



8. ábra - Összefoglaló vázlat az elvégzett kísérletekről

3.1. TÖRZSEK KIVÁLASZTÁSA

Az atrazinbontási vizsgálatban részt vevő törzsek kiválasztása a velük végzett egyéb szennyezőanyagok lebontására irányuló vizsgálati eredmények, valamint szakirodalmi adatok alapján történt. Az alábbiakban szakirodalmak elemzésével nemzetség szinten mutatom be a biodegradációs vizsgálatokra kiválasztott törzseket, melyek faj szinten a 4. számú táblázatban láthatóak.

4. táblázat - A kiválasztott törzsek nemzetség szerinti elkülönítése

<u>NEMZETSÉG</u>	<u>LABOR JELZÉS</u>	<u>IDENTIFIKÁCIÓ</u>	<u>NEMZETSÉG</u>	<u>LABOR JELZÉS</u>	<u>IDENTIFIKÁCIÓ</u>
<u>ACINETOBACTER</u>	T3-N9	<i>Acinetobacter venetianus</i>	<u>PSEUDOMONAS</u>	ZS1	<i>Pseudomonas citronellolis</i>
<u>ARTHROBACTER</u>	TC1	<i>Arthrobacter aureus TC1</i>		DSM 11735	<i>Pseudomonas citronellolis ADP</i>
	J4	<i>Arthrobacter protophormiae</i>		FEH 28	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>
<u>BACILLUS</u>	NZS19	<i>Bacillus megaterium</i>		NCP-3	<i>Pseudomonas putida</i>
<u>CHRYSEO-BACTERIUM</u>	UA5/8	<i>Chryseobacterium formosense</i>		Kö-5	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
	CHB 20p	<i>Chryseobacterium hungaricum</i>	<u>PSEUDOXANTHOMONAS</u>	H4	<i>Pseudoxanthomonas kalmensis</i>
	TN 4	<i>Chryseobacterium sp.</i>		NZS6	<i>Pseudoxanthomonas suwonensis</i>
<u>CUPRIAVIDUS</u>	BRB 6A	<i>Cupriavidus basiliensis</i>	<u>RHODOCOCCUS</u>	AK-44	<i>Rhodococcus aetherivorans</i>
	ŐR 16	<i>Cupriavidus basiliensis</i>		AK-35	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
<u>GORDONIA</u>	NZS 14	<i>Gordonia paraffinivorans</i>		NI1	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
<u>MICRO-BACTERIUM</u>	EL 1	<i>Microbacterium barkeri</i>		AK-36	<i>Rhodococcus globerulus</i>
	NZS9	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>		AK-37	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>
<u>OCHROBACTRUM</u>	DT2	<i>Ochrobactrum tritici</i>		K408	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>
<u>OLIVIBACTER</u>	TBF2/ 20.2	<i>Olivibacter oleidegradans</i>		AK-38	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>
<u>PARACOCCUS</u>	BSZ10	<i>Paracoccus sp.</i>		CHB-15p	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>
	CSZ4	<i>Paracoccus sp.</i>		AK-40	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>
			<u>SPHINGOPYXIS</u>	Kö-10	<i>Sphingopyxis chilensis</i>

A széleskörű aromás gyűrűbontó aktivitással rendelkező *Acinetobacter* nemzetséget gyakran írják le gázolajjal szennyezett mintákban. Szinte bárhol előfordulnak, egyes képviselőik opportunistá kórokozók (Towner, 2006).

Az *Arthrobacter* nemzetség tagjai többségében vízi környezetből lettek izolálva, jelentőségét a szénhidrogénnel szennyezett területen igazolták, nehezen bontható xenobiotikumok degradálására képes (Vasileva-Tonkova et al., 2008).

A *Bacillus* nemzetségnek regisztrálták nitrifikációra képes fajait (Madigan et al., 2003). Az ezzel foglalkozó legtöbb szakirodalom beszámol jó szénhidrogén-bontó képességükről.

A *Chryseobacterium* nemzetség egyik tagjáról, egy faj szinten azonosítatlan izolátum metil-terc-butil-éter bontó képességéről jelentettek meg tanulmányt (Zhang et al., 2007). Jelenlétüket kimutatták már felszíni- és felszín alatti vizekben, ivóvízben, talajban, élelmiszerekben (hús, tej, hal), valamint klinikai mintákban egyaránt (Vandamme et al., 1994; Hugo et al., 2003; Kämpfer et al., 2003; Li et al., 2003; Gallego et al., 2006).

A *Gordonia* nemzetség legtöbb tagja a szakirodalmi adatok alapján képes környezeti szennyezőanyagok, xenobiotikumok metabolizálására, illetve aromás szénhidrogének bontásában vett részt (Shen et al., 2006).

Az *Olivibacter* nemzetség összesen 5 fajt számlál, a vizsgálataimba bevont *Olivibacter oleidegradans* a Szent István Egyetem Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszéke által legutóbb leírt új faj, melynek kapcsán először sikerült igazolni szénhidrogén bontó képességet (Szabó et al., 2011).

A *Paracoccus* tagjai denitrifikáló baktériumok (Madigan et al., 2003).

A *Pseudomonas* nemzetség tagjai nagyon sokféle xenobiotikumot, szervesanyagot, köztük pl. fenolt, aromás szénhidrogéneket is hasznosítanak. Számos fajuk nitrát légzésre is képes (Madigan et al., 2003).

A *Rhodococcus* genus tagjai tipikus talajlakó baktériumok, szénhidrogén bontó képességüket több irodalom is említi és számos aromás vegyület lebontásában is közreműködnek, sok esetben használják fel a nemzetség tagjait biodegradációs folyamatokban, jó bontási képességeik miatt oltóanyagok gyakori alkotói (Lee et al., 2010).

A *Sphingopyxis* nemzetség tagjai poli-béta-hidroxi-butirát (PHB) raktározásra képesek (Silva et al., 2007), folynak a kutatások szénhidrogénbontó képességük igazolására.

A *Microbacterium* nemzetség tagjai szaprofita és fakultatív patogén baktériumok - bárhol előfordulhatnak, obligát patogén - a fertőzött szervezetben és környezetében (Takeuchi & Hatano, 1998).

Aromás halogénezett szénhidrogének bontását kimutatták *Ochrobactrum* nemzetség több tagja kapcsán (Smidt & de Vos 2004).

A *Cupriavidus* nemzetség több tagján detektáltak már aromás és klóraromás vegyületek degradálásának képességét (Fischera et al., 2010).

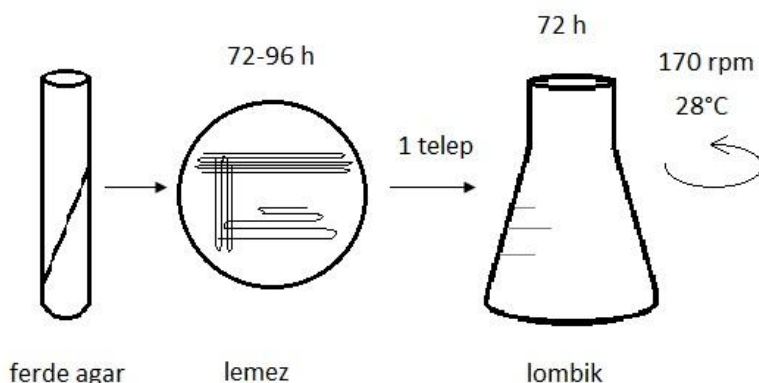
3.2. ATRAZINBONTÁSI KÍSÉRLET

3.2.1. SZABAD SEJTES VIZSGÁLATOK

3.2.1.1. FRISS TENYÉSZETEK LÉTREHOZÁSA, INOKULUMKÉSZÍTÉS

A kísérletek előkészítése friss tenyészetek alkalmazását teszi szükségessé. Az általam vizsgált törzsek felszaporításához LB tápoldatot és táptalajt [tripton 10 g, élesztőkivonat 5 g, NaCl 9 g, bakteriológiai agar (ha szükséges) 18 g, desztillát víz 1000 cm³, sterilizés autoklávbán 121°C-on, 1 atm túlnyomáson 15 perc] használtam. A táptalajból, amíg az agar nem dermedt vissza, 20 ml mennyiséget Petri-csészékbe öntve táplemezeket készítettem. A ferde agaron tárolt törzseket lamináris boksztól, aszeptikus körülmények között oltókacccsal az agarlemezre szélesztettem. A lemezeket 28 °C-on, 72 órán keresztül inkubáltam.

Az agarlemezről 72 órás inkubálás után egy-egy különálló telepet oltókacccsal steril, 50 ml LB tápoldatot tartalmazó 300 ml-es Erlenmeyer lombikba oltottam. A lombikokat 28 °C-os rázó-termosztátban 170 rpm fordulatszámon 72 óráig inkubáltam, majd az inokulumból mintát vettem a kívánatos sejtsűrűség beállításához. Az inokulum elkészítésének folyamatát a 9. ábrán tüntetem fel vázlatosan.



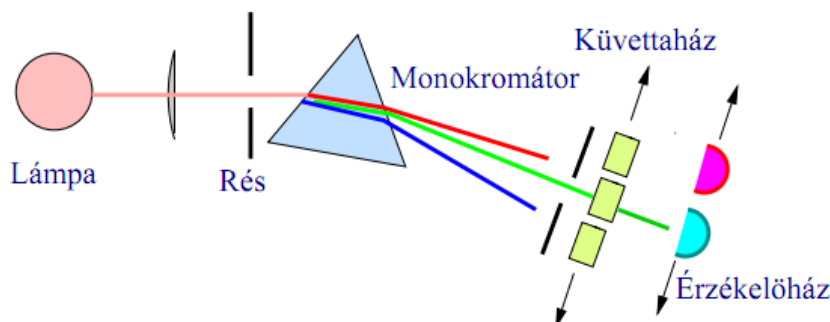
9. ábra - Az inokulum készítésének folyamata

3.2.1.2. OD MÉRÉS

Annak érdekében, hogy a bontási kísérletet az egyes törzsek esetében közel azonos kiindulási sejtszámmal végezzük, a 72 órás, friss inokulumok optikai denzitását IMPLÉN UV/VIS spektrofotométerrel egységesen OD=0,6 értékre állítottuk be. Ennek során a sejtkoncentrációt abszorbancia méréssel, az anyagok átbocsátási együtthatóinak mérésével állapítjuk meg.

A mérés elve: a résen belépő nyaláb egy prizmára vetítődik, amely azt felbontja. A tükröobjektív a felbontott fénynyalábot a kilépő részre vetíti, amely csak egy keskeny hullámhossztartományt enged át, előállítva azt a hullámhosszú fényt, amelyen az abszorpciót meg

akarjuk határozni. A fénysugár ezután a küvettaházba jut, és a küvettában lévő anyagokon halad keresztül (Laczkó et al., 2008). A hígított inokulumban lévő sejteken elnyelődik a fény, így a műszer csak a küvettaházból távozó fénysugarak intenzitását méri (10. ábra).



10. ábra – A spektrofotométer működési elve (Laczkó et al., 2008)

A méréshez az inokulumokból steril körülmények között 1 ml mennyiséget kivettem, ezeket Falcon csövekbe pipettáztam. Kontroll értéként steril (inokulum mentes) LB tápoldatot szolgált, ennek bemérése adta a kezdő abszorbanciát, a műszer ehhez hasonlítja az inokulum abszorbanciáját. Mivel a műszer csak -0,3 és 2,5 közötti tartományban képes abszorbanciát mérni, a Falcon csőbe pipettázott inokulumot LB táplevelessel hígítottam. Ennek megfelelően 600 nm hullámhosszon mérve addig hígítottam a mintát, amíg elértem a 0,6 sejtsűrűség értéket. A bontási kísérlet indításához a 0,6 sejtsűrűségnek megfelelően hígított inokulummal oltottam be az atrazinnal mesterségesen kontaminált tápoldatot.

3.2.1.3. A BONTÁSI RENDSZER

Az atrazin-törzsoldat elkészítéséhez analitikai tisztaságú atrazint (Sigma-Aldrich Ltd.) dimetil-szulfoxidban (DMSO, Reanal Finomvegyszergyár Zrt.) oldottunk, a végkoncentrációt 5000 ppm-re (mg/l) állítottuk be.

300 ml-es Erlenmeyer lombikokba 45 ml LB táplevest mértünk (sterilizés: 121 °C, 1 atm túlnyomás, 15 perc). Lehűlés után 5 ml 0,6 OD értékű baktérium inokulumot mértünk a tápoldathoz automata pipetta segítségével. Az 50 ml végtérfogatú oldat atrazinkoncentrációját 50 ppm-re állítottuk be, ehhez az 5000 ppm-es törzsoldatból 500 µl-t mértünk be. Az 50 ml, inokulált tápoldatunk atrazintartalma így 2,5 mg volt. A vak mintákat (kontroll) ugyanígy készítettük el, inokulum felhasználása nélkül, esetükben az inokulum helyett 5 ml steril LB tápoldatot pipettáztunk a 45 ml tápoldathoz. A kontroll mintára az abiotikus veszteségek miatt volt szükség, viszonyítási alapként szolgált az analitikai mérések során.

A lombikokat 170 rpm fordulatszámon, 28 °C-on 7 napon keresztül rázótermosztátban inkubáltuk. A mintákat ezután analitikai vizsgálatra küldtük, mely során GC-MS vizsgálattal mérték

vissza a baktériumok által el nem bontott atrazin mennyiségét. Ezeket az értékeket a vak mintához hasonlítva megkaptuk az egyes törzsek bontási százalékát.

Azon törzsek esetében, ahol a jó bontási százalék elérését az analitikai vizsgálatok bizonyították, a kísérletet 3 párhuzamos beállításban, a fentiekben ismertetett módon és feltételekkel ismételtük meg, az analitikai mérések eredményeit átlagoltuk és a legjobb bontási értékeket mutató törzseket a további vizsgálatokra kiválasztottuk.

3.2.1.4. ATRAZINBONTÁS KEVERT TENYÉSZET ALKALMAZÁSÁVAL

A 3 párhuzamos bontási kísérlet során az atrazint 50% felett bontó mikrotörzsekkel párokat alakítottunk ki, melyekkel a biodegradációs vizsgálatokat a fent bemutatott módon elvégeztük. Tekintettel arra, hogy az egyes törzsek az enzimszisztémájuknak megfelelően eltérő metabolikus útvonalakon hasznosíthatják az atrazint, illetve az egyik törzs bontási termékét egy másik kiindulási vegyületként hasznosíthatja, a törzspárok alkalmazásával esély lehet arra, hogy a biodegradáció mértékét fokozni tudjuk. A kevert tenyészetes bontási kísérletet 4 törzs felhasználásával kezdtük meg: AK-37, ŐR 16, NI1, valamint TBF2/20.2, összesen 4 kísérletet állítottunk be a következő törzspárosítással:

- AK-37+ŐR16 (*R. pyridinivorans* + *Cupriavidus basiliensis*)
- AK-37+NI1 (*R. pyridinivorans* + *R. erythropolis*)
- ŐR16+NI1 (*Cupriavidus basiliensis* + *R. erythropolis*)
- NI1+TBF2/20.2 (*R. erythropolis* + *Olivibacter oleidegradans*)

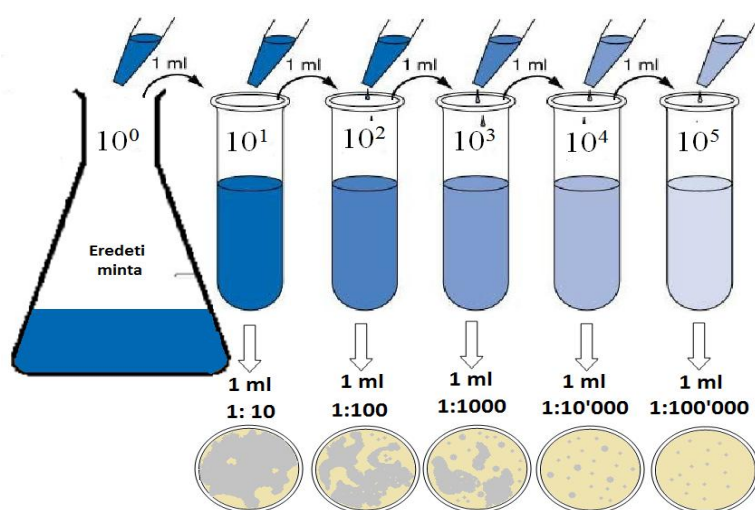
A bontási kísérletet a fent ismertetett módon végeztük azzal a különbséggel, hogy a 0,6 OD értékű inokulumokból 2,5+2,5 ml-t mértünk be 45 ml LB tápoldatba, melyhez az atrazint hozzákevertük. A lombikokat 170 rpm fordulatszámon, 28 °C-on 7 napig rázattuk.

3.3. IMMOBILIZÁLÁS

3.3.1. *EGYÜTTES SZAPORÍTHATÓSÁG*

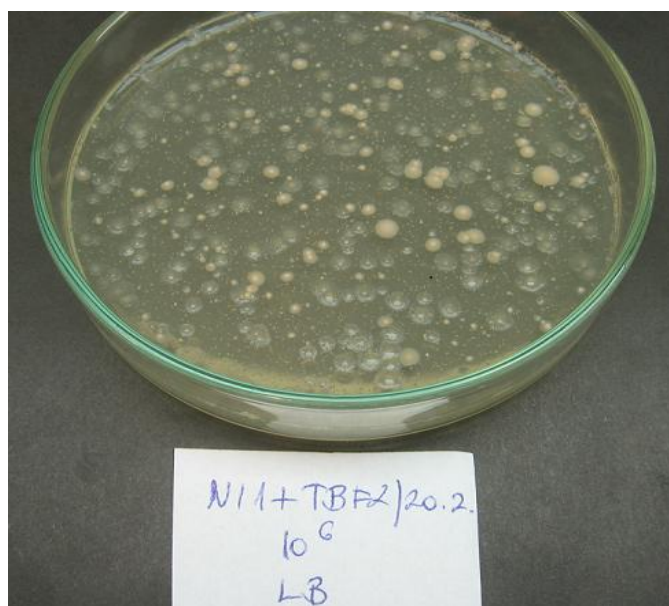
A kevert tenyészetes bontási kísérlet során a legjobb eredményt produkáló NI1 és a TBF2/20.2 jelű törzspárt készítettük elő immobilizációra. Az immobilizáció előtt megvizsgáltuk, hogy a törzspár együttes szaporítása során a törzsek milyen elősejtszámot képesek elérni. Ennek célja annak megállapítása volt, hogy a mikroorganizmusok termelnek-e a másik számára toxikus vagy gátló anyagcseretermékeket (azaz bakteriosztatikus vagy baktericid hatással vannak

egymásra). Ehhez a 4.2.1.1. fejezetben bemutatott módszerrel inokulumokat hoztunk létre, melyek OD értékét 0,6-ra állítottuk be, ezt követően 1-1 ml-t friss, 50 ml LB tápoldatba oltottunk, majd 28 °C-on 72 órán át rázattuk 170 rpm fordulatszámon. Az inkubáció végén a tenyészetből 10 tagú hígítási sort készítettünk és lemezöntést végeztünk. Ehhez az inokulum (mely 10^0 hígításnak tekinthető) 1 ml-ét 9 ml steril desztillált víz és detergens (Tween 80, mely elősegíti az sejtaggregátumok szétválását és a minta homogenizálását) keverékébe mértük, ezáltal megkaptuk a 10^{-1} hígítási fokot, melyből összekeverés után újabb 1 ml-t vittünk át 9 ml hígítófolyadékba. Ezt a műveletet 10^{-10} nagyságrendig végeztük. A hígítási tagokból 1-1 ml-t steril Petri csészébe mértünk, majd felolvasztott és kézmelegre visszahűtött LB tápaggarral lemezt öntöttünk. A hígítási sor és lemezöntés elkészítésének folyamatát a 11. számú ábra mutatja be.



11. ábra - Hígítási sor és lemezöntés készítésének folyamata (<http22> felhasználásával)

A lemezeket 28 °C-on inkubáltuk, a morfológiailag eltérő törzsek élősejtszámát, illetve az összes élősejtszámot 12 óránként leolvastuk. A lemezöntés 10^6 hígítási fokáról készült kép a 12. számú ábrán található.



12. ábra - Az együttes szaporítás után készült lemezöntés 10^6 hígítási fokú képe

3.3.2. AZ IMMOBILIZÁCIÓ OPTIMALIZÁLÁSA

Első lépésben többféle molekulasúlyú polivinil-alkohol felhasználásával kezdtük meg a vizsgálatokat (PVA, Sigma-Aldrich Ltd.), hogy céljainknak megfelelő nagy stabilitással rendelkező PVA-polimer gyöngyöket tudjunk előállítani, melyek képesek ellenállni a környezeti behatásoknak, stabil állaguknál fogva eltarthatóak legyenek:

- $M_w \sim 47.000$ (jelzése a továbbiakban 6-98)
- $M_w \sim 61.000$ (továbbiakban 10-98)
- $M_w \sim 67.000$ (továbbiakban 8-88)
- $M_w \sim 89.000-98.000$ (továbbiakban 88-98)
- $M_w \sim 125.000$ (továbbiakban 20-98)

Az optimális mátrix kidolgozásánál figyelembe vettük a szakirodalmi adatokat, mely szerint az optimális PVA tartalom 9-10 m/m%. A nagyobb stabilitás érdekében 0,9-3 m/m% nátrium-alginát (Sigma-Aldrich Ltd.) adható a mátrixhoz.

A mátrix elkészítéséhez 9 m/m% PVA-t és 1 m/m% nátrium-alginátot használtunk. A PVA-ból 4,5 g-ot, nátrium-algintából 0,5 g-ot 45 ml desztillált vízben elkevertünk, majd autoklávban 100 °C-on túlnyomás nélkül 30 percen keresztül sterilizáltuk (tekintettel arra, hogy a PVA 110 °C felett bomlik), majd a visszahűlt mátrixot pipetta segítségével 5 m/V% bórsavat (mely anyag oldhatósági határa 21 °C) és 4 m/V% kalcium-nitrátot tartalmazó koaguláló oldatba csepegtettük. A kialakuló gyöngyöket a bórsavas- kalcium-nitrátos kevertetés után desztillált vízzel átmostuk, ezután 0,5 M-os nátrium-szulfát (Na_2SO_4) oldattal fél órán át kezeltük, hogy ezzel gumyszerű elaszticitást és tartósságot érjünk el (Idris et al., 2008). A nátrium-szulfátos kezelést a 89-98 és 20-98 jelű, magasabb molekulasúlyú PVA esetében alkalmaztuk. A PVA gyöngyök készítésének folyamatát a 3. számú Mellékletben képekkel szemléltetem. Az eltérő módon előállított és kezelt gyöngyök átlagos tömegét és átmérőjét lemértük, majd 50 db gyöngyöt 4 °C -on desztillált vízben tároltuk 7 napig, ezután ismét tömeget és átmérőt mértünk (ennek számszerű értékeit az 1. számú Melléklet táblázatai tartalmazzák), így megállapíthattuk a gyöngyök duzzadási képességét, mely fordítottan arányos a stabilitással. Ezzel párhuzamosan az eltérő gyöngyökből 50-50 db-ot 20 ml desztillát vízben 100 ml-es Erlenmeyer lombikban 170 rpm fordulatszámon 4 héten át rázattunk, mely során szintén a gyöngyök stabilitásáról, fizikai, mechanikai hatásokkal szembeni ellenállóképességéről kaptunk képet. A vizsgált gyöngyök közül a 6-98-as jelű a 7 napos kevertetés során teljesen feloldódott. A stabilitást tovább vizsgálva 4 hét után a 10-98-as gyöngyök is maradék nélkül visszaoldódtak, azonban a 89-98-as PVA-ból készült gyöngyök mindkét típusa (alap módszerrel

készített és a szulfáttal kezelt is) még a 4 hét intenzív mágneses kevertetés után is egyben maradt. A 20-98-as gyöngyök nagy része ugyan egyben volt a 4 hét után is, de egy kisebb része összetöredezve aggregátumot képzett.

A vizsgálat során tapasztalt eredmények alapján kiválasztott, 89.000-98.000-es molekulasúlyú polivinil-alkohollal végeztük az előbontási kísérletek és az analitikai mérések alapján jó bontási képességgel rendelkező törzspár (NI1 és TBF2/20.2) immobilizációját.

3.3.3. *ATRAZINBONTÁS IMMOBILIZÁLT SEJTEKKEL*

3.3.3.1. BIOMASSZA ELKÉSZÍTÉSE

Szakirodalmi adatok alapján az immobilizáció során rögzített optimális biomassa mennyisége 3,33 mg száraz tömeg 1 ml polimer mátrixra vetítve. Mivel a biomassa mennyiség száraz tömegre volt megadva, a törzseink (melyek eltérő nedvességtartalmúak lehetnek) nedves tömegét átszámoltuk száraz tömegre. Ehhez a 4.2.1.1. fejezetben bemutatott módon inokulumot hoztunk létre. A folyékony tenyészeteket 50 ml térfogatú Falcon csövekbe töltöttük és 4 °C-on 4600 rpm-en 30 percig centrifugáltuk. Az így nyert sejtpelletből 1 g nedves biomasszát vákuumszáritó alatt 12 órán át szárítottuk, majd a tömegüket ismét lemértük, így megkaptuk, hogy a törzsek nedves tömege mennyi száraz tömeggel egyenértékű. Az NI1 jelű törzs esetében ez 92,85% visszamaradt száraz tömeget, a TBF2/20.2 esetében pedig 89,72%-ot jelent.

Következő lépésben a törzsekből friss inokulumokat készítettünk, melyekből centrifugálással kinyertük a sejteket. Ezt kétszer átmostuk steril desztillált vízzel, majd a tisztított pelletből a PVA mátrix mennyiségének megfelelően kimértük a szükséges biomassa mennyiségeket.

3.3.3.2. MÁTRIX ELKÉSZÍTÉSE A FELSZAPORÍTOTT TENYÉSZETBŐL

A kísérletet az előkészített biomassa felhasználásával végeztük, melyhez előállítottuk a hordozó mátrixot. A számunkra szükséges 250 g mennyiségű mátrix 9 m/m% (22,5 g) PVA-t és 1 m/m% (2,5 g) nátrium-alginátot tartalmaz. Ezt 500 ml-es Schott-üvegbe mértük, és 200 cm³ desztillált vízzel elkevertük (ügyelve arra, hogy a 25 cm³ nedves biomassa felszuszpendálásához használt vízmennyiséget levontuk a mátrix előállításánál) majd sterilizáltuk. Ezzel egy időben ugyanennyi mennyiséget szintén 0,5 literes Schott-üvegbe mértünk a sejtinokulum nélküli (üres, a bontási vizsgálatban kontrollként szolgáló) gyöngyök előállításához.

3.3.3.3. A KOAGULÁLÓ ÉS Na_2SO_4 OLDAT ELKÉSZÍTÉSE

A gyöngyök megszilárdítására szolgáló koaguláló oldathoz 125 g bórsavat és 143,9 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -t (melyben 100 g a $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) használtunk fel. Figyelembe kell venni, hogy bemért kristályvizes kalcium-nitrát 43,9 g vizet tartalmaz, ez a mennyiség a megfelelő koncentráció eléréséhez levonásra került a hozzáadott desztillált víz mennyiségéből. Ennek megfelelően az analitikai mérlegen kimért anyagokat $2456,1 \text{ cm}^3$ desztillált vízzel elegyítettük, majd mágneses keverővel együtt sterilizáltuk. A 0,5 M-os Na_2SO_4 oldathoz 71 g anyagot oldottunk fel 1000 cm^3 desztillált vízben, majd Schott üvegben sterilizáltuk.

3.3.3.4. SEJTBEZÁRÁS

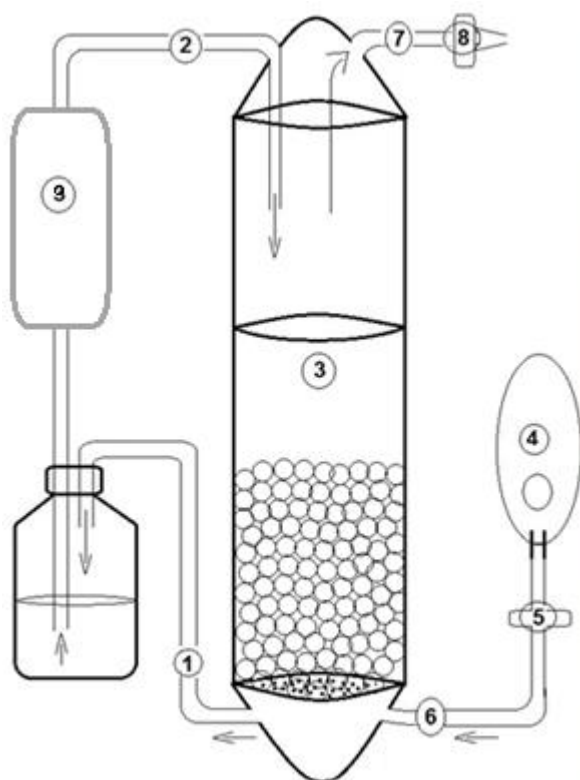
A 250 ml mátrixhoz összesen 832,5 mg (mindkét törzsből 416,25 mg) száraz tömegnek megfelelő nedves biomassa szükséges. Ehhez az előzetes vizsgálatok alapján (4.3.3.1. fejezet) az NI 1 törzs nedves pelletéből 448,3 mg-ot, a TBF2/20.2. törzsből 463,9 mg-ot 25 ml steril desztillált vízzel felfuszpendáltunk, majd a PVA mátrixszal alaposan elkevertük. A mátrixot perisztaltikus pumpa segítségével folyamatosan kevertetett koaguláló oldatba csepegtettük. Ugyanígy tettünk a sejtszuszpenziót nem tartalmazó (üres) mátrixszal. A perisztaltikus pumpa adagolási sebességét és magasságát úgy állítottuk be, hogy az oldatba érkező gyöngyök ne deformálódjanak, és optimális gömbformát vegyenek fel.

A kicsöpögtetés után a gyöngyöket egy órán át a gélesítő oldatban mágneses keverő segítségével tovább kevertettük. Ezután a gyöngyöket steril desztillált vízzel átmostuk, majd 0,5 liter 0,5 M-os nátrium-szulfát oldatban fél órán át kevertettük. Ezt követően a gyöngyöket steril desztillált vízzel többször átmostuk, majd felhasználásig szintén steril desztillált vízben 4°C -on tároltuk őket.

3.3.4. *ATRAZINBONTÁS TÖLTÖTT OSZLOPPAL*

A töltött oszlopban történő bontás lényege, hogy az atrazin törzsoldatot tartalmazó tápleves keringtetve van a bontásra képes, immobilizált sejtek körül, így a bontásra szánt szennyezőanyag könnyebben hozzáférhető a mikroorganizmusok számára. A levegőztető rendszer bevezetésével oxigénhez juttattuk a mikroorganizmusokat az aerob körülmények fenntartása érdekében, valamint elkerültük, hogy a gyöngyök összetapadjanak, aggregátumokat képezzenek.

A kísérlethez egy folyamatos áramoltatásra alkalmas rendszert állítottunk össze. Az alkalmazott üvegoszlop sematikus képét illetve működését a 13. számú ábra mutatja.



13. ábra - Az oszloptöltet sematikus rajza, valamint az üzemben lévő oszloptöltetről készült felvétel

1. Tápoldat kifolyó szakasz; 2. Tápoldat befolyó szakasz; 3. PVA gyöngyök immobilizált sejtekkel (töltet)+ atrazinnal kontaminált tápoldat; 4. Levegőztető műszer; 5. Membránszűrő; 6. Levegő bevezető szakasz; 7. Levegő kivezető szakasz; 8. Membránszűrő; 9. Perisztaltikus pumpa

A csiszolatos dugón létrehozott két nyílás közül az egyik a tápoldat beadagolását, a másik a levegő eltávozását szolgálja. Az oszlop alsó, tefloncsapokkal ellátott nyílásain történik a tápoldat ki-, illetve a steril levegő bevezetése. A levegőztető rendszer sterilitását egy aktív szén-szűrő és egy membránszűrő közbeiktatásával őriztük meg, az elvezetett levegőt membránszűrőn bocsátottuk át. A tápoldat áramoltatását perisztaltikus pumpa segítségével végeztük (átfolyási sebesség: 500ml/h).

A kísérlethez minden eszközt, csapot steriliztunk. A két oszlopot 150 cm^3 (baktériumtörzseket tartalmazó, illetve üres) gyönggyel töltöttük meg. Ezen 400 cm^3 , atrazint 50 ppm végkoncentrációban tartalmazó tápoldatot áramoltattunk, a rendszert óránként 10 percig levegőztettük. Az oszloptöltet üzemelését 2 hét után szüntettük meg, majd analitikai vizsgálatokra küldtük a mintákat.

4. EREDMÉNYEK

Az egyes részfolyamatok és azok eredményei egymásra épülve alkotnak képet az elvégzett munkáról, és mindig csak egy-egy kísérlet eredményének függvényében tudtunk további célirányt kitűzni, további vizsgálatokat folytatni.

Az atrazinbontásra vizsgált törzsek nagy része leginkább szénhidrogénekkal rendszeresen szennyezett kárhelyről származik és képesek is azokat, valamint egyéb szennyezőanyagokat (pl. mikotoxinokat) metabolizálni. Szénhidrogének és egyéb, aromás szerkezeti elemet (melyhez hasonló az atrazin szerkezetében is megtalálható) tartalmazó szennyezőanyag bontására már pozitív eredménnyel tesztelt baktériumok lettek kiválasztva atrazin bontására.

Az Eredmények című fejezetben bemutatom az atrazinbontási vizsgálatok során elért eredményeket: a törzsek atrazin degradáló képességét szabad sejtes, kevert tenyészetes illetve immobilizált formában, valamint a PVA hordozóval kapcsolatos vizsgálatokat.

4.1. ATRAZINBONTÁSI KÍSÉRLET

4.1.1. SZABAD SEJTES VIZSGÁLATOK

Az előzetes bontási vizsgálatokban a már meglévő törzsgyűjteményből kiválasztott 33 törzs vett részt. Az atrazin bontási kísérletbe bevont összes törzs bontási képességének százalékos eredménye a vakhoz viszonyítva az alábbi (5. számú) táblázatban látható.

Az eredmények alapján elmondható, hogy az első, tájékoztató jellegű kísérlet során összesen 10 törzs (NI1, NZS6, NZS19, H4, Kö-10, ŐR 16, TBF2/20.2, AK-37, AK-44, CHB-15p) mutatott 50% feletti bontási képességet. A továbbiakban az AK-44 és CHB-15p kivételével (ezek esetében jelenleg tartanak a vizsgálatok) a vizsgálatokat 3 párhuzamos beállításban ismételtük meg.

A második, 3 párhuzamos bontási kísérletben az első vizsgálat eredményei alapján 8 törzs vett részt, az analitikai vizsgálatokkal igazolt eredmények átlagai az alábbi, 6. számú táblázatból leolvashatók.

5. táblázat – A vizsgálatba vont törzsek első atrazin- bontási kísérlet során detektált biodegradációs eredményei, %-ban kifejezve, a Kontroll mintához képest

Nemzetség	Jelzés	Bontási %	Nemzetség	Jelzés	Bontási %
<u>Acinetobacter</u>	T3-N9	42,58	<u>Pseudomonas</u>	ZS1	34,8
<u>Arthrobacter</u>	TC1	25,11		DSM 11735	18,04
	J4	20,8		FEH 28	35,34
<u>Bacillus</u>	NZS19	59,39		NCP-3	29,7
<u>Cryseobacterium</u>	UA5/8	29,7		Kö-5	43,86
	CHB 20p	29,44	<u>Pseudoxanthomonas</u>	H4	58,39
	TN 4	40,63		NZS6	86,97
<u>Cupriavidus</u>	BRB 6A	38,2	<u>Rhodococcus</u>	AK-44	58,85
	ÖR 16	69,83		AK-35	35,94
<u>Gordonia</u>	NZS 14	41,6		NI1	61,4
<u>Microbacterium</u>	EL 1	36,25		AK-36	34,9
	NZS9	14,28		Ak-37	57,66
<u>Ochrobactrum</u>	DT2	10,42		K408	31,87
<u>Olivibacter</u>	TBF2/20.2	54,25		AK-38	44,27
<u>Paracoccus</u>	BSZ10	25,81		CHB-15p	54,16
	CSZ4	27,82		AK-40	42,18
			<u>Sphingopyxis</u>	Kö-10	87,47

6. táblázat – Az előzetes bontási kísérlet és a 3 párhuzamos vizsgálatban mért eredmények, %-ban kifejezve, a Kontroll mintához képest

Törzs jele	Identifikáció	Bontási % 1.bontási kísérlet (1 beállításból visszamért)	Bontási % ± Szórás % 2.bontási kísérlet (3 párhuzamos mérés átlaga)
NZS19	<i>Bacillus megaterium</i>	59,39	36,88 ± 8,40
<u>ÖR 16</u>	<i>Cupriavidus basilensis</i>	69,83	61,75 ± 1,94
<u>TBF2/20.2</u>	<i>Olivibacter oleidegradans</i>	54,25	51,87 ± 1,90
NZS6	<i>Pseudoxanthomonas suwonensis</i>	86,97	10,5 ± 2,04
H4	<i>Pseudoxanthomonas kalmensis</i>	58,39	40,65 ± 0,57
AK-44	<i>Rhodococcus aetherivorans</i>	58,85	-
<u>NI1</u>	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	61,4	50,54 ± 2,62
<u>AK-37</u>	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	57,66	64,1 ± 1,28
CHB-15p	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	54,16	-
Kö-10	<i>Sphingopyxis chilensis</i>	87,47	7,2 ± 3,10

Adatsorok jellemzéséhez szükséges ismerni, hogy a középértékhez viszonyítva hogyan helyezkednek el az adatok. A párhuzamos beállítások egyes eredményeinek a 3 mérés átlagától való eltérését szórást meghatározva állapítottam meg, ezt százalékos értékben tüntettem fel. Ez az érték a legtöbb esetben 5 % alatti, illetve a jó bontási százalékot elérő törzsek esetében alacsony (2 % alatti).

A 3 párhuzamos mérés során az NI1, ŐR16, AK-37 és a TBF2/20.2 jelű törzsek átlagolt eredményei ebben a beállításban is 50% feletti bontási eredményt mutattak. Ezek közül az analitikai eredmények alapján kiválasztottuk a legjobb degradációs képességgel rendelkező törzspárt, így ennek megfelelően az NI1 valamint TBF2/20.2 törzsekkel folytattunk további vizsgálatokat.

A 3 párhuzamos beállításban megismételt vizsgálat alapján az NZS6, NZS19, H4 és Kö-10 jelű törzsek esetében a várt eredmény elmaradt.

4.1.2. A KEVERT TENYÉSZETES BONTÁSI KÍSÉRLET EREDMÉNYEI

A 3 párhuzamos mérés eredményei alapján világossá vált, mely törzsekkel érdemes kevert tenyészetes bontási kísérletet indítanunk. A bontási százalék megállapításához a kevert tenyészettel kezelt mintából visszamért atrazin koncentrációját ez esetben is a vakhoz viszonyítottuk. A 4, különböző párokkal történt bontási kísérlet eredményeit analitikai vizsgálattal támasztottuk alá, mely eredmények a 7. számú táblázatban vannak feltüntetve.

7. táblázat – A kevert tenyészetes bontás eredményei

Törzs jele	Identifikáció	Bontási % (1 beállítás)	Bontási % (3 beállítás)
AK-37+ŐR16	<i>R. pyridinivorans</i> + <i>C. basilensis</i>	18,72	-
AK-37+NI1	<i>R. pyridinivorans</i> + <i>R. erythropolis</i>	28	-
ŐR16+NI1	<i>C. basilensis</i> + <i>R. erythropolis</i>	61,28	-
NI1+ TBF2/20.2	<i>R. erythropolis</i> + <i>O. oleidegradans</i>	88	70 ± 1,66

Ebben a vizsgálatban egy beállítás során jó eredményt két esetben, az ŐR16 és NI1, valamint a TBF2/20.2 és NI1 törzsek keverékénél, előbbinél 61,28%, utóbbinál pedig 88%-os bontási eredményt detektáltunk. A legjobb eredményt mutató NI1+TBF2/20.2 törzspár esetében a kísérletet 3 párhuzamos beállításban is megismételtük, ahol 70%-os eredményt tapasztaltunk 1,66%-os szórás mellett. Az analitikai eredmények által az NI1 és TBF2/20.2 jelű törzsek esetében kimutatott jó bontási százalék alapján ezen törzsek keverékével végeztük a sejtbezárást, a törzsek immobilizációját.

4.2. IMMOBILIZÁCIÓ

Az immobilizáció megkezdéséhez szükséges együttes szaporíthatóság vizsgálatát a második kísérletben 3 párhuzamos beállítás során az atrazint jól degradáló törzsekkel kezdtük meg. Ennek eredményeképpen lemezöntéssel megállapítottuk, hogy az immobilizálni kívánt törzspár (NI1 és TBF2/20.2) egymásra gátló hatású anyagot nem termel. Az elkülöníthető és megszámlált telepek alapján a csíraszámok nagyságrendileg azonosak, az NI1 esetében $1,46 \cdot 10^9$, a TBF2/20.2 jelű törzs esetében $1,87 \cdot 10^9$ csíraszámot számoltunk, így az élősejtszám vizsgálat után megkezdődtek az immobilizációs kísérletek (a lemezöntés 10^6 hígítási fokáról készült kép a 32. oldal 13. számú ábráján látható).

4.2.1. IMMOBILIZÁCIÓ OPTIMALIZÁLÁSÁNAK EREDMÉNYEI

A sejtbezárást megelőző kísérletek folyamán különböző stabilitási vizsgálatoknak tettük ki a PVA gyöngyöket. Az ötféle polivinil-alkohol alkalmazásával beállított kísérletek eredményeképpen kiválasztottuk, hogy melyik molekulaszámu polimerrel érdemes folytatni a vizsgálatot.

A stabilitási vizsgálat elején a 8-88-as PVA-ból készült gyöngyök néhány napos desztillált vízben történő tárolás alatt nagy részben visszaoldódtak a tároló folyadékba, ezáltal kizártuk a további vizsgálatból. Ezután a tartósnak látszó gyöngyökkel indítottuk el a stabilitási vizsgálatokat, melynek során azokat mágneses keverőn kevertettük, valamint átlagos tömeg és átmérő alapján mértük a duzzadás mértékét - mivel a gyöngyök stabilitása fordítottan arányos a duzzadás mértékével - illetve scanning elektronmikroszkópos felvételeket készítettünk a gyöngyök felszínéről és belső szerkezetéről. A gyöngyökről készült elektronmikroszkópos felvételek a Mellékletek c. fejezetben (2. számú Melléklet) találhatóak.

A gyöngyök kevertetését 4 hét elteltével szakítottuk meg. A vizsgált gyöngyök közül a 6-98-as jelű a 7 napos kevertetés során teljesen feloldódott. A későbbiekben 4 hét után a 10-98-as gyöngyök is maradék nélkül visszaoldódtak. A 20-98-as gyöngyök nagy része ugyan egyben volt a 4 hét után is, de elvétele néhány helyen összetöredezve aggregátumot képzett. A stabilitási vizsgálatok, vagyis 4 hét intenzív mágneses kevertetés után a 89-98-as PVA-ból készült gyöngyök esetében tapasztaltuk, hogy a gyöngyök egyben maradtak, megőrizték formájukat, és nem képeztek aggregátumokat. Tekintettel a témával foglalkozó szakirodalmi adatokra ez igen fontos eredmény, hiszen a PVA alapú gyöngyök stabilitásának időtartamát általában 2 hétben adják meg. A stabilitás vizsgálat eredményei, valamint az azt megelőző, illetve utána készült elektronmikroszkópos felvételek alapján a továbbiakban a 89-98-as ($M_w \sim 89.000-98.000$) PVA-t alkalmazzuk. A

gyöngyök átlagos tömeg, illetve átmérő eredményeit az 1. számú Melléklet, illetve a belső szerkezetét bemutató elektronmikroszkópos felvételeket a 2. számú Melléklet tartalmazza.

4.2.2. ATRAZINBONTÁS OSZLOPTÖLTETBEN – EREDMÉNYEK

Az oszloptöltet 2 hétig történő folyamatos üzemeltetése után mintát vettünk az oszlop tápoldatából, majd 50 cm³ térfogatot analitikai vizsgálatra küldtünk. A GC-MS technikával elvégzett vizsgálat a bontás eredménye mellett kimutatta, hogy a kontroll minta atrazin koncentrációja is lényegesen kevesebb az eredetileg beállított koncentrációtól. Az analitikai vizsgálat eredményei az eredeti oldattérfogatra visszaszámolva az alábbi, 8. táblázatban találhatók.

8. táblázat – Az oszloptöltet tápoldatából vett minta analitikai eredményei

Minta jele	Minta térfogata	Visszamért atrazin (mg)
NI1+TBF2/20.2	400 cm ³	5,52
VAK minta	400 cm ³	6

A táblázatból egyértelműen kivehető, hogy már a vak mintából visszamért atrazin koncentrációja is csekély az eredetileg beállított 50 ppm atrazin koncentrációhoz képest, mely 400 cm³ tápoldatban 20 mg oldott anyagot jelent. A megváltozott atrazin koncentráció kiderítésére egy második analitikai vizsgálatra küldtünk be mintát, ez esetben a polivinil-alkohol gyöngyökből. Ennek a mérésnek az volt a célja, hogy megállapításra kerüljön, a csökkent atrazin koncentráció lehet-e a polivinil-alkohol alapú hordozón való felületi megtapadás eredménye.

Az analitikai vizsgálat során a gyöngyökön ultrahangos acetonos extrahálást végeztek el, és az atrazin koncentrációját GC-MS technikával elemezték. A végeredményt két mérés átlagaként kaptuk meg, mely az alábbi, 9. számú táblázatból leolvasható.

9. táblázat – A gyöngyök felületéről visszamért atrazin mennyisége

Minta jele	Minta jellege	Atrazin a gyöngyök felületén (mg)
NI1+TBF2/20.2	150 cm ³ , bezárt sejtet tartalmazó polivinil-alkohol gyöngyök	0,255
VAK minta	150 cm ³ , „üres” polivinil-alkohol gyöngyök	0,45

A gyöngyök felszínén a beállított kezdeti atrazin mennyiségének mindössze 1, 275 illetve 2,25%-a kötődött meg. Az üres gyöngyös vak minta esetén a tápoldatból és a gyöngyök felszínéről visszamért atrazin mennyisége összesen 6,45 mg, az NI1+TBF2/20.2 esetében 5,775 mg volt. Az analitikai eredmények függvényében kijelenthető, hogy az eredetileg 20 mg atrazint tartalmazó tápoldat atrazin-vesztése jelentős a kontroll, baktériumsejteket nem tartalmazó mintában is.

Egymáshoz viszonyítva mindössze 10,47%-kal kisebb a baktériumsejtet tartalmazó minta atrazin-mennyisége, mint a vak mintáé, a kontroll minta jelentősen lecsökkent atrazin koncentrációja miatt azonban a biodegradáció tényleges mértéke nem állapítható meg.

5. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

A bontási vizsgálatok során az egyes törzsek esetében elért eredményeket szakirodalmi adatokra támaszkodva értékeltük, melyekkel bizonyítható a bontásra kiválasztott nemzetségek degradációs képessége.

Az első bontási kísérlet eredményei alapján el tudtuk különíteni azokat a törzseket, melyeket a további vizsgálatokból kizártunk, továbbá az előzetes bontási kísérlet alkalmával összesen 10 törzs (NZS6, NZS19, H4, Kö-10, NI1, AK-37, ÖR16, TBF2/20.2, CHB-15p, AK-44) esetében tapasztaltuk, hogy az atrazin több, mint 50%-os biodegradációjára voltak képesek.. A második bontási kísérletben a tízből eddig 8 esetében ismételtük meg a vizsgálatot, mely során 3 párhuzamos beállítás átlagának eredményeként 4 törzs biodegradációs képessége haladta meg az 50%-ot, ezek egyéb szennyezőanyagokra vonatkozó lebontó képességét szakirodalmi adatokkal támasztom alá.

Rhodococcus pyridinivorans – Az évek során számos szennyezőanyagok degradációjára képes *Rhodococcus* törzset írtak le. A piridin degradációjában több tudományos adat szerint is hatékony, nagy kapacitással képes bontani azt. Mint azt neve is mutatja, a „piridinbontó *Rhodococcus*-t” Yoon 2000 novemberében jelölte új fajnak, új nevén *Rhodococcus pyridinivorans* sp. (Yoon, 2000).

Rhodococcus erythropolis - Aerob, Gram-pozitív baktérium, amely gyakran előfordul szennyezett és nem szennyezett talajokban egyaránt, már nyers kőolajból is izolálták. Kiemelkedő szerepe van a gázolaj lebontásában (Szoboszlai et al., 2002; Benedek, 2009). Képes arra, hogy egyedüli szénforrásként fenolt, pirokatechint, rezorcinolt, p-nitrofenolt, p-clorofenolt, hidroxibenzoátot (Cejkova et al., 2004), benzolt, toluolt hasznosítson. Kutatások alapján két vizsgált *Rhodococcus erythropolis* törzs hatékonyan képes eliminálni a talaj sztirolszennyeződését (Orsovai, 2009).

Olivibacter oleidegradans– Pálcika alakú, szénhidrogén bontására képes, Gram-negatív, obligát aerob baktérium, melyet egy szénhidrogénnel szennyezett területről Magyarországon izoláltak 2011-ben. A Szent István Egyetem Környezetvédelmi- és Környezetbiztonsági Tanszéke által identifikált és leírt új faj esetében igazoltak először szénhidrogénbontó képességet a nemzetségen belül. Az elvégzett 16S rDNS szekvencia vizsgálatok alapján az *Olivibacter* nemzetséggel valamint a *Sphingobacteriaceae* családdal áll kapcsolatban. A legközelebbi rokona az *Olivibacter ginsengisoli* (Szabó et al., 2011).

Cupriavidus basiliensis – Gram-negatív aerob baktérium, mely képes a biszfenol-A-t, mint egyedüli szén és energiaforrásként hasznosítani. Alkalmas továbbá fenol, 4-izopropilfenol, etanol,

metanol, aceton és számos egyéb aromás és alifás vegyületek degradációjára (Fischera et al., 2010). Más források szerint a furfurol degradációs képessége is jelentős (Koopman et al., 2010).

A szakirodalom által közölt adatok igazolják, hogy az atrazin esetében jó bontási százalékot elért törzseink egyéb szennyezőanyagok bontásában vettek már részt. Ezzel alátámasztható a döntés, mely alapján a törzsek a biodegradációs kísérlethez kiválasztásra kerültek, tehát képesek lehetnek az atrazint, mint szintén aromás elemet tartalmazó molekulát bontani. Az eredmények értékelésénél azt tapasztaltuk, hogy 4 – a második, 3 párhuzamos beállítási kísérletben jól bontó - törzs, az NZS6, NZS19, H4 és Kö-10 esetében a várt értékek jóval alul maradtak a tényleges adatoknak, melynek oka lehet a kezdeti analitikai mérések esetleges bizonytalansága és/vagy a törzsek tárolás során történő genetikai változása. A második bontási kísérlet eredményei alapján kialakított törzspárok közül az NI1 és TBF2/20.2 törzsek kiváló, 70%-os bontási eredményt mutattak együttes, kevert tenyészetes bontási rendszerben. Az immobilizációjukat megelőző együttes szaporítás során megállapítottuk, hogy egymás növekedésére negatív hatást nem gyakorolnak, élősejtszámuk nagyságrendileg azonos (10^9 CFU/ml) volt.

A sejtek számára legstabilabb szerkezetű hordozó kialakítása elsődleges fontosságú volt vizsgálataink szemszögéből. Az üres PVA gyöngyökről, valamint a bezárt sejtes gyöngyökről készült felvételek a 2. számú Mellékletben láthatók. Megfigyelhető, a PVA gyöngy scanning elektronmikroszkópos képén a jellegzetes micella szerkezet, melyekben a sejtek megtapadhatnak, ezért is fontos a megfelelő arányban alkalmazott PVA/nátrium-alginát keverék, és ezzel a megfelelő szerkezet kialakítása.

Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a bórsavas - kalcium-nitrátos gélesítő rendszert alkalmazva a kicsepegő PVA mátrix szabályos rugalmas gyönggyé formálódna, és nem képeznek aggregátumot. A munka során ezt a beállítást alkalmaztuk. Az immobilizáció jelentős eredményeként könnyvelhető el a mátrix szerkezetének optimalizálása, ami egy fizikailag igen stabil, mechanikai hatásoknak jól ellenálló polimer gyöngy kialakítását eredményezte, melyet nem csak az optimalizációs vizsgálatoknál, hanem az oszloptöltet esetében is tapasztaltunk. Kevés szakirodalmi adat tesz említést erős mértékű próbatételre, a polivinil-alkohol gyöngyök élettartamát legtöbb esetben általában két hétben határozza meg. A stabilitási vizsgálatoknak való megfelelés felveti a gyöngyök hosszú távú felhasználásának lehetőségét, a környezetben a külső behatásoknak időben tovább ellenállva hosszú távú bontási vizsgálatokban engedné részt venni. Az elvégzett kísérletek során a gyöngyök szerkezetét tehát sikerült stabilizálni, a mechanikai behatásokkal szemben igen ellenálló polimer gyöngyöt kifejleszteni. Az oszloptöltetben végzett biodegradációs kísérlet eredményi alapján elmondható, hogy az általunk használt rendszerben a bontás mértéke (10,47%)

messze elmaradt a szabad sejtes beállításhoz képest, azonban a rendszerben jelentős atrazin-csökkenést tapasztaltunk a kontroll (baktériumsejteket nem tartalmazó) mintában is, a jelenség okának felderítése feltétlenül szükséges a továbbiakban. Ezen kívül analitikai vizsgálatok segítségével bebizonyosodott, hogy a PVA gyöngyök felületén az atrazin csak csekély mértékben volt képes megkötődni. Ezek alapján indokolt megismételni az immobilizált sejtes bontási kísérletet és amennyiben szükséges, továbbfejleszteni az oszloptöltetet.

A kísérletek folytatása során feltétlenül javasolható a szabad sejtes vizsgálatokban egy beállításban jó eredményt mutató CHB-15p (*Rhodococcus pyridinivorans*) és AK-44 (*Rhodococcus aetherivorans*) törzsekkel, valamint az ÖR16+NI1 törzspárral a bontási kísérlet megismétlése több párhuzamos beállításban, valamint újabb törzspárok tesztelése.

Az egészségügyi- és környezeti veszélyek csökkentése illetve az újabb, környezetkímélőbb technológiák kifejlesztése érdekében szükség van a növényvédő szerek bomlási maradványainak pontos meghatározására és a lebomlás útvonalainak megismerésére. Tekintettel arra, hogy az atrazin mikrobiológiai lebomlása több útvonalon keresztül mehet végbe, a bontásra képes baktériumtörzsek enzimrendszerének feltérképezésével lefedhetővé válna a teljes metabolikus spektrum. Erre lehetőséget nyújthatnak a modern molekuláris biológiai PCR alapú módszerek, melyek segítségével, valamint az egyes génekre specifikus primerpárok alkalmazásával detektálhatóvá válhatnak a lebontásban résztvevő enzimeket kódoló gének. Ezáltal a bontásra kiválasztott törzsek kevert tenyészetekben történő alkalmazásuk során képesek lehetnek egymás enzimrendszerének segítésére, kiegészítésére, ezzel az atrazin köztitermék nélküli lebontására.

Folytatva a gondolatmenetet érdemes lehet ökotoxikológiai tesztekkel bővíteni a vizsgálatokat. Ennek egyik lehetséges módja az algateszt. Az algák, mint fotoszintetizációra képes szervezetek, alkalmasak az atrazin kimutatására. Érzékenységüknél fogva (lásd 2. táblázat algafajokra vonatkozó LC₅₀ értékei) az atrazin, mint toxikus bontási maradvány indikátorszervezetei is lehetnek, mely költséghatékony megoldást jelenthetne az analitikai vizsgálatokkal szemben, valamint az esetlegesen toxikus hatású bomlástermékek megjelenését is jelezheti, melyeket az atrazinra irányuló analitikai vizsgálat nem mutat ki.

Tekintettel arra, hogy irodalmi adatok szerint az atrazinnak a két legközönségesebb bomlásterméke, a deetil-atrazin és deizopropil-atrazin is aromataz-enzim indukáló hatású humán sejtvonalakon (Sanderson et al., 2001), a biodegradáció során keletkező, esetlegesen hormonhatású bomlástermékek kimutatására lehet alkalmas a vitellogenin teszt zebra-dánián (*Danio rerio*), mely széleskörűen vizsgált modellállat, genetikai és fejlődésbiológiai szempontból a legjobban ismert halfaj. A vitellogenin fehérje a nőstény zebra-dániók májában termelődik ösztrogén hormon hatására. Az atrazin, valamint a már említett bomlástermékei az aromataz enzim indukálásán

keresztül a hím nemi hormonok ösztrogénekké alakulását idézik elő, ezen vegyületek hatására hím zebradániók májában is termelődhet vitellogenin. Ennek jelenlétét és mennyiségét is Real-Time PCR segítségével lehet vizsgálni (Wang et al., 2005). Ez alapján képet kaphatunk arról, hogy a biodegradáció során a bontási maradékanyag rendelkezik-e biológiailag káros hatással.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A magas szintű mezőgazdasági termeléshez nélkülözhetetlen növényvédőszer-felhasználás közismerten sokféle környezeti és egészségügyi problémát okoz. Az ide vonatkozó hazai és nemzetközi jogszabályi rendelkezések egyaránt törekednek a környezetbe, ezáltal közvetett módon a szervezetünkbe kerülő toxikus anyagok minimalizálására. A már környezetbe került szennyező anyagok biológiai úton történő lebontása napjaink egyik kiemelkedő kutatási témája, támogatva ezzel a környezetkímélő biodegradációs technológiák fejlődését, kialakulását.

A dolgozat központi vegyülete az atrazin, melynek csaknem ötven éves alkalmazásának hatására több tudományos kutatás is felhívja a figyelmet. Perzisztenciája és az ebből következő tartós jelenléte a környezeti elemekben még későbbi generációknak is problémát jelent majd, hormonháztartást zavaró hatását számos gerinces élőlényre nézve bizonyították, valamint összefüggésbe hozható egyes daganatos megbetegedések előfordulásával is.

Az atrazinhoz hasonló szennyezőanyagok eliminálásában egyre nagyobb szerepet töltenek be a biológiai kármentesítés eszközei.

A vizsgálatom tárgyát képező atrazin lebontására mikrobiológiai szervezeteket használtunk. Az atrazin biodegradációjára irányuló vizsgálataimat egy összetett kísérletsorozaton vezettem végig: 3 különböző szinten vizsgáltam atrazin bontására képes mikroszervezeteket. A rendelkezésemre álló, korábban már faj szinten identifikált 33 baktériumtörzsből az előzetes atrazin-bontási vizsgálatokban egy beállítás alapján 10 törzs degradációs képessége bizonyult 50% felettinek, e törzsek közül a második bontási kísérletben 3 párhuzamos beállítás átlagának eredményeként négy [az NI1 (*Rhodococcus erythropolis*), ÖR16 (*Cupriavidus basilensis*), TBF2/20.2 (*Olivibacter oleidegradans*) és AK-37 (*Rhodococcus pyridinivorans*) jelű] törzs további vizsgálatát találtuk indokoltnak. Ezeknél a bontási aktivitást kevert tenyészetekben négy különböző beállításban is teszteltük. A kevert tenyészetes bontási kísérletben 2 törzs, az NI1 és TBF2/20.2 keverék esetében a bontás mértéke 70% volt. Az együttes szaporíthatóság vizsgálata során megállapítást nyert, hogy a legjobb bontási hatásfokkal bíró törzspár együtt szaporítható. Következő lépésként optimalizáltuk a polivinil-alkohol alapú mátrixszal történő immobilizációt. A kiváló bontási képességű NI1 és TBF2/20.2 jelű törzspárt az optimalizálás során kiválasztott PVA mátrixban immobilizáltuk. Az így bezárt sejtekkel oszloptöltetet készítettünk és átfolyó rendszerben vizsgáltuk az atrazin biodegradációját. Az immobilizációs technika fejlesztése stabilitási szempontból eredményes volt, azonban az oszloptöltetben végzett immobilizált sejtes lebontási kísérletet mindenképpen szükséges megismételni.

A biológiai lebontás hatékonyságának nyomon követése ökotoxikológiai tesztekkel növelhető. Az atrazin bontására képes törzsek enzimszisztémájának feltérképezése, funkciójának keresése lehetőséget adhat arra, hogy olyan baktériumkonzorciumot alkalmazzunk az atrazin lebontására, mely segítségével a vegyület teljesen mineralizálható.

A továbbiakban ezen kívül a töltet fejlesztése, valamint a keletkező bomlástermékek ökotoxikológiai vizsgálata javasolt.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet és hálámat kifejezni Háhn Judit konzulensemnek, hogy lehetőséget biztosított munkám elvégzéséhez és dolgozatom megírásához. Gyakorlati tanácsaival és meglátásaival alapvetően hozzájárult szakmai fejlődésemhez és munkámhoz. Köszönöm segítőkész támogatását, türelmét, valamint dolgozatom alapos és kritikus áttekintését.

Köszönöm a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék és a Regionális Egyetemi Tudásközpont minden munkatársának dolgozatom létrejöttéhez nyújtott technikai és baráti segítségét.

Külön köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak, akik megértésükkel ösztönözték kitartásomat.

A kutatás a Baross Gábor Program, HALEDC09, REG-KM-09-2-2009-0066 pályázat és a TÁMOP-4.2.1B-11/2/KMR-2011-0003 projekt támogatásával készült.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- AKSENOV, A. V., AKSENOVA, I. V. (2009): Use of the ring opening reactions of 1,3,5-triazines in organic synthesis. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 45: 130-150. p.
- ASPELIN, A. L. (1996): Pesticides industry sales and usage, 1994 and 1995 market estimates. U.S.E.P.A. Offices of Pesticides Programs. Biological and Economic Analysis Division. Washington, D.C.
- BARÓTFI I. (2000): Környezettechnika. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 308-312. p.
- BENEDEK T. (2009): A gázolaj biodegradációjában résztvevő mikroorganizmusok izolálása és tanulmányozása. Sapienia Erdélyi Magyar Tudományegyetem. Kolozsvár.
- BICKERSTAFF, G. F. (1997): Immobilization of enzymes and cells. Some practical consideration. In: Bickerstaff G. F. (szerk.) *Immobilization of enzymes and cells*. Totowa, New Jersey: Humana Press
- BORBÉLY J. (2002): Az atrazin degradációja különböző tulajdonságú talajokban. Debreceni Egyetem, Debrecen, Ph.D. értekezés.
- BUTTIGLIERI, G., MIGLIORISI, L., MALPEI, F. (2011): Adsorption and removal at low atrazine concentration in an MBR pilot plant. *Water Science and Technology*. vol. 63. (7) 1334-1340. p.
- CAO, B., NAGARAJAN, K., LOH, K. C. (2009): Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. *Applied and Environmental Microbiology*. vol: 85(2):207-28. p.
- CAUICH-RODRIGUEZ, J. V., DEB, S., SMITH, R. (1996): Effect of cross-linking agents on the dynamic mechanical properties of hydrogel blends of poly(acrylic acid)-poly(vinylalcohol-vinyl acetate). *Biomaterials*. 17: 2259-2264. p.
- CEJKOVA, A., MASAK, J., JIRKU, V., VESELY, M., PATEK, M., NESVERA, J. (2004): Potential of *Rhodococcus erythropolis* as a bioremediation organism. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol: 21, Number 3, (5)317-32 pp.
- CHANG, C. C., TSENG, SZ. K. (1998): Immobilization of *Alcaligenes eutrophus* using PVA crosslinked with sodium nitrate. Graduate Institute of Environmental Engineering. National Taiwan University. *Biotechnology Techniques*. Vol 12: 865-868. p.
- CHAUHAN, G. S., LAL, H. (2003): Novel grafted cellulose-based hydrogels for water technologies, *Desalination*. 159: 131-13. p.
- CHIBATA, I., TOSA, T., SATO, T. (1985): Improvement of productivity by both development of immobilization method and construction of new *Escherichia coli* strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 13 (3): 231-240 p.
- CHIELLINI, E., CORTI, A., D'ANTONE, S., SOLARO, R. (2003): Biodegradation of poly(vinyl alcohol) based materials. *Progress in polymer Science*. 28: 963-1014. p.

CHUNYU, Y., YANG, L., KUN, Z., XIA, W., CUIQING, M., HONGZHI, T., PING, X. (2009): Atrazin degradation by a simple consortium of *Klebsiella* sp. A1 and *Comamonas* sp. A2 in nitrogen enriched medium. Biodegradation. vol: 21 (1). 97-105. p.

DARVAS B., POLGÁR A. L., SCHWARCZINGER L. I., TURÓCZI GY. (1999): A biológiai növényvédelem és helyzete Magyarországon. OMFB, Budapest. 15-48. p.

DARVAS B., SZÉKÁCS A. (2006): Mezőgazdasági ökotoxikológia. L'Harmattan Kiadó. Budapest. 381. pp.

DE SOUZA, M. L., WACKETT, L. P., SADOWSKY, M. J. (1998): The atzABC genes encoding atrazine catabolism are located on a self-transmissible plasmid in *Pseudomonas* sp. Strain ADP. Applied and Environmental Microbiology. vol: 64. 2323-2326. p.

DERVAKOS, G. A., WEBB, C. (1991): On the merits of viable-cell immobilization. Biotechnology Advances. 9 (4) 559-612. p.

DORAN, P. M., BAILEY, J. E. (1986): Effects of immobilization on growth, fermentation properties, and macromolecular composition of *Saccharomyces cerevisiae* attached to gelatin. Biotechnol Bioeng 28:73–87.

FARKAS G. (2007): Új technológiai lehetőségek alkoholszegény sörök előállítására. Budapesti Corvinus Egyetem. Budapest. Doktori értekezés.

FISCHERA, J., KAPPELMEYER, U., KASTNER, M., SCHAUERB, F., HEIPIEPER, J. H. (2010): The degradation of bisphenol A by the newly isolated bacterium *Cupriavidus basilensis* JF1 can be enhanced by biostimulation with phenol. International Biodeterioration & Biodegradation. Volume 64, Issue 4. Pages 324-330.

GALLEGO, V., GARCIA, M. T., VENTOSA, A. (2006): *Chryseobacterium hispanicum* sp. nov. isolated from the drinking water distribution system of Sevilla, Spain. International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology. 56 (7) 1589–1592. p

GIANESSI, L. P., PUFFER, C. (1991): Herbicide use in the United States: national summary report 1966–1989. Resources for the Future. Washington, D. C. 22 p.

GONDOS G., DARVAS B. (2005): Az ivóvíz nem cserélhető le. Magyar Narancs (interjú). 17 (4):20-21.

HAYES, T.B., COLLINS, A., LEE, M., MENDOZA, M., NORIEGA, N., STUART, A. A., VONK, A. (2002): Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazin at low ecologically relevant doses. The National Academy of Sciences. USA. 99. 5476–5480. p.

HONG, L. T. M. (2003): Enzimjelzéses immunanalitikai módszerek fejlesztése és alkalmazása fenoxikarb és atrazin növényvédőszer hatóanyagok kimutatására. Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem. Budapest. Doktori értekezés.

HUGO, C., SEGERS, P., HOSTE, B., VANCANNEYT, M., KESTERS, K. (2003): *Chryseobacterium joostei* sp. nov., isolated from the dairy environment. International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology. 53 (3) 771–777.

p

- IDRIS, A., ZAIN, N. A., SUHAIMI, M. S. (2008): Immobilization of Baker's yeast invertase in PVA–alginate matrix using innovative immobilization technique. *Process Biochemistry*. Volume 43, (4) Pages 331-338.
- ISLAM, M.O., HARA, M., MIYAKE, J. (2002): Induction of P-glycoprotein, glutathione-S-transferase and cytochrome P450 in rat liver by atrazin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. vol. 12. 1–6. p.
- JOO, H., CHOI, K., HODGSON, E. (2010): Human metabolism of atrazin. *Department of Environmental and Molecular Toxicology*. Vol. 98 (1) Pages 73-79.
- KÁDÁR A. (2005): Vegyszeres gyomirtás és termésszabályozás. *Mezőgazda Kiadó*. Budapest. 65-67. p.
- KÄMPFER, P., DREYER, U., NEEF, A., DOTT, W., BUSSE, H. J. (2003): *Chryseobacterium defluvii* sp. nov., isolated from wastewater. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*. 53 (1) 93–97.
- KÁRPÁTI Z., GYÖRFI L., CSANÁDY M., KÁROLY G., KRÓMER I. (1998): Ivóvizek növényvédőszer szennyezettsége. *Egészségtudomány*, 42. 143-152. p.
- KETTLES, M. K., BROWNING, S. R., PRINCE, T. S., HORSTMAN, S. W. (1997): Triazine herbicide exposure and breast cancer incidence: an ecologic study of Kentucky counties. *Environmental Health Perspectives*. 105(11): 1222–1227. p.
- KIM, J. H., ELDON, R. R., PARK H. S. (2008): Biological oxidation of hydrogen sulfide under steady and transient state conditions in an immobilized cell biofilter. *Bioresour Technol*. 99:583–8. p.
- KLIGERMAN, A. D., DOERR, C. L., TENNANT, A. H., ZUCKER, R. M. (2000a): Cytogenetic studies of three triazone herbicides. I. In vitro studies. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. vol. 465. p. 53-59.
- KLIGERMAN, A. D., DOERR, C. L., TENNANT, A. H., ZUCKER, R. M., (2000b): Cytogenetic studies of three triazone herbicides. II. In vivo studies. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. vol. 471. p. 107-199-205.
- KOOPMAN, F., WIERCKX, N., DE WINDE, J. H., RUIJSSENAARS, H. J. (2010): Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl) furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:4919-4924.
- KOURKUTAS, Y., BEKATOROU, A., BANAT, I. M., MARCHANT, R., KOUTINAS, A. A. (2004): Immobilization technologies and support materials suitable in alcoholic beverages production: a review. *Food Microbiology*, 21 (4) 377-397. p.
- KOVÁCS B. (1999): Talaj (termőföld), talajminőség. A talajminőség védelmének biztosítása, 3. fejezet, in Ed.: Kun-Szabó T.: A környezetvédelem minőség-menedzsmentje. *Műszaki Könyvkiadó*. pp. 50-63.
- LABIDI, N. S., DJEBAILI, A. (2008): Studies of the mechanism of Polyvinyl Alcohol adsorption on the Calcite/Water interface in the presence of sodium oleate. *Journal of Minerals & Materials Characterization & Engineering*, Vol. 7, No.2, pp 147-161
- LACZKÓ G., SZABÓ M. GY. (SZERK.), BOHUS J., MAKRA P., SZAKÁTS R., SZALAI T., SZÉKELY P. (2008): Fizika-biofizika laboratóriumi gyakorlatok. Egyetemi jegyzet. SZTE Kísérleti Fizikai Tanszék.

- LAZORKO-CONNOR, S., ACHARI, G. (2009): A Review of Atrazine, its Occurrence and Treatment in Water. *Environmental Reviews*. vol. 17, pp. 199-214.
- LEBARON, H. M., MCFARLAND, J. E., BURNSIDE, O. (2008): The triazine herbicides: 50 years revolutionizing agriculture. Elsevier. 587. p.
- LEE, E. H., KIM, J., CHO, K. S., AHN, Y. G., HWANG G. S. (2010) Degradation of hexane and other recalcitrant hydrocarbons by a novel isolate, *Rhodococcus* sp. EH831. *Environmental Science and Pollution Research* 17, 64-77
- LI, Y., KAWAMURA, K., FUJIWARA, N., NAKA, T., LIU, H., HUANG, X., KOBAYASI, K., EZAKI, T. (2003): *Chryseobacterium miricola* sp. nov., a novel species isolated from condensation water of space station Mir. *Systematic and Applied Microbiology*. 26 (4) 523-528. p.
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. (2003): Brock Biology of Microorganisms, Tenth Edition. Upper Saddle River. New Jersey: Pearson Education, Inc., USA, 1019 p.
- MANDELBAUM, R. T., ALLAN, D. L., WACKETT, L. P. (1995): Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, p. 1451-1457.
- MÁRKUS F. (1993): Növényvédő szerek környezeti hatásai Magyarországon. WWF-füzetek. Budapest.
- MARTINEZ, B., TOMKINS, J., WACKETT, L. P., WING, R., SADOWSKY M. J. (2001): Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Journal of Bacteriology*, 183:19, 5684-5697 p.
- MLADINICA, M., PERKOVIC, P., ZELJEZIC, D. (2009): Characterization of chromatin instabilities induced by glyphosate, terbuthylazine and carbofuran using cytome FISH assay. *Toxicology Letters*. 189: 130-137. p.
- MONOSTORI K. (2007): Környezettudatosság Magyarországon - Attitűd és cselekvés a szelektív hulladékgyűjtésben. Budapesti Corvinus Egyetem. Budapest. Doktori értekezés.
- MULBRY, W. W., ZHU, H., NOUR, S. M., TOPP, E. (2002): The triazine hydrolase gene trzN from *Nocardioides* sp. strain C190: Cloning and construction of gene-specific primers. *FEMS Microbiology Letters*. vol: 206. 75-79. p.
- NABIYOUNI, G., BARATI, A., SAADAT, M. (2011): Surface Adsorption of Polyethylene Glycol and Polyvinyl Alcohol with Variable Molecular Weights on Zinc Oxide Nanoparticles. *Iranian Journal of Chemical Engineering*. Vol. 8, No. 1.
- NAGY A. (2009): Természetes kármentesítési technológiák vizsgálata. Debreceni Egyetem Agrár- és Műszaki Tudományok Centruma. Debrecen. Doktori értekezés.
- OCSKÓ Z., ERDŐS GY., MOLNÁR J. (2006): Növényvédőszerek, termésnövelő anyagok I–II. 643. p.
- ORSÓVAI Á. (2009): A sztirol lebontásának vizsgálata *Rhodococcus* törzsekkel. ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszék. Budapest. Doktori értekezés.
- PETHŐ ÁGNES (2008): Nemzetközi egyezmény. A Stockholmi egyezmény áttekintése. *Növényvédelem*. 44 (10). 512-515. p.

- PILKINGTON, H., MARGARITIS, A., MENSOUR, N., RUSSEL, I. (1998): Fundamentals of immobilised yeast cells for continuous beer fermentation: A review. *Journal of the Institute of Brewing*. 104 (1) 19-31. p.
- QUAN, X., HANCHANG, S., HONG, L., WANG, J., QIAN, Y. (2004): Removal of 2,4-dichlorophenol in a conventional activated sludge system through bioaugmentation. *Process Biochemistry*, 39 (11) 1701-1707. p.
- RÁDY M. (1982): Növényvédelmi kémia. (szerk.: Fülek Gy.) GATE. Gödöllő. 269-275. p.
- RAKICS R. (2000): Adatok hazánk környezeti állapotáról. Környezetvédelmi Minisztérium. Budapest.
- RICHARDS, R. P., KRAMER, J. W., BAKER, D. B., KRIEGER, K. A. (1987): Pesticides in rainwater in the northeastern United States. *Nature*. vol. 327. 129-131. p.
- ROBERGE, M., HAKK, H., LARSEN, G. (2004): Atrazine is a competitive inhibitor of phosphodiesterase but does not affect the estrogen receptor. *Toxicology Letters*. 154. (2004) 61–68.
- ROUSSEAU, S., HARTMANN, A., SOULAS, G. (2001) Isolation and characterization of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soil. *FEMS Microbiological Letters*. 36:2-3, 211-222.
- SANDERSON, J.T., LETCHER, R.J., HENEWEER, M., GIESY, J.P., VAN DEN BERG, M. (2001): Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. *Environmental Health Perspectives*. 109, 1027–1031. p.
- SHEN, F. T., LU, H. L., LIN, J. L., HUANG, W. S., ARUN, A. B., YOUNG, C. C. (2006): Phylogenetic analysis of members of the metabolically diverse genus *Gordonia* based on proteins encoding the gyrB gene. *Research in Microbiology*. 157, 367-375.
- SILVA, J. A., TOBELLA, L. M., BECERRA, J., GODOY, F., MARTINEZ, M. A. (2007): Biosynthesis of polybeta-hydroxyalkanoate by *Brevundimonas vesicularis* LMG P-23615 and *Sphingopyxis macrogoltabida* LMG 17324 using acid-hydrolyzed sawdust as carbon source. *Journal of bioscience and bioengineering*. 103(6):542-6.
- SIMON F., LACZAY P. (1993): Állatorvosi toxikológia II. Budapest. 252-255. p.
- SMIDT, H., DE VOS, W. (2004): Anaerobic microbial dehalogenation, *Annual Review of Microbiology* 58(1), 43–73.
- STAMER, K. J., GUNDERSON, K. D., RYAN, J. B. (1995): Atrazine Concentrations in the Delaware River. USGS Fact Sheet. 001-94.
- SWAN, S. H., KRUSE, R. L., LIU, F., BARR, D. B., DROBNIS, E. Z., REDMON, J. B., WANG, C., BRAZIL, C., OVERSTREET, J. W. (2003): Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure. *Environ Health Perspect.* vol. 111. 1478–1484. p.
- SZABÓ I., SZOBOSZLAY S., KRISZT B., HÁHN J., HARKAI P., BAKA E., TÁNCICS A., KASZAB E., PRIVLER Z., KUKOLYA J. (2011): *Olivibacter oleidegradans* sp. nov. hydrocarbon degrading strain isolated from a clean-up facility (biofilter) set up on a Hungarian hydrocarbon contaminated site. *International Union of Microbiological Societies*. In Press, DOI: 10.1099/ijs.0.026641-0. (IF: 2,113).

SZOBOSZLAY S., KRISZT B., (2010): Környezeti elemek védelme. Szent István Egyetemi Kiadó. Gödöllő. Egyetemi jegyzet. 107. p.

SZOBOSZLAY S., SOLYMOSI J., KRISZT B. (2002): The biodegradation of hydrocarbon compounds concerning to environmental safety. Academic and Applied Research in Military Science 1(1): 103-106.

TAKEUCHI, M., HATANO, K. (1998) Union of the genera *Microbacterium* Orla-Jensen and *Aureobacterium* Collins et al. in a redefined genus *Microbacterium*. Int. J. Syst.Bacteriol. 48: 739-747.

TOWNER, K. (2006): The Genus *Acinetobacter*. Prokaryotes 6:746–758. p.

UHLICH, T., ULBRICHT, M., TOMASCHEWSKI G. (1996): Immobilization of enzymes in photochemically cross-linked polyvinyl alcohol. Enzyme and Microbial Technology. 19:124-131. p.

VANDAMME, P., BERNARDET, J. F., SEGERS, P., KERSTERS, K., HOLMES, B. (1994): New perspectives in the classification of the *Flavobacteria*: description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. International Journal of Systemic Bacteriology. 44 (4) 827–831. p

VASILEVA-TONKOVA E, GALABOVA D, STOIMENOVA E, LALCHEV Z., (2008): Characterization of bacterial isolates from industrial wastewater according to probable modes of hexadecane uptake. Microbiological Research. 163 pp. 481–4866.

VIBBER, L. L., PRESSLER, M. J., COLORES, G. M. (2007): Isolation and characterization of novel atrazine-degrading microorganisms from an agricultural soil. Applied and Environmental Microbiology. vol: 75(4):921-8.

WANG, H., TAN, J. T. T., EMELYANOV, A., KORZH, V., GONG, Z. (2005): Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, *Danio rerio*. Gene 356, 91 – 100. p.

WEBER, W. J. J. & CORSEUIL, H. X. (1994): Inoculation of contaminated subsurface soils with enriched indigenous microbes to enhance bioremediation rates. Water research 28, 1407-1414. p.

WILLAERT, R. G., BARON, G., DE BACKER, L. (1996): Immobilized living cell systems: modelling and experimental methods. Chichester. England: John Wiley & Sons. 1-20. p.

XIAOLI, D., LUSHENG, Z., JINHUA, W., JUN, W., HUI, X., XINXIN, H., WENTAO, J.(2009): Effects of atrazin on cytochrome P450 enzymes of zebrafish (*Danio rerio*). Chemosphere 77. 404-412. p.

YANZE-KONTCHOU, C., GSCHWIND, N. (1994): Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by a *Pseudomonas* strain. Applied and Environmental Microbiology, 60:12, 4297-4302 p.

YOON, J. H., KANG, S. S., CHO, J. G., LEE, S. T., KHO, J. H., KIM, C. J., PARK, J. H. (2000): *Rhodococcus pyridinivorans* sp. nov., a pyridine-degrading bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50, 2173–2180.

ZHANG, R. L., HUANG, G. Q., LIAN J. Y., LI, X. G. (2007): Degradation of MTBE and TEA by a new isolate from MTBE-contaminated soil. Journal of Environmental Sciences. 19 (9) 1120-1124. p.

IARC MONOGRAPHS VOLUME 73, 1990.

KÁRMENTESÍTÉSI KÉZIKÖNYV 4. (2001): Kármentesítési technológiák. Környezetvédelmi Minisztérium. Budapest.

KÁRMENTESÍTÉSI KÉZIKÖNYV 5. (2010): Bioremediáció: biológiai kármentesítési eljárások. Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium. Budapest.

MTA TALAJTANI ÉS AGROKÉMIAI KUTATÓINTÉZET (2003): Szempontok a TIM rendszer aktualizálását megalapozó talajminta vételezés tervezéséhez, tekintettel a POP vegyületek magyarországi előfordulásának és környezeti kockázatának vizsgálatára. Budapest.

INTERNETES HIVATKOZÁSOK

http1: http://www.uni-miskolc.hu/home/web/wwwkoh/www/hun/kemiai_int/kollegak/o_banhidi/k_vedelem_2.pdf

(Letöltés ideje: 2011. 09. 05.)

http2: http://www.bolyai.elte.hu/download/eloadas/szakmai/innov/200720081/esszek/JLTE_Jurecska_L_Turcsan_E_No_venyvedoszer_maradv.pdf (Letöltés ideje: 2011. 08. 12.)

http3: <http://faostat.fao.org/site/424/DesktopDefault.aspx?PageID=424#ancor> (Letöltés ideje: 2011. 09.27.)

http4: http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest82_e.htm (Letöltés ideje: 2012. 01. 15.)

http5: <http://water.epa.gov/drink/contaminants/basicinformation/atrazine.cfm> (Letöltés ideje: 2011. 06. 06.)

http6: <http://enfo.hu/drupal/node/1751> (Letöltés ideje: 2011. 09. 06.)

http7: http://www.westerlike.hu/external/baybio/Alkalmazott_Mikrobiologia/projektek8.html

(Letöltés ideje: 2012. 01.15.)

http8: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/index2.htm> (Letöltés ideje: 2011. 09. 27.)

http9: <http://www.agr.unideb.hu/novved/Oktatas/tantargyaksegedletek/gyom/2ea.pdf>

(Letöltés ideje: 2011. 06. 12.)

http10: <http://www.atrazinelovers.com/m2.html> (Letöltés ideje: 2011. 07. 27.)

http11: http://www.agraroldal.hu/gyomirto-szerek_szotar.html (Letöltés ideje: 2011. 06. 12.)

http12: http://honlapom.com/fajlok/atrazinavizben/atrazin_korul_www.honlapom.com_.pdf

(Letöltés ideje: 2011. 08. 05.)

http13: http://www.kockazatos.hu/kislexikon/letter_1 (Letöltés ideje: 2011. 06. 19.)

http14: http://www.eoearth.org/article/Atrazine_in_the_environment (Letöltés ideje: 2011. 09. 06.)

http15: members.iif.hu/rad8012/kozegyfiz/14atomm.doc (Letöltés ideje: 2011. 09.27.)

http16: <http://www.kvvm.hu/szakmai/karmentes/kiadvanyok/karmfuzet2/karmfuzet2-2.htm>

(Letöltés ideje: 2011. 09. 27.)

http17: http://water.usgs.gov/nawqa/home_maps/atrazine_gw.html (Letöltés ideje: 2011. 09. 27.)

http18: <http://www.fao.org/DOCREP/003/X2570E/X2570E07.htm> (Letöltés ideje: 2011. 09. 27.)

http19: <http://ks.water.usgs.gov/pubs/reports/wrir.99-4018B.toxicss2.pdf> (Letöltés ideje: 2011. 09. 06.)

http20: www.ara.bme.hu/oktatas/letolt/technologiak.doc (Letöltés ideje: 2011. 07. 12.)

http21: http://www.asko.uni-miskolc.hu/~askmf/hpage/oktat/asv5/krist_kemia.pdf (Letöltés ideje: 2011. 09. 06.)

http22: <http://dc255.4shared.com/doc/nk2VrWha/preview.html> (Letöltés ideje: 2011. 09. 06.)

9. MELLÉKLETEK

1. számú melléklet - PVA hordozó optimalizálásának tömeg- és átmérő értékei

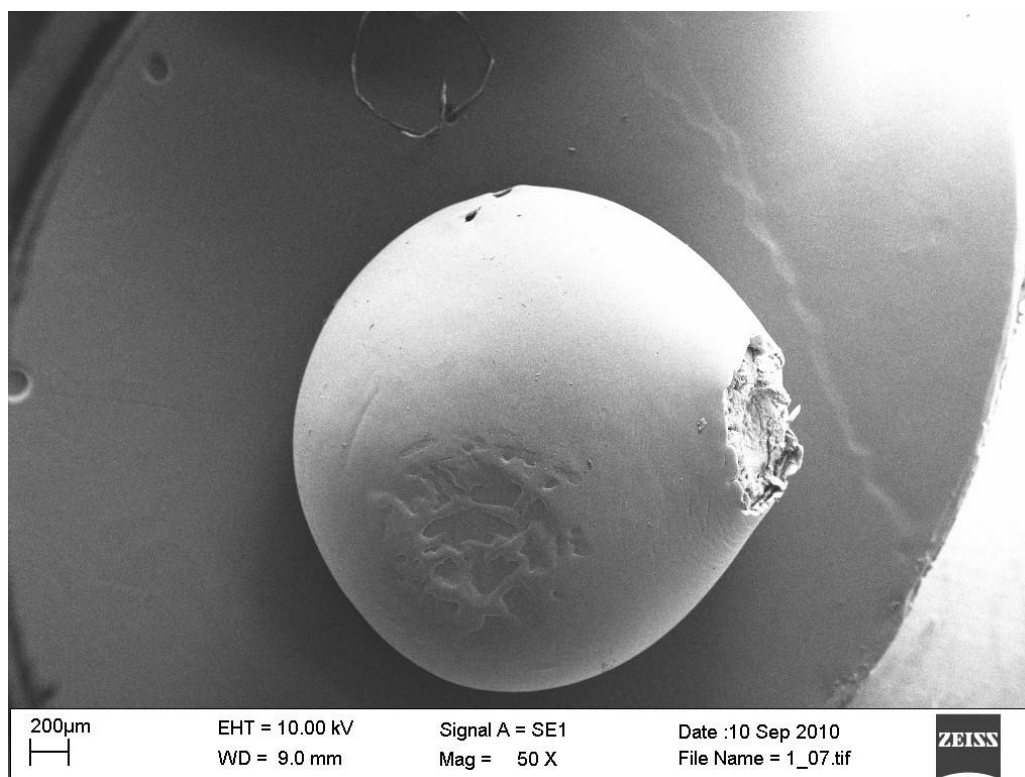
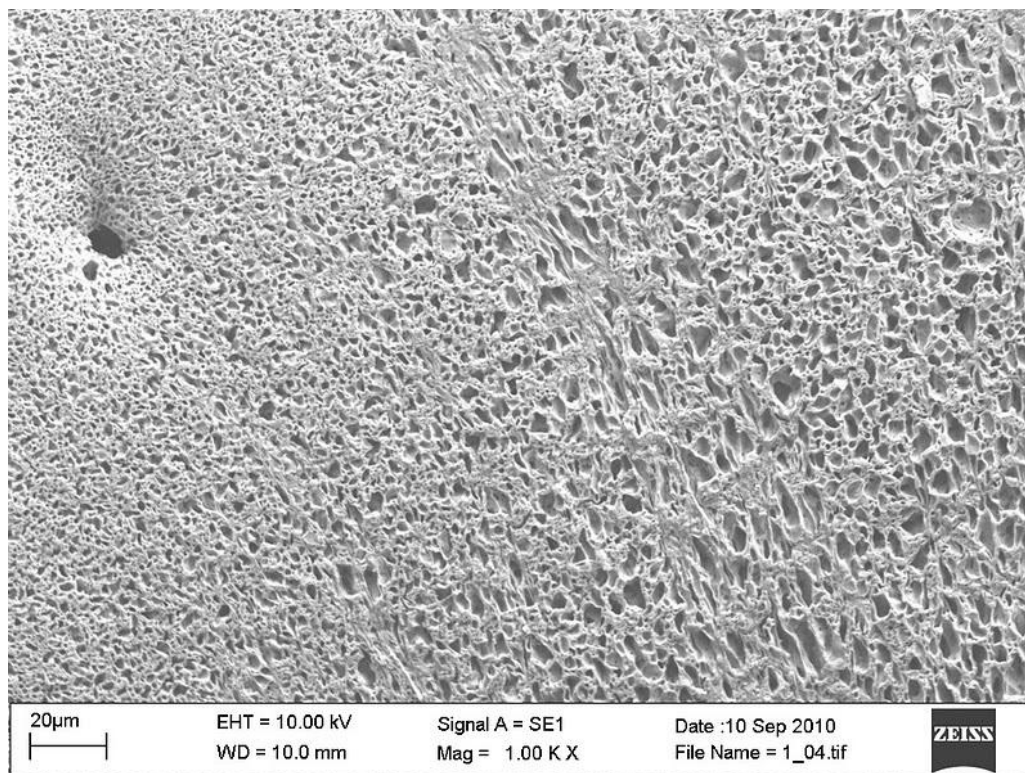
PVA típusa	50 darab gyöngy nedves tömege		
	Kiindulási tömeg (g)	7. napon tömeg (g)	%-os változás a kiindulási mérethez képest
6-98	1,1987	---	---
10-98	1,3858	1,7224	19,54
89-98	2,3974	2,6945	11,03
20-98	3,4128	4,37	21,9

A stabilitási vizsgálatba vont 50 db gyöngy átlagos tömege a 0.órás kiindulási és a 7. napon, illetve a változás %-ban a kiindulási tömeghez képest

PVA típusa	1 darab nedves gyöngy átlagos átmérője (50 db átlagos átmérőjéből számolva)		
	Kiindulás átmérő (mm)	7.napon átmérő (mm)	%-os változás a kiindulási mérethez képest
6-98	3,22	---	---
10-98	3,46	3,78	8,47
89-98	4,04	4,2	3,81
20-98	4,34	4,84	10,33

A stabilitási vizsgálatba vont 50 db gyöngy átlagos átmérőjéből visszszámolt értékek egy gyöngyre vetítve a kiindulási és 7. napon, valamint a %-os változás a kiindulási átmérőhöz képest.

2. számú melléklet - A gyöngyökről készült elektronmikroszkópos felvételek



3. számú melléklet – A PVA gyöngyök előállításának folyamata

A PVA és nátrium-alginát elkeverése desztillált vízben (bal oldal), majd oldódásig történő melegítése (jobb oldal)



A gyöngyök kicsöpögtetése, illetve szilárdítása koaguláló oldat alkalmazásával



10. NYILATKOZAT

Alulírott, a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Környezet- és Tájgazdálkodási Intézetének végzős hallgatója nyilatkozom, hogy a dolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem.

A diplomadolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem.

Gödöllő, 20..... hó.....nap

.....

hallgató aláírása

A dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy a dolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmak korrekt kezelésének követelményeiről jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A diplomadolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem.

Gödöllő, 20..... hó.....nap

.....

konzulens aláírása