



Izotópanalitikai módszerek tesztelése triklór- etilén membrán transzport vizsgálatára *Pseudomonas putida F1* baktériumban

OTDK dolgozat

Készítette

Varga Tamás

Biotechnológia MSc II. évf.

Témavezetők

Dr. Molnár Mihály

&

Janovics Róbert

Tudományos főmunkatárs

Tudományos segédmunkatárs

ATOMKI-Hertelendi Ede Környezetanalitikai Laboratórium

Kihelyezett Környezetfizikai tanszék

Debreceni Egyetem

Természettudományi és Technológiai Kar

Debrecen

A pályamunka lezárásának dátuma: 2014. november 28.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Szakirodalmi áttekintés	5
2.1. A radiokarbon.....	5
2.1.1. A szén természetes izotópjai.....	5
2.1.2. Radiokarbon a környezetkutatásban	6
2.1.3. A ^{14}C mérése tömegspektrométerrel	7
2.2. A triklór-etilén	9
2.2.1. A triklór-etilén fizikai és kémiai tulajdonságai	9
2.2.2. A triklór-etilén ipari alkalmazásai, felhasználása	10
2.2.3. A triklór-etilén élettani hatásai	11
2.2.4. Környezetszennyezés és lebontási, kármentesítési lehetőségek.....	12
2.3. <i>Pseudomonas putida</i>	14
2.3.1. <i>Pseudomonas putida</i> F1 általános tulajdonságai.....	14
2.3.2. <i>Pseudomonas putida</i> F1 triklór-etilén oxidációja.....	15
2.4. A TCE lebontás és transzport radiokarbonos kutatása az ENVIKUT projektben	20
3. Anyag és módszer.....	21
3.1. TCE vizes oldat roncsolása.....	21
3.2. <i>Pseudomonas putida</i> F1 tenyésztése	21
3.3. ^{14}C előkészítés és mérés	22
3.3.1. Előkészítés	22
3.3.2. Feltárás.....	23
3.3.3. Grafitizálás és préselés.....	24
3.3.4. ^{14}C mérés	26
3.4. $\delta^{13}\text{C}$ és $\delta^{15}\text{N}$ mérés	29
4. Eredmények	30
4.1. TCE vizes oldatának roncsolása.....	30
4.2. Sejttömeg és szárazanyagtartalma	32
4.3. Minta előkészítési módszer, kitermelés.....	34

4.4. $\delta^{13}\text{C}$ eredmények.....	35
4.4.1. Baktériumok stabilizotóp-aránya	35
4.4.2. A tápoldat stabilizotóp-aránya	37
4.4.3. Baktériumok-médium stabilizotóp-arány kapcsolat	39
4.5 Radiokarbon tesztmérések eredményei	41
Összegzés	43
KITEKINTÉS, Javaslatok	45
rövidítések gyűjteménye	46
Ábrajegyzék.....	47
Melléklet	49
Köszönetnyilvánítás.....	50
Felhasznált irodalom	51
Internetes hivatkozások	56
I. számú függelék.....	57
II. számú függelék.....	58

1. BEVEZETÉS

A különböző ipari szennyezések jelentős károkat okozhatnak környezetünkben. Ezen problémák jelentkezhetnek globálisan és lokálisan egyaránt. A rohamos ipari és tudományos fejlődés következtében számos vegyszer, oldószer került és kerül forgalomba napjainkban is. Ám ezeknek a hosszútávon jelentkező hatásai nem jelezhetők minden esetben előre. Továbbá a tudomány mindenkori állása nem sok esetben tudta bizonyítani vagy vizsgálni, hogy az adott vegyület milyen károsodásokat okozhat. Továbbá a hulladék magatartás, előírások figyelmen kívül hagyása mind-mind potenciális kockázatként jelennek meg ezen a területen. Amennyiben ezen anyagok a vártnál később bomlanak le és ennek következtében felhalmozódnak a környezetben, továbbá a táplálékláncban, úgy különböző élettani hatásokat fejthetnek ki. Így nem csak pillanatnyi, azonnal jelentkező tünetekkel kell számolnunk, hanem akut, hosszan elhúzódó következményekről, szövődményekről kell beszélnünk. A legtöbb vegyület nem csak a környezetre nézve jelent veszélyt, hanem az emberi szervezetre is jelentős kockázatot rejt magában. Az ivóvízbázisban felhalmozódó különböző vegyületek a lakossági vízellátást és emberi egészséget is veszélyeztet. Ezért elengedhetetlen az ivóvízbázisok folyamatos monitorozása és a felmerülő problémák gyors és hatékony elhárítása. Ez viszont megfelelő tudományos és szakmai ismeretek hiányában nem kivitelezhető.

Jelen kutatásunk szorosan kapcsolódik, egy lokálisan, Debrecenhez fűződő problémához. Debrecen város ivóvízbázisának közvetlen környezete elszennyeződött különböző szerves vegyületekkel és vegyszerekkel. Az egykoron oldószerként és zsírtalanításra, tisztításra használt triklóretilén jelentős kockázatot jelent napjainkban. Ennek a vegyületnek az eltávolítása a szakirodalom szerint megtörténhet kémiai és biológiai kezelés által egyaránt. Az in situ kezelések alkalmazásánál különböző paramétereket kell figyelembe vennünk. A vegyszeres kezelés lehet olcsó, de gyakran katalizátorokat és utókezelés, semlegesítést igényelhet. Szemben ezzel a bioremediációs, biotechnológiai módszerek során baktériumok segítségével ártalmatlaníthatjuk az anyagokat, káros melléktermékek megjelenése nélkül. Amennyiben a baktérium (jelen esetben: *Pseudomonas putida* F1) képes bontani, és tápanyagként felhasználni az eltávolítani kívánt vegyületet, akkor ezen eljárásokkal olcsón és igen nagy hatékonysággal háríthatunk el nagy területű szennyezéseket. Ám a biológiai rendszerek anyagáramlása, baktériumok metabolizmusa rendkívül összetett.

Ezért kiemelt hangsúlyt kell fektetnünk a transzport folyamatok felderítésére. Különböző anyagáramlások felderítésére rendkívül jó lehetőséget biztosít számunkra a radioaktív nyomjelzés lehetősége. Mivel az Magyar Tudományos Akadémia Atommagkutató Intézetében működő, Hertelendi Ede Környezetanaltikai Laboratórium rendelkezik nagy teljesítményű ^{13}C izotóparány és ^{14}C mérésre alkalmas tömegspektrométerrel, így a szén frakcionálódása adta kémiai átalakulási információkat nyerhetünk ki, illetve a TCE nyomjelzésével annak akára bomlástermékeit is nyomokban is ki lehet mutatni.. Az ENVIKUT projekt keretében ez a vizsgálat rendkívül fontos információkat adhat az általunk vizsgált *Pseudomonas putida F1* baktérium azon tulajdonságáról, hogy képes-e metabolizálni a Triklóretilént.

Vizsgálatom célja tehát a szakirodalmi adatok pontosításán túlmenően:

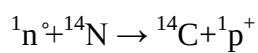
- Módszerfejlesztés baktérium stabilizotóp-arányának mérésére
- Módszerfejlesztés radioaktívan nyomjelzett anyag (triklór-etilén) mérésére biológiai rendszerből
- Izotópfractionálódás vizsgálata
- *Pseudomonas putida F1* baktérium triklóretilén felvételének vizsgálata izotópanalitikai módszerekkel

2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

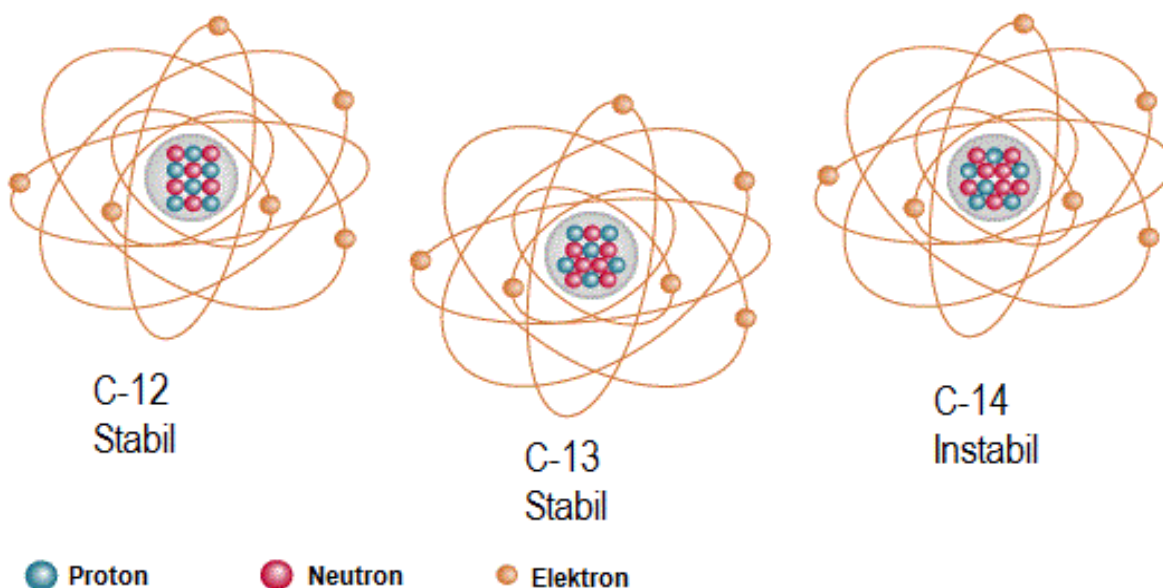
2.1. A radiokarbon

2.1.1. A szén természetes izotópjai

A Földön a szénnek három izotópjja ismert (^{12}C , ^{13}C , ^{14}C), a csak kis mennyiségben bár, de természetesen is előforduló ^{14}C izotópot más néven radiokarbonként szokás említeni. Ennek az izotópnak a felezési ideje 5730 ± 40 év, tehát ha nem termelődné, akkor a Földön nem szabadna léteznie ennek a radiokarbonnak. Viszont légköri nukleáris folyamatok termékeként folyamatosan újratermelődik a ^{14}C . A légkörbe jutó kozmikus sugarak átalakulása során nagy mennyiségű neutron képződik. A neutronok ütköznek a légkör nagy hányadát kievő nitrogénmolekulák egy-egy atomjával és a ^{14}N atomot ^{14}C izotóppá alakítják át.



A ^{14}C a levegőben gyorsan oxidálódik széndioxiddá, és folyamatosan nyomjelzi a légköri szén-dioxidot. A ^{14}C béta-sugárzó, radioaktív izotóp (P.E. Damon).



1. ábra: A szén természetes izotópjai

2.1.2. Radiokarbon a környezetkutatásban

A ^{14}C CO_2 -á oxidálódása után bekerül a troposzférába, ahol a környezeti szén-ciklusok részévé válik. A szervetlen és szerves kémiai formái egyaránt bekerülnek a vízi és szárazföldi tározókba. A radiokarbon keletkezésének és ülepedésének aránya viszonylag stabilnak tekinthető, ám az ipari és katonai tevékenységek különböző változásokat okozhatnak időszakos alakulásában (I Svetlik, 2010). A múlt századi nukleáris fegyverkísérletek jelentős antropogén ^{14}C forrásként jelentek meg. Egyes területeken a radiokarbon koncentráció a természetes szint kétszeresére is emelkedett 1963-ban (Nydal and Lövseth 1965; Meijer et al. 1995).

Az időben stabilnak mondható radiokarbon szint és annak felezési idejének ismeretében, a radiokarbon kormeghatározás széles körben elterjedt. Alkalmazzák a archeológiában, geológiában, hidrológiában, klimatológiában és számos más tudományosan fontos területen. Magyarországon a 80-as évektől alkalmazzák az archeológiában és a nukleáris környezeti monitorozás területén egyaránt (Csongor and Hertelendi 1986). Tehát a radiokarbon a kormeghatározáson túl környezetvédelmi szempontból is igen hasznosnak bizonyul. Fontos kutatási terület az atmoszférikus ^{14}C aktivitás koncentrációjának mérése. Mivel a cellulóz nem mobilizálódik újra a fák szöveteiben (Hertelendi and Csongor 1982; Hua et al. 1999), így a fák évgűrűi alkalmassá válnak az atmoszférikus radiokarbon szint nyomon követésére (Tans et al. 1979; Otlet et al. 1989; Isogai et al. 2002; Mazeika et al. 2008).

Viszont a radiokarbon nem csak a környezetvédelemben és a kormeghatározásban alkalmazható sikeresen. Fontos szerepet tölthet be, indikátorként radioaktív nyomjelzési folyamatokban. Ezt a technikát, ahol a vizsgálni kívánt nem radioaktív elemhez, nyomjelzőként kisebb mennyiségű radioaktív elemet kevernek Hevesy György dolgozta ki. A sugárzó és nem sugárzó izotópok kémiaiilag teljesen azonosan viselkednek és vesznek részt a különböző folyamatokban, viszont az így hozzáadott ritkább, radioaktívan bomló elem mérésével nyomon követhetőek a folyamatok. Hevesy elsőként növényekben, később állatokban lejátszódó biológiai folyamatok vizsgálatára alkalmazta. Többek között víz, foszfor és vas anyagcsere tanulmányozásával foglalkozott (Hevesy és Paneth, 1938; Hevesy, 1948; Kamen, 1951).

Az egyszerűbb szerves vegyületeken túl, bonyolultabb szerves vegyületek, fehérjék radioaktív nyomjelzése is kivitelezhető. Így vizsgálhatjuk az anyagok transzport folyamatait, metabolizmusát egy adott sejtben, szervezetben. Radioaktív nyomjelzésre természetesen nem csak a radiokarbon használható, hanem más radioaktívan bomló izotóp is, amelyeket az első táblázat szemléltet.

1.Táblázat: Néhány radionuklid jellemző fizikai adatai (Tóth és Tömböly 2012)

Izotóp	Felezési idő	Sugárzás típusa	Sugárzás max. energiája
³ H	12,4 év	β ⁻	18,6 keV
¹⁴ C	5730 év	β ⁻	156 keV
¹¹ C	20,4 perc	β ⁺	0,96 MeV
¹⁵ O	2,0 perc	β ⁺	1,72 MeV
¹³ N	9,9 perc	β ⁺	1,19 MeV
³² P	14,3 nap	β ⁻	1,71 MeV
³³ P	25,3 nap	β ⁻	249 keV
³⁵ S	87,4 nap	β ⁻	167 keV
¹²³ I	13 óra	γ	159 keV
¹²⁵ I	60,2 nap	γ	35 keV
¹³¹ I	8 nap	β ⁻	607 keV
		γ	364 keV

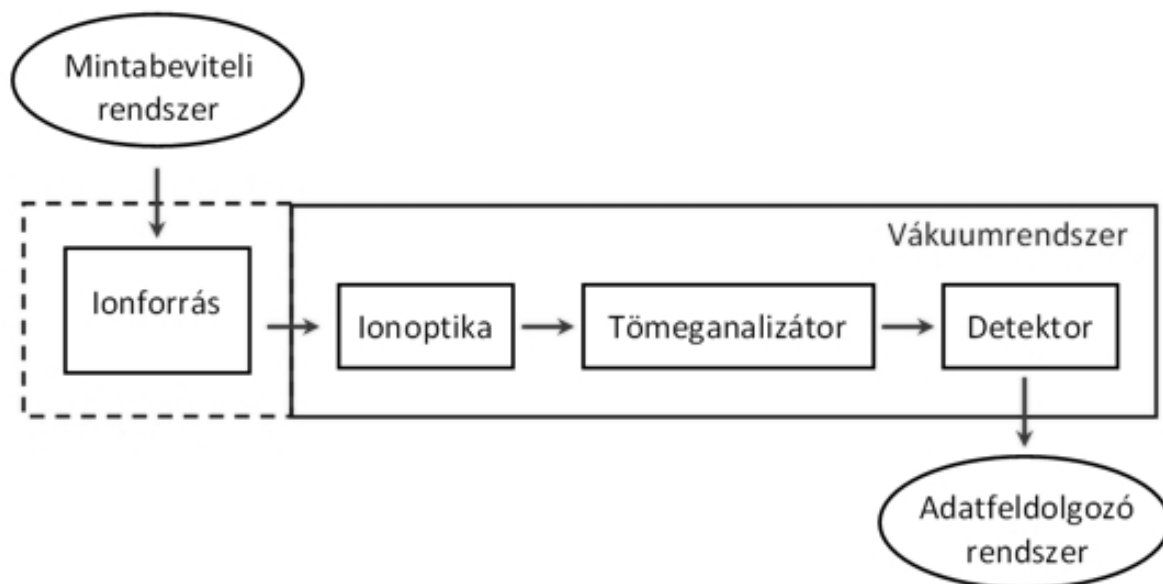
Élettudományi kutatásokban főleg a trícium (³H), radiokarbon (¹⁴C), ³²P és ³⁵S izotópok felhasználása a leggyakoribb. Gyógyszerfejlesztésben, ahol a hatóanyagok metabolizmusára és farmakokinetikai vizsgálatára van szükség, ott alkalmazhatóak a ¹⁴C és ³H jelzett vegyületek. Fehérjeszintézis vizsgálatánál a trícium és radiokarbon jelölésen túl a ³⁵S jelölt aminosavakat alkalmaznak. Nukleinsavak szintézisének ³²P és ³³P jelzett nukleotidokat használnak (Tóth és Tömböly 2012).

2.1.3. A ¹⁴C mérése tömegspektrométerrel

A tömegspektrométerek széles körben elterjedt igen pontos műszer családot fednek le. A tudományos kutatás számos területén alkalmazzák ezen műszereket. A tömegspektrométerek segítségével protein szekvenciák vizsgálata is lehetséges, továbbá a teljes genom szekvenálásokban is jelentős szerepet tölthetnek be (Yates 1998).

Az orvos és egészségtudományon túl, a környezetvédelemben is jelentős szerepet játszhatnak ezek a mérési módszerek, mivel a környezetbe kerülő vegyszerek,

fertőtlenítőszer, gyógyszer, hormonok, toxinok, növényvédőszer, felületaktív anyagok és más szerves vagy szervetlen anyagok kimutatására is alkalmasak. Továbbá királis szennyezők kimutatása is lehetséges (Richardson 2006). A tömegspektrométerek általános felépítését a 2. ábra szemlélteti.



2. ábra: A tömegspektrométerek általános felépítése (Internetes hiv. 1.)

A tömegspektrométerek rendkívül összetett és általában nem szelektív, hanem igen széles spektrum lefedésére alkalmas vizsgálati eszközök. Különböző csoportokat alkothatunk az ionforrás, tömeganalizátor és a detektor típusa szerint egyaránt. Viszont a továbbiakban csak a tanulmány szempontjából fontos ^{14}C mérésre alkalmas tömegspektrométer jellemzésére fektetek hangsúlyt.

A ^{14}C direkt mérése úgy valósítható meg, hogy ionforrásként magfizikai gyorsítót használnak. Az AMS magasabb hatásfokkal és gyorsabban működik, mint a hasonló vizsgálatokhoz alkalmazott, de nem tömegspektrométeres, hanem radiometrikus (LSC vagy GPC) készülékek. Az AMS kisebb mintamennyiség (1-2 mg az 1-2 g helyett) pontos feldolgozását teszi lehetővé. Hátrányát a készülék magas ára és az alkalmazott előkészítési technikák összetettsége jelenti (Janovics et al 2011).

A debreceni ATOMKI-ban telepített, ^{14}C mérésekre alkalmazott MICADAS-AMS berendezés a gyorsító szakaszban $1+$ ionnyalábot hoz létre a negatív szén ionokból, és többszörös molekula-ütköztetés segítségével csökkenti az interferáló molekulaionok

menyiségét az analízisre használt nyalábban. A készülék nem csak ^{14}C mérésére, hanem $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ arány meghatározására is egyidejűleg alkalmas. Ez számos AMS-nél nem megoldható, és csak nehezen, részlegesen pótolható. Más AMS-ekhez képest felépítése is egyszerűbb és mérete is kisebb alapterületű. A készülék dedikáltan rutinszerű ^{14}C mérésekre fejlesztett. A fejlesztés lényeges újításai megkönnyítik és stabilabbá teszik üzemeltetését (Synal et al. 2007).

Az orvosbiológiai kutatásokban egyre nagyobb szerepet játszik a radiokatív nyomjelzés. Viszont eddig a műszerek összetettsége, időigényes minta előkészítés, alacsony mérési kapacitás, esetlegesen magas sugárdózis hátráltatta elterjedését. Ezen problémák megoldására született meg az ATOMKI-ban telepített AMS készülékhez hasonló BioMICADAS készülék is, amely készülék egy potenciális alternatívát szolgáltat a radiokarbon tömegspektrométerek körében a gyógyszeripar számára. Amely készülék a gyógyszerfejlesztések különböző fázisait lerövidítheti és megkönnyítheti (Ulrich 2011). A ^{14}C alkalmazási területei a legegyszerűbb nyomjelzési vizsgálatokon túl kiterjedhetnek igen összetett vizsgálatokra:

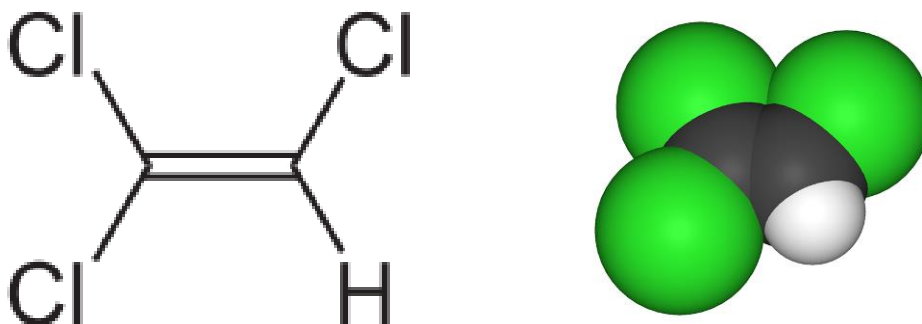
1. Gyógyszeripari alkalmazás: gyógyszer kinetikája és dinamikája
2. Táplálkozás: tápanyagok beépülése, kinetikája és dinamikája
3. Genotoxicitás: adott anyag kötődése a DNS-hez
4. Neurológia: egy adott vegyület átjutása a vér agy gáton
5. Biológiai regeneráció tanulmányozása: sejtek megújulásának tanulmányozása (Sculze-König 2010)

2.2. A triklór-etilén

2.2.1. A triklór-etilén fizikai és kémiai tulajdonságai

Szintelen, kloroformra emlékeztető szagú vegyület, halogénezett szénhidrogén. Az etilén klórtartalmú származéka. Nagy fajsúlyú, könnyen mozgó folyadék. Vízen rosszul oldódik, viszont szerves oldószerekkel szinte kivétel nélkül elegyedik. Jó oldószer. Nem gyúlékony, az égést nem táplálja. A közönséges fémeket nedves közegben sem támadja. Fény

és alumíniumpor vagy zsírsavak hatására sósav hasad le róla. Ezt a folyamatot aminok, például a trietil-amin akadályozza (Erdey-Grúz 1963).



3. ábra: A triklór-etilén szerkezete

2. Táblázat: A triklór-etilén fontosabb tulajdonságai (Internetes hiv. 2-3-4 alapján).

Neve	Triklóretilén, triklóretén, 1,1,2-triklóretilén; etilén-triklorid
Molekulaképlet	C_2HCl_3
Moláris tömeg	131,4 g/mol
Sűrűsége (20 °C-on)	1,46 g/cm ³
Relatív sűrűsége	1,5
Olvadáspont	-87 °C
Forráspont	87 °C
Oldhatóság (20 °C, vízben)	1 g/l
Relatív párolgási sebesség (ButAc=1)	6,2
Gőznyomás (20°C-on)	7,8 kPa
Felezési ideje vizes közegben	300 nap
Gyúlékonyság	Nem gyúlékony
Öngyulladási hőmérséklet	420 °C

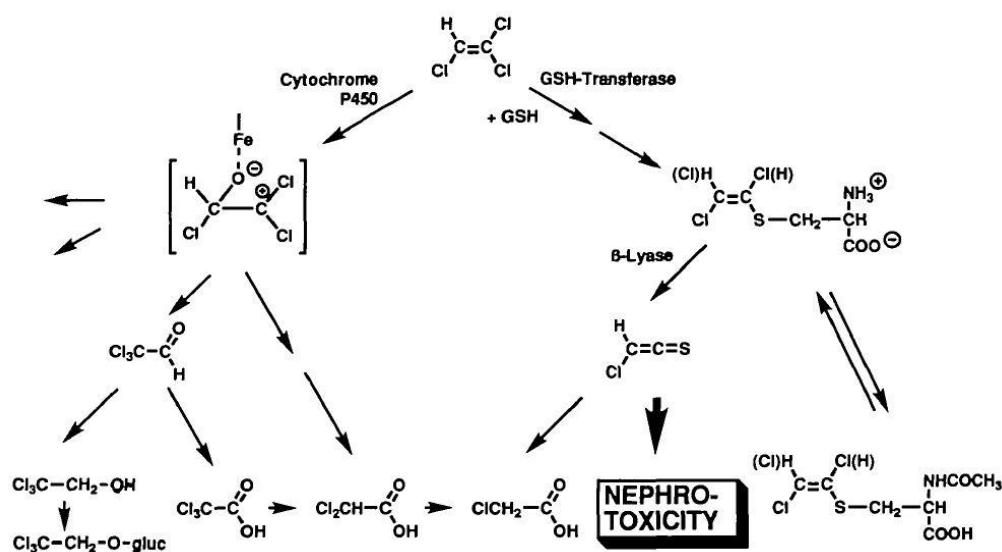
2.2.2. A triklór-etilén ipari alkalmazásai, felhasználása

Elsősorban oldószerként használják vagy használták a múltban. Többek között nyersgumi, bitumen, kátrány, olajok és zsírok, viaszok, kenőanyagok, gyanták, cellulózéterek oldására. Gáztisztításban kén és foszfor oldószereként alkalmazták. Esetleg fémek tisztítására

vagy üveg és textilanyagok zsírtalanítására is alkalmazható. A száraz vegytisztítás egyik kedvelt anyaga volt mosodákban. Szerves szintézisekbe, kártevők irtására, tojás konzerválására is alkalmas a gépek alkatrészeinek és anyagainak tisztításán túl (Erdey-Grúz 1963, Kuney 1986). Korábban a gyógyszeripari minőségnek megfelelő TCE-t használták altatószerként is sebészeti, fogászati és akár szülészeti eljárásoknál is. Úgy becsülik, hogy a múltban évente mintegy 60 000 ember volt kitéve triklóretilén expozíciónak ilyen módon (Rudolf et al. 1995). Háztartási cikkekben is fellelhető, mint például hibajavító folyadékban, festék eltávolítóknak vagy folttisztítókban, ragasztókban (Frankenberry et al. 1987). Fontos ipari termék vagy alapanyag további szerves szintézisekhez. Az USA, Nyugat-Európa, Japán gyártó kapacitása $0,53 \cdot 10^6$ t/év volt a 90-es évek elején (Weissermel & Arpe 1994).

2.2.3. A triklór-etilén élettani hatásai

A triklór-etilén különböző élettani hatásokkal bír, az expozíció helyétől függően. Kisebb mennyiségben irritáló hatást fejt ki a bőrre, szemre és nyálkahártyára. Nagyobb mennyiségben belélegezve vagy lenyelve általános mérgezési tüneteket produkál. Jellemzően szédülést, hányingert, álmoságot, gyengeséget, fejfájást vagy akár eszméletvesztést okozhat. Nagyobb mennyiségben és hosszabb távon a belső szervek károsodását okozhatja, veszélyes a májra, vesére és tüdőre egyaránt. Jól oldódik a szervezet lipidekben gazdag képleteiben és képes átmenni a vér-agy gáton is. Az emberi szervezetben végbemenő metabolizmusában főként a Cytochrome P450 és GSH-Transferase enzim játszik fontos szerepet.



4. ábra: A TCE metabolizmusa az emberben (Brüning et al.1998)

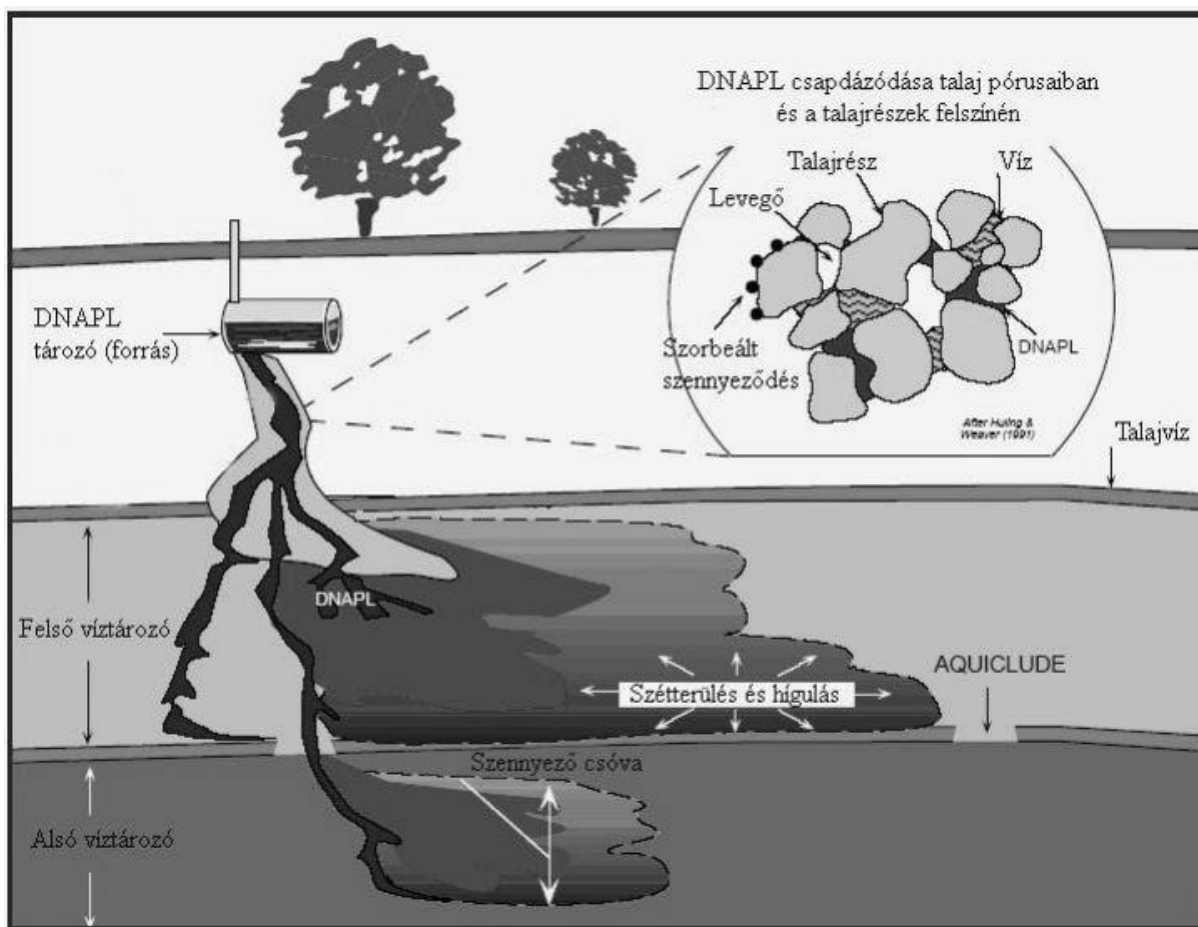
Legsúlyosabb esetben a TCE képes akut szervkárosodást és halálos kimenetelű mérgezést is okozni. Viszont LD50 értéke alapján (ami 4920 mg/kg, patkányon, szájon át) gyenge méregnek mondható (Internetes hiv. 5.). A mérgezési tünetek mellett kiemelten fontos, hogy a TCE rákkeltő tulajdonságú (EPA 2011).

Állatkísérletek alapján a fő tumor kialakulási helyek a máj és tüdő az egereknél, hím patkányok esetében pedig a vese (Fahrig et al. 1995). Kísérletek alapján, amelyekben ^{14}C nyomjelzést is alkalmaztak, kimutatták, hogy a TCE és metabolitjai képesek a DNS-hez és egyes fehérjékhez kötődni, így részt vehetnek a tumorgenezisben (Kautiainen et al. 1997., Banerjee and Duuren 1978). A fajok között viszont különbségek adódhatnak TCE toxikusságát illetően, mivel a különböző szervezetek különböző módon is metabolizálják a vegyületet, így eltérő módon reagálnak az expozícióra (Dekant et al. 1986). Magzatokra és újszülöttekre is különösen veszélyes lehet, mivel képes átjutni a placentán, és az anyatejben is megjelenhet (Internetes hiv. 6.)

Vizsgálata és a szennyezett területek kármentesítése rákkeltő hatása miatt is kiemelten fontos. Mivel hosszú távú expozíció esetén jelentős számú embert veszélyeztethet jelenléte a talajban, talajvízben, ivóvízbázisban. Ezért a szennyezés terjedését, valamint biomagnifikációt meg kell előzni.

2.2.4. Környezetszennyezés és lebontási, kármentesítési lehetőségek

A munkabiztonsági előírások be nem tartása, szándékos és véletlenszerű kibocsátások következtében a környezetbe kerülhet. Alacsony oldhatóságának és illékonyságának köszönhetően főként gőzfázisba, a levegőben van jelen. Ahol a hidroxil gyökök hatására könnyen bomlik. Ezen folyamatok hatására felezési ideje 1-11 napra tehető a levegőben. Mérsékelt oldhatóságának köszönhetően tehát elsődlegesen a légkörbe való bejutása és ott lebomlása figyelhető meg. Ám nagy mennyiségű kibocsátás vagy szennyezés hatására a talajvízbe jutva, azzal együtt vándorolva képes kifejteni hatásait. Mivel ilyen közegben nem képes elillanni így felhalmozódhat a vízzáró rétegeken. Az ilyen szénhidrogéneket a DNAPL vegyületek közé sorolják (EPA 1991,2001). Az 5. ábrán jól látható, hogy a szennyező forrástól haladva hogyan és milyen módon terjednek a talajban a DNAPL vegyületek.



5. ábra: A DNAPL vegyületek viselkedése a talajban (Internetes hiv.7.)

A TCE kémiai úton való lebontására több lehetőség is fellelhető. Egyes módszerek mind laboratóriumi, mind terepi körülmények között alkalmazhatóak. Fontos, hogy a kármentesítés során semmilyen káros melléktermék ne maradjon hátra. Egyes esetekben katalizátorok segíthetik a reakciókat. Például a perszulfát vagy peroxi-monoszulfát esetében a Fe^{2+} kisebb mértékben javíthatja a hatásfokot (Ki-Man et al. 2010). A Nátrium-perszulfát és H_2O_2 mellett szintén Fe^{2+} továbbá tioszulfát alkalmazható katalizátorként. Katalizátor mentes reagensként alkalmazható a KMnO_4 . Ezen eljárások laboratóriumi körülmények között viszonylag hosszú időt vesznek igénybe, akár 24 órás reakcióidőről beszélhetünk. Viszont ezen eljárásokkal közel 100 %-os TCE degradációt érhetünk el. A H_2O_2 és katalizátorai akár terepi körülmények között is alkalmazható remediációs eljárás (Fekete-Kertész et al. 2013). A H_2O_2 mellett alkalmazható még TiO_2 katalizátorként, ám a vegyületek mellett az 1 vagy annál magasabb (akár 2,5) atm oxigén nyomás nagyban javíthatja a hatásfokot és csökkentheti a reakcióidőt, így akár 90 percre csökkenthető laboratóriumi körülmények között a lebontás,

ami laboratóriumi kísérleteknél hasznosnak bizonyulhat (Hoseini et al 2013). A H_2O_2 -al együtt az UV degradáció is ígéretes, mivel káros melléktermékek nélkül alkalmazható (Dobaradaran et al. 2014).

A kémiai lebontáson túl egyes esetekben indokolt lehet a biológiai úton való lebontás. Amikor káros segédanyagok és melléktermékek nem keletkezhetnek, akkor sokkal alkalmasabb lehet a biológiai szervezetek segítségével való degradáció. Továbbá néhány esetben olcsóbban, költséghatékonyabban érhetünk el közel azonos hatásfokú végeredményt.

A TCE biodegradációjára több alkalmas módszer is fellelhető a szakirodalomban. Egyes *Dehalococcoides* fajok képesek reduktíven dehalogénezní a TCE-t egészen eténig, ezáltal egy ártalmatlan végtermékké degradálni (West et al. 2008). A *Dehalococcoides* TCE reduktív dehalogenáza a baktérium *tceA* génje által kódolt (Johnson et al. 2005). Ezen baktériumok viszont szigorúan anaerob szervezetek (Jianzhong et al. 2005). Továbbá egyes metán, propán vagy ammónia oxidáló baktériumok (mint például: egyes *Mikobaktérium* törzsek vagy *Nitrosomonas europaea*) is képesek bontani a TCE-t (Wackett et al. 1989., Arciero et al. 1989., Little et al. 1988.)

Alternatívaként a Debreceni Egyetemen is vizsgált *Pseudomonas putida* F1 baktérium szolgálhat, amely a rendelkezésre álló adatok alapján szintén képes bontani a triklór-etilént (Pintér et al 2010).

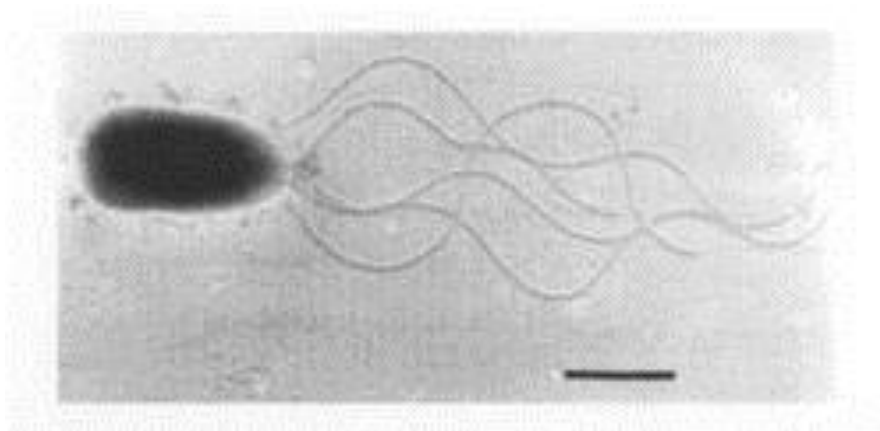
2.3. *Pseudomonas putida*

2.3.1. *Pseudomonas putida* F1 általános tulajdonságai

3. Táblázat: A *Pseudomonas putida* F1 taxonómiája (Internetes hiv. 8.)

Domén:	Bacteria
Törzs:	Proteobacteria
Osztály:	Gamma Proteobacteria
Rend:	Pseudomonadaceae
Család:	Pseudomonadaceae
Nemzetség:	<i>Pseudomonas</i>
Faj:	<i>Pseudomonas Putida</i>

A *Pseudomonas putida* F1 egy gramm negatív, pálcika alakú aerob baktérium, ami számos környezeti típusban előfordul. A *P. putida* faj tagjai rendkívül széles skálájú metabolikus aktivitást mutatnak, ami segíti az adaptációjukat a különböző környezetekhez. Ennek köszönhetően megél szerves anyagokkal szennyezett talajban és üledékben egyaránt. Továbbá gyakran megtalálható növényi növekedést serkentő endofita baktériumként (Wu et al. 2010). Mozgását csillók poláris csillók segítik, növekedési optima 25-30 °C-on található. Könnyen izolálható a talajon és üledéken túl vizekben is. A baktérium nem csak megélni, hanem növekedni is képes különböző szerves szennyezőkkel terhelt területeken. Az F1 jól növekszik benzolon, toluolon és etil-benzolon egyaránt. Az egyik legtöbbet vizsgált baktérium amely képes bontani az aromás szénhidrogéneket. Az aromás szénhidrogének a toluol dioxygenáz enzim szubsztrátjai, amely képes oxidálni a triklór-etilént, indolt, nitrotoluolt, klórbenzolt és más aromás szubsztrátot. Viszont a *P. putida* F1 nem képes a TCE-t szén és energia forrásként felhasználni, csak detoxifikálni azt más szénforrás mellett. Ezen tulajdonságainak köszönhetően gyakran alkalmazott szervezet a bioremediációs eljárások során (Internetes hiv. 9.).

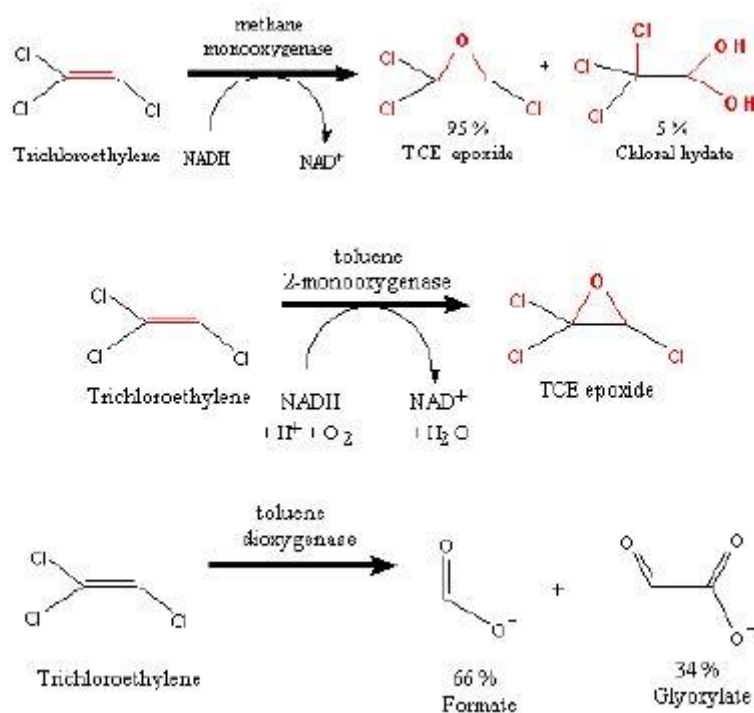


6. ábra: *Pseudomonas putida* F1 (Internetes hiv. 9.)

2.3.2. *Pseudomonas putida* F1 triklór-etilén oxidációja

A *P. putida* F1 több enzim segítségével is oxidálhatja a triklór-etilént:

- toluol dioxygenáz
- toluol 2-monooxygenáz
- metán monooxygenáz (Morono et al. 2004)



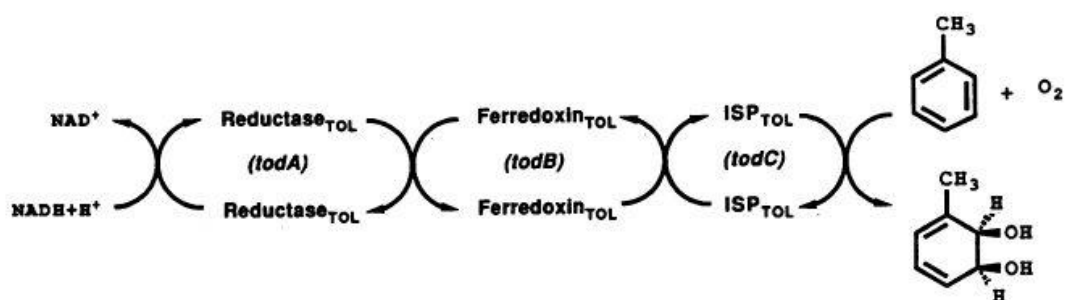
7. ábra: A triklór-etilén aerob lebontásának módjai

A tanulmányban a toluol dioxigenáz enzim és enzimrendszerrel foglalkozom kiemelten, amelynek indukálásához nem elegendő a TCE megjelenése. Az enzimrendszer aktiválódásához szükség van egy elsődleges szubsztrátra, amely képes elindítani a gének expresszióját. Ezt követően mehet végbe a TCE oxidációja is az enzimrendszer segítségével. Ezt a folyamatot kometabolizmus néven ismert (Heald és Jenkins 1994, Peterson 1999). Ilyen esetben a mikroorganizmusnak szüksége van egy elsődleges szubsztrátra, amely szénforrásként szolgál növekedéséhez, populációjának fenntartásához, és képes az enzimrendszer aktiválására. Ezt az enzimrendszert elsősorban a toluol indukálhatja, ám kiváltható lehet más anyagokkal is. Ennek a másodlagos szubsztrát-transzformációnak a segítségével képesek lehetünk lebontani perzisztens vegyületeket. Továbbá a folyamat szabályozhatóvá válhat, az elsődleges szubsztrát adagolásának függvényében. Az elsődleges szubsztrát vagy induktor jelenlétében megjelenő enzimek nem szubsztrát specifikusak, így lehetséges, hogy több illékony szerves vegyület lebontására is alkalmasak (Horvath 1972).

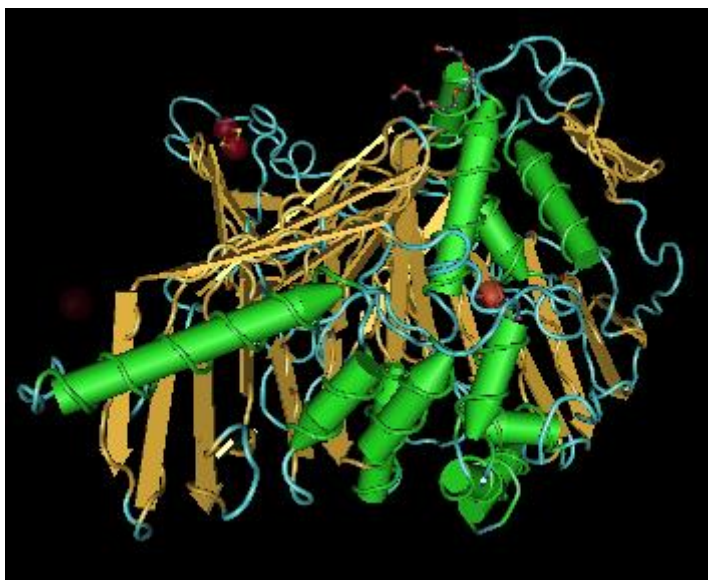
A toluol-dehidrogenáz enzimrendszer a *P.putrida* F1-ben a *tod* operonon található, amely több gént kódol: *tod*(ABC1C2).

- *todA* (reduktáz_{TOL})
- *todB* (ferredoxin_{TOL})
- *todC1* (terminális dioxigenáz nagy alegysége)
- *todC2* (terminális dioxigenáz kis alegysége) (Zylstra et al. 1988).

Az enzimrendszer felépítését a 7. ábra, az enzim 3D szerkezetét pedig a 8. ábra szemlélteti.

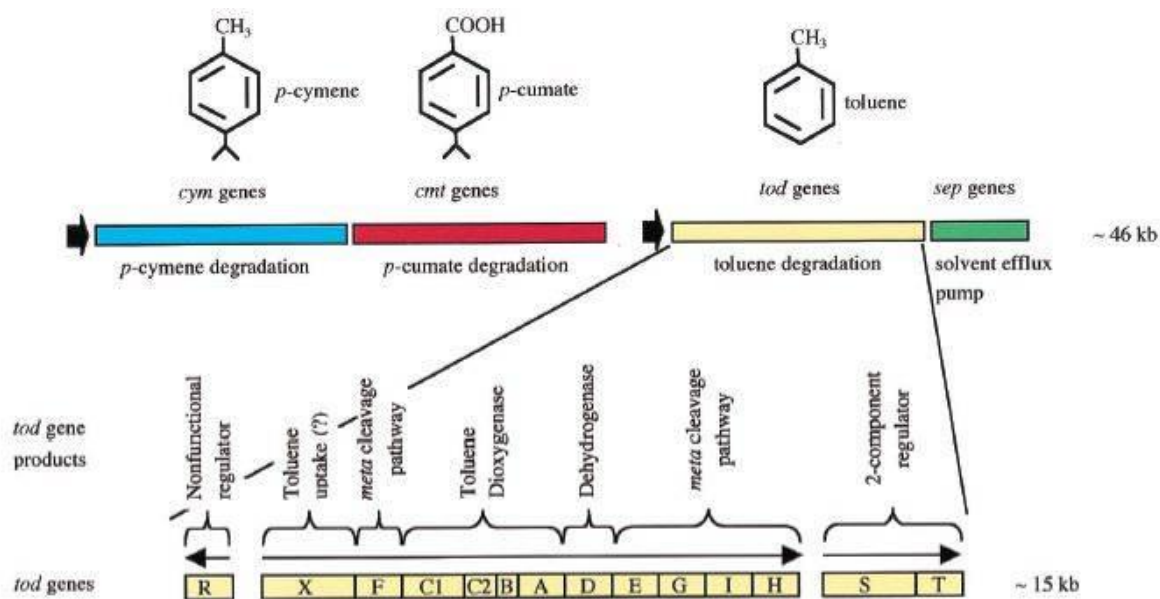


8. ábra: A toluol-dioxigenáz enzimrendszer (Zylstra et al. 1988)



9. ábra: A toluol-dioxigenáz enzim 3D szerkezete

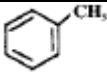
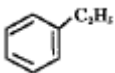
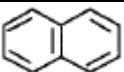
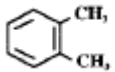
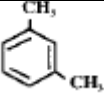
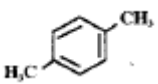
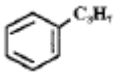
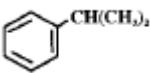
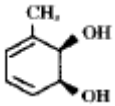
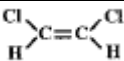
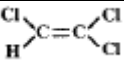
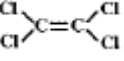
A *tod* génklaszterbe a toluol dioxigenázt kódoló géneken kívül egy dehidrogenázt és további, a toluol degradációjához szükséges gének tartoznak, mint például a toluol felvételéhez szükséges gén. A *tod* génklasztert a 9. ábra szemlélteti. (Parales et al. 2000).



10. ábra: A toluol dioxigenáz gén klaszter genetikai szerveződése (Parales et al. 2000)

A toluol dioxigenáz számára számos vegyület szolgálhat szubsztrátként, ám a *P.putida* F1 nem minden anyagot képes felhasználni a növekedéséhez, amint azt korábban a kometabolizmus kapcsán említettem. A legfontosabb vegyületeket, amelyek szubsztrátként szolgálhatnak az enzim számára, a 3. táblázatban foglalom össze. Jól látható, hogy számos vegyület szubsztrátja az enzimnek, ám a baktérium növekedését nem szolgálja. Továbbá látható, hogy a baktérium, a toluol dehidrogenáz enzim segítségével nem képes bontani PCE-t. Ezt fontos figyelembe venni, mivel egyes esetekben a TCE úgy jelenik meg, mint a PCE bomlásterméke. Viszont figyelemre méltó, hogy rendkívül sok mérgező anyagot képes degradálni az enzim (például: TCE, DCE, Xilol, Toluol stb.). Ez teszi kiemelkedően fontossá, és alkalmassá különböző bioremediációs feladatokra.

4. táblázat: A toluol dioxigenáz által bontható vegyületek (Parales et al. 2000)

Vegyület	Szerkezet	Növekedési szubsztrát a <i>P.putida</i> F1 számára ^a	Szubsztrát a toluol dioxigenáz számára ^b
Toluol		+	I
Benzol		+	I
Etil-Benzol		+	I
Naftalin		-	I
o-Xilol		-	N
m-Xilol		-	I
p-Xilol		-	I
Propil-benzol		-	I
Izopropil-benzol		-	I
Toloul cis-dihidrodiol		n.i	N
DCE		n.i.	I
TCE		-	I
PCE		n.i	N

^a +, Igen; -, NEM; n.i, nincs adat

^b I, Igen; N, Nem

2.4. A TCE lebontás és transzport radiokarbonos kutatása az ENVIKUT projektben

A multi és interdiszciplináris kutatási projekt célja a vizek minőségének megóvása, célzott kémiai és biológiai kutatások segítségével. A munkacsoportok céljai analitikai módszerek fejlesztése a nagy hígításban jelentkező szennyezések kimutatására, javaslatok és használható módszerek kidolgozása a szennyező források megszüntetésére. Továbbá eljárások kidolgozása a már meglévőszennyezések felszámolására. A projektben résztvevő szervezetek között szerepel a Debreceni Egyetem hat kutatócsoportja, a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszékének Felületkémiai Kutatócsoportja (a környezetkémiai csoport keretében), az MTA ATOMKI HEKAL laboratóriuma. Az egyetem különböző területeit egyesítve, a HEKAL egyedülálló ismereteivel és műszeregyüttesével kiegészülve elsőként a szennyezett víz állapotától a tiszta víz állapotáig való eljutást célozták meg.

A Hertelendi Ede Környezetanalitikai Laboratórium (HEKAL) a felsorolt kutatásokkal járul hozzá a pályázatban részletezett projekt sikeres teljesítéséhez: szerves szennyezők biodegradációjának nyomon követése a kiindulási és végtermék stabilizotóp-frakcionálódásának és az ezt befolyásoló tényezők vizsgálatával; ^{14}C -alapú izotópanalitikai módszerek fejlesztése és alkalmazása célzott kémiai és biológiai alapkutatásokhoz környezeti szennyezők felszámolására; valamint a kijelölt szennyezett vízbázisok hidrogeológiai és izotóphidrológiai vizsgálata. A projekt csoportjait és csoportok közötti kapcsolatokat az 1. számú melléklet mutatja (Internetes hiv. 10.).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

A projekt keretében izotópanalitikai módszerek alkalmazása a célunk, melyben gyorsító tömegspektrométer segítségével kívánjuk mérni a radioaktívan nyomjelzett triklór-etilén mennyiségét a különböző fázisokban (tápanyag, baktérium). Ehhez elsősorban meg kell vizsgálnunk a feltárás minőségét és mind a preparálás és alkalmazott izotópanalitikai módszerek hatásfokát és reprodukálhatóságát. Az munkafolyamatok során keletkező szennyeződések felderítése is fontos pontja a kutatásnak.

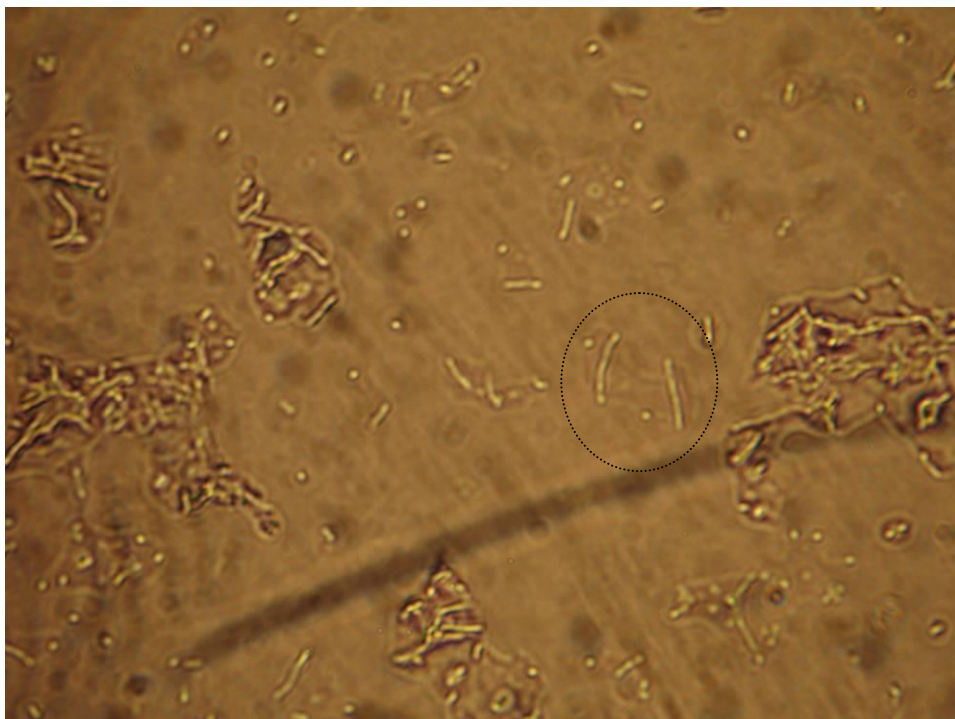
3.1.TCE vizes oldat roncsolása

Vizsgáltuk vizes oldatban a TCE roncsolásának hatásfokát. A vizsgálatban 5 ml krómkénsav és a 48 órás roncsolásoknál 10 ml kénsav-ezüstsulfát mellé 10 ml, 0,65 g/l TCE oldatot injektáltunk fecskendővel a vákuumtérbe. Ezt követően 120 °C-on 2,5 óráig roncsoltuk az oldatot. Majd a keletkezett CO₂ gázt tisztítottuk, mennyiségét mértük és $\delta^{13}\text{C}$ stabilizotóp-arányát Thermo Finnigan Delta plus XP típusú stabilizotóp-arány mérő tömegspektrométer segítségével határoztuk meg. Ezek alapján vizsgáltuk a roncsolás hatásfokát és minőségét. A keletkezett CO₂ abszolút mennyiséget egy ismert térfogatú térben, adott hőmérsékleten nagy pontosságú nyomásméréssel határoztuk meg, az ideális gáztörvény alapján, amelyből a szén mennyisége is meghatározható. Ebből pedig következtethetünk a TCE szén mennyisége alapján a roncsolás hatékonyságára.

3.2. *Pseudomonas putida* F1 tenyésztése

A baktériumtenyészetek előállítását a Debreceni Egyetem – Természettudományi és Technológiai Karának Biomérnöki tanszéke végezte az ENVIKUT projekt közös résztvevőjeként. A HEKAL feladata a minták előkészítése izotópanalitikai mérésekre. Elsőként meghatározták a baktérium növekedési görbáját steril, 100 ml, 0,5 % kazein peptont tartalmazó BSM (Basalt Salt Medium) táptalajon. A vizsgálatok során meghatározták, hogy az exponenciális szakasz 2-4 óra közé tehető. A tenyészetek előállítása után következhetett a kontroll és TCE-vel kezelt minták előállítása. Mind a TCE-vel kezelt és kezeletlen tenyészetekből 0,1,2,3,4 és 5 óra inkubálási idő elteltével kaptunk 4 °C-ra lehűtött 10 ml-nyi

mintákat stabilizotóp és radiokarbon mérésre. Ezen a hőmérsékleten a baktériumok nem, vagy csak elhanyagolható mértékű aktivitást mutatnak. A baktériumok optikai mikroszkópos képét a 11. ábra szemlélteti.



11. ábra: A tápoldat és benne lévő baktériumok mikroszkópi képe (saját kép)

3.3. ^{14}C előkészítés és mérés

3.3.1. Előkészítés

Elsőként a baktériumtenyészetek és tápoldatok szárazanyag és baktériumtartalmát határoztam meg. Az előzetes mérések során 40 ml-es mintákkal dolgoztunk, ahol centrifugálással elválasztottam a baktériumtömeget a tápoldattól. Az előzetes eredmények alapján a tápoldat megközelítőleg 1%-os szárazanyag tartalommal és 1 mg/ml baktériumtömeggel bír.

Ezek alapján 15 ml-es centrifugacsőbe 4,5 ml mintát mértem, amelyet 6000 rpm-en, 4°C-on 30 percig centrifugáltam, a baktériumok elválasztásának céljából. A felülúszót eltávolítottam további mérésekre megőrizve. A leülepedett baktériumokat kétszer, szénmentes desztillált vízzel öblítettem, és az előzőekben meghatározott módon centrifugáltam. A

desztillált vizet a baktériumokról a felülúszóhoz mértem át, így megőrizve azon anyagokat, amelyek esetleg a baktériumok felületén megtapadtak és a desztillált vízzel eltávolíthatók.

Ezt követően kémcsőbe helyeztem a felülúszót és a kinyert, átöblített baktériummennyiséget, majd liofilizáltam azt. Ezt követően mind a baktériumok tömegét és az oldat szárazanyagtartalmát mértem. Az előkészítés lépéseit a 12. ábra illusztrálja.

Az így nyert mintákból, felülúszókból 0,7 mg-ot mértem automata mintaadáslású stabilizotóp-arány mérésre és a baktérium és felülúszó mintákból (ahol a kinyert mennyiség lehetővé tette) 2-mg-ot pedig AMS és $\delta^{13}\text{C}$ mérésre készítettem elő. A minták mellett standard, ismert stabilizotóp-arányú anyagokat is bemértünk (IAEA N1 és N2 standard, IVA Sediment standard, Sulfanilammide standard). Égéssegítőként vanádium pentoxidot adtunk a mintákhoz, a mintamennyiség kétszeresét.

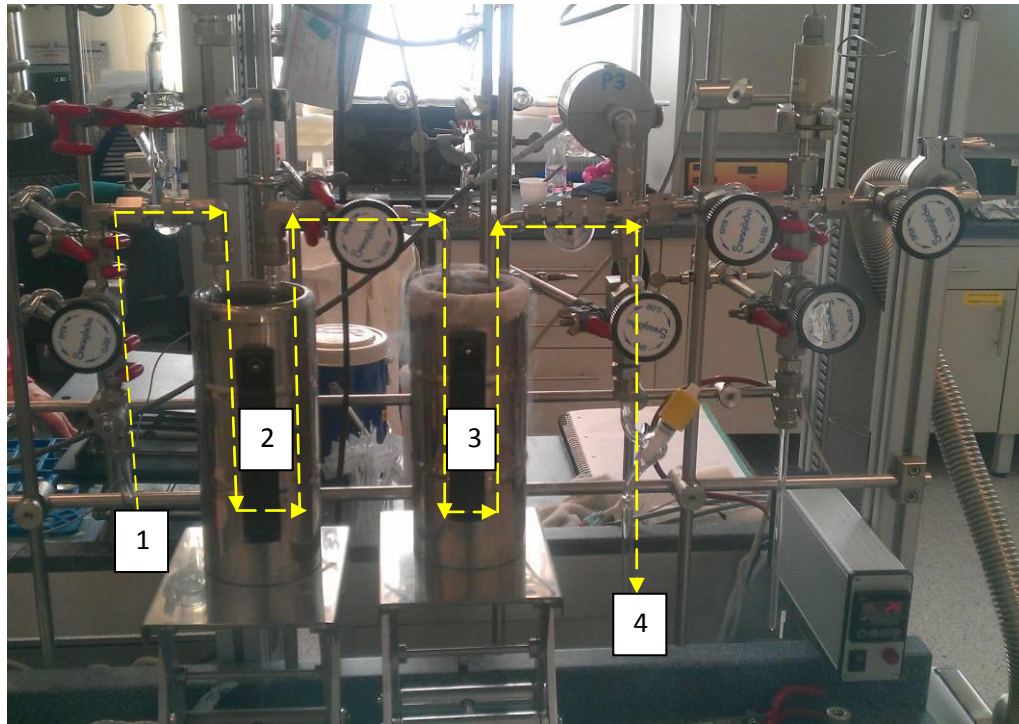


12. ábra: Az előkészítés egyes lépései (mérlegelés-centrifugálás-mosás-fagyasztás-liofilizálás)

3.3.2. Feltárás

A radiokarbon és stabilizotóp-arány mérésekhez a baktérium mintákat MnO_2 segítségével égettem el. A bemért mintamennyiség kétszeres mennyiségét mértem be MnO_2 -ból, majd $550\text{ }^\circ\text{C}$ -on 12 órán át égettem. A bemért mintából így módon keletkezett szén-dioxidot a szennyező anyagoktól, víztől elválasztva speciális rendszeren, vízkifagyasztó csapdán keresztül vezetve megtisztítottam. A keletkezett CO_2 abszolút mennyiséget egy ismert térfogatú térben, adott hőmérsékleten nagypontosságú nyomásméréssel határoztam meg, az ideális gáztörvény alapján. Ezt a feltárási folyamatot követően került a minta grafitizálásra, majd AMS ^{14}C mérésre. A minták mellett a háttérkorrekció érdekében, azokkal egyidejűleg és azonos módszerrel szerves, de ^{14}C mentes fosszilis nemzetközi referencia anyagot preparáltam és analizáltam. A gáztisztító rendszert a 13. ábra szemlélteti:

1. Minta adagolása (leforrasztott ampulla feltörése)
2. Vízkifagyasztó csapda
3. CO₂ csapda
4. Ismert mennyiségű CO₂ grafitizáláshoz



13. ábra: Tiszta CO₂ kinyerése

3.3.3. Grafitizálás és préselés

A reakcióteret egy külső és belső boroszilikát üveg kémcső alkotja. A külső kémcsőbe mérjük a titán-hidridet és a cinket szilárd, por formában. A külső kémcső egy bemélyedéssel van ellátva az oldalán, ami megakadályozza, hogy a belső kisebb kémcső, a reagensekkel kitöltött térbe ereszkedjen. Ebbe a kisebb üvegbe mérjük a vas katalizátort, ami szintén szilárd por alakjában történik meg. Ezt a folyamatot egy magas hőmérsékletű előkezelés követi, ami után az egymásba csúsztatott kémcsöveket egy egyszerű gázkezelő rendszerre illesztve, átfagyasztjuk ide a mintagázt, tisztított szén-dioxid formájában. A gázkezelő rendszeren a mintagázt folyékony nitrogén segítségével fagyasztjuk át a grafitizálás reakcióterébe, és a gáz kifagyása után az üvegcsövet leforrasztjuk. Ezt követően kemencében, igen magas hőmérsékleten, két lépcsőben történik meg a grafitizálás. Elsőként 3 órán keresztül a titán

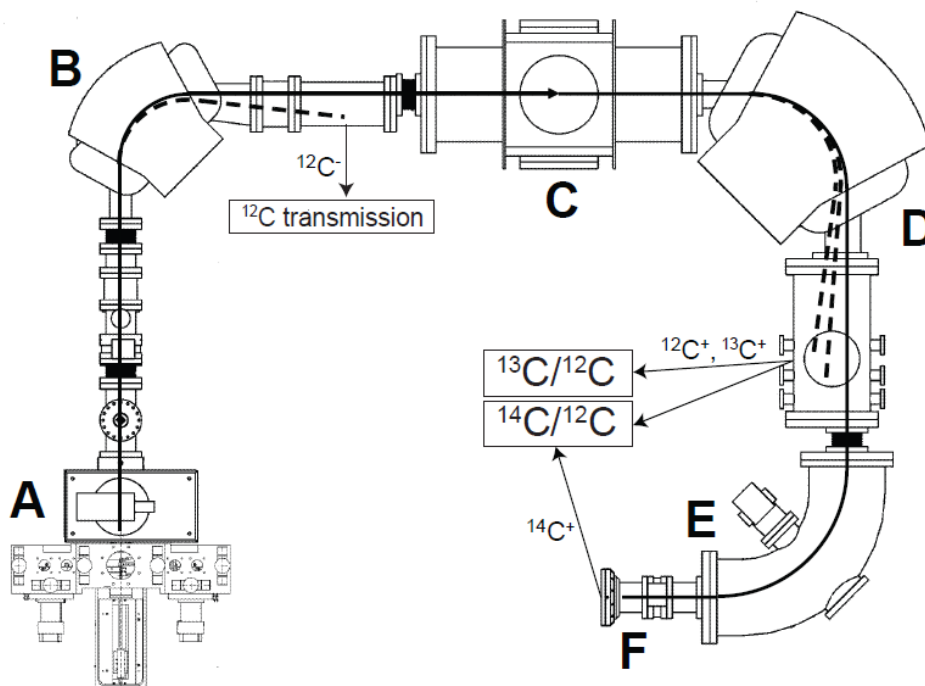
hidridből felszabadítjuk a hidrogént 500°C-on, második fázisként 550°C-ra emeljük a kemence hőfokát, hogy a vaspár által katalizált grafitképződési folyamat a lehető legkedvezőbben menjen végbe. A grafitizálást követően a leforrasztott üvegeket feltörjük és a behulló üvegdarabokat eltávolítjuk. A kisebb üveget kivesszük, ezen található a vas katalizátorra kivált grafit. A grafitot pedig alumínium tartó egységekbe, úgynevezett „target”-ba préseljük és felirattal látjuk el. Ezek után a munkafolyamatok után kerülhet a target a MICADAS-AMS-be analízálásra. Az erre a célra fejlesztett préselő és „target” a 14. ábrán látható.



14. ábra: Préselő és target

3.3.4. ^{14}C mérés

A ^{14}C méréshez használt, a debreceni ATOMKI-ban működő MICADAS-AMS berendezés $1+$ töltésű ionnyalábot hoz létre a gyorsító szakaszban a negatív szén-ionokból, és a többszörös molekula-ütköztetési módszert kihasználva csökkenti az interferáló molekulaionok mennyiségét a ^{14}C analízisre használt nyalábban. Fontos megjegyezni, hogy a MICADAS AMS a ^{14}C mérés mellett a radiokarbon kor korrekciójához elengedhetetlen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ arányt is egyidejűleg képes mérni a mintából, ami más AMS-ek esetén a napi gyakorlatban sokszor nem megoldható és csak nehezen, részben pótolható. A rendszer elvi felépítése a 15. ábrán látható.



15. ábra: A MICADAS ^{14}C AMS rendszer elrendezése és részei

A: ionforrás; B: kisenergiás tömegspektrométer; C: gyorsító; D: nagyenergiás tömegspektrométer; E: elektrosztatikus-tér analizátor; F: gázionizációs ^{14}C detektor (Schulze-König, 2010)

A más AMS-ekhez képest lényegesen egyszerűbb felépítés egy az eddigieknél jóval kisebb alapterületű (2,5 x 3,0 m) berendezést eredményezett. A dedikáltan rutinszerű ^{14}C mérésekhez fejlesztett MICADAS rendszeren (ETHZ, Zürich) más AMS-ekhez képest több

olyan lényeges újítást vezettek be, melyek nagyban megkönnyítik és stabilabbá teszik az AMS üzemeltetését (Synal et al. 2007).

Az ionforrás (15. ábra A-szakasz) kialakításánál fő szempont volt, hogy a forrást befogadó kamra földpotenciálon legyen, azaz működő AMS esetén is könnyen kezelhető maradjon. Ennek érdekében az ionforrás minden nagyfeszültségű bevezetése egy földpotenciálon lévő vákuumkamrába alulról lett megoldva, izoláltan. A nagyfeszültségű tápegységek az ionforrás tartóvázának alsó részében lettek elhelyezve, egy Faraday-kalitkával védett térrészben. Ez a kialakítás 50 keV-os kivonási energia elérését teszi lehetővé a C^- ionok számára. A cézium-tartály az ionforrás kamrában kapott helyet. A tipikus C^- ionáram 30-50 μA közötti érték. Az ionforrás egy többkatódos mintaváltó-rendszerrel van ellátva, mely egy lineáris elrendezésű tárban (16. ábra.) összesen egyszerre maximum 23 minta (target) kezelésére képes, a vákuumkamrán belül. A szilárd katódokon túl a forrás gázhalmazállapotú CO_2 direkt mérését is lehetővé teszi. A gázkezelő rendszert és az ionforrást egy kapillárisal kötik össze, melyen keresztül hélium és CO_2 keverékét lehet a céltárgy pozíciójába juttatni. Titán betéttel ellátott mintatartókat használnak gáz-targetként.



16. ábra: 22 db grafit targettel feltöltött mérési tár a MICADAS AMS 14C méréshez

Az alacsonyenergiás tömegspektrométer (15. ábra B-szakasz) szakasz kialakítása egy megfelelően elhelyezett detektorral lehetővé teszi az ionforrásból kilépő szén-ionáram mérését a gyorsító előtt, így folyamatosan ellenőrizhető a transzmissziós tényező a gyorsítós szakaszon keresztül (mivel a gyorsító után is folyamatosan mérhető az átjutó ionáram). Ebben a szakaszban kapott helyet az a gyors működtetésű pulzáló rendszer (fast beam switching system: „pulsing”), mely az egyes eltérő tömegszámú szén-ionok gyorsítón való átjutásának sorrendjét szabályozza, megfelelő időzítés mellett (^{12}C , ^{14}C , ^{13}C majd ^{14}C : 50 μs , 40ms, 500 μs majd 40ms sorrendben). Az alkalmazott összeállítás mellett, a mágneses térerősség elég széles tartományában biztosítható volt a megfelelően stabil $^{13}C/^{12}C$ és $^{14}C/^{12}C$ arány érték a nagyenergiás detektor oldalon, ami alapfeltétele a megbízható izotóparány méréseknek.

A tandem elrendezésű, maximum 200 kV terminálfeszültségen üzemelő gyorsító (15. ábra C-szakasz) egy vákuum izolált kamrában lett elhelyezve, melynek külső felülete földpotenciálón van. A nagyfeszültséget egyedi módon, egy kereskedelmi forgalomban is kapható tápegységgel (Heinzinger Type: PNC 200,000-5) biztosítják, mely a gyorsítót tartó váz alsó részébe van beépítve. Fosztó gázként („stripper gas”) nitrogéngázt használunk, melynek sűrűségét a fosztó szakaszban egy teljesen fémből készült szabályozható túszelep segítségével állítják be (gáznyomás $\sim 10^{-6}$ mbar), oly módon, hogy a teret folyamatosan három darab, egymástól független, földpotenciálón tartott nagy teljesítményű turbó-szivattyú tartja vákuum alatt.

A gyorsítós szakaszt követő nagyenergiás tömegspektrométerben (15. ábra D-szakasz) történik meg az egyes szén-izotópok szétválasztása. Ebben a szakaszban három független Faraday-kalitka detektor lett elhelyezve. Kettő ezek közül a gyorsítón átjutó $^{12}\text{C}^+$ és $^{13}\text{C}^+$ ionáramot méri. Ezek között kapott helyet a harmadik detektor, ami szintén $^{13}\text{C}^+$ ionáramot mér, de azon frakcióját (energia szerint kiválasztva), amely $^{13}\text{CH}^+$ molekulaion formában indulva jutott át a gyorsítón és jelentős hozzájárulást adhat a mért ^{14}C jelhez. Ennek az egyedi „molekulaion” detektornak a jele a háttérkorrekció során jól használható.

A nagyenergiás mágnes egy ESA (elektrosztatikus-tér) analizátor (15. ábra E-szakasz) követi, mely kondicionálja az ionnyalábot a megfelelő ^{14}C detektálás érdekében, s melyben becsúsztható kapuk segítségével további geometriai korlátozással csökkenthető, vágható a nyalábnak azon részlete, mely a berendezés háttéréhez jelentős hozzájárulást adna, míg a ^{14}C jelhez csak kevésbé járul hozzá.

A ^{14}C ionok számlálására a detektor (15. ábra F-szakasz) szakaszban egy gázionizációs kamra lett kialakítva, melynek ablaka egy 5 x 5 mm-es területű 50nm vastagságú $\text{Si}_3\text{N}_3.1$ fólia (Döbeli et al. 2004). A kamra számlálógáza 15 mbar nyomású isobután gáz. Az ATOMKI-HEKAL-ban található eszközt a 16. ábra szemlélteti.



17. ábra: MICADAS ^{14}C AMS berendezés az ATOMKI-ban

3.4. $\delta^{13}\text{C}$ és $\delta^{15}\text{N}$ mérés

Különböző kémiai, biológiai és fizikai folyamatok során az elemek izotópjainak aránya megváltozhat a különböző fázisokban. Ez különösen jól megfigyelhető a biológiai folyamatok során (pl: RUBISCO enzim működése). Továbbá egyes tápanyagok előnyben részesítése baktériumoknál is hatással lehet az izotóparányokra a szervezeteken belül. Ezen izotópok, stabilizotópok aránya és változása fontos információkat szolgáltat számunkra a lejátszódó folyamatokról. Viszont a természetben végbemenő folyamatokban az izotópfractionálódás igen kis mértékben megy végbe, ezért rendkívül pontos mérőeszközökre, nagy érzékenységű berendezésekre van szükségünk az ilyen jellegű folyamatok nyomon követésére. A HEKAL-ban egy erre alkalmas Thermo Finnigan gyártmányú Delta plus XP stabilizotóp-arány mérő berendezést alkalmaztunk a vizsgálat során. A tömegspektrométer az izotóparányokat H_2 , N_2 , CO_2 , SO_2 formában méri. A műszer mérési pontossága: $\delta^{13}\text{C}$: $\pm 0,1\%$. A berendezést főként víz, vízben oldott szerves anyagok, méz izocukor vizsgálatára használják. Jelen esetben rendhagyó módon, baktérium és annak táptalajának vizsgálatát végezzük el. Ami a későbbiekben új alkalmazásoknak adhat teret.

4. EREDMÉNYEK

Tanulmányomban több módszert és műszert alkalmaztam annak érdekében, hogy a TCE lebontási folyamatainak szénizotópos vizsgálataihoz megfelelő módszertani eljárást fejlesszünk ki. Ezen módszereket az előző fejezetben mutattam be, munkám eredményeit pedig a következőkben részletezem. Elsőként a TCE vizes oldatának roncsolását tűztök ki célul. Ezt követően végeztük el a módszerfejlesztés a baktériumtenyészetek vizsgálatára. Amely a későbbiekben radioaktívan nyomjelezett TCE vizsgálatát, követését teszi számunkra lehetővé.

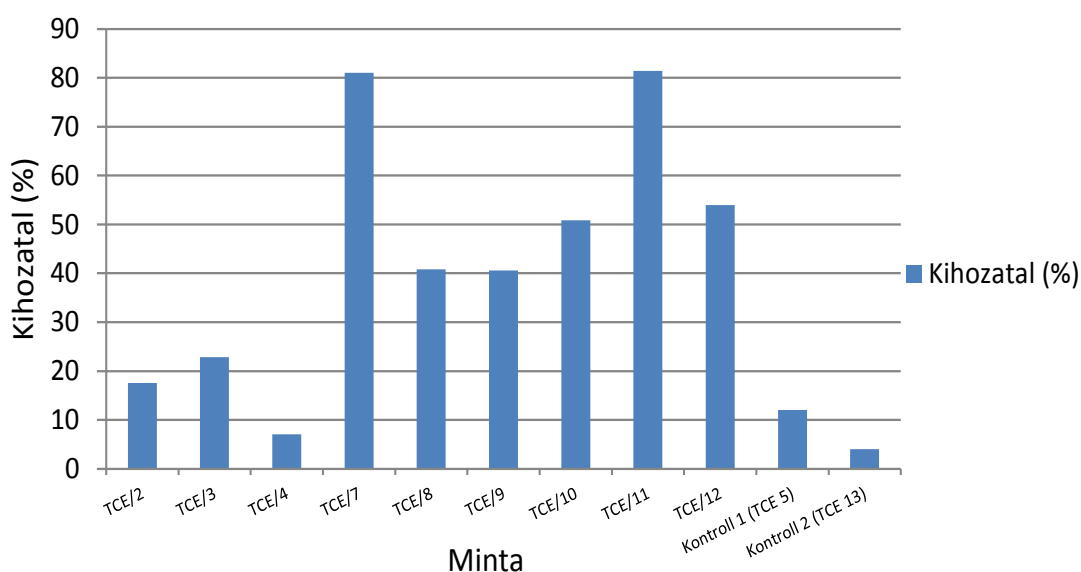
4.1. TCE vizes oldatának roncsolása

A roncsolási vizsgálatok eredményei alapján elmondható, hogy a TCE még igen erős oxidáló sav jelenlétében sem bontható le teljes mértékben. A kihozatal és a stabilizotóp-arány között kismértékű korreláció volt megfigyelhető, ám ez a Sigma-Aldrich-től beszerzett TCE stabilizotóp-arányától eltérő, nagy szórást mutat. A vizsgálat paramétereit és eredményeit a 4. táblázat szemlélteti.

5. táblázat: A vizsgálat paramétereit és eredményeit.

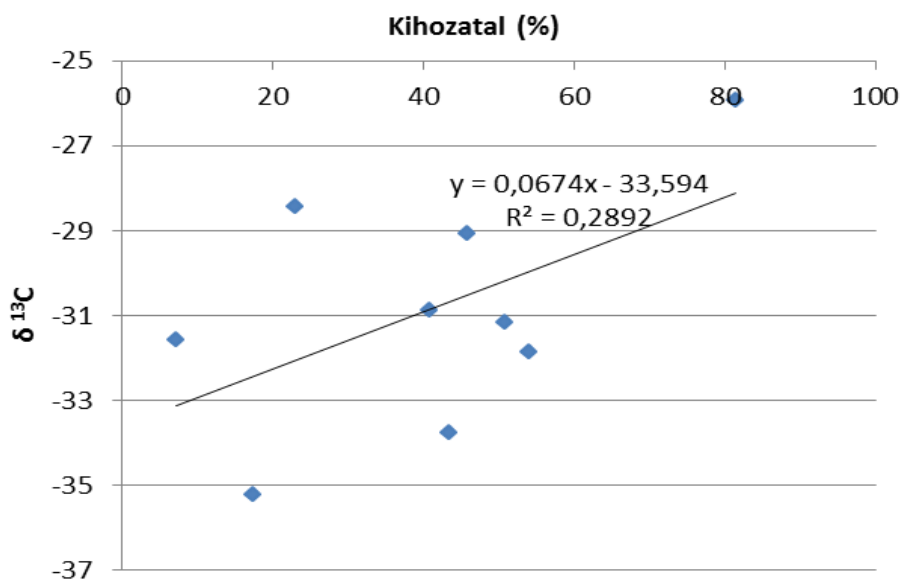
Teszt kódja	Oxidálószer típusai	V _{oxidáló} (ml)	V _{TCE} (ml)	C _{TCE} (g/L)	Idő (óra)	Szén (mg)	Kihozatal (%)	δ ¹³ C (‰)
TCE/2	Krómkénsav	5	10	0,13	2	0,04	17,55	n.a.
TCE/3	Krómkénsav	6	10	0,13	2	0,05	22,88	-28,4
TCE/4	Krómkénsav	7	10	0,13	2	0,02	7,05	-31,6
TCE/5	Krómkénsav (Kontroll)	8	0	0,13	2	0,03	-	n.a.
TCE/7	Krómkénsav, Ezüst szulfát-kénsav	5+15	10	0,65	48	0,96	80,99	-29,1
TCE/8	Krómkénsav, Ezüst szulfát-kénsav	5+15	10	0,65	48	0,48	40,80	-30,9
TCE/9	Krómkénsav, Ezüst szulfát-kénsav	5+15	10	0,65	48	0,48	40,57	n.a.
TCE/10	Krómkénsav, Ezüst szulfát-kénsav	5+15	10	0,65	48	0,60	50,84	-31,15
TCE/11	Krómkénsav, Ezüst szulfát-kénsav	5+15	10	0,65	48	0,96	81,43	-25,94
TCE/12	Krómkénsav, Ezüst szulfát-kénsav	5+15	10	0,65	48	0,64	53,99	-31,86
TCE/13	Krómkénsav, Ezüst szulfát-kénsav (Kontroll)	5+15	0	0,65	48	0,05	-	n.a.

A 12. ábrán jól látható, hogy kombinált oxidálószer elegy alkalmazásával, és hosszabb roncsolási idővel a kezdeti 10-20 %-os kihozatal növelhető. Egyes esetekben akár 80 %-os hatékonysággal is sikerült lebontani a vegyületet. Ám a kiugró értékeket kivéve, a hatásfok igen erős oxidálószer és hosszantartó roncsolás következtében is csak 50 % körüli értékre tehető. Ezt a hatásfokot javíthatjuk más vegyszerek és katalizátorok adagolásával. A kontroll minták értékeit a hozzá tartozó módszer várt szén tömegéhez viszonyítottan százalékosan feltüntettem a diagramban (18.ábra).



18. ábra: TCE lebontásának hatékonysága

A roncsolás hatásfokát nem csak a kihozatal mérésével vizsgáltuk, hanem stabilizotóp-arány mérésének segítségével kívántuk meghatározni a roncsolás teljességét, ugyanis nem teljes roncsolás esetén jelentős izotópfractionálódás lép fel (19. ábra).

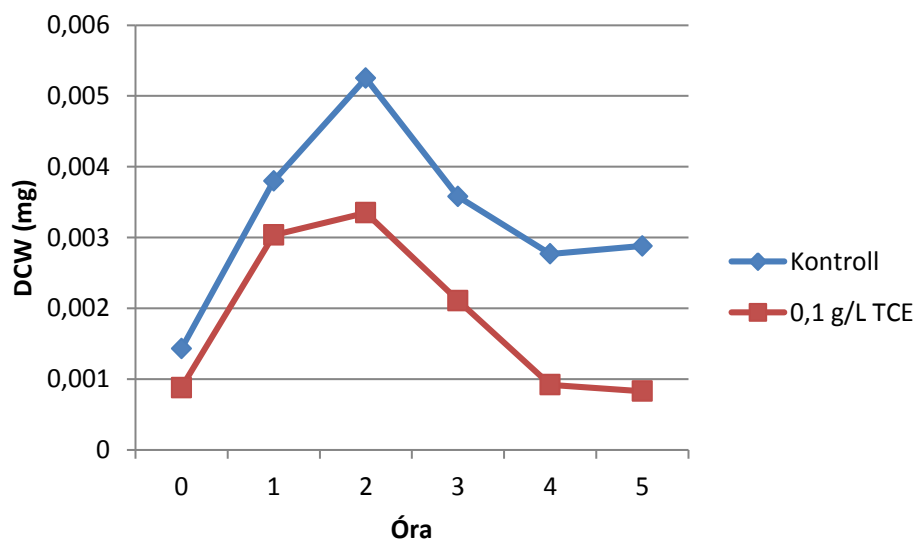


19. ábra: Kihozatal és $\delta^{13}\text{C}$

Ahogy az a 19. ábrán is jól látható, a mért stabilizotóp arány-értékei igen nagy szórást mutatnak, és a korreláció is igen alacsony. Továbbá a kihozatal növekedésével sem közelíti meg a tiszta TCE stabilizotóp-arány értékét, ami $33,2 \pm 0,04$ ‰. Ennek oka az alacsony hatásfok következtében fellépő izotópfractionáció, esetleg a tömítésként használt gumigyűrű roncsolódása is okozhatja az adatok torzulását. Ennek kiküszöbölésére alkalmazhatunk teflonbetétes, szeptummal ellátott, gumigyűrű mentes reakciócellákat, ahol sem az oxidálószer sem az oldat (jelen esetben TCE) nem érintkezhet közvetlen más anyaggal, csak teflonnal és üvegfelületekkel. A labor által kifejlesztett reakciócella képe a 2. mellékleten látható.

4.2 Sejttömeg és szárazanyagtartalma

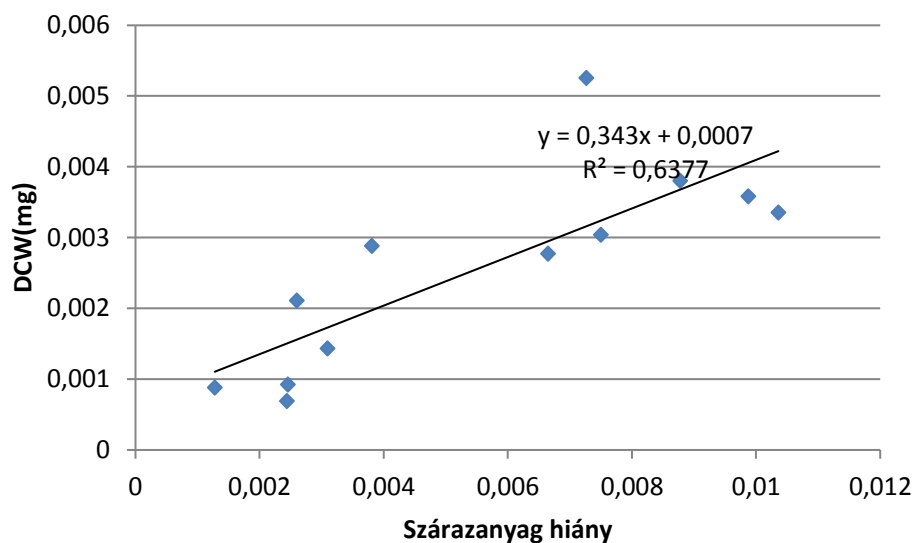
A kiszáritott száraz sejttömeg és az oldat szárazanyagtartalmából is vonhatunk le következtetéseket. A száraz sejttömeg vizsgálatával növekedési görbét állíthatunk fel, továbbá a TCE baktériumokra gyakorolt hatását is vizsgálhatjuk. Továbbá ez a paraméter erősen befolyásolja az alkalmazandó ^{14}C jelzőanyag mennyiségét a kívánt kimutatási határok eléréséhez. A vizsgálat során 0,1 g/L TCE-volt jelen a tápoldatban.



20. ábra: DCW-0,1 g/L TCE esetén

Ahogy a 20. ábra mutatja, hogy a baktériumok kezdeti gyarapodása két óra után megszűnik és csökkenő tendenciát mutat. 5 óra elteltével a TCE tartalmú tápoldatban kisebb mennyiségű baktérium figyelhető meg mint a kiindulási oldatban. Az adatok alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy 0,1 g/L TCE gátló hatást fejt ki a *Pseudomonas putida* F1 baktérium növekedésére. Ugyan növekedés megfigyelhető mindkét esetben, a kontroll mintában az növekedési fázis jóval meredekebb, és az után is jóval magasabb érték figyelhető meg. A csökkenés köszönhető lehet valamilyen tápanyag kimerülésének.

A táptalaj szárazanyagtartalmának vizsgálata is több információval szolgálhat számunkra. Amennyiben ismerjük a kezdeti szárazanyagtartalmat, és a köztes időpontokban vett minták szárazanyagtartalmát, a baktériumok anyagcseréjéről kaphatunk információt.

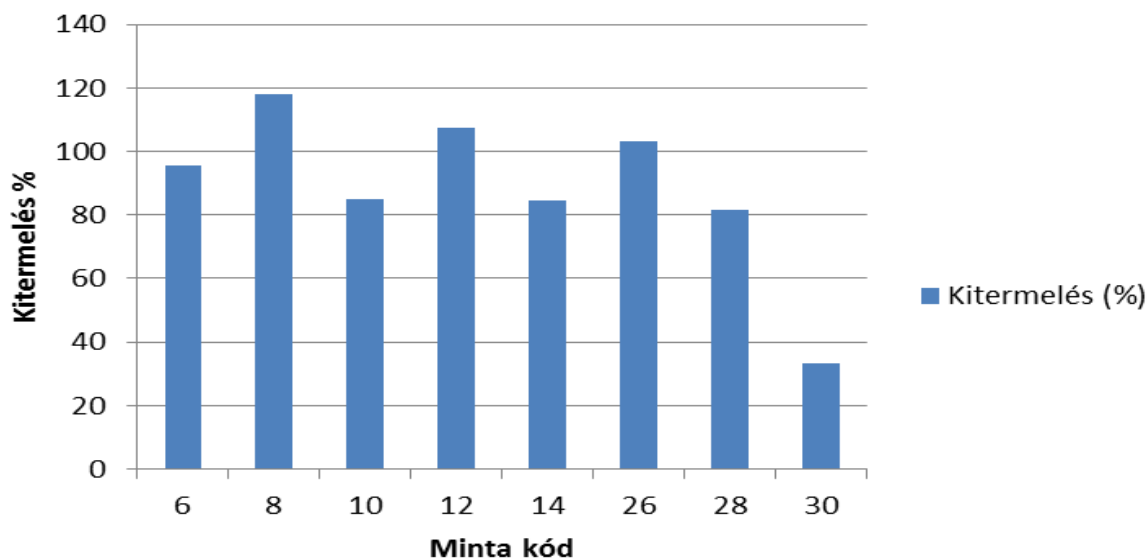


21. ábra: A száraz sejttömeg és a szárazanyag hiány kapcsolata

Ahogy a 21. ábra is mutatja, kezdeti szárazanyag tartalomhoz viszonyított „hiányzó szárazanyag” mennyisége és a keletkezett sejttömeg értékei jól korrelálnak. Ezen adatok alapján nincs jelentős mértékű veszteség más utakon a táptalajból. Átlagosan a hiányzó szárazanyag mennyiségének 50%-át fedi le a sejttömeg. A hiány jelentős részét továbbá a baktériumok légzésével távozó CO₂ fedheti le, ami jelentős szervesanyagból származó szén és szárazanyag távozását jelenti az szilárd/folyadék fázisból.

4.3. Minta előkészítési módszer, kitermelés

A mérés pontosságának egyik alapfeltétele, hogy a kiindulási anyagmennyiség minél nagyobb hányadát juttassuk el a mérésig. Az preparálás során a mintából történő veszteség hibás mérést eredményezhet, izotópfrafrakcinálódás történhet stb. A *Pseudomonas putida* F1 baktérium megközelítőleg 50 % széntartalmú mikroba. Természetesen kisebb nagyobb eltérések lehetnek a baktérium széntartalmában, ám ez igen kis százaléknyi eltérést jelent. (Passman & Jones 1985). Ezek alapján a bemért mintamennyiség felének szénnek kell lennie, ezzel számolva adtam meg a kitermelés százalékos értékét, amelyet a 22. ábra mutat.



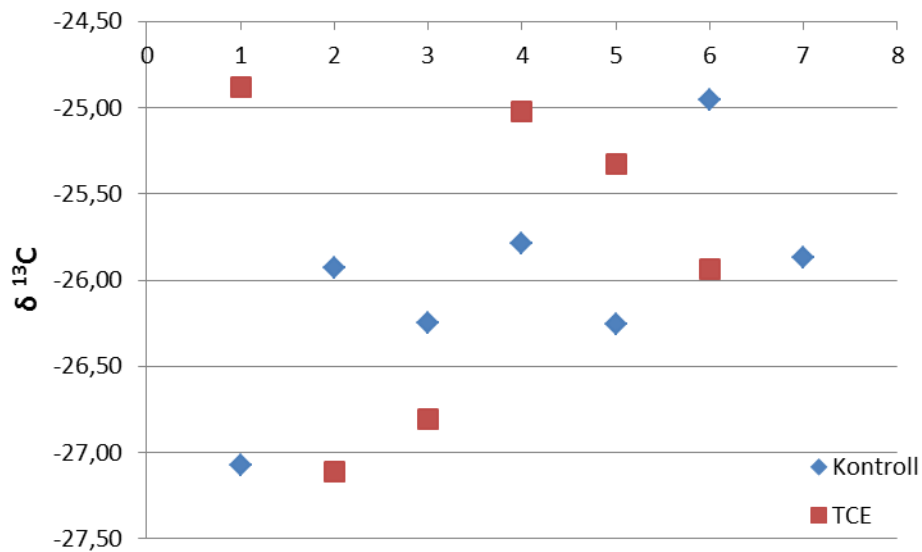
22. ábra: Kitermelés

A 22. ábra alapján is kijelenthetjük, hogy egy minta kivételével a feldolgozott baktérium mintáknál 80 % feletti kitermelést sikerült elérni. A 100 % feletti értékek adódhatnak a baktérium saját tulajdonságából, magasabb széntartalom a vártnál. Ám a jelentősebb „túltermelés” szennyeződésre is utalhat.

4.4. $\delta^{13}\text{C}$ eredmények

4.4.1. Baktériumok stabilizotóp-aránya

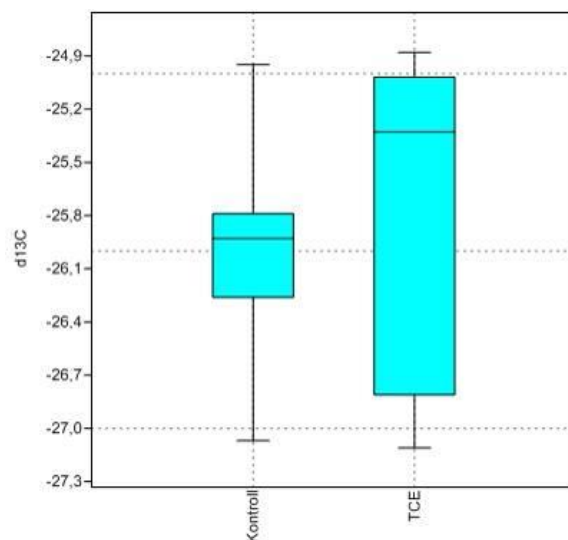
Ahogy a 23. ábra mutatja a baktériumok stabilizotóp-aránya kissé eltérő eredményeket mutat, ám egy szűk tartományon belül ingadozik. Figyelembe véve a biológiai folyamatok sokszínűségét, különböző életfolyamatokban, fázisokban fellépő enzimműködéseket, ez nem meglepő.



23. ábra: Baktérium $\delta^{13}\text{C}$

Továbbá a 24. ábrán látható BoxPlot ábrán megfigyelhető külön a Kontroll és TCE-vel kezelt baktériumminták csoportja. Jól látható, hogy a kontrollcsoport interkvartilis terjedelme jóval szűkebb tartományban mozog, egy-egy kiugró értéket kivéve jól behatárolható értékeket közelít meg. Ez viszont nem mondható el a TCE-vel kezelt baktériumok $\delta^{13}\text{C}$ arányáról. Megfigyelhető, hogy jóval szélesebb tartományban mozog az interkvartilis terjedelem és átlaguk is pozitív irányba tolódott el. Ám szélsőértékeik ugyanazon határokon helyezkednek el. Ezen eredmények a nem radioaktív nyomjelzésnél lehetnek hasznosak. Feltételezhetően két különböző tápanyag preferenciájáról is kaphatunk információt. Minél jobban közelít egy baktérium stabilizotóp-aránya a tápoldat egyik komponenséhez, annál jobban részesíti azt előnyben. Közismerten vannak nehezen és könnyebben felvehető szénforrások a baktériumok számára. Ezek tanulmányozásában segítséget nyújthat a stabilizotóp-arány vizsgálata.

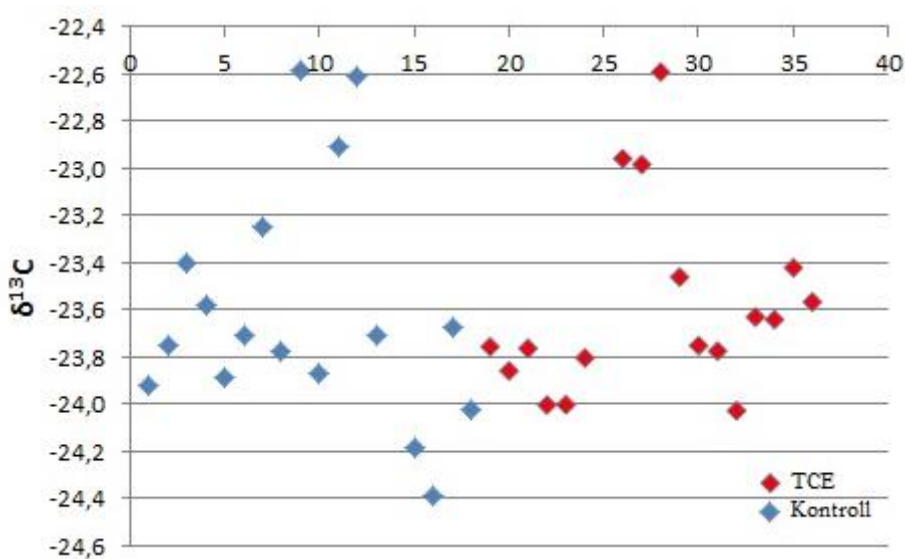
A *P.putida* F1 $\delta^{13}\text{C}$ stabilizotóp-aránya a vizsgálatok alapján $-25,94 \pm 0,73$ ‰-nek adódott. Hasonló tanulmányban a heterotróf *Desulfotomaculum acetoxidans* stabilizotóp-aránya $-25,4 \pm 0,9$ ‰ (Londry et al. 2004).



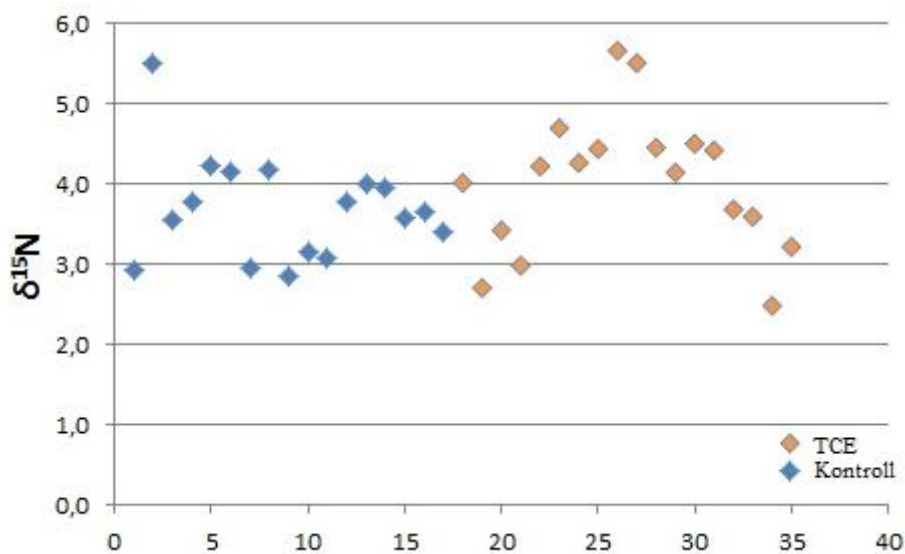
24. ábra: Kontroll és TCE-vel kezelt minták $\delta^{13}\text{C}$ aránya

4.4.2. A tápoldat stabilizitóp-aránya

Ahhoz, hogy következtetéseket tudjunk levonni a baktérium és életfolyamatai következtében létrejövő izotópfractionációra, tudnunk kell az általa felhasznált tápoldat vagy annak szerves-szárazanyagtartalmának stabilizitóp-arányát. Ahogy a 25. és 26. ábra mutatja a tápoldat $\delta^{13}\text{C}$ és $\delta^{15}\text{N}$ aránya viszonylag egy jól meghatározott érték körül mozog. ($\delta^{13}\text{C}$: $-23,6 \pm 0,46$; $\delta^{15}\text{N}$: $3,9 \pm 0,78$. Kisebb-nagyobb eltérések megfigyelhetők.



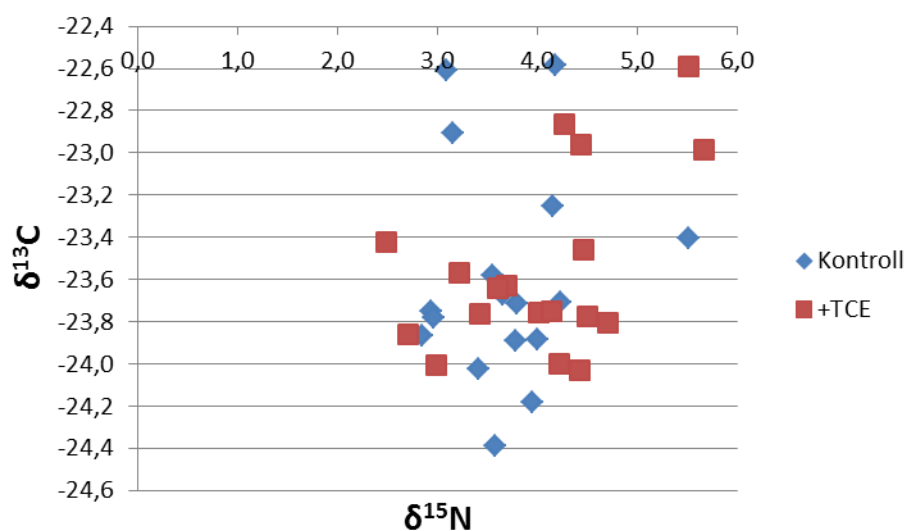
25. ábra: Tápoldat $\delta^{13}\text{C}$



26. ábra: $\delta^{15}\text{N}$

Az eredmények alapján a frakcionálódási tényezőt állapíthatunk meg, amelyet alább részletezek. A baktériumok esetében $\delta^{15}\text{N}$ eredményt a felhasználható kis mintamennyiség következtében nem kaptunk.

A két változó ($\delta^{15}\text{N}$ és $\delta^{13}\text{C}$) együttes ábrázolásával (27. ábra) az anyagok egy jól elkülöníthető halmazba sorolhatók. A minták jelentős része egy pont körül szóródik, néhány esetben nagyobb eltérés megfigyelhető.

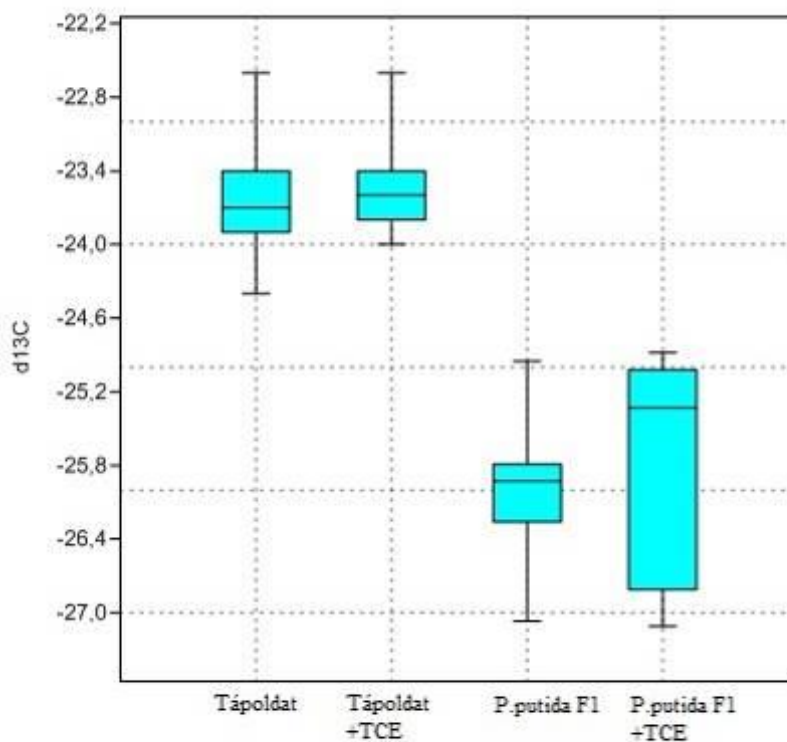


27. ábra: Tápoldat $\delta^{15}\text{N}$ és $\delta^{13}\text{C}$

4.4.3. Baktériumok-médium stabilizotóp-arány kapcsolat

Mivel a baktérium a tápoldat szervesanyag tartalmából képes felépíteni önmagát, ezért a médium stabilizotóp-aránya nagyban befolyásolja a baktérium-stabilizotóp arányát is. Viszont az izotópfractionálódási folyamatok következtében a két érték eltérhet egymástól, ez különböző szervezetekben eltérő mértékű lehet. Ahogy a 28. ábra is mutatja, az izotópfractionálódási folyamatok jelen vizsgálatban is megfigyelhetők. A fractionálódási tényező átlagosan 1,11-ra tehető.

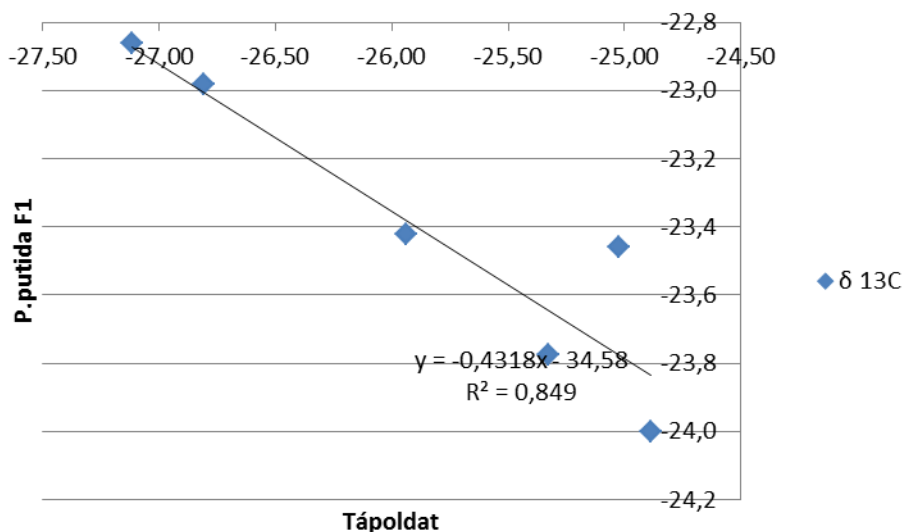
A baktérium minták esetében nem mérhettünk $\delta^{15}\text{N}$ arányt, ám a következő vizsgálatokban érdekesnek bizonyulhat ez a vizsgálat is. Mivel valószínűsíthetően a N izotópok esetében is megfigyelhető izotópfractionálódás, és ezen adatokat egy kétváltozós diagramon ábrázolva valószínűsíthetően két, jól elkülöníthető területet fednének le a tápoldat és a baktérium minták.



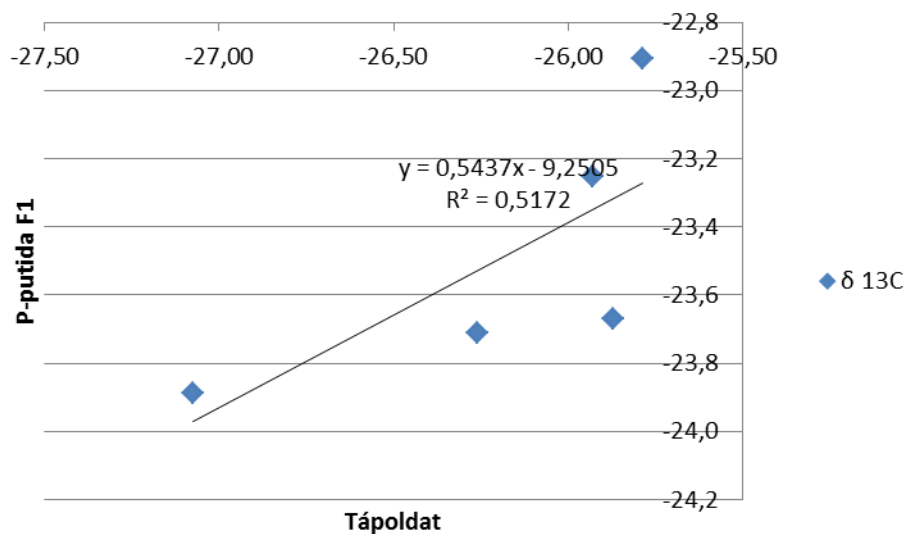
28. ábra: A médium és P.putida F1 stabilizotóp aránya

A 29. ábrán a TCE-vel kezelt *Pseudomonas putida* F1 és tápoldatának stabilizotóp-arányának kapcsolata látható. Megfigyelhető, hogy az értékek között jelentős korreláció mutatkozik. A megfigyelt negatív korreláció oka az lehet, hogy amikor a baktérium a tápoldatból egyre negatívabb stabilizotóp-arányú szenet vesz fel (azaz a könnyebb szénizotópokat preferálja), akkor nyilvánvalóan az oldatban egyre pozitívabb lesz a visszamaradó oldott szénfrakció izotóparánya (azaz a fel nem használt nehezebb izotópban dúsul a tépoldat).

Jól látható, hogy az R^2 érték mindkét esetben jóval magasabb, mint 0,6. Ami jelentős mértékű korrelációnak mondható. Viszont a TCE mentes minták eredményei nem mutatnak ilyen mértékű kapcsolatot. Ez akár az alacsony számú mérés és esetleges mérési hibákból is adódhat. Két kiugróan eltérő eredmény következtében a kontroll minták R^2 értéke jóval 0,5 alá csökkent, viszont ezen értékek nélkül az R^2 0,51 (30. ábra).



29. ábra: *P. putida* F1 és tápoldatának $\delta^{13}\text{C}$ aránya (TCE kezelt)



30. ábra: : P.putida F1 és tápoldatának $\delta^{13}\text{C}$ aránya

Ahogy a 30. ábra is mutatja a kontroll minták között már nem volt jelentős negatív korreláció, illetve a ksi mintaszám miatt ez nem volt kimutatható szignifikánsan. Az eredményekben mutatkozó anomáliák felderítésére további vizsgálatok, többszörös ismétlések szükségesek.

4.5 Radiokarbon tesztmérések eredményei

A radiokarbonméréseknél elsőként a tápoldat komponenseinek és egy valós Putida baktérium-tápoldat minta sorozatban a kezdeti, közbenső és végső állapotban a baktériumba beépült szén mérésére került sor. Mivel az eredetileg felhasznált szervesanyagokból építik fel magukat a baktériumok, ezért fontos a médium radiokarbon tartalmának ismerete is. A stabilizotóp mérésekből valószínűsíthető, hogy a tápoldat szervesanyagtartalma és a baktérium biomassza radiokarbon tartalma igen hasonló eredményeket ad. A vizsgálatok során a korábbi fejezetekben említett előkészítési és feltárási módszert alkalmazva vizsgáltuk a kazein-pepton és agar tápanyagok ^{14}C tartalmát is, melyek fontos bemeneti paraméterek lesznek a későbbi ^{14}C jelzéses kísérletek tervezéséhez.

Az 5. táblázatban közölt AMS ^{14}C mérési eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a fejlesztések során kidolgozott ^{14}C minta-előkészítési és mérési módszer igen jól reprodukálhatóan adta a nemzetközi referencia anyagra (IAEA-C7) várt ^{14}C fajlagos aktivitás

(100 pMC = 0,226 Bq ^{14}C / 1 gC) értékeket. Tehát a kidolgozott szerves anyag előkészítési módszer, s az alkalmazott méréstechnika kiválóan teljesíti a kutatási célul kitűzött analitikai pontossági paramétereket.

A baktérium tenyésztés táptalajának fő alkotóelemeit (agar-agar és kazein) is megvizsgáltam a ^{14}C tartalmuk tekintetében. A vizsgált agar és kazein minta szenének fajlagos ^{14}C tartalma meglepően azonos volt (107,1 pMC). A baktérium nélküli kezdeti tápoldat főként ezekből az összetevőkből készült, de nyilvánvalóan tartalmazott egyéb széntartalmú (esetleg szennyező) anyagokat is, mert ennek a teljes szervesanyag tartalma már kissé eltérő ^{14}C aktivitást mutatott (108,8 pMC). A kezdetben bevitt, előtenyésztett baktérium törzs egy más táptalajon nevelkedhetett, hiszen ennek fajlagos ^{14}C tartalma kezdetben jelentősen eltért (100,4 pMC), a tápoldat szenéhez képest. A baktérium szenének ^{14}C koncentrációja a kezdeti alacsonyabb szintről a vizsgált tápoldatban való növekedés és anyagcsere során egy magasabb értékre emelkedett (hibán belül 103,0 pMC), hiszen a magasabb fajlagos ^{14}C tartalmú tápoldatból építkezve növekedett.

6. táblázat: Referencia anyag, a tápoldat és kinyert baktérium minták ^{14}C eredményei.

AMS mérés kódja	Minta kód HEKAL	Minta leírása	C-14 pMC (%)	+/- pMC (1 sigma)
DeA-4979	C7a	IAEA-C7 nemzetközi referencia anyag (49.53 pMC)	49,43	0,18
DeA-4980	C7b	IAEA-C7 nemzetközi referencia anyag (49.53 pMC)	50,02	0,19
DeA-4978	agar	A tápoldat alapanyaga	107,09	0,25
DeA-4981	kazein	A tápoldat alapanyaga	107,13	0,26
DeA-5076	DE-BE 3	A kísérlet elején összeállított tápoldat, baktérium nélkül	108,79	0,39
DeA-5077	DE-BE 6	A bevitt baktérium szerves anyaga, a tenyésztés elején	100,40	0,43
DeA-5078	DE-BE 8	A bevitt baktérium szerves anyaga a tenyésztés közepén	103,16	0,35
DeA-5079	DE-BE 12	A bevitt baktérium szerves anyaga a tenyésztés végén	102,76	0,35

ÖSSZEGZÉS

A tanulmány az ENVIKUT projekt keretein belül nyújt támogatást a Debreceni Egyetem különböző kutatócsoportjainak számára. A módszerfejlesztési és tesztelési fázis elengedhetetlen a nagyszámú minta pontos analitikai vizsgálatához. Ezen folyamatok során deríthetünk fényt a felmerülő problémákra, nyerhetünk alapvető információkat.

Előtanulmányom során fény derült arra, hogy a TCE még igen erős oxidáló sav hatására sem bomtható le teljes mértékben, ezt a kitermelési és stabilizotóp adatok is alátámasztják. Ez megerősíti azt a tényt, hogy jelenléte a természetben hosszú távú lehet ennek a perzisztens vegyületnek. Szervetlen savak mellett katalizátorok szükségesek lebontásához (ezek lehetnek: Ag, Al, Fe).

A baktériumok száraz tömeg vizsgálata alapján elmondható, hogy nem csak az emberi szervezetre, de akár egy igen ellenálló, viszontagságos körülmények között növekedni képes mikroorganizmusra is gátló hatást fejt ki a vegyület.

Radiokarbon méréseknél, radioaktív nyomjelzett anyagoknál fontos, hogy jelentős mennyiségű veszteség ne lépjen fel. Ez a biológiai folyamatoknál nem egyszerű feladat, mivel a mikroorganizmusok légzése során jelentős mennyiségű CO₂ távozik a rendszerből. Ám a vizsgálatok alapján jól látható, hogy a szervesanyag veszteség a tápoldatból jó arányban lefedhető a baktériumok tömegével.

A baktériumtenyészetek előállítás, tisztítása és előkészítését követően kezdhető meg a feltárás. Ismernünk kell, hogy a bemért mintamennyiség hány százalékát vagyunk képesek analizálni. Ez jelen esetben magasabb, mint 80 %, ami jó aránynak mondható. Minél kevesebb a veszteség, annál bizonyosabb, hogy a mérés a minta teljes egészére reprezentatív lesz.

A $\delta^{13}\text{C}$ eredmények is viszonylag alacsony, szűk tartományon belüli ingadozást mutatnak, ám néhány kiugró érték megfigyelhető. A baktériumok stabilizotóp-aránya $-25,94 \pm 0,73$. Ez nagyban függhet a táptalaj összetételétől. Mivel a mikrobák ebből építik fel magukat. Ez különböző vizsgálatokban hasznosabb lehet, mint jelen esetben. Ám itt is megfigyelhető, hogy a TCE valamilyen hatást gyakorolhat a *P.putida F1*-re. A tápoldat és a baktérium stabilizotóp-arányának ismeretében az izotópfractionálódási folyamatokról kaphatunk információt.

A fejlesztések során kidolgozott ^{14}C minta-előkészítési és mérési módszer igen jól reprodukálhatóan adta a nemzetközi referencia anyagra (IAEA-C7) várt ^{14}C fajlagos aktivitás értékeket, tehát a kidolgozott szerves anyag előkészítési módszer, s az alkalmazott méréstechnika kiválóan teljesíti a kutatási célul kitűzött analitikai pontossági paramétereket. A baktérium tenyésztés táptalajának fő alkotóelemeit (agar-agar és kazein) megvizsgálva az agar és kazein minták szenének fajlagos ^{14}C tartalma meglepően azonos volt. A baktérium nélküli kezdeti tápoldat főként ezekből az összetevőkből készült, de nyilvánvalóan tartalmazott egyéb széntartalmú (esetleg szennyező) anyagokat is, mert ennek a teljes szervesanyag tartalma már kissé eltérő ^{14}C aktivitást mutatott. A kezdetben bevitt, előtenyésztett baktérium törzs egy más táptalajon nevelkedhetett, hiszen ennek fajlagos ^{14}C tartalma kezdetben jelentősen eltért (7%-al alacsonyabb volt), a tápoldat szenéhez képest. A baktérium szenének ^{14}C koncentrációja a kezdeti alacsonyabb szintről a vizsgált tápoldatban való növekedés és anyagcsere során egy magasabb értékre emelkedett, hiszen a magasabb fajlagos ^{14}C tartalmú tápoldatból építkezve növekedett.

A kutatómunkám során kidolgozott szén-izotóp előkészítési és mérési módszerekről valós mintákon tesztelve bizonyítottam, hogy megfelelően érzékenyek és reprodukálhatóak ahhoz, hogy sikeresen alkalmazhatóak legyenek az ENVIKUT projektben a TCE lebontásos baktériumtenyésztési kísérletek precíz szén-izotópkövetéses tanulmányozásához.

KITEKINTÉS, JAVASLATOK

A kutatás szempontjából ajánlott lehet EC_{50} érték (effektív koncentráció) megállapítása a TCE *P.putida F1*-re gyakorolt hatásának vizsgálatából. Ez a koncentráció az LD_{50} értékhez hasonlóan arról ad információt, hogy a baktériumtömeg 50 %-os gátlásához mekkora vegyszer koncentráció szükséges. Ez a továbbiakban alkalmazni kívánt bioremediációs eljárások során fontos lehet, hogy hol alkalmazható a mikroorganizmus hatékonyan.

Fontos lehet a rendszerből eltávozó gázok vizsgálata is. Amennyiben a baktérium felveszi, és lebontja, vagy beépíti szerkezetébe a triklór-etilént, akkor ez CO_2 formájában megjelenhet az eltávozó gázokban. Így ilyen módon is nyomon lehet követni a TCE-ből származó ^{14}C izotópot. Viszont amennyiben nem CO_2 ként távozik a rendszerből a nyomjelzett anyag, akkor lehetséges, hogy pusztán elillan, fotolízis során bomlástermékei távoznak stb.

A stabilizotóp és radiokarbonmérések új alkalmazási területeket nyithatnak a HEKAL AMS labor számára. A nagy pontosságú izotópanalitikai mérések különféle biológiai, gyógyszeripari, orvosi alkalmazásoknak adhatnak teret. Ilyen például a vérben megjelenő, lassan kiürülő gyógyszer hatóanyagok ^{14}C nyomjelzésének lehetősége. Különböző mikroorganizmusok vizsgálata, a *Pseudomonas putida F1*-en túl.

RÖVIDÍTÉSEK GYŰJTEMÉNYE

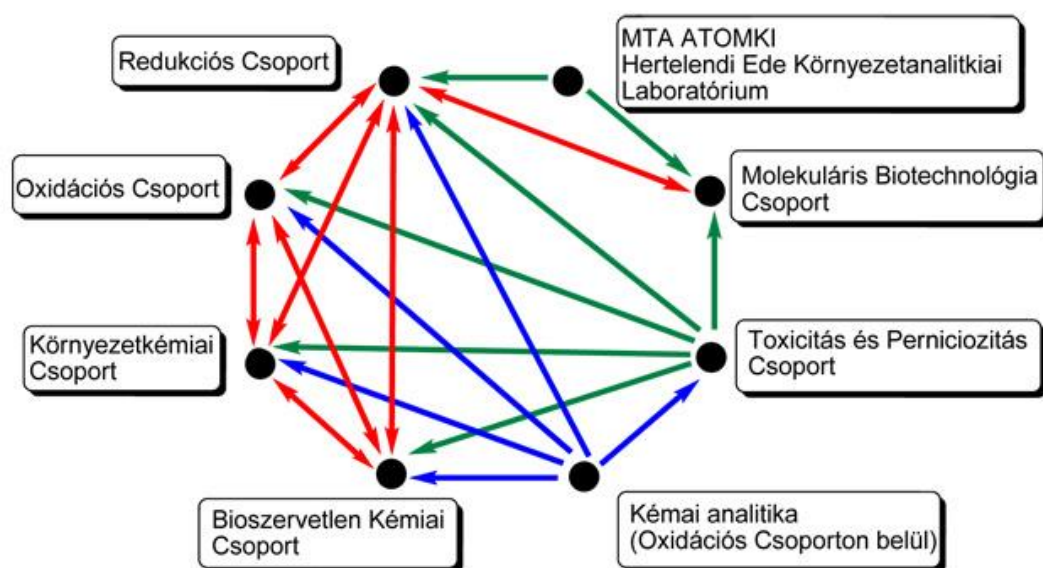
TCE	Triklór-etilén
DCE	Diklór-etilén
PCE	Perklór-etilén/Tetraklór-etilén
HEKAL	Hertelendi Ede Környezetanalitikai Laboratórium
ATOMKI	Atommagkutató intézet
MTA	Magyar Tudományos Akadémia
^{14}C	Radiokarbon
CO_2	Szén-dioxid
^3H	Trícium
AMS	Accelerated Mass Spectrometer (Gyorsító tömegspektrométer)
GPC	Gas Proportional Counter (Gázproporcionális számláló)
LSC	Liquid Scintillation Counting (Folyadékszintillációs számláló)
DNAPL	<i>Dense Non-Aqueous Phase Liquids</i> (nehéz, vízzel nem elegyedő folyadékok)
H_2O_2	Hidrogén-peroxid
TiO_2	Titán-dioxid
KMnO_4	Kálium-permanganát
LD_{50}	Letális dózis, az egyedek 50%-án

ÁBRAJEGYZÉK

1. ábra: A szén természetes izotópjai.....	5
2. ábra: A tömegspektrométerek általános felépítése (Internetes hiv. 1.).....	8
3. ábra: A triklór-etilén szerkezete	10
4. ábra: A TCE metabolizmusa az emberben (Brüning et al.1998).....	11
5. ábra: A DNAPL vegyületek viselkedése a talajban (Internetes hiv.7.).....	13
6. ábra: Pseudomonas putida F1 (Internetes hiv. 9.)	15
7. ábra: A triklór-etilén aerob lebontásának módjai	16
8. ábra: A toluol-dioxigenáz enzimrendszer (Zylstra el al. 1988)	17
9. ábra: A toluol-dioxigenáz enzim 3D szerkezete	17
10. ábra: A toluol dioxigenáz gén klaszter genetikai szerveződése (Parales et al. 2000)	18
11. ábra: A tápoldat és benne lévő baktériumok mikroszkópi képe (saját kép)	22
12. ábra: Az előkészítés egyes lépései (mérlegelés-centrifugálás-mosás-fagyasztás-liofilizálás)	23
13. ábra: Tiszta CO ₂ kinyerése	24
14. ábra: Préselő és target	25
15. ábra: A MICADAS ¹⁴ C AMS rendszer elrendezése és részei.....	26
16. ábra: 22 db grafit targettel feltöltött mérési tár a MICADAS AMS 14C méréshez.....	27
17. ábra: MICADAS ¹⁴ C AMS berendezés az ATOMKI-ban	29
18. ábra: TCE lebontásának hatékonysága.....	31
19. ábra: Kihozatal és $\delta^{13}\text{C}$	32
20. ábra: DCW-0,1 g/L TCE esetén	33
21. ábra: A száraz sejttömeg és a szárazanyag hiány kapcsolata.....	34
22. ábra: Kitermelés	35
23. ábra: Baktérium $\delta^{13}\text{C}$	36
24. ábra: Kontroll és TCE-vel kezelt minták $\delta^{13}\text{C}$ aránya	37
25. ábra: Tápoldat $\delta^{13}\text{C}$	37
26. ábra: $\delta^{15}\text{N}$	38
27. ábra: Tápoldat $\delta^{15}\text{N}$ és $\delta^{13}\text{C}$	38
28. ábra: A médium és P.putida F1 stabilizotóp aránya.....	39

29. ábra: P.putida F1 és tápoldatának $\delta^{13}\text{C}$ aránya (TCE kezelt)	40
30. ábra: : P.putida F1 és tápoldatának $\delta^{13}\text{C}$ aránya	41

MELLÉKLET



1. Melléklet: Az ENVIKUT projekt csoportjai



2. Melléklet: Reakciócella (ATOMKI)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet Dr. Molnár Mihály tudományos munkatársnak, témavezetőmnek, hogy segítette a témaválasztásomat. Útmutatásával és szakmai tudásával és hasznos tanácsaival támogatta munkám eredményességét.

Köszönettel tartozom továbbá Janovics Róbert tudományos segédmunkatársnak, társ-témavezetőmnek, aki támogatta elméleti és gyakorlati munkámat egyaránt.

Ezen túlmenően köszönettel tartozom a Debreceni Egyetem Molekuláris Biotechnológia Csoportjának a baktérium minták szolgáltatásáért.

Végezetül hálával tartozom a HEKAL projektben résztvevő munkatársainak, akik szintén támogatták munkám eredményességét.

A munka a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0043 számú ENVIKUT projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

FELHASZNÁLT IRODALOM

- A. Kautianien, J.S. Vogel, K.W. Turtelaub (1997): Dose-dependent binding of trichloroethylene to hepatic DNA and protein at low doses in mice, *Chemico-Biological Interactions*, Vol. 106., Issue 2., 109-121p
- C. Peterson (1999): *Aerobic Degradation of Trichloroethylene*, Birgham Young University
- C.D. Little, A.V. Palumbo, S.E. Herbes, M.E. Lidstrom, R. L. Tyndall, P.J. Gilmer (1988): Trichloroethylene Biodegradation by a Methane-Oxidizing Bacterium, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 54., No. 4., 951-956p
- Csongor É, Hertelendi E. 1986. Low-level counting facility for ¹⁴C dating. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 17(5–6):493–7.
- D. Arciero, T. Vanelli, M. Logan, A.B. Hopper (1989): Degradation of trichloroethylene by the ammonia oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 159., Issue 2., 640-643p
- D. R. Johnson, P.K.H. Lee, V.F. Holmes, A.C. Fortin, L. Alvarez-Cohen (2005): Transcriptional Expression of the *tceA* Gene in a Dehalococcoides-Containing Microbial Enrichment, *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 71., No. 11. 7145-7151p
- Dobaradaran S., Lutze H., Mahvi AH., Schmidt TC. (2014): Transformation efficiency and formation of transformation products during photochemical degradation of TCE and PCE at micromolar concentrations, *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, Vol. 12
- EPA (1991): Scott G Huling and James W. Weawer, Ground Water Issue, Dense Nonaqueous Phase Liquids, United States Environmental Protection Agency EPA/540/4-91-002
- EPA (2001): Trichloroethylene Health Risk Assessment: Synthesis and Characterization, United States Environmental Protection Agency, Washington DC, EPA/600/P-01/002A

- EPA (2011): Toxicological Review of Trichloroethylene, CAS No. 79-01-6, EPA/635/R-09/011F, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC
- Erdey-Grúz T. (1963): Vegyszerismeret, Műszaki Könyvkiadó, Budapest
- F.J. Passman, G.E. Jones (1985): Preparation and Analysis of *Pseudomonas putida* Cells for Elemental Composition, *Geomicrobiology Journal*, Vol. 4, No. 2, 191-206 p
- Fekete-Kertész I., Molnár M., Atkári Á., Gruz K., Fenyvesi É., Hydrogen peroxide oxidation for in situ remediation of trichloroethylene – from the laboratory to the field, *Periodica polytechnica*, RESEARCH ARTICLE, 41-51p
- Frankenberry M., Kent R., Stroup C. (1987): Household assessment of bioaccumulation. *Chemosphere* 29(7) 1501-1514p
- G.J. Zylstra, W.R. McCombie, D.T. Gibson, B.A. Finette (1988): Toluene Degradation by *Pseudomonas putida* F1: Genetic Organization of the tod Operon, *Applied and Environmental Microbiology*, Bolt. 54., No. 6., 1498-1503p
- Hertelendi E, Csongor E. 1982. Anthropogenic ¹⁴C excess in the troposphere between 1951 and 1978 measured in tree rings. *Radiochemical and Radioanalytical Letters* 56(2):103–10.
- HEVESY G. (1948): Radioactive Indicators. Interscience Publishers, Inc., New York 556 p.
- HEVESY G., PANETH F. (1938): A Manual of Radioactivity. Oxford University Press 306 p
- Hua Q, Barbetti M, Worbes M, Head J, Levchenko VA. 1999. Review of radiocarbon data from atmospheric and tree ring samples for the period AD 1945–1997. *IAWA Journal* 20(3):261–83.
- Isogai K, Cook GT, Anderson R. 2002. Reconstructing the history of ¹⁴C discharges from Sellafield: part 1—atmospheric discharges. *Journal of Environmental Radioactivity* 59(2):207–22.
- J. R. Yates (1998): Mass Spectrometry and the Age of Proteom. *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 33, 1-19 p
- Janovics R., Molnár M., I. Světlík, Major I., L. Wacker: Advances in radiocarbon measurement of water samples. *International Symposium on Isotopes in Hydrology, Marine Ecosystems, and Climate Change Studies*, Monaco, 2011

- J.H. Kuney (1986): Chemcyclopedia, Volume 5. Washington, DC: American Chemical Society. 116p
- Jianzhong H., Youlboong S., R. Krajmalnik-Brown, K.M.Ritalahti, F.E. Löffler (2005): Isolation and characterization of *Dehalococcoides* sp. strain FL2, a trichloroethene (TCE)- and 1,2-dichloroethene-respiring anaerobe, Environmental Microbiology, 7(9), 1442-1450p
- K. Weissermel, H-J. Arpe (1994): Ipari szerves kémia, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest
- K.A. West, D.R. Johnson, P. Hu, T.Z. DeSantis, E.L. Brodie, P.K.H. Lee, H. Feil, G.L. Andersen, S.H. Zinder, L.Alvarez-Cohen (2008): Comparative Genomics of „Dehalococcoides ethenogenes” 195 and Enrichment Culture Containing Unsequenced „Dehalococcoides” Strains, Applied and Environmental Microbiology, Vol 74, No. 11., 3533-3540p
- K.L. Londry, L.L. Jahnke, D.J. Des Marais (2004): Stable Isotope Ratios Of Lipid Biomarkers of Sulfate-Reducing Bacteria, Applied and Environmental Microbiology, Vol 70, No. 2, 745-751 p
- KAMEN M. D. (1951): Radioactive tracers in biology. New York: Academic Press INC. 429 p.
- Ki-Man P., Hong-Kyun L., Si-Hyun D., Sung-Ho K. (2010): Degradation of TCE using Persulfate (PS) and Peroxymonosulfate (PMS): Effect of Inorganic Ions in Groundwater, Proceedings of the World Congress on Engineering and Computer Science 2010 Vol II , San Francisco, USA
- L.P. Wackett, G.A. Brusseau, S.R. Householder, R.S. Hanson (1989): Survey of microbial oxygenases: trichloroethylene degradation by propane-oxidizing bacteria, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 55., No. 11., 2960-2964p
- M. Döbeli, C. Kottler, M Stocker, S. Weinmann, H-A. Synal, M. Grajcar, M Suter (2004): Gas ionization chambers with silicon nitride windows for the detection and identification of low energy ions. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, B219-220, 289-293p
- M. Hoseini, R. Nabizadeh, S. Nazmara, G.H.Safari (2013): Influence of under pressure dissolved oxygen on trichloroethylene degradation by the H₂O₂/TiO₂ process, Journal of Environmental Health Science and Engineering 2013, 11-38

- Mazeika J, Petrosius R, Pukiene R. 2008. Carbon-14 in tree rings and other terrestrial samples in the vicinity of Ignalina Nuclear Power Plant, Lithuania. *Journal of Environmental Radioactivity* 99(2):238–47.
- Meijer HAJ, van der Plicht J, Gislefoss JS, Nydal R. 1995. Long-term atmospheric records near Groningen, Fruholmen, and Izaña. *Radiocarbon* 37(1):39–50.
- Nydal R, Lövseth K. 1965. Distribution of radiocarbon from nuclear tests. *Nature* 206(4988):1029–31.
- Otlet RL, Longley H, Walker AJ. 1989. Measurements of carbon-14 in tree-rings from trees growing in the Sellafield area. *Studies of Environmental Radioactivity in Cumbria, Part 13, AERE R 12362*. United Kingdom Atomic Energy Authority, Harwell, Didcot, UK.
- P.E. Damon, J.C Lerman, A. Long: Temporal fluctuations of atmospheric ^{14}C : causal factors and implications, *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 1978
- Pintér L., Fekete É., Feete E., Karaffa L. (2010): Degradation of trichloroethylene by *Pseudomonas putida* F1, Power of Microbes in Industry and Environment Congress, Malinska, Croatia
- R. Fahrig, S. Madle, H. Baumann (1995): Genetic toxicology of trichloroethylene (TCE), *Mutation Research*. 340 1-36p
- R. Fahrig, S. Madle, H. Baumann (1995): Genetic toxicology of trichloroethylene (TCE), *Mutation Research* 340, 1-36p
- R. S. Horvath (1972): Microbial Co-Metabolism and the Degradation of Organic Compounds in Nature, *Bacteriological Reviews*, Vol. 36., No. 2., 146-155p
- R.E. Parales, J.L. Ditty, C.S. Harwood (2000): Toluene-Degrading Bacteria Are Chemotactic towards the Environmental Pollutants Benzene, Toluene, and Trichloroethylene, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66., No. 9., 4098-4104p
- S. Barnerjee, B.L. Van Duuren (1978): Covalent Binding of Carcinogen Trichloroethylene to Hepatic Microsomal Proteins and to Exogenous DNA in vitro, *Cancer Research*, Vol. 38., 776-780p
- S. D. Richardson (2006): Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminant and Current Issues. *Anal. Chem*, 78. 4021-4026 p

- S. Heald, R.O. Jenkins (1994): Trichloroethylene removal and oxidation toxicity mediated by toluene dioxygenase of *Pseudomonas putida*, *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 60., No. 12., 4634-4637p
- SYNAL, H.A., STOCKER, M. & SUTER, M. (2007): MICADAS: a new compact radiocarbon AMS system. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*. 259 7–13.
- T. Brüning, S. Vamvakas, V. Markopoulos, G. Bimer (1998): Acute Intoxication with Trichloroethene: Clinical Symptoms, Toxicokinetics, Metabolism, and Development of Biochemical Parameters for Renal Damage, *Toxicological Sciences*, Vol. 41., 157-165p
- T. Schulze-König (2010): Advancements in biomedical radiocarbon mass spectrometry. A dissertation submitted to ETH Zurich for the degree of Doctor Sciences, ETH Zurich, Germany
- Tans PP, De Jong, AFM, Mook WG. 1979. Natural atmospheric ¹⁴C variation and the Suess effect. *Nature* 280(5725):826–8.
- Tóth G., Tömböly Cs. (2012): Radioaktív nyomjelző rendszerek. *Magyar tudomány* 2012/2. 136-140 p
- Ulrich Schulze-König Tim Telmore, V.M. (Ed.). (2011). Radiocarbon mass spectrometry for drug development. India: Indian Society for Mass Spectrometry.
- W. Dekant, A. Schulz, M. Metzler (1986): Absorption, elimination and metabolism of trichloroethylene: A quantitative comparison between rats and mice, *Xenobiotica*, Vol. 16., 143-152p
- W. Helen, M. Krauzer, K. H. Jarman (2007): Stable Isotope Ratios and Forensic Analysis of Microorganisms, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 73, No. 12, 3896-3908 p
- X. Wu, S. Monchy, S. Taghavi, W. Zhu, J. Ramos, D. van der Lelie (2010): Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*, *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 35(2), 299-323p
- Y. Morono, H. Unno, Y. Tanji, K. Hori (2004): Addition of Aromatic Substrates Restore Trichloroethylene Degradation Activity in *Pseudomonas putida* F1, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70., No. 5., 2830-2835p

Internetes hivatkozások

1. A tömegspektrométerek általános felépítése:
<http://ttk.pte.hu/analitika/letoltesek/jegyzet/ch09s02.html>
2. Triklór-etilén tulajdonságai 1.:
<http://hu.wikipedia.org/wiki/Trikl%C3%B3retil%C3%A9n>
3. Triklór-etilén tulajdonságai 2.:
http://enfo.hu/mokka/db2/glossary.php?lang=hu&show_hun=on&show_en=on&search_type=term&pattern=trikl%C3%B3retil%C3%A9n
4. Triklór-etilén tulajdonságai 3.:
<http://www.ppg.com/chemicals/chloralkali/products/documents/english/trichlorethylene.pdf>
5. Triklór-etilén LD50 értéke:
<http://cnl.colorado.edu/cnl/images/MSDS/fisher%20trichloroethylene.pdf>
6. Triklór-etilén mérgező hatása:
<http://www.atsdr.cdc.gov/MHMI/mmg19.pdf>
7. A DNAPL vegyületek viselkedése a talajban:
http://kornyezet.elte.hu/cimlap/hu/kornytan/Zarovizsga/Vedes_prez/130617/du/Kocza_Attila.pdf
8. Pseudomonas putida taxonómiája:
http://en.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_putida
9. Pseudomonas putida F1 tulajdonságai:
<http://genome.jgi-psf.org/psepu/psepu.home.html>
10. ENVIKUT projekt:
<http://envikut.unideb.hu/szakmai-alprojektek>

I. SZÁMÚ FÜGGELÉK

I. SZÁMÚ FÜGGELÉK

Munkámat az MTA-ATOMKI Hertelendi Ede Környezetanalitikai Laboratóriumában végeztem. Céлом a témavezetőim útmutatásának segítségével egy megbízható módszer kidolgozása raioaktívan nyomjelzett triklór-etilén mérésére *Pseudomonas putida* F1 baktériumban. Ehhez elsőként módszerfejlesztést kellett megvalósítani a minták megbízható kezelésére, feldolgozására és mérésére. Feladataim elsősorban a következők voltak:

- Triklór-etilén roncsolásának vizsgálata
- Baktériumtömeg elválasztása a tápközegtől
- Baktérium valamint táptalajának radiokarbon és stabilizotóp-arány mérése
- Izotópfractionálódási folyamat vizsgálata a mérési eredmények segítségével
- Radiokarbon mérések előkészítése, előzetes vizsgálatok lefolytatása

A munka előtanulmányként szolgál, a későbbiekben megvalósuló, radioaktív nyomjelzéssel végrehajtott vizsgálatokhoz. Ezen vizsgálat alapadatokat és megbízható eredményeket szolgáltat a későbbi vizsgálatok lefolytatásához, bizonyítja, hogy a módszer alkalmas lehet a raioaktívan nyomjelzett vegyület nyomon követésére a rendszerben.

Ch. Lip

V. T. a.

II. SZÁMÚ FÜGGELÉK

Vizsgálatom előtanulmányként szolgál a mesterképzési diplomamunkámhoz. Az itt végrehajtott kísérletek segítségével végezhető el a konkrét, radioaktívan nyomjelzett TCE-vel elvégzendő vizsgálatok. Diplomamunkámban tovább folytatom az izotópfractionálódási folyamat vizsgálatát, és végrehajtom a radioaktívan nyomjelzett TCE nyomon követését. Ahol az ENVIKUT projekt keretén belül kívánjuk meghatározni, hogy a baktérium képes-e felvenni és metabolizálni a vegyületet. Ehhez volt szükséges a jelen tanulmány lefolytatása, hogy bebizonyíthassam, hogy a módszer megfelelően alkalmas a vizsgálat lefolytatására.

Diplomadolgozatom további feladatai:

- Radioaktívan nyomjelzett TCE-vel végrehajtott vizsgálat végrehajtása
- Izotópfractionálódás vizsgálata Nitrogén esetében
- Passzív transzport lehetőségének vizsgálata
- Sejtalkotók vizsgálata, amennyiben lehetséges
- EC_{50} érték meghatározása

Ezen vizsgálatok, mint a passzív transzport és az EC_{50} érték, fontosak lehetnek a bioremediációs munkák során. Az EC_{50} érték segítségével megállapíthatjuk, hogy milyen koncentráció tartományban alkalmazható a baktérium.

Vizsgálatom témája irodalmi feldolgozásban nagyban hasonló a diplomamunkám témájához, ám az eredményeim csak előtanulmányként szolgálnak ahhoz. Diplomadolgozatom konkrét eredményeit a radioaktívan nyomjelzett TCE-vel végrehajtott vizsgálatok képezik.