

Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Környezet és Tájgazdálkodási Intézet
Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék

SZENNYEZETT TERÜLETEKRŐL SZÁRMAZÓ MIKROSZERVEZETEK PAH BONTÓ
KÉPESSÉGÉNEK VIZSGÁLATA

Készítette: Kozár Szabolcs
Évfolyam: Környezetgazdálkodási Agrármérnök IV. évfolyam

Belső konzulens: Dr. Szabó István
Beosztása: Egyetemi tanársegéd

Gödöllő
2012

Tartalom

1	Bevezetés	3
1.1	Célkitűzések	4
2	Irodalmi áttekintés	5
2.1	Szénhidrogének, mint szennyezőanyagok	5
2.2	TPH (összes alifás szénhidrogén).....	7
2.3	Aromás szénhidrogének	7
2.3.1	BTEX vegyületek (benzol- és alkilbenzolok).....	7
2.3.2	PAH vegyületek- Policiklikus aromás szénhidrogének.....	9
2.4	Szénhidrogének biológiai lebonthatósága	10
2.4.1	Mineralizáció.....	11
2.4.2	Részleges biodegradáció.....	11
2.4.3	Alifás szénhidrogének és PAH vegyületek biodegradációja	12
2.5	Kármentesítési technológiák.....	13
2.5.1	Biodegradációs eljárások.....	13
2.6	Baktériumtörzsek faj szintű identifikációja	16
3	Anyag és Módszer	17
3.1	A kísérleti rendszerekben alkalmazott mikroszervezetek:.....	18
3.2	Gravimetria.....	18
3.3	PAH vegyületek bontására alkalmas mikroszervezetek keresése.....	20
3.4	Együtt szaporíthatóság vizsgálata.....	21
3.4.1	PAH vegyületek bontására alkalmas törzskeverék.....	21
3.5	PAH bontás igazolása szennyezett területről származó talajmintán (OxiTop talajrespirációs vizsgálat).....	22
4	Eredmények és értékelések.....	24
4.1	Együtt szaporítási vizsgálatok	26
4.2	PAH bontási kísérlet eredményei	27
4.2.1	PAH bontás individuális törzsekkel.....	27
4.3	Az OxiTop talajrespirációs vizsgálat eredményei	28
5	Következtetések és Javaslatok.....	34
6	Összefoglalás.....	37
7	Köszönetnyilvánítás	38
8	Irodalomjegyzék	39
9	Mellékletek	41

1 Bevezetés

Napjainkban a legnagyobb mennyiségben és legsokoldalúbban felhasznált fosszilis energiahordozók a szénhidrogének, illetve a kőolaj és származékai. Leggyakrabban üzemanyagként és műanyagok alapanyagaként hasznosítják, de nagy mennyiségben alkalmazzák oldószerként, peszticidek előállítására, illetve a gyógyszergyártás során is. Kőolajszármazékok feldolgozása, szállítása, tárolása, és használata során bekövetkező hibák, emberi mulasztások, haváriák révén az általuk okozott szennyezések megjelenésével mindenhol számolni kell. Ennek következtében elengedhetetlen az ilyen jellegű, szennyezett területek minél teljesebb körű kármentesítése, a szennyeződés kockázatának megszüntetése.

A kőolajszármazékok sokféle, egymástól különböző szénhidrogén vegyületből épülnek fel (főként szénhidrogének, valamint ezek oxigén-, kén-, halogén és nitrogéntartalmú származékai), melyek némelyike karcinogén, teratogén, illetve mutagén hatású lehet az emberi szervezetre nézve (egészségkockázat). Az ilyen jellegű vegyületek lebomlása természetes körülmények között, viszonylag lassan megy végbe. Kőolajszármazékok környezeti kockázatát ezen felül fokozza azok kémiai tulajdonságai, ugyanis mind a vizet, mind pedig a levegőt kiszorítják a talaj kapillárisaiból, ezzel valamint egyéb toxikológiai tulajdonságaikkal, a talajlakó (főként aerob) mikroorganizmusok (és egyéb élőlények) élettani folyamatait is gátolják. Ezáltal megváltoztatják a természetes talajközösségek összetételét, befolyásolják annak diverzitását.

Az ilyen szennyezések felszámolására, az egyik lehetséges, és leginkább természet közeli módszer a szennyezett közegek biológiai tisztítása (bioremediáció). Az Amerikai Környezetvédelmi Hivatal (EPA - Environmental Protection Agency) minden olyan esetben amelyben csak lehetséges, a biológiai módszerek alkalmazását részesíti előnyben az egyéb eljárásokkal szemben.

Szakmai gyakorlatom során – melyet egy gödöllői székhelyű környezetvédelmi vállalkozásnál, valamint a Szent István Egyetem Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszékén töltöttem – lehetőségem nyílt bekapcsolódni a kőolajszármazékokon belül a poliaromás szénhidrogének (PAH-ok) biológiai lebonthatóságának vizsgálatával foglalkozó kísérletsorozatba. Ennek során betekintést nyerhettem a biodegradációs eljárások gyakorlati alkalmazásába, mind terepi, mind pedig laboratóriumi körülmények között. Ez a kísérletsorozat determinálta dolgozatom alábbi fejezetében lévő célkitűzéseimet.

1.1 Célkitűzések

Munkám célja olyan mikroszervezetek keresése volt, melyek okszerűen alkalmazhatóak poliaromás szénhidrogének (PAH vegyületek) biológiai lebontására. Ennek érdekében olyan törzsgyűjteményből származó mikroszervezetekkel végeztem bontási kísérleteket, amelyeket korábban szénhidrogénekkel (TPH, BTEX, PAH) szennyezett területekről izoláltak. Dolgozatom lényegi célja olyan törzspárok kialakítása (laboratóriumi vizsgálatokkal alátámasztva), melyek hatékonyan képesek ilyen szénhidrogének degradálására.

2 Irodalmi áttekintés

A hazai jogalkotásban először a környezetvédelemmel az 1995.évi LVIII. törvény foglalkozott, mely a környezet védelmének általános szabályait, az alapvető fogalmakat, a környezeti elemek, és épített környezet védelmének alapelveit határozta meg. A földtani közeg és felszín alatti víz vonatkozásában az egyes határértékek definícióját, a 219/2004 (VII.21.) Kormány rendelet határozza meg, mely szerint a (B) szennyezettségi határérték olyan, jogszabályban meghatározott szennyezőanyag koncentráció, melynek elérésekor a felszín alatti víz, illetve a földtani közeg szennyezettnek minősül. A környezetvédelmi szempontból kockázatosnak minősített elemek, vegyületek listáját a jelenleg hatályos, a földtani közeg és felszín alatti víz szennyezéssel szembeni védelméhez szükséges határértékekről és szennyezések méréséről szóló 6/2009 (IV.14.) KvVm-EüM-FVM együttes rendelet tartalmazza. A rendelet 1. számú melléklete a földtani közegre, a 2. számú melléklete a felszín alatti vízre vonatkozóan adja meg az egyes anyagcsoportok, illetve anyagok (B) szennyezettségi határértékeit.

Dolgozatom irodalmi áttekintésében bemutatásra kerülnek az egyes szénhidrogén szennyező anyagok, ezen belül is főként a célzott policiklikus aromás szénhidrogének (PAH-ok), melyeknek biológiai úton történő lebonthatóságát vizsgáltam.

2.1 Szénhidrogének, mint szennyezőanyagok

A kőolaj szerves eredetű ásvány, amely a ma elfogadott elmélet szerint tengeri élőlények maradványaiból keletkezett. Az elpusztult élőlények felhalmozódtak az üledékes kőzetekben, ahol oxigéntől elzárt közegben a szerves alkotórészeik bomlást szenvedtek (Furka, 1998).

Kémiaiilag a nyersolaj különböző szerves vegyületek elegye, amely több ezer telített (egyszeres-), illetve telítetlen (többszörös kovalens kötésekkel rendelkező) szénhidrogén komponenseket tartalmaz. Ezen vegyületek összetétele tag határok között mozog: 81-87% szén, 10-14% hidrogén, 0-7% oxigén, 0-7% kén, 0-2% nitrogén. A kőolajat alkotó szénhidrogének lehetnek különböző szerkezetű, és molekulatömegű nyílt szénláncú (alifás), ezen belül egyenes szénláncú, normál (n-) paraffinok, elágazó szénláncú izo (i-) paraffinok, gyűrűs szénláncú (aliciklikus), ciklo(c-) paraffinok, valamint aromás gyűrűt tartalmazó, illetve ezen kívül több aromás gyűrű kapcsolatából létrejövő poliaromás szerkezetűek. Az összetételük, valamint a bennük legnagyobb mennyiségben előforduló szénhidrogén típusok alapján három csoportra oszthatóak, úgymint paraffin bázisú (főleg nyílt láncú, alifás szénhidrogének alkotják), naftén bázisú (főként aromás, illetve poliaromás szénhidrogéneket tartalmaz), valamint átmeneti bázisú kőolajokat (Bruckner, 1952; Furka, 1998;

Breuer, 2003). A kőolaj feldolgozása (finomítása) desztilláló berendezésben történik (kolonna), ezekben a rendszerekben frakcionált desztilláció segítségével, a forráspont különbséget kihasználva választják szét az elegyet. Folyamat eredményeként nyerik a nyersbenzint (C_4 - C_{10}), a kerozint (C_9 - C_{16}), a gázolajat (C_{15} - C_{25}), valamint további desztillálással nehéz fűtőolajat, nyers kenőolajokat, és szilárd maradékként az aszfaltot (Kovács-Halmos, 1976; Furka, 1998).

A szénatomszám általában információt ad a szénhidrogén vegyületek tulajdonságairól. Normál viszonyok között a C_1 - C_4 atomszámig gázok, C_5 - C_{17} folyadékok e felettiek szilárdak. Ennek megfelelően a forráspont, az olvadáspont, valamint a sűrűség is növekszik az atomszám növekedésével, valamint meghatározzák egyéb tulajdonságaikat is, úgy mint:

- Tenzió (gőznyomás): Egyes szénhidrogének, benzin, kerozin szabad levegőn könnyen párolognak, dízel olaj, valamint könnyű fűtőolajok lassabban, ezzel szemben magas forráspontú anyagok szinte minimálisan.

- Viskozitás: Forráspont függvényében változó érték. Magas forráspontú vegyületek viszkozitása nagy, lassabban terjednek, mozognak, mint az alacsony forráspontúak. Hőmérséklet növekedésével csökken a viszkozitás.

- Vízoldhatóság: A különböző eredetű kőolajok eltérő kémiai karakterükből adódóan más és más mértékben oldódnak vízben. A szénhidrogének közül a paraffinok oldódnak legkevésbé, míg az aromás vegyületeket tartalmazók leginkább (Barótfi, 2000).

Szénhidrogének, mint szennyezőanyagok a földtani közegbe, valamint a felszín alatti vizekbe kőolaj származékok és a fenti termékek formájában juthatnak mesterséges úton. Fenti tulajdonságaik meghatározzák a ezek környezetben való viselkedésüket. Ezeken felül számos más tényezővel kell számolni, amennyiben szénhidrogének bekerülnek a földtani közegbe, illetve felszín alatti vizekbe.

- Az illékony komponensek a levegő oxigénjével elegyedve tűz- és robbanásveszélyt eredményezhetnek.

- Bőrön, nyálkahártyán, tüdőn keresztül is felszívódhatnak, irritáló, toxikus hatásúak lehetnek

- Bizonyos (alifás, BTEX, PAH) vegyületek mutagén (genetikai károsodást), teratogén (fejlődési rendellenességet), illetve karcinogén (daganatképző) hatásúak lehetnek.

- Apoláros jellegüknél fogva kiszorítják a vizet, levegőt a talaj kapillárisaiból, így a biodegradációs öntisztulási folyamatokat gátolják (Szoboszlai-Kriszt, 2005).

A következőkben az egyes szénhidrogén típusokat, úgymint alifás (nyílt láncú), valamint aromás (BTEX, PAH) vegyületek tulajdonságait mutatom be részletesen. A szennyezőanyagok bemutatásában a kémiai szerkezetet szem előtt tartó környezetvédelmi csoportosítást követem a

6/2009. együttes rendeletnek megfelelően. Ez alapján megkülönböztetünk alifás (nyílt láncú), BTEX (benzol és alkilbenzolok), valamint policiklikus aromás szénhidrogén (PAH) vegyületeket.

2.2 TPH (összes alifás szénhidrogén)

A nemzetközi környezetvédelemben a minden olyan kőolaj eredetű szénhidrogén vegyület amely C_5 - C_{40} atomszámban kimutatható TPH (Total Petrol Hydrocarbon) nevezéssel illet. Ezzel szemben a hazai jogszabályokban csak az olyan alifás (nyílt láncú) szénhidrogének tartoznak ebbe a csoportba, amelyek szénatomszáma C_5 - C_{40} terjed.

Kőolajokban, kőolajszármazékokban megtalálhatóak. Gyakorlatilag bárhol a környezeti elemekbe kerülhetnek ahol olajkitermeléssel, -szállítással, -feldolgozással foglalkoznak. Minden alifás szénhidrogént a TPH vegyületek közé sorolunk, függetlenül attól, hogy azok telítettek, telítetlenek, illetve ezen belül normál, elágazást tartalmazó, vagy és gyűrűs szénláncúak. A TPH vegyületeken belül megkülönböztetünk VPH (Volatile Petrol Hydrocarbons) vegyületeket, amelyek C_5 - C_{10} számúak (nagy arányban a benzinben, kerozinban, gázolinban) találhatóak, valamint EPH (Extractable Petrol Hydrocarbons), melyek nem, vagy kevésbé illékonyak (gázolajok, fűtőolajok kenőolajok) (Szoboszlai-Kriszt, 2005).

2.3 Aromás szénhidrogének

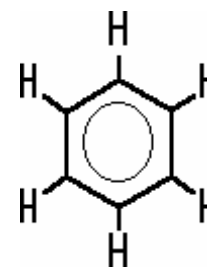
Az „aromás” elnevezés régi keletű, azon szénvegyületek eredetére utal, melyek kellemes illatú növényi aromájú termékekből nyerhetőek (Bruckner, 1955). Lehetnek homo-, vagy heterociklikus szénhidrogének. Telítetlen, gyűrűs szerkezetűek, ahol a szénatomok váltakozva, egyes és kettős kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz, konjugált gyűrűs szerkezetet hozva létre. Legegyszerűbb képviselőjük a benzol (Kovács-Halmos, 1976; Breuer, 2003).

2.3.1 BTEX vegyületek (benzol- és alkilbenzolok)

Ide tartoznak azok az illékony monoaromás vegyületek, melyek közül a legjelentősebbek a csoport névadói (benzol, toluol, etil-benzol, xilol). A csoportba egyedei a benzol mellett tehát azok az alkil benzolok, melyek esetében az aromás gyűrű hidrogén atomját egy, vagy több alkil csoport helyettesíti. Felhasználják őket oldószerként (olajok, festékek, gyanták, lakkok), valamint gyógyszer előállításában is.

Benzol

Szintelen, jellegzetes szagú folyadék, mely vízben kevésbé (1,8 g/l) oldódik, azonban a legtöbb szerves oldószerrel korlátlanul elegyedik. Olvadáspontja $5,5^{\circ}\text{C}$, forráspontja $80,2^{\circ}\text{C}$. Szerkezetét tekintve hat szénatom szerkezetű gyűrűt alkot.



1. ábra Benzol gyűrű

A vegyületet alkotó szénatomok síkban, egy szabályos hatszög csúcsain helyezkednek el. A szénatomokhoz kapcsolódó hidrogének is ugyanebben a síkban találhatóak, valamint azok elrendezése is szabályos hatszög alakzatot mutat (1. ábra). Környezeti, valamint humán-egészségügyi szempontból kiemelkedő a benzol szerepe, ugyanis ez emberben bizonyítottan rákkeltő hatású. A benzolt leginkább az ólommentes benzin adalékanyagaként használják 1 térfogatszázalékban. Megemlítendő, hogy 1 liter benzinben lévő benzol mennyiséggel kb. 8 millió liter vizet elszennyezni, hogy annak „B” szennyezettségi határértékét elérje (Szoboszlai-Kriszt, 2005; [http1](#); Berecz, 1991).

Toluol

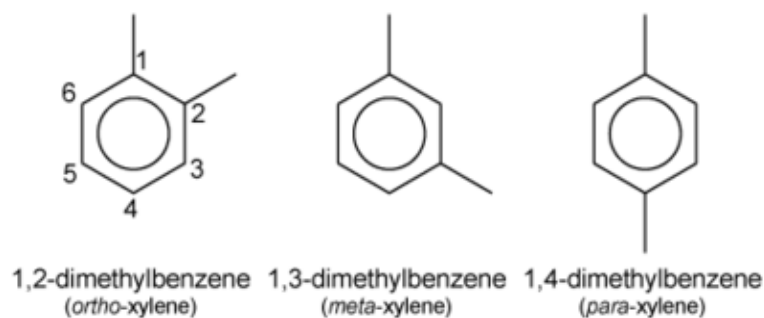
Szintelen, kormozó lánggal égő, aromás szagú vegyület. Olvadáspontja $-97,7^{\circ}\text{C}$, forráspontja $110,8^{\circ}\text{C}$. Kémiai szerkezete szerint egy benzol gyűrűből, és egy ahhoz kapcsolódó metil csoportból ($-\text{CH}_3$) áll. Megtalálható kőszénkátrányban, de elsősorban benzinformálásnál állítják elő. Vízen kevésbé, ($0,52\text{ g/l}$) oldódik, szerves oldószerekben azonban oldódása jó (Furka, 1998).

Etil-benzol

Szintelen, benzolra emlékeztető szagú folyadék. Olvadáspontja $-92,8^{\circ}\text{C}$, forráspontja $188,5^{\circ}\text{C}$, vízben kevésbé oldódik ($<1\text{ g/l}$). Kémiai szerkezetét tekintve benzolgyűrűből, és az ahhoz kapcsolódó etil csoportból ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$) áll. A sztírol gyártásának alapanyaga, mely során az alapmolekulát dehidrogénezik (hidrogént vonnak el). A sztírolt az iparban nagy mennyiségben alkalmazzák kiindulási anyagként poliszztírol előállítására. Emellett az etil-benzol köztes termék számos más szerves vegyület előállításánál (Furka, 1998).

Xilolok

Szintelen, aromás szagú folyékony, kormozó lánggal égő vegyületek. Olvadáspontjaik $-29\text{-}13^{\circ}\text{C}$ között, míg forráspontjai $135,5\text{-}145,9^{\circ}\text{C}$ között mozognak. Kis részük kőolajkátrányból, jelentős hányaduk benzinformálásból származik. Nagyon jól alkalmazhatóak szerves oldószerként. Kémiai szerkezetüket tekintve dimetil-benzolok (benzolgyűrű, és két hozzá kapcsolt metil-csoport). A metil-csoportok elhelyezkedése szerint beszélhetünk meta-, orto-, és para-xilolról (2. ábra). Az m-xilol felhasználása a legcsekélyebb, míg az o-, és p-xilolt a műanyagipari alapanyagként használják (Furka, 1998).



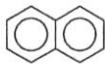
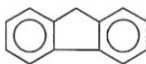
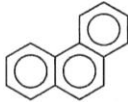
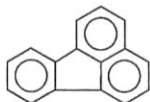
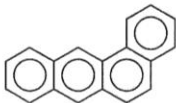
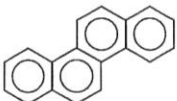
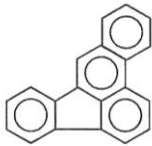
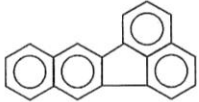
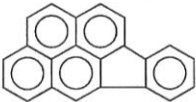
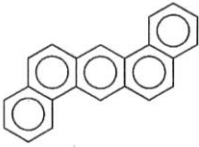
2. ábra Xilolok

2.3.2 PAH vegyületek- Policiklikus aromás szénhidrogének

A csoport neve policiklikus szénhidrogének (poliaromás szénhidrogének), az angol rövidítéséből (polycyclic aromatic hydrocarbons) származik. Közel 200 féle anyag tartozik ebbe a csoportba. Kondenzált aromás vegyületek, kettő, vagy több benzolgyűrű kapcsolódásából épülnek fel és a két gyűrűs a naftalinok (naftalin, 1-metil naftalin, 2-metil naftalin) kivételével nem illékonyak. A fontosabb vegyületeket a 3. ábra mutatja be. A hosszú szénláncú alifás szénhidrogénekhez hasonlóan a PAH vegyületek hidrofóbok, szerves oldószerekben könnyen oldódnak, vízben kevésbé.

Poliaromás szénhidrogének növényi, állati szervezetek bomlásakor, kőolaj képződésekor, szerves anyagok magas hőfokon történő tökéletlen égése során keletkeznek, így gyakorlatilag jelentős mennyiségű PAH vegyületet tartalmaz a korom, a kátrány, a szurok petróleum, a kőolaj és a dízelmotorok kipufogó gázai.

Egyes vegyületek ezek közül a perzisztens szerves szennyezők (POP vegyületek „Persistent Organic Pollutants”) közé sorolhatóak. Ezek az anyagok rendkívül nehezen bomlanak le a környezetben, továbbá jellemző rájuk az erős toxicitás, valamint bioakkumulációs (élő szervezetekben történő felhalmozódás) készség. Eddig bizonyítottan hét vegyületről bizonyosodott be humán karcinogén hatás [benzo(a)pirén, benzo(a)antracén, dibenzo(a,h)antracén, benzo(g,h,i)perilén, benzo(e)pirén, 2-metil-krizén, krizén] (Szoboszlai-Kriszt, 2005; Anton et al., 2010; [http2](#); [http3](#)).

 32 mg/L 1,145g/cm ³ naftalin*	 acenaftilén	 acenaftén
 fluorén	 fenantrén	 antracén
 2,6*10 ⁻¹ mg/L fluorantén	 pirén	 benz (a) antracén RK
 1,27 g/cm ³ krizén RK	 2,4*10 ⁻³ mg/L benz (b) fluorantén RK	 benz (k) fluorantén RK
 1,3*10 ⁻³ mg/L 1,35 g/cm ³ benz (a) pirén RK	 indenol (1,2,3-c,d) pirén RK	 dibenz (a,h) antracén RK
 benz (a) pirén	 7*10 ⁻⁴ mg/L benz (g,h,i) perilén	[mg/L] = vízdoldhatóság [g/cm ³] = sűrűség RK = RÁKKELTŐ

3. ábra PAH vegyületek (Feltüntetve az ábrákon: vízdoldékonyság, sűrűség) (Szoboszlai-Kriszt, 2005)

2.4 Szénhidrogének biológiai lebonthatósága

Az 1960-as évek óta kutatási cél a mikroorganizmusoknak azon tulajdonságainak vizsgálata, mely a környezetbe kerülő xenobiotikumokat az emberre ártalmatlan végtermékké képesek átalakítani (Anton, 2010). Ez a folyamat természetes körülmények között is lezajlik, de egyes szennyezőanyagok lebonthatósága annyira korlátozott, hogy emberi beavatkozás nélkül a szennyezés mértéke nem csökken, ezáltal tartós szennyezés alakul ki az adott területen.

A biológiai lebomlás (biodegradáció) a mikroorganizmusok által végzett biológiai-biokémiai folyamatokon keresztül megvalósuló lebontási (katabolikus), illetve átalakítási (transzformációs) folyamatok összessége, melyeket a mikroorganizmusok végeznek enzimeik segítségével. Ezen képességüket kihasználva lehetőség nyílik arra, hogy mesterségesen a környezetbe kerülő szennyezőanyagokat ártalmatlanítsuk. A biodegradáció lehet teljes (mineralizáció), illetve részleges (Anton et al., 2010; Pesti et al., 2001; Szoboszlai-Kriszt, 2005).

2.4.1 Mineralizáció

Mineralizációnak vagy ásványosodásnak a teljes lebontási folyamatot nevezzük, mely során a mikroorganizmusok olyan természetes katalizátorokat, enzimeket termelnek, melyek a szerves vegyületeket (így akár a szennyezőanyagokat) széndioxid (CO_2), metán (CH_4), víz (H_2O) és szervesetlen sók keletkezése mellett bontják le. A folyamat célja, hogy a mikroorganizmusok anyagcsere-folyamataikhoz, új sejtek felépítéséhez szükséges építőelemeket és energiát nyerjenek. A bioszintézis anabolikus reakciói kapcsolják össze az építőelemeket, eközben energiát, elektron donorokat és elektron akceptorokat használnak fel. Aerob körülmények között a végső elektronakceptor a levegő oxigénje, anaerob feltételek mellett alternatív elektron akceptorként Fe^{3+} ionok, szén-dioxid, nitrát, szulfát szolgál (Anton et al., 2010).

2.4.2 Részleges biodegradáció

Részleges biodegradáció következhet be olyan esetekben, melyek során a lebontást, átalakítást végző mikroszervezetek számára nem optimálisak a körülmények. Ezek adódhatnak az elektron akceptotrok, a víz, vagy a nyomelemek hiányából. Előfordulhat, hogy a lebontást végző mikroszervezetek élettani tulajdonságaik alapján nem képesek teljes mértékben degradálni az adott szennyező anyagokat.

A részleges biodegradációnak három típusa ismert:

- kometabolizmus (kooxidáció)
- átalakítást végző enzimek hiánya
- polimerizáció

Az első típus a kooxidáció, amely során a kiindulási vegyület részleges, néha teljes oxidációja lezajlik, de a lebontást végző mikroszervezetek a folyamatból származó energiát nem használják fel. Kometabolizmus során a szennyezőanyag a mikroorganizmus számára nem szolgál tápanyagul, azonban más, hasznosítható szubsztrát jelenlétében annak átalakulásával egybekötve zajlik a

szennyezőanyag biotranszformációja, valamint a szennyező anyagok transzformációját (átalakítását) teszi lehetővé, ásványosítását (mineralizációját) nem, azonban része lehet a folyamatának, amennyiben a szennyező anyagok kometabolikus átalakításakor keletkező anyagok, tápanyagul szolgálnak más lebontó szervezetek számára.

A második típus, során a lebontást, átalakítást végző enzimek közül valamelyik hiányzik, ezért a folyamat megreked egy köztes termékénél, vegyületénél. A lebontási folyamatból származó energiát a mikroszervezet hasznosítja.

A harmadik típusába azok a folyamatok tartoznak, melynek során a hasonló elemek összeépülnek polimerizálódnak, vagyis a szintézis folyamatok révén a kiindulási anyagoknál összetettebb, stabilabb vegyületek keletkeznek.

Enzimkatalizált reakciók során, melynek eredményeként végbemennek a biodegradációs folyamatok, olyan termékek is keletkezhetnek, melyek a kiindulási anyagoknál toxikusabbak lehetnek. Gyakran akkumulálódhatnak, felhalmozódhatnak az átalakítást végző szervezetekben, vagy beépülhetnek a közeg természetes rendszerébe (pl. talaj), annak anyagaiba (pl. humusz). (Anton et al., 2010; Szoboszlay-Kriszt, 2005; Szabó, 1989).

2.4.3 Alifás szénhidrogének és PAH vegyületek biodegradációja

Az alifás szénhidrogének biodegradációja aerob körülmények között viszonylag gyorsan mehet végbe. Lebomlásukat a nyers kőolaj legfőbb alkotói, az n-alkánok példáján keresztül mutatom be. Ezen vegyületek lebomlása aerob körülmények között alkán-monooxygenáz enzimek segítségével a szénlánc általában terminális szénatomjának oxidációjával indul, a reakció eredményeként alkohol keletkezik. Ezt dehidrogenáz enzim aldehiddé, majd zsírsavvá alakítja, a bomlási folyamat tehát az alkán → alkohol → aldehyd → zsírsav útvonalon keresztül megy végbe. A telítetlen, kettős kötést tartalmazó szénhidrogének lebontása oxigén-szegény környezetben különböző szulfát-redukáló és egyéb anaerob baktériumok által történő oxidáció során mehet végbe.

A PAH vegyületeket általában 3 benzolgyűrűig tekintjük jól lebonthatónak, e feletti gyűrűszám esetében a lebonthatóság, vízzoldékonyság, valamint a biológiai hozzáférhetőség csökken. Ennek tulajdonítható, hogy kármentesítés során, a magas atomszámú PAH vegyületek feldúsulnak a közegben. A PAH vegyületek lebomlása, a monoaromás vegyületek lebomlásával megegyező módon megy végbe. Az egyes benzol gyűrűk egymás után bomlanak fel, majd szervesetlen vegyületek képződnek (mineralizáció). A folyamatot a mikroorganizmusok által termelt monooxygenáz, dioxigenáz enzimek katalizálják (Anton et al., 2010; Haritash et al., 2009).

Számos különböző baktérium, valamint gomba csoport tagjai rendelkeznek olyan tulajdonságokkal, mely során szénhidrogén vegyületeket képesek degradálni. Ilyen tulajdonságokkal többek között az

Acinetobacter, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, és gombák közül *Candida*, valamint *Sporobolomyces* fajok rendelkeznek (Atlas, 1981; Anton et al., 2010).

Policiklikus aromás szénhidrogének biológiai lebonthatóságát több kutatási eredményben publikálták. Az egyes eredmények arról számolnak be, hogy antarcén, fluorantén és benzo(a)antracén bontására képesek *Pseudomonas*, *Sphingomonas* fajok (Mrozik et al., 2002; Schneider et al., 1996). Más kutatások során benz(a)pirén-en közel 85%-os bontást értek el *Bacillus subtilis* fajt alkalmazva (Madhuri et al., 2009), de sikeres bontásról számolnak be egyes *Mycobacterium*, *Novosphingobium*, *Arthrobacter* fajok esetében is (Willumsen et al., 2001; Kallimanis et al., 2009; Yuan et al., 2009).

Dolgozatom következő fejezetében bemutatom az egyes kármentesítési technológiákat, külön kiemelve a gyakorlatban leginkább alkalmazott, mikroszervezetek által végzett biodegradációs eljárásokat.

2.5 Kármentesítési technológiák

Napjainkban számos kármentesítési technológia létezik szénhidrogén szennyezők eltávolítására földtani közegből, illetve felszín alatti vízből. Ezeket a módszereket tisztítási elv szerint lehet csoportosítani, úgymint fizikai-kémiai, biológiai, illetve termikus eljárások. A kármentesítési beavatkozás végezhető *in situ*, illetve *ex situ* módszerekkel.

In situ beavatkozásnál a tisztítandó földtani közeget, és/vagy felszín alatti vizet olyan eljárással tisztítják meg a szennyező anyagoktól, amely során a szennyezett közeget nem termelik ki, valamint a tisztított felszín alatti vizet visszanyeletik, szikkasztják a területen belül. Az *ex situ* kezelés létre jöhet *on site*, mikor a kitermelt közeget helyben kezelik, valamint *off site*, mely esetben elszállítják, és kontrollált körülmények között történik a szennyezőanyagoktól való mentesítése (Barótfi, 2000; http5).

2.5.1 Biodegradációs eljárások

Olyan esetekben, melynek során szennyezőanyagok kerülnek a földtani közegbe, valamint felszín alatti vizekbe a biodegradációs eljárások hatékonyan alkalmazhatóak a szennyezőanyagok ártalmatlanítására. Ahogy azt a bevezetésben említettem az Amerikai Környezetvédelmi Ügynökség (EPA, Environmental Protection Agency) minden olyan esetben, amelyben lehetséges, a biodegradációs eljárásokat részesíti előnyben (Szoboszlay et al., 2002). Más eljárásokkal szemben, biológiai módszerek alkalmazása a felszín minimális bolygatásával jár, nagy kiterjedésű területekre is alkalmazhatóak, a talaj élővilágával kíméletesek és a leginkább természet közeli megoldásnak

tekinthetők, valamint a szennyezők a folyamat eredményeként (mineralizáció) veszélytelen anyagokká alakulnak át (szén-dioxid, és víz).

Biodegradációs eljárások tervezése, alkalmazása során a következőket kell figyelembe venni:

- alacsony hőmérsékleten a bontás csökken, leáll
- a mikroszervezetek szennyezőanyag tűrő képessége véges
- a biodegradációs módszerek alkalmazása előtt a szabad fázisban lévő szennyező anyagokat el kell távolítani (anaerob körülmények elkerülése miatt)
- patogén, vagy fakultatív patogén mikroszervezetek felszaporítása, alkalmazása egészségügyi kockázatokkal járhat (Anton et al., 2010; Szoboszlai-Kriszt, 2005)

A biodegradációs eljárásoknak többféle módja is lehetséges, úgymint ellenőrzött- (spontán), stimulált- (irányított) biodegradáció, ezen felül alkalmazhatóak levegőközléses, talajlazításos, valamint tartályos eljárások, továbbá tervezett oltóanyag használata.

- Ellenőrzött (spontán) biodegradáció

A kárhelyen élő mikroszervezetek által végzett természetes lebontási folyamat, annak nyomon követése kémiai analitikai, illetve biológiai monitoringgal. Az eljárás folyamán nincs mesterséges beavatkozás. Hátránya lehet, hogy a degradációs folyamatok lassan mennek végbe, ugyanis nem biztos, hogy az adott mikroszervezetek rendelkeznek olyan enzimrendszerrel, amely a szennyezőanyag teljes spektrumát bontani képes. Ezen felül más tényezők is, úgymint az elektron akceptorok (pl: O_2 , CO_2 , SO_4^{2-} , NO_3^-), és tápanyagok hiánya is (N, P, K) befolyásolhatják ennek az eljárásnak a sikerességét.

- Stimulált (irányított) aerob biodegradáció

Mesterséges beavatkozással felgyorsított kármentesítési eljárás. Az eljárás lényege, hogy a lebontásban részt vevő mikroorganizmusok számára optimális körülményeket teremtünk. Ez oxigén, illetve tápanyagok (szénforrás, nitrogén, kálium, foszfor) pótlásával, kiegészítésével történik. A kármentesítés során patogén, és fakultatív patogén mikroszervezetek is előfordulhatnak, ezért a terület kémiai, és mikrobiológiai monitoringját folyamatosan végezni kell.

- Levegőközléses eljárások:

Az oxigén ellátás javítása érdekében a közegbe perforált csöveken keresztül levegőt, vagy oxigénnel dúsított vizet juttatnak. Az eljárás alkalmas tápanyag, illetve nedvesség utánpótlásra. Amennyiben nem zárt rendszerű a kármentesítési folyamat, illékony szerves szennyezők esetében fennáll annak a veszélye, hogy más közegeket is elszennyezhetünk. Az oxigén-fejlesztő anyagok

adagolása a rendszerbe abban az esetben alkalmazható, amennyiben nincs a mikroszervezetekre gyakorolt toxikus hatása.

- Talajlazításos eljárások:

A közeg lazításával (mélylazítás, forgatás, tárcsázás) biztosítják a lebontáshoz szükséges oxigén mennyiséget, valamint a művelet során adalékanyagokat is juttatnak a szennyezett közegbe, amely általában víz, valamint szerves tápanyagok. *Ex situ* technológia során, az adalékanyagokat kiegészíthetik térfogatnövelő szerves anyagokkal (CNP-műtrágyák), melyeknek segítségével lebontást fokozó C:N arány állítható be. Ezen eljárás esetében is fennállhat a szennyezés-átvezetés másik közegbe, amennyiben a rendszer nem zárt.

- Tartályos eljárások

A szennyezett talajt magas nedvességtartalmú zaggyá szuszpendálják, majd keverik, levegőztetik, így törekedve a minél jobb körülmények megteremtésére. A tisztítás után a szuszpendált talajt víztelenítik. A kitermelt szennyezett talajvizet tartályokban, aerob viszonyok között, a mikroszervezetek felszaporítása érdekében kezelik. Az esetleges károsító anyagokat (kő, kavics, egyéb anyagok) a tartályba helyezés előtt célszerű szelektálni. A tisztított talajnak megváltozik szerkezete, mikrobapopulációja, ezáltal tápanyag-szolgáltató képessége csökkenhet.

- Tervezett oltóanyag használat:

Azokat az eljárásokat soroljuk ebbe a csoportba, melyek faj-szinten identifikált ismert tulajdonságokkal rendelkező mikroszervezeteket alkalmaznak. Az oltás során nagy csíraszámú szuszpenziót juttatnak a szennyezett közegbe. A kijutatott oltóanyagnak az alábbi követelményeknek kell megfelelnie. Csak indentifikált mikroba fajokat tartalmazhat, melyeknek a bontási spektruma korábbi vizsgálatokból ismert. Fontos, hogy a használt oltóanyagnak obligát, és fakultatív patogén mikrobáktól mentesnek kell lennie, ezen kívül ismerni kell a benne lévő mikroszervezetek nehézfém tűrő képességét. Ezen szabályok közé tartozik továbbá, hogy az oltóanyagként használt mikroszervezet letétbe legyen helyezve legalább egy nemzetközi mikrobiológiai törzsgyűjteményben. Hazánkban ilyen a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye (NCAIMB)(Anton et al., 2010; Szoboszlai-Kriszt, 2006,).

Biodegradációs célokra szánt oltóanyagok estében fontos az oltóanyagban megtalálható mikroorganizmusok faj szintű meghatározása, mivel obligát, illetve fakultatív patogén mikroszervezetek nem alkalmazhatóak kármentesítés során.

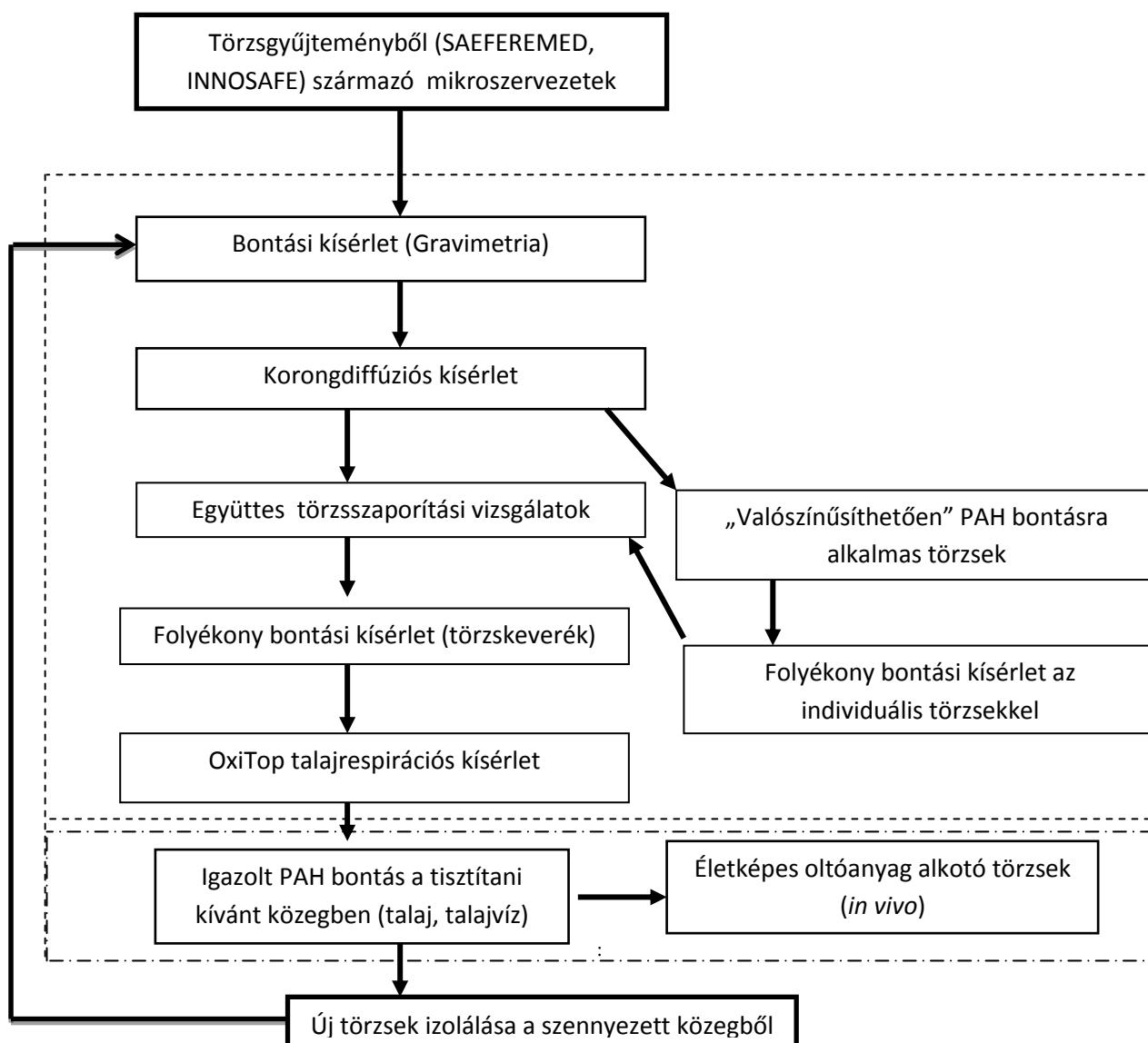
2.6 Baktériumtörzsek faj szintű identifikációja

A bioaugmentáció során alkalmazott baktériumok, mint prokarióták, nem rendelkeznek körülhatárolt sejtmaggal, bennük a DNS molekula általában cirkuláris, szuperhelikális állapotban található. Tartalmazhatnak még további, önálló replikációra képes genetikai elemeket, plazmidokat, melyek kis cirkuláris DNS molekulák; ezek a sejtnak a környezet megváltozása esetén gyorsabb adaptációs és védelmi képességeket is biztosíthatnak (pl. enzimek, toxinok termelése, antibiotikum rezisztencia stb.), illetve sok esetben a degradációs képesség is plazmidokon kódolt. Fontos tulajdonság a riboszómák felépítése és tulajdonságai is, mert a riboszómális RNS-ek lassan változnak és könnyen izolálhatók, mint az őket kódoló rDNS szakaszok is. A riboszómák a fehérjeszintézis színhelyéül szolgálnak, fehérjemolekulákból és riboszómális RNS-ből állnak. Megtalálhatóak a sejthártya belső felszínéhez tapadva, a citoplazmában szabadon, de mRNS láncokkal összekapcsolódva kromoszóma-poliszóma komplexet hozhatnak létre. A citoplazmából centrifugálás útján elválaszthatók ülepedési sebességük alapján. Prokarióták esetében az ülepedési állandó 70S (S = Swedberg féle centrifugális ülepedési állandó), mely két alegységre, a 30S és 50S egységekre bontható. A 30S alegység 21 különböző fehérjéből és egy 16S riboszómális RNS-ből áll. A prokarióta baktériumokban a 16S rDNS kb. 1500 bázispár hosszúságú szakasz, melynek végei a legtöbb baktériumfajban megegyeznek, ezek az ún. konzervált régiók. A konzervált szakaszok közötti variábilis részek azonban már fajonként eltérőek, ezen szakaszok szekvencia sorrendjének összehasonlító vizsgálata alapján lehetővé válik az egyes törzsek faj szintű identifikációja (Szeberényi, 2004). Amennyiben a 16S rDNS szekvencia analízis során egyes törzsek bázissorrendjének hasonlósága 98% feletti, azonos fajokról beszélhetünk (Tindall et al, 2010).

3 Anyag és Módszer

Munkám során olyan mikroszervezetekkel végeztem bontási kísérleteket, melyek szénhidrogénnel szennyezett területekről származtak, ugyanis feltételezésünk szerint szénhidrogénnel szennyezett közegből nagyobb valószínűséggel izolálhatók olyan mikroszervezetek, mely megfelelő bontási potenciállal rendelkeznek. Ezen szervezetek izolálása, identifikációja (16S rDNS szekvencia analízis alapján), valamint humán, és környezetegészségügyi kockázatot jelentő besorolása a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszéken korábban megtörtént.

Ezeket a mikrobákat szintén korábban két tanszéki törzsgyűjteményben (SAFEREMED, INNOSAFE) helyezték el. Ezen törzsgyűjteményi mikroszervezetek bontási kapacitásának vizsgálatára irányuló kísérleteket, azok egymásra épülésének folyamatát, a célkitűzéseknek megfelelően az alábbi 1. ábra szemlélteti.



4. ábra PAH vegyületek lebonthatóságának vizsgálatára kidolgozott kísérleti rendszer

3.1 A kísérleti rendszerekben alkalmazott mikroszervezetek:

Vizsgálati rendszerünkben az alábbi két törzsgyűjtemény tagjainak bontási kapacitását vizsgáltuk TPH, valamint PAH vegyületeken, ugyanis korábbi vizsgálatok azt igazolták, hogy ezen mikroszervezetek jelentős szénhidrogén bontási potenciállal rendelkeznek.

.SAFEREMED törzsek: AK-35 (*Rhodococcus erythropolis*), AK-36 (*Rhodococcus globerulus*), AK-37 (*Rhodococcus pyridinivorans*), AK-38 (*Rhodococcus gordoniae*), AK-40 (*Rhodococcus rhodochrous*), AK-44 (*Rhodococcus aetherivorans*), CHB-15p (*Rhodococcus pyridinivorans*), CHB-20p (*Chryseobacterium hungaricum*) NCP-3 (*Pseudomonas putida*) NCAIMB-1494 (*Pseudomonas putida*)

INNOSAFE törzsek: TBF2/20.2 (*Olivibacter oleidegradans*), ZFM 23.1 (*Rhodococcus erythropolis*), S-8 (*Rhodococcus ruber*), OM-7.2 (*Rhodococcus erythropolis*), SZM5/4.2 (*Pseudomonas mandelii*)

Az 4. ábrán szemléltetett módon, első lépésként a kísérleti rendszerekben alkalmazott mikroszervezetek szénhidrogén bontási kapacitását vizsgáltam gravimetriás módszerrel.

3.2 Gravimetria

A 16S rDNS szekvencia analízis során meghatározott fajú, nem patogén törzsekkel kezdtem munkámat, melyeknek első lépésben szénhidrogén bontó képességét vizsgáltam gravimetriás módszerrel. A baktériumokból ferde agaron 24 órás friss tiszta tenyészetet készítettem. Az így előkészített mikroba telepeket inkubációs idő (24h) leteltével steril üvegbot segítségével 50ml folyékony táplevesbe mostam (LB tápleves). A beoltott lombikok 72 órán át rázódtak 28°C-on, 170-rpm fordulatszámon. Az így nyert szuszpenzióból 5-5 ml-t 100ml OIR III. tápoldatba mértem, [5,0 g (NH₄)₂SO₄; 1 g K₂HPO₄; 0,5 g KH₂PO₄; 0,5 g MgSO₄×7H₂O; 0,2 g CaCl₂×6H₂O, 0,01 g FeSO₄×7H₂O, 1000 cm³ desztillált víz, sterilizálás: 121 °C, 1 bar, 15 perc], melyhez egyedüli szénforrásként 2 ml (nagyjából 1,7g) 3:2 arányú nyers gázolaj-kőolaj keveréket adtam. A minták mellett baktérium szuszpenziót nem tartalmazó gázolaj-kőolajjal hasonlóan kiegészített OIR-III és tápoldatot alkalmaztam kontrollként. A lombikokat ezután 28°C-on, 120 órán át, 170 rpm fordulaton rázatva inkubáltam.

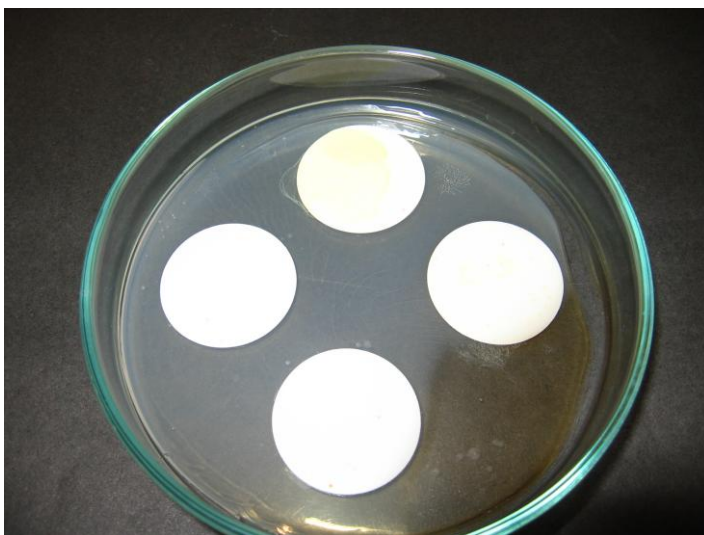
Az inkubációs idő után az olajos rázóként használt Erlenmeyer lombik tartalmát rázótolcsérbe öntöttem, majd 50 ml petrolétert adtam hozzá, különös figyelmet fordítva, hogy átmossam azzal a

lombik falát, így lemosva róla a maradék olajszármazékot. Alapos keverés után két fázis különült el a rázótölcsérben. Egy vizes-, valamint egy olajos-oldószeres fázis. A petroléter fajsúlyából adódóan a vizes fázis felett helyezkedik el. A fázissztétválasztás után a vizes fázist visszaöntöttem a rázótölcsérbe, míg az oldószeres, olajos fázist szűrőpapíron átszűrtem (a folyamatot megelőzően a szűrőpapírra nátrium-szulfátot szórtam, az esetleges pontatlan fázissztétválasztásból adódóan visszamaradt víz megkötésére). A petroléterrel történő átmosást háromszor egymás után végeztem el. Ezek után a maradék olaj kioldása céljából a lombikot egyszer átmostam kloroformmal. A kloroformmal történő rázatás, (kloroform esetében, annak fajsúlyából adódóan az oldószeres-olajos fázis került a rázótölcsér aljára), majd szűrés után előzőleg ezredgramm pontossággal lemerített gömblombikba öntöttem az oldószeres-olajos elegyet. Heidolph típusú bepárlókészülék segítségével forráspontkülönbség alapján (petroléter forráspontja: 50-60°C, kloroform forráspontja: 60-65°C) szétválasztottam az olajat az oldószerektől. A gömblombik a bepárlás után elvileg már csak azt a visszamaradt olajat tartalmazta, mely a rázatott Erlenmeyer lombikban volt megtalálható. A folyamat után a gömblombikokat szárítószekrényben 65°C-on 45 percig szárítottam, az esetleges visszamaradt víz, valamint oldószer eltávolítása céljából. A baktérium inokulumot nem tartalmazó mintákkal ugyanígy jártam el. A szárítás befejeztével a gömblombikokat ismét lemerítettem analitikai mérleggel. Ha az így kapott tömegből kivonom a lombikok kiindulási tömegét, megkapom a lombikban lévő olaj tömegét, amely a visszamaradt olaj tömege. Ezt összehasonlítva a kontroll mintában lévő olaj mennyiségével, megkaptam a %-ban kifejezett szénhidrogén bontási eredményt. Kísérleteink első lépéseként az INNOSAFE, valamint SAFEREMED törzsgyűjtemény tagjainak TPH bontását vizsgáltuk gravimetriás módszerrel, majd ezeket a törzseket háromszoros olajos rázatással passzáltuk. A passzálás során, a fejezet elején ismertetett módon baktérium szuszpenziót készítettem, melyből 5-5ml-t mértem 100ml OIR-III ásványi tápoldatba, melyhez egyedüli szénforrásként 2 ml (3:2) arányú nyers gázolaj-kőolaj keveréket adtam. Ezt követően 28°C-on, 170 rpm fordulatszámon, 120 órán át inkubáltam. Az inkubációs idő leteltével a lombikokból 5-5ml-t átoltottam friss, 100ml OIR-III tápoldat, és 2ml (3:2) arányú gázolaj-kőolaj keveréket tartalmazó Erlenmeyer lombikokba. Az inkubációs idő szintén 120óra volt 28°C-on, 170rpm fordulatszámon. Ezt a folyamatot még egyszer megismételtem, majd az előbbieken ismertetett módon meghatároztam a passzált törzsek szénhidrogén bontási képességét gravimetriás módszerrel, valamint ezen törzseket, a további használat céljából 2 példányban -80°C-on tárolom. Az említett vizsgálatok eredményeit az „Eredmények” című fejezetben mutatom be.

3.3 PAH vegyületek bontására alkalmas mikroszervezetek keresése

Ebben a munkaszakaszban szükségünk volt egy olyan módszerrendszerre, melynek segítségével a törzsgyűjteményekből ki tudjuk választani azokat a mikroszervezeteket, melyek alkalmazhatóak poliaromás szénhidrogének degradálására. A törzsgyűjtemény szelektálására azokat a baktériumokat választottuk ki, amelyek a passzálás és a gravimetria eredményei alapján jelentős (50% feletti) bontási kapacitással rendelkeztek. Rajtuk egy kínai kutatócsoport által kifejlesztett 'screenelési' technológiát alkalmaztuk (Zhao B. et al 2009).

A kísérlet során három PAH vegyületen [benz(a)pirén (BaP), benz(a)antracén (BaA), fluorantén (Flu)] vizsgáltuk a baktériumok bontási képességét. Első lépésben a fent bemutatott OIR III (1,5%-os) ásványi táptalajra (petri csészében) 4 darab 2,5 cm átmérőjű 0,45 µm pórusátmérőjű Millipore szűrőt (MERCK Millipore cat. no. HAWP02500) helyeztünk steril csipesszel (1. kép). Ezt követően 5000 ppm végkoncentrációban készítettünk törzsoldatot dietil-éterben oldva a vizsgálni kívánt három PAH vegyülettel szeptummal lezárt vialos üvegbe. A filterre 100µl mennyiségben szélesztettük a kiválasztott PAH törzsoldatot steril üvegbottal. A négy szűrőből háromra tehát egy-egy PAH vegyületet (BaP, BaA, Flu) tartalmazó törzsoldat került, a negyedik filter kontrollként szolgált, amelyet tiszta dietil éterrel kezeltünk. Ezt a folyamatot 5 perces szárítás követte elszívófülkében. A PAH vegyületet tartalmazó törzsoldatot



1. Kép a kísérlet folyamán alkalmazott filterek

üvegfecskendővel, és fém tűvel vettük ki a vial üvegből a tetején lévő teflon szeptumon át, majd a megfelelő filterre injektáltuk. Az oldószer elpárolgása után a baktérium szuszpenzió szélesztése történt a filterre 100 µl mennyiségben steril üvegbottal, melyet előzetesen LB táptalajon szaporítottuk fel az alábbiak szerint.

A törzsgyűjteményből származó baktériumokat steril üvegbottal szélesztettük LB (10 g tripton; 5 g élesztőkivonat, 10 g NaCl; 18 g bakteriológiai agar; 1000 cm³ desztillált víz) tápagarra. A lemezekről az inkubációs idő leteltével (28°C, 72 óra) egy-egy típusos telep beoltása történt sterilen, üvegbot segítségével 50ml LB táplevesbe. Az inkubációs idő 72 óra, 28°C-on, 170 rpm fordulattal történt. Ezt követően a 72 órás inokulumokat centrifugáltam (4600 rpm, 20 perc), a felülúszót leöntöttem, steril desztillált vízzel átmostam, majd újra centrifugáltam. A mosott pelletet szuszpendáltam steril desztillált vízben, ezt követően spektrofotométer segítségével a sejtsűrűséget

egységesen $OD_{600}=1$ értékre állítottam be. A különálló filterekre az így elkészített baktériumszuszpenzió került. Az inkubációs idő a filtereken 10 nap volt, 25°C-on.

Minden esetben a telepképződést, valamint telepnövekedést figyeltük. Mivel a rendszerben egyedüli szénforrásként a törzsoldatban lévő PAH vegyület hasznosítható, (OIR III ásványi táptalaj nem tartalmazott szénforrást) így elvárásunk szerint csak azok a mikroszervezetek szaporodtak a filtereken, melyek képesek túlélni a vizsgált PAH vegyület jelenlétében. A továbbiakban a vizsgált törzset a jelölt PAH vegyületet „valószínűsíthetően bontóként” jegyeztük fel.

A szakirodalom szerint a háromnál több aromás gyűrűt tartalmazó vegyületek esetében a vízőldékonyság, a lebonthatóság, és a biológia hozzáférhetőség is csökken. Ezen felül több irodalom is beszámol arról, hogy policiklikus aromás szénhidrogének hatékony degradációjára mikroba konzorciumok lehetnek képesek (Yu. et al 2005). Ennek érdekében törzspárokat alakítottunk ki a SAFEREMED, valamint az INNOSAFE törzsgyűjteményekből a korongos vizsgálatok, továbbá a gravimetriás kísérlet eredményeinek függvényében.

3.4 Együtt szaporíthatóság vizsgálata

A 3.2 fejezetben leírt módon inokulumokat készítettem a vizsgálandó mikroszervezetekből. Annak érdekében, hogy a kiindulási sejtszám megközelítőleg azonos legyen, a 72 órás friss inokulumok sejtsűrűségét egységesen $OD_{600}=0,6$ értékre állítottam. Ebből, egyenként 2,5 -2,5 ml szuszpenziót steril, LB táplevesbe mértem, majd 72 órán át, 28°C-on, 170 rpm fordulaton inkubáltam. A törzspárok együttes szaporítása során az egyes tagok élő sejtszámát 24 óránként történő lemezöntéssel határoztam meg. Ehhez hígítási sort készítettem. A szuszpenzió 1ml-ét 9 ml steril desztillált víz, és TWEEN 80 keverékébe pipettáztam, megkapva így az eredeti minta 10^1 hígítási fokát. Ebből újabb 1ml-t pipettáztam 9ml steril desztillált víz, és TWEEN 80 keverékbe, egészen 10^{10} hígítási fokig. A 10^4 - 10^{10} hígítási tagokból 100 μ l-t mértem LB agarra, melyet steril üvegbottal szétszélesztettem. A lemezeket 28°C-on inkubáltam, 96-120 óra után a lemezeken képződött telepeket leszámloltam. A PAH bontási kísérletet az együttes szaporíthatóság eredményeinek függvényében végeztük el.

3.4.1 PAH vegyületek bontására alkalmas törzskeverék

Ebben a szakaszban folyékony táptalajban rázatott mikroba keveréket alkalmaztunk annak érdekében, hogy folyékony közegben elemezzük azok PAH degradációs képességét. Ezen vizsgálati részben olyan törzspárosításokat alkalmaztunk, melyek az együtt szaporítási kísérletek során egymás növekedését nem gátolták.

A három PAH vegyületből, benzo(a)pirénből, benzo(a)antracénből és fluoranténből egyenként 15 mg/ml koncentrációjú törzsoldatot készítettünk, ehhez minden vegyületből 300 mg-ot adagoltunk, majd 20 ml acetonban oldottuk. A bontási kísérletben a PAH vegyületek együttes lebontását vizsgáltuk úgy, hogy azok együttes végkoncentrációja a bontási rendszerben 450 ppm (mg/l) legyen (150-150-150 ppm). A továbbiakban 300 ml-es előzetesen sterilizált Erlenmeyer lombikokba elszívó fülke alatt minden törzsoldatból 500 µl mértünk, majd az oldószer elpárolgása után 45-45 ml Bushnell-Haas (B-H; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,02 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1 g KH_2PO_4 ; 1 g K_2HPO_4 ; 1 g NH_4NO_3 ; 0,05 g FeCl_3 ; 1000 cm³ desztillált víz) tápoldatot mértem steril mérőhengerrel, mely 1 v/v%-ban Tween80 detergenst tartalmazott. A Tween80 irodalmi kutatásaink alapján növeli a biodegradáció hatékonyságát, valamint segíti a vegyületek oldódását ([http6](#), [http7](#)).

A már ismertetett módon baktérium szuszpenziót készítettem. A törzspárosítás egyes tagjainak szuszpenzióiból 2,5-2,5 ml-t mértem a PAH vegyületet tartalmazó 45 ml Bushnell-Haas tápoldathoz, így az 50 ml térfogatú tápoldat PAH koncentrációja 450 ppm lett. Az inkubációs idő 14 nap volt, 28°C-on 170 rpm fordulaton. A kísérlet három párhuzamos beállításban történt, kontrollként baktérium szuszpenziót nem, csak PAH vegyületeket azonos koncentrációban tartalmazó tápoldatot használtunk.

A screenelési (korongos kísérlet) vizsgálatokra alapozva elindítottunk egy másik kísérleti rendszert, melyben azokat a törzseket vizsgáltuk folyékony közegben, melyek a filteren telepeket képeztek. Ebben a kísérletben az inkubációs idő nem 14, hanem 21 napig tartott, szintén 28°C-on, 170 rpm fordulaton. Ebben az esetben, csak individuális törzsekkel vizsgáltuk a bontást. A 14, illetve a 21 napos inkubációs idő leteltével a mintákat analitikai vizsgálatra küldtük.

3.5 PAH bontás igazolása szennyezett területről származó talajmintán (OxiTop talajrespirációs vizsgálat)

Az OxiTop vizsgálatainkat a 3.2.2 fejezetben említett együttes szaporíthatóság eredményeinek függvényében végeztük el PAH, és TPH komponensekkel szennyezett talajmintán. Az OxiTop talajrespirációs vizsgálat a CO₂ kibocsátás mérésére szolgál (2. kép). A zárt rendszerben a talajlégzésből származó CO₂-ot NaOH oldatban kötjük meg, melynek eredményeként a zárt rendszerben mikrovákuum keletkezik, melynek nagyságából következtetni lehet a talajlégzés aktivitására. Az OxiTop rendszer a vákuum mértékét regisztrálja nagy precizitással. A zárt rendszerben bekövetkező vákuum változását az eszköz fej egysége regisztrálja, anélkül, hogy a minta bármilyen bolygatása szükséges lenne. Az adatok leolvasása egy leolvasó egységen keresztül

történik infra adatátvitellel. Az edényeket a rendszerhez tartozó termosztátban digitálisan beállított hőmérsékleten ($\pm 2^{\circ}\text{C}$ eltéréssel) tároljuk. A záró fejek kinyitása abban az esetben lehet szükséges, hogy a rendszerből már nem felvehető oxigén mennyiségét pótolni lehessen. Ilyenkor a vákuum respirációs görbe szellőztetés előtti végpontja, és a szellőztetés utáni kezdőpontja összeilleszthető.



2. Kép OxiTop talajrespirométer

4 Eredmények és értékelések

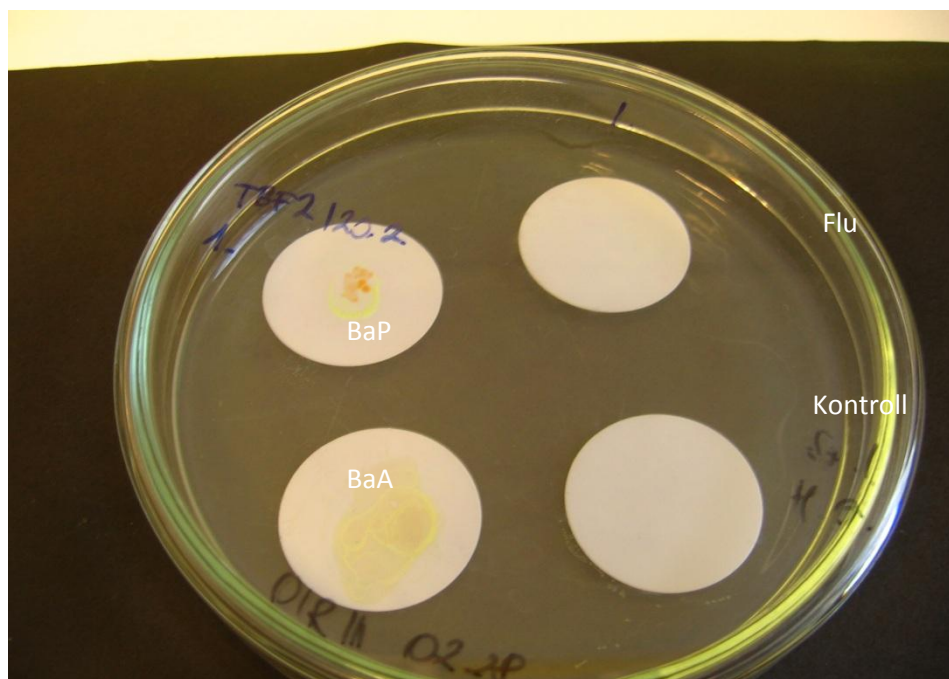
Mint azt a 3. fejezetben bemutattam, vizsgálataimat olyan mikroszervezetekkel végeztem, melyek szénhidrogénnel szennyezett területekről származnak. Első lépésben az INNOSAFE, valamint SAFEREMED törzsek TPH bontását vizsgáltuk gravimetriás módszerrel, majd ezeket háromszoros olajos rázatással passzáltuk, szintén a gravimetriás módszerrel, annak érdekében, hogy a bontási képességet fokozzuk. Hosszú időn keresztül laboratóriumi körülmények között tárolt, bontó törzsek esetében ugyanis előfordulhat, hogy bontási képességük csökken, ugyanis a rendszeres átoltások során a mikrobák enzimrendszere adaptálódik a táptalajokban alkalmazott glükózhoz, mint szénforrás. Ezt követően elvégeztük a gyűjteményes törzsek PAH bontási képességét felmérő korongdiffúziós kísérleteket. Mivel a filterkorongos vizsgálat nem tekinthető 100%-ban sterilnek, ezért a törzsek filtereken növekedett telepeit leválasztottuk a filterről. Az izolálás célja az volt, hogy igazoljuk, hogy valóban azok a törzsek képzettek telepeket, melyeket eredetileg szélesztettünk. Ezt a faji szintű igazolást molekuláris biológiai módszerrel, 16S rDNS szekvencia analízissel végeztük el. Néhány esetben előfordult, hogy nem azok a törzsek nőttek a korongon melyet eredetileg szélesztettünk. Ebben az esetben az „idegen” törzset RTF jelöléssel láttuk el (a táblázatban az RTF jelölés mellett annak a törzsnek a jele, illetve a vizsgált PAH vegyület szerepel, amelynek 'helyéről' izoláltuk) és vizsgáltuk annak szénhidrogén bontó képességét gravimetriás módszerrel. Az alábbi 1. táblázat tartalmazza a korongos kísérletek (PAH korong) esetében a gyűjteményes törzsek gravimetriás méréseit (TPH-G), valamint a passzált törzsek (TPH-GP) szénhidrogén bontási eredményeit.

Törzsek jele (származás szerint elkülönítve)		Fajnév	Rázatás		PAH korong		
			TPH-G	TPH-GP			
			bontási%				
SAFEREMED	AK-35	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	26,16	65,55	+	+	+
	AK-36	<i>Rhodococcus globerulus</i>	21,60	35,57	-	-	-
	AK-37	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	2,51	26,96	+	+	+
	AK-38	<i>Rhodococcus gordoniae</i>	57,17	73,30	-	-	-
	AK-40	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	44,89	69,25	+	+	+
	AK-44	<i>Rhodococcus aetherivorans</i>	20,60	53,40	+	+	+
	CHB-20p	<i>Chryseobacterium hungaricum</i>	n/sz				
	CHB-15p	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	n/a	n/a	+	+	+
	NCP-3	<i>Pseudomonas putida</i>	19,18	22,11	-	-	-
	NCAIMB-1494	<i>Pseudomonas putida</i>	n/a	n/a	-	-	-
INNOSAFE	DSM 7226	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	n/a	n/a	-	-	-
	TBF2/20.2	<i>Olivibacter oleidegradans</i>	0,00	58,33	+	+	-
	ZFM 23.1	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	37,19	1,85	-	-	-
	S-8	<i>Rhodococcus ruber</i>	44,80	19,82	-	-	-
	OM-7.2	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	34,08	37,80	-	-	-
Filter	SZM5/4.2	<i>Pseudomonas mandelii</i>	n/sz				
	RTF-1(AK-35 BaP 2.)	<i>Serratia fonticola</i>	n/sz	n/sz			
	RTF-2 (TFB2 BaA 2.)	<i>Rhodococcus ruber</i>	41,4	n/a	+	+	+
	RTF-3 (AK44 FluA)	<i>Rhodococcus ruber</i>	55,08	n/a	+	+	+
	RTF4 (CHB15p FluA, BaP 1.)	<i>Pseudomonas japonica</i>	8,64	n/a	+	+	+

1. táblázat A vizsgált törzsek szénhidrogén (TPH) bontó képessége és növekedése a PAH korongokon

Jelmagyarázat: n/a: nincs adat, n/sz nem szaporodott fel, -: nem növekedett a korongon, +: telepek a korongon, piros cella: 50%-nál nagyobb bontás, sárga cella: 40%-nál nagyobb bontás

A táblázat adatai alapján látható, hogy a gravimetriás mérések (TPH-G) eredményéhez képest, a passzálást követően (TPH-GP) egyes törzsek bontó kapacitása jelentősen megnőtt. Ezek közül is kiemelkedően magas, az AK-35 (*Rhodococcus erythropolis*), az AK-38 (*Rhodococcus gordoniae*), az AK-40 (*Rhodococcus rhodochrous*), az AK-44 (*Rhodococcus aetherivorans*), valamint a TBF2/20.2 (*Olivibacter oleidegradans*), melyek esetében közel 30-40%-al nőtt a bontási potenciál. Hozzájuk hasonlóan az AK-36 (*Rhodococcus globerulus*), az AK-37 (*Rhodococcus pyridinivorans*), valamint az NCP-3 (*Pseudomonas putida*) esetében is közel 15-25% növekedés figyelhető meg a kezdeti gravimetriás mérésekhez viszonyítva. A korong diffúziós vizsgálatok során, a SAFEREMED tagjai közül az AK-35, AK-37, AK-40, AK-44, és a CHB-15p (*Rhodococcus pyridinivorans*) jelölésűek növekedtek benz(a)pirén (BaP), benz(a)antracén, (BaA), és fluorantén (Flu) vegyületekkel kezelt korongokon. Az INNOSAFE törzsgyűjteményből kizárólag a TBF2/20.2 mutatott növekedést, továbbá a 3 PAH vegyület közül csak a benz(a)pirén (BaP), és benz(a)antracén, (BaA) vegyületekkel kezelt korongokon (3. kép).



3. Kép A TBF2/20.2 törzs növekedése benz(a)pirén (BaP), benz(a)antracén (BaA) és fluorantén (Flu) vegyületeken

4.1 Együtt szaporítási vizsgálatok

A PAH bontási kísérletbe olyan törzsekből alakítottunk ki törzspárokat, melyek a passzálás, valamint a gravimetria eredményei alapján jelentős (50% feletti) bontási kapacitással rendelkeztek és/vagy a korong diffúziós vizsgálat eredményeként telepeket képeztek a PAH vegyülettel kezelt korongokon. Azt vizsgáltuk, hogy egymás jelenlétében milyen mértékben képesek szaporodni, gyakorolnak-e egymásra gátló hatást. A 3.4 fejezetben ismertetett módon az élősejt számolás eredményeit a 2. táblázat tartalmazza.

Vizsgált törzspárok	CFU/ml 72 óra után
AK-35 – AK-38	$10^9 \backslash 10^8$
AK-40 – CHB-15p	$10^9 \backslash 10^9$
AK-38 – NCP-3	$10^8 \backslash 10^9$
TBF2/20.2-AK-35	$10^5 \backslash 10^9$
TBF2/20.2-AK-40	$10^8 \backslash 0$
TBF2/20.2-AK-44	$10^9 \backslash 0$

2. táblázat a PAH bontási kísérletben alkalmazott törzspárok együtt szaporítási eredményei

Az eredményekből látható, hogy a 72 órás rázatást követően az AK-35 + AK-38, az AK-40 + CHB-15p, valamint az AK-38 + NCP-3 törzspárok voltak képesek közel azonos, magas élő sejtszámban (CFU/ml, vagyis ml-kénti összes élő sejtszám) szaporodni. A TBF2/20.2 + AK-35 törzspárok esetében a 72 órás rázatást követően az AK-35 volt képes magas élő sejtszámban (10^9 CFU/ml)

szaporodni, a TBF2/20.2-vel szemben (10^5 CFU/ml). A TBF2/20.2 + AK-40, valamint a TBF2/20.2 + AK-44 vizsgálata azt az eredményt mutatta mindkét esetben, hogy csak a TBF2/20.2 törzs volt képes növekedésre az együtt szaporítás során. Mivel az AK-35+AK38 (*Rhodococcus erythropolis* + *R. gordoniae*) törzspár a 72 órás rázatást követően közel azonos, magas élő sejtszámban volt képes szaporodni, a továbbiakban ezen páros bontási képességét vizsgáltuk folyékony tápoldatban, PAH vegyületek bontására.

4.2 PAH bontási kísérlet eredményei

Az analitikai vizsgálatra küldött tápoldatokból visszamért egyes PAH vegyületek mennyiségének átlagát, valamint azok kontroll minták [baktériumot nem tartalmazó (VAK) és Tween 80 keveréke] átlagához viszonyított eredményeit a 3. táblázat mutatja be az AK-35 + AK-38 törzskeverék esetében. A táblázat első oszlopában az alkalmazott PAH vegyületeket tüntettem fel. A második oszlopban a kontroll minták eredményei láthatóak, ehhez hasonlítottuk a harmadik oszlopban található, törzspárral beoltott minták eredményeit.

	kontroll (VAK+Tween)	AK-35 + AK-38 + Tween 3 ismétlés átlaga	Törzsek bontási%-a kontrollhoz képest
	µg/minta		
BaA	6200	5320	14,2
BaP	6425	5005	22,1
Flu	7305	6835	6,4
BaA+BaP+FluA	19930	17160	13,9

3. táblázat: a 14 napos bontási kísérlet során analitikával visszamért eredmények

Az eredmények alapján az AK-35+AK-38 törzskeverék 6-22% közötti mennyiségben bontotta a vizsgált PAH vegyületeket, legnagyobb mértékben (20% feletti) a benz(a) pirént. A három PAH vegyületet együttesen tartalmazó oldat esetében 14% körüli bontást mutatott a kontrollhoz képest az analitikai vizsgálatok alapján. A bontások nem túl jelentős mértékűek, de figyelembe kell venni, hogy a kísérlet időtartama mindösszesen 14 nap volt.

4.2.1 PAH bontás individuális törzsekkel

A törzspárokkal végzett bontási kísérlettel párhuzamosan PAH bontást végeztük individuális törzsekkel is, melyek esetében az inkubációs időt 14 napról 21 napra emeltük. Ezen törzseket a korongdiffúziós vizsgálatok eredményei alapján választottuk ki (1. táblázat). A kísérlet eredményeit

a 4-5. táblázat tartalmazza. Ezen vizsgálatokat 3 párhuzamos ismételtsben végeztük. A 4. táblázatban tüntettem fel az ismételések analitikai eredményeinek átlagait a baktériumot nem tartalmazó (VAK) oldathoz viszonyítva. Az 5. táblázatban a viszonyított bontási %-ok átlaga látható.

	Flu	BaA	BaP
	átlag (ug/minta)		
AK-35	19533,3	15933,3	16300,0
AK-37	18433,3	14966,7	14500,0
AK-40	17566,7	15000,0	15500,0
AK-44	16900,0	14933,3	14400,0
CHB-15p	19500,0	15600,0	16366,7
TBF2/20.2	19833,3	15733,3	16433,3
VAK	20000,0	15100,0	16400,0

5. táblázat A 21 napos kísérlet analitikai eredményei

	Bontási% átlagból		
Minta jele	Flu	BaA	BaP
AK-35	2,3	-5,5	0,6
AK-37	7,8	0,9	11,6
AK-40	12,2	0,7	5,5
AK-44	15,5	1,1	12,2
CHB-15p	2,5	-3,3	0,2
TBF2/20.2	0,8	-4,2	-0,2

4. táblázat bontási %-ban a VAK-hoz viszonyítva

Az eredményekből látható, hogy bontást az AK-37, az AK-40, továbbá az AK-44 mutatott. Az előzetesen elvégzett korongos vizsgálat eredményeként ezek a törzsek mindegyike képzett telepeket a filteren. Megfigyelhető, hogy ez esetben a legnagyobb bontási kapacitás 12,2% volt benz(a)pirénre nézve (AK-44), míg az előzőekben leírt törzspár ennek közel dupláját eredményezte, kevesebb időintervallum alatt. Ezek alapján elmondható, hogy a két törzset tartalmazó mikroba konzorciumok nagyobb mértékben voltak képesek a bontásra, annak ellenére, hogy az inkubációs időt egy héttel megnöveltük.

4.3 Az OxiTop talajrespirációs vizsgálat eredményei

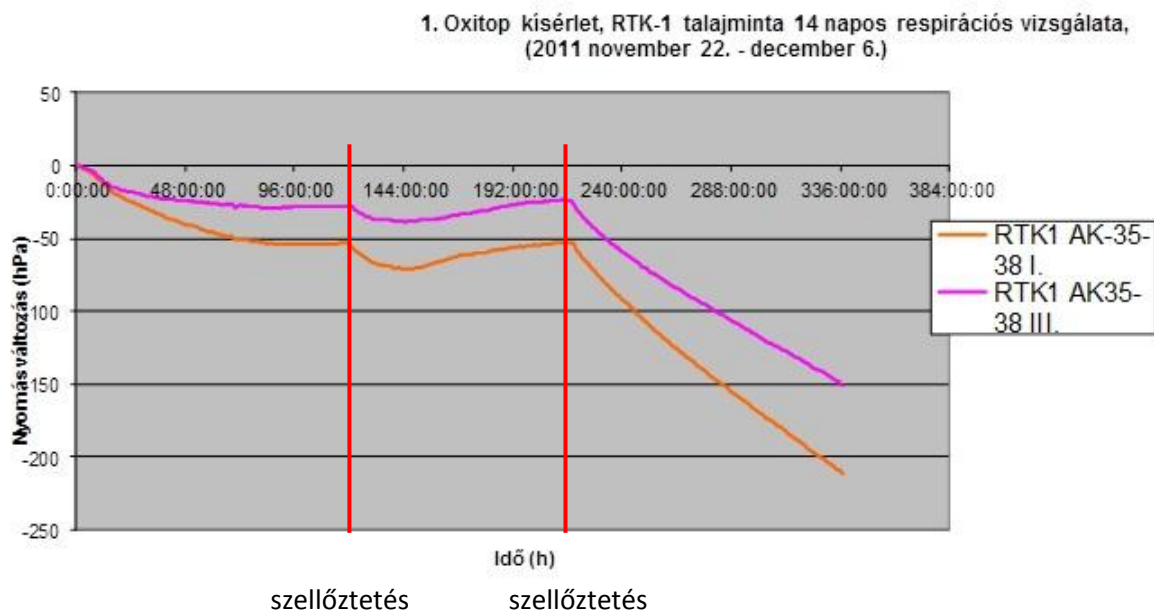
Az OxiTop rendszerben a SAFEREMED törzsgyűjteményből származó törzspároknak bontási kapacitását vizsgáltuk TPH, és PAH komponensekkel szennyezett talajmintán. Első lépésként a szennyezett kárhelyről származó, homokos talajfésűs közeg keveréssel homogenizáltuk. A talajmintából 150-150g-t a SAFEREMED-ből származó AK-35 + AK-38 (*R. erythropolis*+*R. gordoniae*) törzskeverék tagjaival oltottuk be, mivel ezek a törzsek megfelelő élő sejtszámban voltak képesek együtt szaporodni, valamint korábbi vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy egyenként jó TPH bontási kapacitással rendelkeznek, valamint saját vizsgálataink alapján törzspárként PAH bontó képességgel is bírnak. Az inokulum készítéshez, a törzseket 24 órás ferde agarról 50ml TGE-5 (tripton: 5,0 g; élesztő kivonat: 2,5 g; glükóz: 5,0 g; 1000 ml desztillált víz) táplevesbe mostuk be steril üvegbot segítségével. Az így beoltott táptalajokat 48 órán keresztül, szobahőmérsékleten, 150 rpm fordulaton inkubáltuk. A rázatást követően a sejtsűrűséget

egységesen $OD_{600}=0,6$ -ra állítottuk be, folyékony TGE-5-el. Ezt követően az AK-35, és AK-38 törzsekkel külön-külön 2,5-2,5 ml-rel (összesen 5ml) oltottuk be a talajokat három ismétlésben, az inkubációs idő 14 nap volt. Az OxiTop vizsgálattal indításával egy időben a PAH, és TPH szennyezett talajminta kémiai analitikai vizsgálata is megtörtént. Az analitikai vizsgálat eredményeinek kivonatát a 6. táblázat tartalmazza PAH, és TPH komponensek tekintetében. Az 1. számú mellékletben tüntettem fel az analitikai vizsgálatok eredményeinek teljes jegyzékét. Táblázatban a kiindulási (RTK-1 jelzésű) talajminta PAH és TPH értékeit tüntettem fel és ezt hasonlítottam a kezeltékhez. Az RTK-1/1, RTK1/2, valamint az RTK1/3 oszlopokban a törzspárral kezelt talajminták analitikai eredményei láthatóak, míg az utolsó oszlopban ezen három párhuzamos vizsgálat eredményének átlaga olvasható.

Komponens	Mértékegység	A minta jele				Kezelt átlag
		RTK-1 talajminta	RTK1/1	RTK1/2	RTK1/3	
		kiindulási	AK-35/AK-38			
Összes PAH naftalinok nélkül	mg/kg	299,59	172,73	155,7	176,64	168,36
Összes alifás szénhidrogén (TPH)	mg/kg	43100	44300	50800	36500	43866,7

6. táblázat az 1 OxiTop kísérlet analitikai eredményei

Amennyiben a törzspárral kezelt talajminták eredményeinek átlagát viszonyítjuk a kiindulási talajmintához, látható, hogy az összes alifás szénhidrogén (TPH) esetében, nincs jelentős eltérés. Ezek alapján elmondható, hogy az összes alifás szénhidrogén mennyisége nem változott a kezelt talajmintában a kontrollhoz képest. Az összes PAH eredmény a két törzssel beoltott rendszerek átlaga esetében 168,36 mg/kg volt. Ezt az értéket összevetve a kiindulási talajminta PAH értékével (299,59 mg/kg), már jelentősebb az eltérés. Ez esetben az oltott rendszer átlaga 56,2%-a a kiindulási mennyiségnek, vagyis az összes PAH tekintetében több mint 40%-al csökkent a mennyiség a kiindulási értékekhez képest.



5. ábra Az 1. OxiTop kísérlet során bekövetkezett nyomásváltozás görbéje a különböző kezelések esetében

Az 5. ábrán az OxiTop kísérlet során bekövetkezett nyomásváltozást tüntettem föl. Az x tengelyen az időintervallum látható, míg az y tengelyen a nyomásváltozást olvasható le. Az ábrán két piros vonallal jelöltem a 120., illetve a 216. óránál történt szellőztetést.

A vizsgálat során az RTK AK 35-38 II. (azonos RTK-1/2) mintánál nem tudtuk kiértékelni az eredményt valószínűleg az érzékelő fej rossz rögzítésének következtében. Az 5. ábra adatai alapján elmondható, hogy az AK35/AK-38 törzsekkel oltott beállítások egymással párhuzamosak voltak és a kísérlet végére igen jelentős légzésintenzitást mutattak. Az ábrán a görbe meredeksége, illetve annak végpontja minél mélyebb annál nagyobb vákuumot mértünk, vagyis annál intenzívebb a CO₂ keletkezése, vagyis a minta respirációja. Átlagos nyomáscsökkenés: RTK AK 35-38 I., III. = -181,5 hPa, ami igen jelentős respirációnak számít.

Az első kísérlet eredményeit tekintve arra a következtetésre jutottunk, hogy a vizsgálatot megismételjük, hiszen az irodalmi adatok alapján szokatlan, hogy a PAH vegyületek degradációja előbb következik be a rendszerben a TPH-nál. A második kísérletben szintén az AK-35+AK-38 (*R. erythropolis*+*R. gordoniae*) törzskeveréket alkalmaztuk, 50ml TGE-5 tápoldatban felszaporítva, a sejtsűrűséget szintén OD₆₀₀=0,6, valamint 2,5-2,5 ml szuszpenzióval beoltva a szennyezett talajt. Ezen felül alkalmaztunk egy kezelés nélküli kontrollt, valamint egy olyan összeállítást, mely során a szennyezett talajhoz (150g-150g), egy desztillált vizes kiegészítést adtunk az inokulumnak megfelelő mennyiségben. A mintákat három ismétlésben állítottuk össze. Az inkubációs idő szintén 14 nap volt. Az analitikai eredmények kivonatát a 7. táblázat tartalmazza, a teljes táblázatot a 2. számú mellékletben csatolom. A vizsgálatokat 3 párhuzamos ismétlésben végeztük. A táblázatban

az „RTK-1 átlag” a kontroll minták átlagát, míg az „RTK-1DV átlag” a desztillált vízzel kezelt, az „RTK1-AK átlag”, a törzspárral kezelt talajminták átlagát jelölik.

7. táblázat: a kémiai analitikai mérések átlagai, és a bontás %-ban

	A minta jele				K bont %	DV bont%
	RTK-1 talajminta	RTK-1 átlag	RTK-1DV átlag	RTK1-AK átlag		
	kiindulási	„vak”	deszt. víz	AK35/AK38		
	mg/kg					
Összes PAH naftalinok nélkül	299,59	259,4	219,09	165,6	36,16	24,4
Összes alifás szénhidrogén (TPH)	43100	46750	40900	38700	17,22	5,38

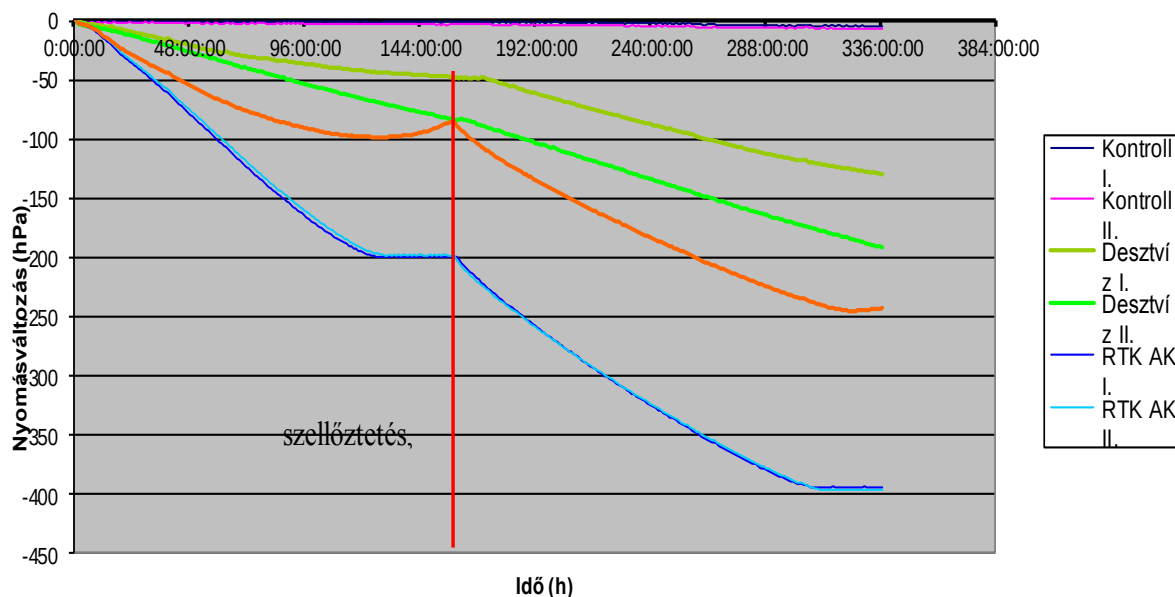
Jelmagyarázat: átlag: az ismétlések kémiai analitikájának átlaga

K bont %: a bontási százalék a kezeletlen kontroll átlagoz viszonyítva

DV bont %: a bontási százalék a desztillált vizes kontroll átlagához viszonyítva

Ezek alapján visszaigazoltuk az első OxiTop kísérlet eredményeit TPH vonatkozásában. Az eredmények alapján ugyanis megállapítható, hogy az összes alifás szénhidrogén tekintetében a kiindulási, a kontroll, valamint a kezelt átlagok mennyiségét nézve, nincs jelentős változás az értékek között. A bontást tekintve, összehasonlítva a kiindulási minta eredményével jelentéktelen veszteség (10%-os) számítható a bontó törzsekkel oltott talajminták átlaga esetében. A PAH vegyületek esetében ismét jelentős változás következett be a rendszerben. Amennyiben az összes PAH eredményt tekintjük látható, hogy a kiindulási RTK-1 talajminta eredményéhez (299,59 mg/kg) képest a kezeletlen (vak) minták (RTK-1 átlag) méréseinek értéke is kevesebb (259,4 mg/kg). Ez 13%-os csökkenést jelent, amely a rendszerben az abiotikus veszteség. Ha ezzel az értékkel korrigáljuk a kezelt minták értékeit, akkor elmondható, hogy a desztillált vizes adagolás 15%-al csökkentette az összes PAH mennyiséget. A két törzsszel (AK-35+AK-38) beoltott rendszer átlag értéke 165,6 mg/kg, ami összehasonlítva a kezeletlen kontroll átlagával (259,4 mg/kg) 36%-os bontást jelent, de a desztillált vizes kontrollhoz képest is közel 25%-os volt. Ez alapján megállapítható, hogy a desztillált vizes kezelés az alkalmazott talajon elősegítette a biodegradációs folyamatokat. Megfigyelhető még, hogy a törzspárral kezelt talajmintán a PAH vegyületek tekintetében jelentősebb bontás mutatkozott. A 6. ábrán a 2. OxiTop vizsgálat nyomásváltozásának görbét tüntetem fel. Az ábrán az x tengelyen idő tényező, az y tengelyen a nyomásváltozás látható. Piros vonallal szintén a szelőztetést jelöltem.

RTK talajminta 14 napos respirációs vizsgálata (2011 december 5-19-ig).



6. ábra A 2. OxiTop kísérlet során bekövetkezett nyomásváltozás görbéje

A vizsgálat során az RTK I. és RTK II. jelű kontroll talajminták esetében minimális respirációs értékek láthatóak, a kirajzolt görbék esetében megfigyelhető, hogy alig hagyják el a 0-10 hPa közötti értéket. Ezzel szemben a desztillált vízzel kezelt talajminták (RTK DV I., illetve –II.) esetében már közepes respirációs aktivitás figyelhető meg a talajminták mindkét ismétlést tekintve. 1. OxiTop kísérletünkhöz hasonlóan a törzsinokulumot is tartalmazó talajminták magas respirációs értékeket adtak a vizsgálat ideje alatt (6. ábra). Átlagos nyomáscsökkenés: Kontroll I.-II. = -6 hPa; desztvíz I.-II. = -161 hPa; RTK AK I.-II. = - 396 hPa.

Mivel a második kísérlet során azt tapasztaltuk, hogy az egyszerű desztillált vizes kiegészítés is változást okozott a közegben, ezért ezt a kísérletet megismételtük. Ezen felül azt kívántuk igazolni, hogy más törzspárokat alkalmazva, melyek együttesen szaporítva kellően magas élő sejt-számban képesek növekedni, továbbá igazoltan jó TPH bontással rendelkeznek, képesek e ebben a közegben a szennyezőanyagok eliminálására. Ebben a kísérletben ezért már nem az AK-35 + AK-38 törzskeverékkel kezeltük a talajmintát, hanem az AK-38 + NCP-3 (*R. gordoniae*+*Pseudomonas putida*), valamint a CHB-15p + AK 40 (*R. pyridinivorans* + *R. rhodochrous*) párosítással, kiegészítve az előzőekben is alkalmazott desztillált vizes kezeléssel, valamint egy kezeletlen kontroll mintával szintén három párhuzamos ismétlésben. 50 ml LB táptalajon előzetesen kiválasztott külön-külön felszaporított törzskeveréket készítettünk. Ebből individuális baktérium szuszpenziót készítettünk centrifugálással a fenti fejezetekben leírtaknak megfelelően. A keverékben lévő két törzset külön-külön $OD_{600}=1$ -re beállítottuk desztillált vízzel, amiből 2,5-2,5

ml-el oltottuk a 150 g talajmintát, melyet 14 napig inkubáltunk 20°C-on. Az eredmények kivonatát a 8. táblázat tartalmazza, a teljes táblázatot a 3. számú mellékletben mutatom be. A második OxiTop kísérletben alkalmazott talajmintát újra homogenizáltuk, és RTK-0229 jelöléssel (vagyis a homogenizálás dátuma) láttuk el. A táblázatban feltüntettem a kiindulási minta (RTK-0229) analitikai eredményit. Látható továbbá a kezeletlen kontroll minták-, a desztillált vízzel kezelt minták-, illetve a törzspárokkal kezelt minták eredményeinek átlaga. A desztillált vizes kezelést csak a kontrollhoz viszonyítottuk, míg a törzspárokkal kezelt talajmintákat mind a kontroll mintával, mind pedig a desztillált vizes kezelést kapott minták eredményeivel vetettük össze.

8. táblázat: az Oxitop rendszerben alkalmazott törzspárok kémiai analitikai vizsgálatának eredményei

	Kiindulás RTK-0229	Kontroll átlag	Deszt. víz		AK38-NCP3			CHB15p-AK40		
			átlag	bont%	átlag	K bont%	DV bont%	átlag	K bont%	DV bont%
Összes PAH naftalinok nélkül	312,56	228,47	186,87	18,21	172,41	24,54	7,73	186,18	18,51	0,36
Összes alifás szénhidrogén	42500,00	42400,00	42500,00	-0,24	43366,67	-2,28	-2,04	42900,00	-1,18	-0,94

Jelmagyarázat: átlag: az ismételések kémiai analitikájának átlaga (µg/l)

K bont%: bontási % a kezeletlen kontroll átlagához viszonyítva

DV bont%: bontási % a desztillált vizes kontroll átlagához viszonyítva

Az eredményekből látható, hogy az összes alifás szénhidrogén (TPH) mennyiségében a kiindulási (RTK-0229) értékhez képest ismét nem történt változás. A második OxiTop-os vizsgálat eredményeihez hasonlóan a desztillált vizes kezelés ebben az esetben is csökkentette (18%-al) a PAH vegyületek mennyiségét, vagyis igazoltuk, hogy a desztillált vizes kezelés esetében is megfigyelhető biodegradáció. Az AK-38+NCP-3 törzskeverék a kontroll mintához viszonyítva 24%-os bontást mutatott PAH vegyületeken, amely a desztillált vizes kezeléshez viszonyítva 7%. A CHB15p+AK-40 törzskeverék a kezeletlen kontroll mintához viszonyítva 18%-os bontást eredményezett, amely a desztillált vizes kezelést kapott minta bontási százalékát megközelítő érték. A vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a kísérletbe vont két új törzspár kevésbé hatékony a PAH vegyületek bontása tekintetében, mint az előzőekben vizsgált AK-35+AK-38 törzskeverék.

5 Következtetések és Javaslatok

Vizsgálataim során két szénhidrogénbontásban alkalmazott törzsgyűjtemény, a SAFEREMED, valamint az INNOSAFE tagjainak bontási képességét vizsgáltam összes alifás szénhidrogén (TPH), valamint policiklikus aromás szénhidrogének (PAH) vonatkozásában.

Első lépésként a törzsgyűjtemény tagjainak alifás szénhidrogén bontó képességét vizsgáltam gravimetriás módszerrel, majd háromszoros olajos rázatással passzáltuk a törzseket, melynek során a SAFEREMED törzsgyűjtemény tagjai közül az AK-35 (*Rhodococcus erythropolis*), AK-38 (*Rhodococcus gordoniae*), A-40 (*Rhodococcus rhodochrous*), AK-44 (*Rhodococcus aetherivorans*), továbbá az INNOSAFE törzsgyűjteményből a TBF2/20.2 (*Olivibacter oleidegradans*) mutatott 50% feletti bontást.

Poliaromás szénhidrogének lebonthatóságának vizsgálatát a korongdiffúziós eljárással kezdtük, eszerint a törzsgyűjtemény tagjait szelektáltuk PAH vegyületeken történő növekedésük alapján. A korong diffúziós vizsgálatok során, a SAFEREMED tagjai közül az AK-35 (*Rhodococcus erythropolis*), AK-37 (*Rhodococcus pyridinivorans*), AK-40 (*Rhodococcus rhodochrous*), AK-44 (*Rhodococcus aetherivorans*), és a CHB-15p (*Rhodococcus pyridinivorans*) törzsek növekedtek benz(a)pirén (BaP), benz(a)antracén, (BaA), és fluorantén (Flu) vegyületekkel kezelt korongokon. Az INNOSAFE törzsgyűjteményből kizárólag a TBF2/20.2 (*Olivibacter oleidegradans*) mutatott növekedést, továbbá a 3 PAH vegyület közül csak a benz(a)pirén (BaP), és benz(a)antracén, (BaA) vegyületekkel kezelt korongokon. Ezen törzseket a továbbiakban bontási kísérletbe vontuk. Első lépésben fenti mikrobák tagjaiból törzspárokat alakítottunk ki, amelyekkel vizsgáltuk a PAH vegyületek bontásának mértékét folyékony közegben. Ezzel párhuzamosan végeztünk PAH bontási kísérleteket individuális törzsekkel is, szintén szubmerz tenyészetekben. Az eredmények alapján elmondható, hogy az individuális törzsek esetében az AK-37, AK-40, AK-44 estében 7,8-15,5% közötti értéket mutatunk ki a fluorantén esetében, valamint 5,5-12,2% közötti értékben bontották a benz(a)pirént. Ennél általában kisebb értékeket kaptunk benz(a)antracén esetében Ezzel szemben az AK-35+AK-38 törzskeverék 6-22% közötti mennyiségben bontotta a vizsgált PAH vegyületeket, legnagyobb mértékben (22% feletti) a benz(a)pirént. Ez alapján is igazolható, hogy a mikrobakonzorciumok nagyobb bontási kapacitással rendelkeznek poliaromás vegyületek vonatkozásában.

Az OxiTop talajrespirációs vizsgálatot három párhuzamos ismételtsben végeztük el. Az eredmények alapján az a megállapítás tehető, hogy az AK-35+AK38 törzskeverék 36-40% közötti mennyiségben csökkentette a vizsgált talajminta poliaromás szennyezőit. Ezen felül érdekes, hogy a

desztillált víz adagolás is biodegradációs folyamatokat eredményezett. Ennek oka az lehet, hogy a vizsgált talajminta szervezetei között lehetnek olyanok, amelyek képesek ezen szennyezők bontására, de a bontási folyamathoz szükséges víz nem állt rendelkezésre a természetes talajban, elképzelhető tehát, hogy a vizsgált mintához adagolt desztillált víz, egyfajta lökést adott a degradációra képes mikrobaközösség tagjainak.

Az AK-38+NCP-3 törzspár 24%-os bontást mutatott, szemben a CHB15p+AK40 18%-os bontási kapacitásával. A korongos vizsgálat függvényében megállapítható, hogy az AK-38, és az NCP-3 nem mutatott növekedést a filteren, ezzel szemben magasabb értékben bontotta a PAH vegyületeket, mint a CHB15-p, valamint az AK-40 törzsek, melyek a korongos vizsgálat során telepeket képeztek a filteren. Mindhárom OxiTop kísérletünk közös tanulsága, hogy a vizsgált talaj esetében bármilyen kombinációt próbáltunk ki a bontásban, a TPH komponensek értéke alig változott a kontrollhoz képest. Ezek szerint ebben a rendszerben ezen szennyező anyagok bontása csak a PAH vegyületek bontása után, vagy azoknál lassabban következhet be. Eredményeim rámutatnak arra, hogy az OxiTop rendszer alkalmas lehet, hogy modellrendszerként alkalmazzuk annak eldöntésére, hogy a célzott talajkezelés esetében milyen beavatkozást válasszunk. A kísérleti eredmények ugyanis megmutatták, hogy megfelelő törzspárok alkalmazásával elérhető a PAH vegyületek hatékony biodegradációja, de akár egy vizes kezelés is degradációra készítheti a bennszülött mikroszervezeteket. A kísérlet időtartama 14 nap volt, azonban néhány szakirodalom 30-40 nap lebontási időt említ, ezért elképzelhető, hogy a törzspárokkal jobb bontási határfok érhető el hosszabb távú kísérlet során. Javaslataim a további kutatásokat illetően a következők:

- Szakirodalom alapján igazolt PAH bontó képességgel rendelkező mikroszervezetek alkalmazása a korongdiffúziós kísérletben [(*Mycobacterium vanbaalenii* ([http8](#)), *Bacillus subtilis*, (Madhuri et al, 2009), *Mycobacterium gilvum* ([http9](#)), *Pseudomonas sp.*([http10](#))]. Ennek célja egyrészt igazolni az általunk felépített módszerrendszer helyességét, másrészt összehasonlítani a saját törzseink degradációs eredményeit más, igazoltan poliaromás szénhidrogén bontó mikrobákéval.
- Fenti, irodalmi adatokkal igazolt bontó képességgel rendelkező mikroszervezetekből további törzspárok kialakítása, együttes szaporíthatóságuk vizsgálata (pl. a SAFEREMED törzsgyűjtemény tagjaival), valamint ezek PAH bontó képességének vizsgálata szubmerz tenyészetben, lehetséges oltóanyag előállítása céljából.
- OxiTop talajrespirációs vizsgálat elvégzése más szennyezett területekről származó talajmintán, az előzőekben javasolt, illetve a gyűjteményes törzspárokkal kezelve.
- Az OxiTop rendszerben a desztillált vizes kezelés igazoltan biodegradációs folyamatokat eredményezett, ezért ebből a vizes közegből bontó mikroszervezetek izolálása, faj szintű

identifikációja (16S rDNS szekvencia analízisalapján). Amennyiben ezek humán-, és környezetegészségügyi kockázatot nem jelentő törzsek, szénhidrogén bontási kísérletbe történő bevonásuk.

- Fermentációs vizsgálatok az egyes - igazoltan jó bontási képességgel, meghatározott bontási spektrummal rendelkező - törzsekkel, így vizsgálva azok ipari méretű szaporíthatóságának lehetőségét, valamint azt, hogy a későbbiekben alkalmazhatóak-e mint oltóanyag alkotó törzsek bioremediációs kármentesítési technológiákban.

6 Összefoglalás

A poliaromás szénhidrogének (PAH), mint szennyezőanyagok, kőolajokban, kőolajszármazékokban, illetve termékeiben előforduló, valamint szerves anyagok tökéletlen égése során keletkező vegyületek, amelyek nehezen lebonthatóak és perzisztensek. Környezetvédelmi jelentőségüket növeli, hogy humán egészségügyi hatásaikat tekintve eddig hét PAH vegyületről bizonyosodott be humán karcinogén hatás, továbbá egyeseknek mutagén, teratogén, hatásaik is ismertek. Munkám célja olyan mikroszervezetek keresése volt, melyek okszerűen alkalmazhatóak PAH vegyületek biológiai lebontására.

Ennek érdekében a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék törzsgyűjteményének felhasználásával olyan mikroba törzseket választottam ki, amelyeket korábban kőolajszármazékokkal (TPH, BTEX, PAH) szennyezett területekről (talaj-, talajvízmintákból) izoláltak. A kiválasztott mikroszervezeteket bontási kísérleteknek vetettük alá, amelyek során degradációs képességüket vizsgáltuk három munkafázisban. Az első lépésben kínai kutatók módszerét (B. Zhao et al., 2009) használtuk három PAH vegyület [benza(a)pirén, benz(a)antracén, fluorantén] esetében, hogy kiválasszuk a potenciálisan bontásra képes törzseket. A második szakaszban folyékony táptalajban rázatott mikroba tenyészetet alkalmaztunk annak érdekében, hogy a törzsek PAH degradációs képességét elemezzük *in vitro*, folyékony közegben. Ehhez törzspárokat állítottunk össze, amelyekkel a kísérletet megelőzően együttszaporítási vizsgálatokat végeztünk, mivel az irodalmi adatok azt bizonyítják, hogy egy törzskeverékek általában nagyobb bontási képességgel rendelkeznek PAH vegyületek esetében. A harmadik munkaszakaszban OxiTop talajrespirációs vizsgálatot végeztünk két ismétlésben PAH, és TPH szennyezett kárhelyről származó talajmintán. A kísérletben egy kezelés nélküli kontrollt, egy együtt szaporodásra képes törzspárosítást, valamint egy desztillált vizes kezelést alkalmaztunk. Következtetéseim alapján az OxiTop rendszer alkalmazásával mikrokozmosz térben tesztelhető a célzott szennyeződés felszámolásának sikeressége különböző beállításokban.

Eredményeim megalapozzák egy olyan oltóanyag kialakítását, amely PAH vegyületekkel szennyezett kárhelyeken *in vivo* tesztelhető, valamint segítséget nyújt a mikrobiológiai módszerek rendszerszerű alkalmazásához.

7 Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni Dr. Szabó István konzulensemnek, valamint a Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék, és a Regionális Egyetemi Tudásközpont minden dolgozójának, a rengeteg segítséget, tanácsot, és határtalan türelmet, mely nélkül dolgozatom nem jöhetett volna létre.

8 Irodalomjegyzék

1. Anton A. (2010) – Bioremediáció: Mikrobiológiai kármentesítési eljárások. Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium, Kármentesítési kézikönyv 5, 5-54p.
2. Atlas R. M. (1981) – Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbiological Reviews, Vol. 45(1): 180-209
3. Barótfi I. (2000) – Környezettechnika. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 981 p., 312-317p, 566-584p.,
4. Berecz E., Kirnérné Kiss A., Montovay T., Péter L., Raisz I., Sipos L., Szita L., Vorsatz B. (1991) – Kémia műszakiaknak. Tankönyvkiadó, Budapest, 816p., 470-560p.
5. Breuer, H. (2003): Atlasz kémia, Atheneum 2000 kiadó, Budapest, 470 p., 299-334 p
6. Bruckner Gy. (1952): Szerves kémia, I. Kötet, Tankönyvkiadó, Budapest, 795 p., 69-78 p
7. Bruckner Gy. (1955): Szerves Kémia, II. Kötet, Tankönyvkiadó, Budapest, 916 p., 4-102 p
8. Furka Á. (1998): Szerves kémia, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest 930 p., 63-318 p
9. Haritash A., Kaushik C. (2009)- Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)
10. Kallimanis A., Kavakiotis K., Perisynakis A., Spröer C., Pukall R., Drinas C., Koukkou A. I. (2009)- *Arthrobacter phenanthrenivorans* sp. nov., to accommodate the phenanthrene-degrading bacterium *Arthrobacter* sp.
11. Kovács K., Halmos M. (1976) – A szerves kémia alapjai. Tankönyvkiadó, Budapest, 670 p.
12. Madhuri K. L., Ashutosh B., Koushalya Da., Veena G. (2009)- Degradation of *benzo [a] pyrene* by a novel strain *Bacillus subtilis* BMT4i
13. Pesti M., Bíró S., Hornok L., Kevei F., Kucsera J., Maráz A., Szűcs Gy., Vágvolgyi Cs. (2001) – Általános mikrobiológia. Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs, 304 p., 60-85. p.
14. Szabó I. M. (1989) – A bioszféra mikrobiológiája, II. kötet. Akadémia Kiadó, Budapest. 1208-1227 p.
15. Szeberényi J. (2004) – Molekuláris sejtből. Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs, 553p., 30-65p., 95-100 p.
16. Szoboszlai S., Kriszt B. (2005) – Környezeti elemek védelme I. Egyetemi jegyzet, Gödöllő
17. Szoboszlai S., Kriszt B. (2006) – Környezeti elemek védelme II. Egyetemi jegyzet, Gödöllő
18. Szoboszlai S., Solymosi J., Kriszt B. (2002) - The biodegradation of hydrocarbon compounds concerning to environmental safety. Academic and Applied Research in Military Science 1, 103-106. p.
19. Tindall B. J., Rosselló-Móra R., Busse H.-J., Ludwig W., Kampf P. (2010): Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. IJSEM Vol 60:249-266p.

20. Willumsen P., Karlson U., Stackebrandt E., Kroppenstedt M. R. (2001)- *Mycobacterium frederiksbergense* sp. nov., a novel polycyclic aromatic hydrocarbondegrading *Mycobacterium* sp.
21. Yu S. H., Ke L., Wong Y. S., Tam N. F. (2005) - Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Environment International*, Vol 31(2):149-154
22. Yuan J., Lai Q., Zheng T., Shao Z., (2009)- *Novosphingobium indicum* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from a deep-sea environment
23. Zhao B., Wang H., Mao X., Li R. (2009): A rapid screening method for bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons, *Letters in Applied Microbiology*, 49, 3, p. 408–410)

Felhasznált Internetes oldalak:

- http1: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0004/170734/e96640.pdf
- http2: http://www.kvvm.hu/cim/documents/Egeszseg_fugg2_OETI.pdf
- http3 <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>
- http4:<http://enfo.agt.bme.hu/drupal/sites/default/files/Biodegrad%C3%A1ci%C3%B3.pdf>
- http6: <http://enfo.agt.bme.hu/drupal/sites/default/files/etanf4.pdf>
- http7: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21862321>
- http8: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3202633?dopt=Citation>
- http 9: <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-11096.html>
- http10: <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-8368.html>

A dolgozatomban felhasznált jogszabályok, rendeletek, jegyzéke:

1. Az 1995. évi LIII tv. a környezet védelmének általános szabályairól
2. 6/2009. (IV. 14.) KvVM–EüM–FVM együttes rendelete a földtani közeg és a felszín alatti víz szennyezéssel szembeni védelméhez szükséges határértékekről és a szennyezések méréséről
3. 219/2004 (VII.21.) kormányrendelet a felszín alatti vizek védelméről

9 Mellékletek

1.számú melléklet

Komponens	Mértékegység	A minta jele				Kezelt átlag
		RTK-1 talajminta	RTK1/1	RTK1/2	RTK1/3	
		kiindulási	AK-35/AK-38			
Naftalin	mg/kg	68,6	9,54	5,16	12,5	9,07
1-Metilnaftalin	mg/kg	88,4	71,3	68,1	70,0	69,80
2-Metilnaftalin	mg/kg	102	56,2	46,1	59,7	54,00
Naftalinok összesen	mg/kg	259	137,04	119,36	142,2	132,87
Acenaftilén	mg/kg	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
Acenaftén	mg/kg	1,34	1,05	0,94	0,97	0,99
Fluorén	mg/kg	7,50	6,18	7,17	6,30	6,55
Fenantrén	mg/kg	21,9	19,4	18,8	18,2	18,80
Antracén	mg/kg	0,61	0,60	0,70	0,53	0,61
Fluorantén	mg/kg	0,48	0,44	0,50	0,43	0,46
Pirén	mg/kg	1,72	1,55	1,64	1,50	1,56
Benzo[a]antracén	mg/kg	0,90	0,61	0,65	0,65	0,64
Krizén	mg/kg	3,93	3,37	3,44	3,20	3,34
Benzo[b]fluorantén	mg/kg	0,50	0,47	0,45	0,47	0,46
Benzo[k]fluorantén	mg/kg	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
Benzo[e]pirén	mg/kg	1,27	1,32	1,34	1,42	1,36
Benzo[a]pirén	mg/kg	0,11	0,23	0,22	0,23	0,23
Indeno[1,2,3-cd]pirén	mg/kg	<0,02	0,08	0,07	0,14	0,10
Dibenzo[a,h]antracén	mg/kg	0,14	0,16	0,18	0,18	0,17
Benzo[ghi]perilén	mg/kg	0,19	0,23	0,24	0,22	0,23
Összes PAH (19) (a)	mg/kg	299,59	172,73	155,7	176,64	168,36
Összes alifás szénhidrogén (TPH C5-C40)	mg/kg	43100	44300	50800	36500	43866,7

7. táblázat: Az 1. OxiTop kísérlet kémiai analitika eredményei

2. számú melléklet

Komponens	A minta jele				K bont %	DV bont%
	RTK-1 talajminta	RTK-1 átlag	RTK-1DV átlag	RTK1-AK átlag		
	kiindulási		deszt. víz	AK35/AK38		
	mg/kg					
Naftalin	68,6	59,5	37,05	8,92	85,01	75,9
1-Metilnaftalin	88,4	75,45	70,4	66,07	12,43	6,15
2-Metilnaftalin	102	85,85	73,3	53,33	37,88	27,2
Naftalinok összesen	259	220,8	180,75	128,32	41,88	29,0
Acenaftilén	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	-	-
Acenaftén	1,34	0,86	1,105	1,05	-22,09	4,98
Fluorén	7,5	6,63	6,455	6,19	6,64	4,11
Fenantrén	21,9	20,7	20,1	20,03	3,24	0,35
Antracén	0,61	0,85	0,995	0,8	5,88	19,6
Fluorantén	0,48	0,48	0,5	0,48	0,00	4
Pirén	1,72	1,73	1,815	1,69	2,31	6,89
Benzo[a]antracén	0,9	0,84	0,865	0,79	5,95	8,67
Krizén	3,93	3,58	3,65	3,37	5,87	7,67
Benzo[b]fluorantén	0,5	0,25	0,26	0,3	-20,00	-15
Benzo[k]fluorantén	<0,02	0,25	0,305	0,24	4,00	21,3
Benzo[e]pirén	1,27	1,57	1,545	1,56	0,64	-1
Benzo[a]pirén	0,11	0,27	0,29	0,21	22,22	27,6
Indeno[1,2,3-cd]pirén	<0,02	0,17	0,125	0,14	17,65	-12
Dibenzo[a,h]antracén	0,14	0,2	0,17	0,18	10,00	-5,9
Benzo[ghi]perilén	0,19	0,27	0,165	0,23	14,81	-39
Összes PAH naftalinok nélkül	299,59	259,4	219,09	165,6	36,16	24,4
Összes alifás szénhidrogén	43100	46750	40900	38700	17,22	5,38

8. táblázat A 2. OxiTop kísérlet kémiai analitikai eredményei

3.számú melléklet

Komponens	Kiindulás RTK- 0229	Kontroll átlag	Deszt. víz		AK38-NCP3			CHB15p-AK40		
			átlag	bont%	átlag	K bont%	DV bont%	átlag	K bont%	DV bont%
Naftalin	60,40	42,95	25,75	40,05	17,60	59,02	31,65	26,07	39,31	-1,23
1-Metilnaftalin	82,70	67,55	60,35	10,66	58,13	13,94	3,67	60,20	10,88	0,25
2-Metilnaftalin	131,00	83,05	66,60	19,81	61,43	26,03	7,76	65,87	20,69	1,10
Naftalinok összesen	274,10	193,55	152,70	21,11	137,17	29,13	10,17	152,13	21,40	0,37
Acenaftilén	<0,02	<0,02	<0,02	-	<0,02	-	-	<0,02	-	-
Acenaftén	0,85	0,81	0,98	-21,74	0,80	1,04	18,71	0,94	-17,18	3,74
Fluorén	6,21	5,13	5,40	-5,37	6,29	-22,80	-16,54	5,94	-15,97	-10,06
Fenantrén	24,90	21,35	20,40	4,45	20,60	3,51	-0,98	20,60	3,51	-0,98
Antracén	0,50	0,42	0,48	-13,10	0,50	-18,25	-4,56	0,45	-6,35	5,96
Fluorantén	0,19	0,96	0,95	1,05	0,72	24,96	24,16	0,32	66,84	66,49
Pirén	0,63	1,19	1,16	2,94	1,29	-8,68	-11,98	0,99	16,81	14,29
Benzo[a]antracén	0,44	0,39	0,38	2,60	0,48	-24,68	-28,00	0,41	-7,36	-10,22
Krizén	1,60	1,95	1,71	12,08	1,55	20,48	9,55	1,50	22,88	12,28
Benzo[b]fluorantén	0,52	0,60	0,58	3,36	0,65	-9,24	-13,04	0,61	-1,96	-5,51
Benzo[k]fluorantén	0,47	0,06	0,05	9,09	0,05	9,09	0,00	0,03	39,39	33,33
Benzo[e]pirén	1,31	1,63	1,61	1,53	1,73	-6,13	-7,79	1,71	-4,91	-6,54
Benzo[a]pirén	0,19	<0,02	<0,02	-	<0,02	-	-	<0,02	-	-
Indeno[1,2,3-cd]pirén	0,19	<0,02	<0,02	-	<0,02	-	-	<0,02	-	-
Dibenzo[a,h]antracén	0,20	0,23	0,26	-10,87	0,25	-10,14	0,65	0,24	-4,35	5,88
Benzo[ghi]perilén	0,26	0,24	0,24	-2,13	0,34	-44,68	-41,67	0,31	-30,50	-27,78
Összes PAH naftalinok nélkül	312,56	228,47	186,87	18,21	172,41	24,54	7,73	186,18	18,51	0,36
(TPH C5-C40)	42500,00	42400,00	42500,00	-0,24	43366,67	-2,28	-2,04	42900,00	-1,18	-0,94

9. táblázat A 3 OxiTop vizsgálat kémiai analitika eredményei