

# **XXXII. OTDK BIOLÓGIA SZEKCIÓ**

**Hulladékhasznosítással kapcsolatos biológiai talajjavítás**

**Rédei Eszter**

**Biológus MSc II évf.**

**Szegedi Tudományegyetem**

**Témavezetők:**

**Dr. Perei Katalin egyetemi adjunktus**

**Kis Ágnes doktorjelölt**

## Tartalomjegyzék

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Ábra- és diagramjegyzék.....                                                              | 3  |
| Tartalmi összefoglaló.....                                                                | 4  |
| 1. Irodalmi áttekintés.....                                                               | 5  |
| 1.1. Talaj és élővilága.....                                                              | 5  |
| 1.2. A talaj és a növények kapcsolata.....                                                | 5  |
| 1.2.1. A talaj, mint tápanyagforrás .....                                                 | 5  |
| 1.2.2. A növények tápanyagigénye.....                                                     | 6  |
| 1.2.3. A gyökérzóna szerepe a tápanyagfelvételben.....                                    | 6  |
| 1.3. Foszfor.....                                                                         | 7  |
| 1.3.1. Jellemzői, előfordulása, átalakulása, felvétele.....                               | 7  |
| 1.3.2. A foszfor szerepe a növények fejlődésében .....                                    | 8  |
| 1.4. A foszforutánpótlás lehetőségei.....                                                 | 9  |
| 1.4.1. Műtrágyák és használatuk kérdésköre.....                                           | 9  |
| 1.4.2. Mikrobiális foszforutánpótlás.....                                                 | 10 |
| 1.4.2.1. A foszformobilizálás alapanyaga.....                                             | 10 |
| 1.4.2.2. A foszformobilizálás mechanizmusai.....                                          | 11 |
| 1.5. A foszfátmobilizálók legjelentősebb képviselői: a <i>Pseudomonas</i> nemzetség ..... | 13 |
| 1.5.1. A foszfát mobilizálására kiválasztott baktériumtörzs .....                         | 13 |
| 2. Célkitűzések .....                                                                     | 15 |
| 3. Anyagok és módszerek.....                                                              | 16 |
| 3.1. Anyagok .....                                                                        | 16 |
| 3.1.1. A felhasznált baktérium törzs .....                                                | 16 |
| 3.1.2. Felhasznált anyagok, vegyszerek és tápoldatok .....                                | 16 |
| 3.2. Módszerek .....                                                                      | 18 |
| 3.2.1. Sejtenyészet létrehozása, fenntartása, előkultúra készítése .....                  | 18 |
| 3.2.2. A kísérleti elegy összeállítása, a tápoldatok vizsgálata .....                     | 19 |
| 3.2.3. A sejtek fehérjemintázatának vizsgálata.....                                       | 20 |
| 4. Eredmények és értékelésük .....                                                        | 24 |
| 4.1 Az <i>F1 törzs</i> foszfát és kalciummobilizáló képességének igazolása.....           | 24 |
| 4.2. A tápoldat kémhatásának vizsgálata különböző szubsztrátok jelenlétében.....          | 26 |
| 4.3. A tápoldatok szerves savtartalmának alakulása.....                                   | 27 |
| 4.4. A foszformobilizálás és a szervessav-termelődés kapcsolata.....                      | 28 |
| 4.5. Enzimaktivitás mérése az egyes frakciókban .....                                     | 30 |
| 4.6. A sejtek fehérjemintázatának vizsgálata.....                                         | 33 |
| 5. Összefoglalás .....                                                                    | 34 |

## Ábrajegyzék

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. ábra: Glükózt tartalmazó minta kromatogramja.....                              | 28 |
| 2. ábra: Na-citrátot tartalmazó minta kromatogramja.....                          | 28 |
| 3. ábra: Glükóz és Na-citrát jelenlétében növesztett sejtek fehérjemintázata..... | 33 |

## Diagramjegyzék

|                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. diagram: Az <i>F1 törzs</i> által felszabadított foszfát mennyisége egy nap inkubációs idő után..... | 25 |
| 2. diagram: Az <i>F1 törzs</i> által felszabadított kalcium mennyisége egy nap inkubációs idő után..... | 26 |
| 3. diagram: A tápoldatok kémhatásának változása Na-citrát és glükóz szénforrás esetén.....              | 27 |
| 4. diagram: A foszforfelszabadulás és kémhatás kapcsolata glükóz szénforrás esetén.....                 | 29 |
| 5. diagram: Az ismeretlen komponens relatív mennyiségének változása.....                                | 29 |
| 6. diagram: A foszfor mobilizálása és a kémhatás alakulása Na-citrát jelenlétében.....                  | 30 |
| 7. diagram: Alkalikus foszfatáz aktivitás mérése különböző szénforrások esetén.....                     | 31 |
| 8. diagram: Savas foszfatáz aktivitás mérése különböző szénforrások esetén.....                         | 32 |

## Rövidítések jegyzéke:

OD: Optikai denzitás

LB: Luria Bertani

pNPP: para-nitrofenil foszfát

pNP: para-nitrofenol

HPLC: nagy hatékonyságú folyadék kromatográfia

rRU: relatív retenció egység

SDS-PAGE: Na-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis

TGS: Tris/Glicin/SDS puffer

## Tartalmi összefoglaló

### Kulcsszavak

Foszfátmobilizálás, *foszfátmobilizáló izolátum - F1 törzs*, foszfor, hulladékhasznosítás.

A 21. században a folyamatos népességnövekedés mellett az emberek étel- és táplálék iránti minőségi és mennyiségi igénye egyre növekvő tendenciát mutat és olyan nagy méreteket öltő problémát okoz napjainkban, melyre megoldásokat kell keresnünk.

Az emberek mindennapi szükségleteik szempontjából fontos, hogy a mezőgazdasági, (étel- és táplálék-, vegyi, stb.) ipari termelés, közlekedés kielégítően működjön és mindenkit kiszolgáljon, azonban nem elhanyagolható kérdés, milyen módon teszi ezt. Nagy a felelősségünk abban, hogy csökkentsük az okozott környezeti terhelés mértékét és környezetkímélő, fenntartható stratégiákat dolgozzunk ki, így biztosítva minél jobb életkörülményeket saját magunk és a következő generációk számára is.

A növénytermesztés szempontjából ez azt jelenti, hogy fenn kell tartani, illetve lehetőségeinkhez mérten növelni kell a termés hozamot és a termésminőséget, miközben mindent megteszünk az emberi egészség, a környezeti és a természeti állapot megóvása érdekében. Új területek korlátozott módon még bevonhatók a termelésbe, továbbá a jelenleg is használt növényvédő szerek és műtrágyák használatával növelni tudjuk a termés hozamot. Foszforműtrágyák esetén azonban számolnunk kell a nyers foszforásványok bányászatával, a feldolgozásuk során használt vegyszerek, hő és adalékanyagok káros hatásaival, kijuttatásukkor pedig az esetleges helytelen, túlzott használat következményeivel, ami hozzájárul a vizek eutrofizálódásához és az ivóvízbázis szennyezéséhez. Kiemelkedő fontosságú tehát, hogy új megoldásokat keressünk a termés hozam növelésére.

Jelenleg is rendelkezésünkre állnak már alternatív tápanyag-utánpótlási módszerek, melyekben a műtrágyákat mikrobiális rendszerekkel helyettesítik. Ezen módszerek kutatása és fejlesztése nagyban hozzájárulhat a növénytermesztés műtrágya-függőségének csökkentéséhez.

A kísérleteim során használt *Pseudomonas sp. F1* nem patogén, talajban élő baktérium, amely képes foszfátot mobilizálni szerves foszfátforrásból, esetemben egy húsipari melléktermékből, csontból. Dolgozatomban célja azon mechanizmusok különböző körülmények közötti részletes vizsgálata és jellemzése, amelyek befolyásolják a baktérium törzs foszfátmobilizáló képességét.

# 1. Irodalmi áttekintés

## 1.1. Talaj és élővilága

A talaj és növények kapcsolatának és tulajdonságainak alapos ismerete elengedhetetlen, hiszen a kísérletek során általam használt *Fl törzs* természetes közege a talaj, illetve hosszútávon a mezőgazdasági területeken termesztett növények mikrobák közreműködésével biztosított foszforutánpótlása a cél.

A talaj összetett, háromfázisú rendszer: szerves és szervesetlen összetételű szilárd fázisból, szállítóközegként működő folyékony fázisból és gázfázisból áll. Mint a földkéreg külső szilárd rétege, élőhelyet, vizet és tápanyagokat biztosít a növények számára, így segítve a primer produktum termelődését és a földi életet. Szoros kapcsolatban áll a benne és rajta élő és növekvő élőlényekkel és fontos szerepe van az anyagok és energia körforgalmában, átalakításában. Ha ezek a folyamatok zavartalanul működnek, a talaj megfelelően funkcionál mint természeti erőforrás és bevonható a termelésbe. A minél nagyobb terméshozamot elérő növénytermesztés érdekében rövid- vagy hosszútávon trágyázással, öntözéssel, talajjavítással, gyomirtókkal pozitívan vagy negatívan is befolyásolhatjuk tulajdonságait (Stefanovits és mtsai 1999).

A földtani, éghajlati, domborzati, emberi és biológiai tényezők hatására kialakuló talaj életközösségének összefoglaló neve edafon. A talajélőlények biomasszáját túlnyomó részt a gyökerek alkotják, majd ezt követi a baktériumok tömege, ami hektáronként elérheti az 1-2 tonnát is. A baktériumok oxigénigényüktől függően akár 250 cm-es mélységig megtalálhatók és részt vesznek szinte minden lebontó és felépítő folyamatban, akár tömegük 1000-szeresét átalakítva egy nap alatt. A legfontosabb talajbaktériumok a *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, és *Spirochaeta* fajok közül kerülnek ki, melyek specifikus enzimek segítségével végzik az anyagátalakítást. Ezek közül a *Pseudomonas*-oknak szerepe van a cellulóz és lignin bontásában, a fehérjék és kitin ammonifikációjában és a denitrifikációban is (Stefanovits és mtsai 1999).

## 1.2. A talaj és a növények kapcsolata

### 1.2.1. A talaj, mint tápanyagforrás

A talaj mellett, hogy élőhelyet biztosít, tápanyagokkal is ellátja a növényeket. E képesség alapja, hogy a benne lévő agyagásványok és humuszfélék felületén ionok

raktározódhatnak. Az ionok erősen kötve; a növények számára közvetve felvehetően; a talajoldatban szabadon, könnyen felvehetően fordulnak elő és ezek a formák egymásba átalakulhatnak. A tápanyagok elérhetőségét számos tényező befolyásolja, úgymint a hőmérséklet, talajnedvesség, szervesanyag-tartalom, kémhatás, agyag-, humusz-, karbonát- és nehézfém-tartalom, mikrobák jelenléte, tömődöttség és a növény és talaj között lejátszódó folyamatpárok, mint például ásványosodás/immobilizáció, adszorpció/desorpció, kicsapódás/feloldódás (Láng 2007).

### **1.2.2. A növények tápanyagigénye**

A növények számára a legalapvetőbb forrás a C, H és O, melyekből víz és szén-dioxid formájában, a napfény segítségével több millióféle szerves molekulát képesek szintetizálni és végső soron szárazanyaguk is túlnyomóan (kb. 95%-ban) ezekből az elemekből épül fel. A növények tápelem-tartalma és -összetétele talajonként, szervenként, szövetenként is változhat, így funkcióik alapján célravezető a szükséges építőelemeket 4 csoportba sorolni, melyek a következők: 1. C, H, O, N és S – a szerves anyagok fő felépítői, melyek a talajoldatból és talajlevegőből vehetők fel; 2. P, B és Si, melyek foszfátokból, borátokból, bórsavból és szilikátokból származhatnak és észtereket képeznek; 3. K, Na, Mg, Ca, Mn és Cl, melyek feladata sokrétű – pl. enzimalkotó, töltéskiegyenlítő szerepük van; 4. Fe, Cu, Zn és Mo, ezek többek között az elektrontranszportot segítik (Láng 2007).

Az általam végzett kísérletek szempontjából érdemes kiemelni a kalcium növényekben betöltött szerepét, mivel a munkám során használt csontszén nagy mennyiségben tartalmazza. Nélkülözhetetlen a növekedés és a fejlődés során, szükséges a növényi sejtmembránok struktúrájának és funkciójának fenntartásához és a sejtfalak stabilizálásához. Ezenkívül részt vesz az anyagcsere-forgalomban, fehérjeképződésben és növeli a nehézfémekkel szembeni ellenálló képességet. Hiánya esetén a gyökérzet és a hajtások fejletlenebbek (Hepler 2005).

A kísérletek során elsődleges fontosságú elem, a foszfor tárgyalására a későbbiekben kerül sor.

### **1.2.3. A gyökérzóna szerepe a tápanyagfelvételben**

A növények maguk is képesek befolyásolni a tápanyagok felvételét, egyrészt gyökérzetük növekedési, morfológiai, szerkezeti sajátosságaival, másrészt különféle vegyületek és ionok szintézisével és kibocsátásával, melyek a környező talajrész tulajdonságainak

megváltoztatásával segítik a rizoszféra kialakulását. Ilyen kibocsátott anyagok a  $H^+$ ,  $HCO_3^-$ , aminosavak, cukrok, szerves savak, enzimek, nyálkaanyagok. Számos elem, mint például a vas, foszfor, cink, kálium a felsorolt anyagok hatása (pH-csökkenés, redukció, stb.) következtében oldhatóbbá, könnyebben felvehetővé válik. Az adott növényre jellemzők a rizoszféra mikroorganizmusai is, melyek a magas energiatartalmú anyagok (aminosavak, szerves savak) miatt képesek megtelepedni. Ezek a populációk azután képesek a növényi tápanyagfelvételre, gyökérfejlődésre hatni és káros hatásokat kivédeni (Arcand és Schneider 2006). A növényi fejlődést elősegítő rizobaktériumok közvetett módon, a patogén mikrobák káros hatásainak csökkentésével, vagy közvetlenül, többek között fitohormonok termelésével,  $N_2$ -fixációval, a gyökér membránpotenciáljának csökkentésével, enzimszintézissel fejtik ki jótékony hatásukat. Ilyen baktériumtörzsek találhatók a *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Erwinia*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter* és *Flavobacterium* fajok között (Rodríguez és Fraga 1999).

### 1.3. Foszfor

#### 1.3.1. Jellemzői, előfordulása, átalakulása, felvétele

A foszfor Földünk 11. leggyakoribb anyaga, szilárd, nem fémes jellegű biogén elem, mely minden élőlény felépítésében fontos szerepet játszik. A természetben szerves (észter, inozit-foszfát) és szervetlen (Ca-, Al-, Fe-foszfát) formában található (Wisniak 2005). A szerves foszforvegyületek a talaj teljes foszfortartalékának átlagosan 30-50%-át teszik ki. Ennek akár fele inozit-foszfát lehet, ami egy stabil, növények és mikrobák által termelt fitát. További, a talajban is előforduló szerves formái a foszfomonoészterek, foszfodiészterek (foszfolipidek és nukleinsavak) és foszfortriészterek (Rodríguez és Fraga 1999). Savanyú talajokban a foszfátion a humusz, agyagásványok és vas- vagy alumínium-hidroxidok felületén kötődhet meg. Lúgos talajokban felületi kicsapódással válik oldhatatlanná, kalcium-foszfátok keletkeznek. Az előzőekből is látszik, hogy a kémhatás fontos a foszfor elérhetősége szempontjából. Savas körülmények között  $AlPO_4$  és  $FePO_4$ , lúgos talajban pedig  $Ca_3(PO_4)_2$  formájában fordul elő, a növények számára felvehetetlenül. Savanyú talajból  $H_2PO_4^-$ , semleges és lúgos közegből  $HPO_4^{2-}$  formájában tudják felvenni és hasznosítani a növények (Arcand és Schneider 2006).

A talaj szerves foszfortartalmát (nukleinsavak, fitin, stb.) a növények közvetlenül nem képesek hasznosítani. Egyes baktériumok, sugárgombák és gombák viszont hidrolízissel

bontják ezeket a vegyületeket, így létrehozva olyan ásványos foszforformákat, melyeket a növények is fel tudnak venni (Zaidi és mtsai 2009).

A felvett szervetlen foszfát akár pár perc alatt szervessé alakulhat a gyökérben, de xilémbe lépése előtt ugyanilyen könnyedén válik újra szervetlenné. Szerves formában könnyűszerrel mozog a növényben mindkét irányba (Láng 2007).

### **1.3.2. A foszfor szerepe a növények fejlődésében**

A növények számára a foszfor esszenciális elem, azaz más elemmel nem pótolható, közvetlen szerepe van a metabolizmusban, hiánya akár a növény pusztulását is okozhatja. A foszfor a legszélesebb körű makroelem, ami szinte az összes biokémiai, élettani folyamatban részt vesz. Szerepe van a nagy energiatartalmú ATP és más energiatároló molekulák felépítésében, így hatással van a poliszacharid- és lipidszintézisre, az energiatárolásra és -átalakításra. Fontos építőeleme a nukleinsavaknak és foszfolipideknek, ezért nélkülözhetetlen a membránok és örökítőanyagok létrehozásában. Szükséges a növekedéshez, osztódáshoz, fotoszintézishez, enzimatikus folyamatok szabályozásához. A magvakban fitinként raktározódik, csírázáskor különböző tápionokhoz juttatva a növényt (Ashley 2011).

A növény foszfortartalma nagyrészt szerves vegyületként, főleg pirofoszfát és cukorfoszfát formájában található. Sejten belül Mg-, Ca-, Na-, K-sóként, vakuólumokban anorganikus ionként raktározódik. Bár a növényi szárazanyagnak kb. 0,1-0,5%-át teszi ki foszfor, az egészséges anyagcseréhez a növényeknek a fejlődés kezdetétől szükségük van megfelelő mennyiségű foszforra, mert így biztosíthatják a cukor-, keményítő- és fehérjeszintézist, a vegetatív és szaporítószervek fejlődését továbbá szerepe van a szárazságtűrés növelésében és a toxikus hatások kivédésében is (Füleky 1999).

A legtöbb mezőgazdasági talaj teljes foszfortartalma jelentős ugyan, de ennek legnagyobb része kötött, kicsapódott formában raktározódik el, így a növények számára csekély mennyiség marad felvehető állapotban (Zaidi és mtsai 2009).

Hiánya esetén a gyökerek kevésbé fejlettek, a levelek merevebbek, sötétebbek, gyakran vöröses elszíneződéssel. A tünetek a foszfor könnyű remobilizálódása miatt az idősebb részekben jelentkeznek először. A foszforhiány miatt eltolódik a virágzás, gabonanövényeknél pedig csökken a kalászok száma és a szemek tömege. Az esetleges foszfor túladagolás következtében pedig bizonyos elemek (pl.: Zn, Mg, Fe) felvétele gátolt (Láng 2007).

Az említett okok miatt a megfelelő termés hozam elérése érdekében szükséges tehát a talaj felvehető foszfortartalmának növelése. Ennek jelenleg legelterjedtebb, hagyományos formája a műtrágyák alkalmazása, és ígéretes, jelenleg is vizsgált formája a mikroorganizmusok segítségével történő foszfát-felszabadítás (Zaidi és mtsai 2009).

## **1.4. A foszforutánpótlás lehetőségei**

### **1.4.1. Műtrágyák és használatuk kérdésköre**

A növények tápanyag utánpótlásának egyik lehetséges módja a műtrágyák használata.

A legelső foszforműtrágyát 1840-ben készítették csontlisztből, majd a növekvő igények miatt nyersfoszfátokat kezdtek el alapanyagként használni. Ezeket különböző apatitok (fluorapatit, hidroxipapatit, klórapatit) építik fel, közös jellemzőjük a nehezen bontható szerkezet. Apatitok nagy mennyiségben magmatikus kőzetekben, illetve tengeri üledékben lelhetők fel, a fő kitermelő országok között szerepel Marokkó, Kína és az USA (Smil 2000). Becslések szerint azonban a rendelkezésre álló foszfortartalékok akár 50-100 éven belül kimerülhetnek az emberiség egyre növekvő igényei miatt, melynek 90%-áért a mezőgazdaságban használt műtrágyák előállítása tehető felelőssé (Cordell és mtsai 2009). A foszfor, mint nem megújuló erőforrás esetén a lehető leghatékonyabb felhasználásra kell törekedni, azonban a kőzetek kitermelése, feldolgozása, majd a termékek szállítása és kezelése során jelenleg is mintegy 33-43%-os veszteséggel kell számolni. Emellett a lelőhelyek kimerítésének következtében a foszfor tartalmú kőzetek bányászata mind költségesebbé válik, illetve egyre gyengébb minőségű kőzetek kitermelésére, tisztítására és feldolgozására van lehetőség, ami tovább rontja a foszforműtrágya-gyártás gazdaságosságát (Schröder 2010).

A foszforműtrágyák gyártása során a nyers foszforkőzeteket többek között kénsavas, foszforsavas kezelésnek vagy hőkezelésnek vetik alá. Az egyes előállítási módok végeredményeképp szuperfoszfát, termofoszfát vagy nitrofoszfát műtrágyák keletkeznek, melyek hatóanyagtartalma átlagosan 8-24% közötti (Smil 2000).

Mint más típusokban, úgy a foszforműtrágyákban is a fő hatóanyag mellett átlagosan 50-60%-ban adalékanyagokat, vivőanyagokat találunk, így többek között olyan makro- és mikroösszetevők mutathatók ki bennük, mint a Ca, S, Mg, Al, Fe, Na, Sr, As, Hg, Ba, Mn, Zn, Ni, Cd, Cr (Fülek 1999). Kutatások bizonyították, hogy ezen elemek egy részének felvételére jelentős hatást gyakorol a műtrágyák talajsavanyító hatása, mely foszforműtrágyák

esetében a szabad savak és gipsz savanyú hidrolízisének köszönhető (Loch és Nosticzius 2004).

Mivel a foszforműtrágyák oldhatósága és felvehetősége a talajba kerüléstől kezdve gyorsan csökken, a mezőgazdaságban gyakran az igényeket túllépő mennyiségben alkalmazzák őket. Ha azonban a talaj eléri véges pufferkapacitását és nem képes több vegyületet megkötni, a felsorolt, esetenként mérgező vegyületek, nehézfémek nagyobb mennyiségben kerülhetnek a táplálékláncba és vízkészletbe. Ezáltal a talajok elsavasodását, a talajvizek minőségének romlását okozhatják vagy feldúsulás következtében már az élőlényekre nézve veszélyes koncentrációban lehetnek jelen. A kimosódás és erózió miatt a túltrágyázás komoly problémát okozhat a felszín alatti és felszíni vizekben, ahol a magas foszfortartalom kezdeti tápanyag-feldúsulást, majd oxigénhiányt és az élőlények pusztulását okozza, így létrehozva az eutrofizáció jelenségét (Smil 2000).

#### **1.4.2. Mikrobiális foszforutánpótlás**

Tekintve, hogy a foszforműtrágyák folyamatosan drágulnak és igen alacsony hatásfokkal működnek, továbbá káros hatással vannak a környezetre, nem meglepő, hogy egyre nagyobb az érdeklődés az olcsóbb, környezetkímélő megoldások iránt. Ilyen alternatíva a rizoszférában élő foszforoldásra képes mikrobák vizsgálata és műtrágya helyett való alkalmazása. Kutatások szerint az ilyen mikrobák képesek az oldhatatlan foszfort oldhatóvá tenni, ami így a növények számára már felvehető formában lesz jelen a talajoldatban. A legjelentősebb baktériumok, melyek képesek erre, a *Bacillus*-ok és a *Pseudomonas*-ok közül kerülnek ki. A foszfort oldó mikrobák hatásfoka fajonként, talajonként különbözik, függ a talaj tápanyag-ellátottságától, környezeti faktoroktól, *in vitro* körülmények között pedig a szén-, nitrogénforrás, a hőmérséklet és a fémion-koncentráció is hatással van rá (Zaidi és mtsai 2009).

##### **1.4.2.1. A foszformobilizálás alapanyaga**

A foszforműtrágyák előzőekben tárgyalt problémáinak ellensúlyozására ideális megoldást kínál a csontszén használata, ami az állattenyésztésből és élelmiszeriparból származó csont hulladék pirolizált és őrölt formája (Chen és mtsai 2011).  $P_2O_5$  tartalma magas, 20-25% is lehet (Riegel és Kent 2003), de jelentős mennyiségű kalciumot, nitrogént és káliumot is tartalmaz, használatával pedig lehetőség nyílik állati eredetű melléktermékek újrahasznosítására és a termelés műtrágyától való függésének bizonyos mértékű

csökkentésére. Európában évente több millió tonna potenciálisan csontszénné alakítható csontliszt keletkezik, amely megfelelő alternatívát jelenthet a foszforműtrágyákkal szemben a kisléptékű gazdaságok, biofarmok számára (Chen és mtsai 2011).

#### **1.4.2.2. A foszformobilizálás mechanizmusai**

Számos kutatás eredménye azt mutatja, hogy a foszforoldásra képes mikroorganizmusok több mechanizmus segítségével is képesek lebonyolítani a folyamatot. Ezek közül a legtöbbet kutatottak a foszforelvonás elmélete, a szerves savak termelése és a közeg protonkibocsátás általi lesavanyítása (Zaidi és mtsai 2009).

##### A foszforelvonás elmélete

Az elmélet lényege, hogy a foszfor folyamatos eltávolítása a talajoldatból közvetett módon a Ca-P vegyületek feloldását eredményezi, így növelve a szabad foszfor mennyiségét. Az elmélet magyarázza a szerves foszfortartalmú összetevők ásványosodását, mivel a biomassza foszfortartalma folytonos összefüggésben áll a foszfortartalmú szerves szubsztrátok lebomlásával (Zaidi és mtsai 2009). Illmer és Schinner kutatásaik során azonban nem találtak bizonyítékot arra, hogy a mikrobák erőteljes foszforfelvétele segítené a Ca-P vegyületek további oldását, mivel a felhasznált baktériumok foszfortartalma és -felvétele végig átlagos volt, míg az oldatban gyakorlatilag az összes foszfor vízzoldékony formára alakult (Illmer és Schinner 1995).

##### Mobilizálás szerves savak termelésével

Az előzőnél jóval elfogadottabb elképzelés szerint a foszforoldást szerves savakkal érik el a foszfor-mobilizáló mikrobák. Szerves savak (pl.: glükonsav, citromsav, oxálsav, propionsav, ecetsav) kibocsátásával kelálják a foszforhoz kötött szerves kationokat, vagy annyira lecsökkentik a közeg pH-ját, hogy a foszfor oldatba megy. Ez a mikrobasejtek és környezetük elsavanyodását okozza és azt, hogy a foszfátásványban a  $\text{Ca}^{2+}$  ionok protonokra cserélődnek. A kutatók azonban nem tudtak összefüggést kimutatni a kémhatás és az oldott foszfor mennyisége között, illetve találtak olyan foszforoldásra képes mikrobatorzset, ahol szerves savak termelése nem kimutatható. Az előzőek miatt a szerves sav általi foszfát-mobilizálás

mellett más alternatív lehetőségek is felvetődtek, mint például a kelátképző anyagok vagy szervesetlen savak termelése és  $H^+$  kibocsátás (Zaidi és mtsai 2009).

A szerves savak termelésének vizsgálatából az is kiderült, hogy a kibocsátott savak fajtája és mennyisége függ a használt foszfát szubsztráttól és fajonként is változik, tekintet nélkül az adott törzs genetikai hátterére (Vyas és Gulati 2009). Kutatások szerint (Rodríguez és Fraga 1999) néhány Gram-negatív baktériumtörzs foszfátoldó képességének alapja a glükóz glükonsavvá és ketoglükonsavvá való oxidálása. E két domináns szerves sav mellett kimutattak olyanokat is, mint az ecetsav, glikolsav, almasav, oxálsav, borostyánkősav, tejsav, izovaleriánsav és izovajsav is (Rodríguez és Fraga 1999).

A talaj foszfortartalmának akár 29-65%-a szerves formában, kationokhoz kapcsolva fitátként raktározódhat. A fitát foszfomonoészter kötése a növények számára felbonthatatlanok, így ezt a jelentős mennyiségű foszfort nem képesek felhasználni. Egy indiai kísérlet során olyan mikrobákat teszteltek, amik szerves savak és fitáz termelésére is képesek. Az eredmények alapján a szerves savak növelték a fitáz enzim fitinbontó hatását, így növelve a növények által felvehető foszfor mennyiségét (Patel és mtsai 2010).

### Protonkibocsátás

A  $H^+$  kiválasztása magyarázza az olyan foszforoldó mikrobák hatásosságát, amik szerves savakat nem termelnek, jelenlétükben mégis lesavanyodik a közeg és foszfor-felszabadulás figyelhető meg. Kutatások szerint a protonkibocsátás folyamatát kationok (főleg  $NH_4^+$ ) asszimilációja kíséri (Zaidi és mtsai 2009).

### Foszfátázok

A talajok jelentős szerves foszfortartalmát először szervesetlen foszforra kell hidrolizálni, ahhoz, hogy felhasználható legyen a növények számára. A szerves foszforvegyületek ásványosítása foszfátáz enzimek segítségével történik. A talaj foszfátáz-aktivitásának túlnyomó része mikrobiális eredetű és fokozottan mutatható ki a rizoszférában. Kutatások alapján (Rodríguez és Fraga 1999) a talajban és gyökérzónában élő mikroorganizmusok 30-48%-a képes a fitát hasznosítására, ami a szerves foszforvegyületek mintegy felét adja.

A foszfátázok két nagy csoportja az alkalikus és a savas foszfátázok, ezen belül szubsztrátspecifitásuk alapján elkülöníthetünk specifikus és nem-specifikus foszfátázokat. Mivel a legtöbb talaj kémhatása savas vagy semleges, feltételezték, hogy a savas

foszfatázoknak van nagyobb szerepük és ki is mutatták ezen enzimek aktivitását többek között *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Serratia* és *Proteus* fajok törzseiben (Rodríguez és Fraga 1999). A foszfatázok termelődése és aktivitása változatos, komplex szabályozási rendszerektől függ. Az *Enterobacteriaceae* család esetén például az alkalikus foszfatázokat jelentősen, a savas foszfatázokat pedig nem gátolta a magas foszfor koncentráció. A *Pseudomonas fluorescens* esetében a tenyésztési hőmérsékleté volt a szabályozó szerep. Egy *Escherichia coli* törzs vizsgálatakor azt találták (Rodríguez és Fraga 1999), hogy a szénforrás a meghatározó, mivel glükóz jelenlétében kikapcsolt, más szénforrás esetében pedig bekapcsolt a törzs savas foszfatáza. A *Salmonella typhimurium*-nál pedig a cAMP és receptorfehérjeje pozitívan szabályozott két foszfatázt (Rodríguez és Fraga 1999).

### **1.5. A foszfátmobilizálók legjelentősebb képviselői: a *Pseudomonas* nemzetség**

A jelentős fajszerű *Pseudomonas* nemzetség a Pseudomonadaceae család többi tagjával együtt a baktériumok Gracilicutes divíziójába tartozik. Gram-negatív, obligát aerob baktériumok, egyenes vagy kissé görbült pálcika alakúak. Átlagosan 0,5-1 µm az átmérőjük és 1,5-5 µm hosszúak. Mozgékonyaságukat a polárisan elhelyezkedő egy vagy több flagellumnak köszönhetik. A sejteket vastag polimer tok védi (pl. alginát), savérzékenyek. Többségük kemoorganotróf, szaprofita, de vannak fakultatív kemolitotróf képviselők is. Sok faj humán, állati (pl.: *P. aeruginosa*) vagy növényi (pl.: *P. syringae*) kórokozó, általában erős antibiotikum rezisztenciával. Bizonyos *Pseudomonas* fajok képesek különböző anyagokat termelni, például a pyoverdint, ami egy sárgás, fluoreszkáló pigment vagy az antibiotikus hatású pyocianint (Kevei és Kucsera 2010).

#### **1.5.1. A foszfát mobilizálására kiválasztott baktériumtörzs**

A foszfát mobilizálását kísérleteim során a Biotechnológiai Tanszék törzsgyűjteményében megtalálható *Pseudomonas* sp. F1 segítségével végeztem. E talajizolátum nagy hasonlóságot mutat egy Koreában izolált, és jellemzett törzssel.

A *Pseudomonas*-ok ezen képviselője aerob, Gram-negatív, pálcika alakú, spórát nem képző talajbaktérium. A sejtek 1-2 µm nagyságúak, poláris flagellumaik segítségével képesek mozogni. Luria-Bertani agaron fehéres-sárgás kör alakú telepeket képeznek. A sejtek optimális növekedéséhez a kultúrának szüksége van 5% NaCl-ra, viszont ha a sótartalom a

7%-ot is meghaladja, a sejtek elpusztulnak. A kultúra 4°C-on képes a szaporodásra, 37°C-on viszont már nem (Kwon és mtsai 2003).

A faj eddig is szerepelt biológiai kutatásokban, mivel olyan felületaktív anyagot termel, ami az eredmények alapján jelentős mértékben képes visszaszorítani bizonyos, széles körben elterjedt petespórás gombák által okozott növénybetegségeket (Hultberg és mtsai 2010). Mindeközben a gyökér eredeti mikroflóráját nem változtatja meg, a növény növekedésére sincs negatív hatással és a régebb óta használt opportunistá humánpatogén *P. aeruginosa* káros hatása is megelőzhető használatával. A termelt felületaktív anyag természetes úton lebomlik, káros melléktermékeket nem hagy hátra.

## 2. Célkitűzések

A gyarapodó népesség megnövekedett élelmiszerigénye miatt szükséges a mezőgazdasági termelés hatékonyságának maximalizálása. Ezt jelenleg legnagyobbbrészt új termőterületek bevonásával és műtrágyák, növényvédőszeresek használatával érik el. Ezek közül hosszú távon egyik sem megfelelő megoldás, hiszen a kemikáliák használata veszélyeztetheti az élővilágot, az emberi egészséget, előállításuk nagy környezeti terhelést jelent és számolnunk kell a nyersanyagokat szolgáltató források kimerülésével is. Foszforműtrágyák esetében fennáll a nem megfelelő használat miatti egyenetlen foszforellátás és –túladagolás is, ami a vízbázis foszforszennyezéséhez és eutrofizációhoz vezethet. Ennek kiküszöbölésére más, haladóbb szemléletű és fenntarthatóbb módszereket kell kidolgoznunk a foszforpótlás biztosítására.

Kísérleteim során arra kerestem választ, hogy az *F1 törzs* alkalmas-e ilyen célok megvalósítására. Vizsgálatom elsődleges célja volt, hogy csonthulladékból előállított csontszén vízzoldhatatlan foszfátjaiból (hidroxiapatit) a baktérium segítségével vízzoldékony formává alakítsam a foszfátot és, hogy e folyamat körülményeit megismerjem. A keletkező ortofoszfát forma már alkalmas arra, hogy a növények közvetlenül felvegyék a talajoldatból, biztosítva számukra a foszfor utánpótlást. A releváns szakirodalom áttekintését követően kutatásaim a szerves szubsztrátok és a foszfát-felszabadulás kapcsolata köré összpontosult. Feltételezéseink szerint ugyanis a foszfát-felszabadulás kétféle úton mehet végbe. A baktérium irodalmi adatok szerint (Rodríguez és Fraga 1999) glükóz szénforrásból a glükóz-dehidrogenáz enzime segítségével glükonsavat állít elő, melynek következtében csökken a közeg pH-ja, és a foszfát az alacsony pH miatt oldatba megy. Egyes szénforrások esetén a közeg pH-ja nem tolódik el savas irányba, ekkor a foszfát oldásában a sejt foszfatáz enzime játszanak szerepet (Rodríguez és Fraga 1999). Utóbbi feltételezés alátámasztásául célom volt megvizsgálni a szénforrások és a kultúra kémhatásának foszfát mobilizálására gyakorolt hatását. Az eredményekből levont következtetések alapján továbbhaladva elvégeztem a minták szerves savtartalmának meghatározását, továbbá vizsgáltam a minták foszfatáz-aktivitását is. Kutatásaim kiterjedtek a sejtek feltárását követően a foszformobilizáló baktérium fehérje mintázatának elemzésére is.

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. Anyagok

##### 3.1.1. A felhasznált baktérium törzs

Kísérleteim során a *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó *F1* törzsszel dolgoztam, melyet a Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai Tanszék munkatársai izoláltak szénhidrogénnel szennyezett talajmintából, majd a Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH fajmeghatározó részleg közreműködésével azonosították.

##### 3.1.2. Felhasznált anyagok, vegyszerek és tápoldatok

A vegyszereket és anyagokat, amelyeket a kísérletek során használtam, a Merck, Reanal, Sigma és Spektrum 3D cégek forgalmazzák.

##### A baktérium növesztéséhez használt táptalajok és tápoldatok

Luria-Bertani (LB) tápoldat (pH=7,0): 10g/L tripton, 5g/L élesztőkivonat, 10g/L NaCl

LB táplemez: LB tápoldat 15g/L Bacto agarral kiegészítve

##### A foszfát felszabadulásának vizsgálatához használt tápoldat

Foszfát mentes minimál tápoldat: 0,58 g/L NaCl, 0,125 g/L  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,044 g/L  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,0012 g/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0,014 g/L  $\text{FeSO}_4$ , 2 ml SL 6 mikroelem törzsoldat: 2975mg/L  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ , 300mg/L  $\text{H}_3\text{BO}_4$ , 200mg/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 100mg/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 30mg/L  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 30mg/L  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 20mg/L  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 10mg/L  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

A sejtek szén és energiaforrása kísérletektől függően változó volt, többek között glükóz, citrát szervesanyagokat használtam.

##### Csontszén

A magas foszfáttartalmú csontszén a TERRENEUM Terület-rekultivációs és Környezetvédelmi Bt. biztosította. A csontszén foszfáttartalma a  $\text{P}_2\text{O}_5$  tartalom szerint megadva: 28%.

#### A foszfát tartalom méréshez használt összetevők

VMR-reagens, melynek összetétele:

1. oldat: 1,25 g ammónium-heptamolibdát-tetrahidrát 15 ml desztillált vízben feloldva,
2. oldat: 0,0625 g ammónium-metavanadát 15 ml desztillált vízben feloldva.

A két oldat összemérése után 3,5 ml desztillált víz és 16,5 ml tömény sósav hozzáadása szükséges.

#### A $\text{Ca}^{2+}$ tartalom méréshez használt reagens

A Merck cég által forgalmazott  $\text{Ca}^{2+}$ -teszt (1.00049.0001).

#### A sejtfeltáráshoz felhasznált anyagok

5 mM Trisz(hidroximetil)-aminometán (Tris) oldat

SET-puffer: 40 mM EDTA pH=8,0, 50 mM Tris-HCl pH=8,0, 0,75 M szukróz oldat.

#### A Micro-Lowry módszerrel történő fehérjemennyiség meghatározásához használt anyagok

0,25 M NaOH

'A' reagens – 6%  $\text{NaCO}_3$

'B' reagens – 1,5%  $\text{CuSO}_4$  és 3% Na-citrát

'C' reagens – 1 ml 'A' és 20  $\mu\text{l}$  'B' reagens elegye. A reagenst frissen kell készíteni!

'D' reagens – 72%-os Folin reagens

#### A fehérjék gélelektroforéziséhez használt 10%-os poliakrilamid gél összetétele

Szeparáló gél: 1,9 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 1,7 ml 30 % akrilamid - biszakrilamid (29:1) keverék, 1,3 ml 1,5 M Tris-HCl puffer (pH = 8,8); 0,05 ml 10 % SDS; 0,05 ml 10 % ammónium-perszulfát; 0,003 ml TEMED.

Gyűjtő gél: 2,1 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 ml 30 % akrilamid - biszakrilamid (29:1) keverék; 0,38 ml 1 M Tris-HCl puffer (pH = 6,8), 0,03 ml 10 % SDS; 0,03 ml 10 % ammónium-perszulfát; 0,003 ml TEMED.

A géleket Tris-glicin (25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS - pH = 8,3) pufferben futtattam.

### Gélfestés ezüst-nitráttal

Festék: 2 g/l ezüst nitrát

Fixáló folyadék: 30% etanol, 10% ecetsav

Mosáshoz: 20% etanol és desztillált víz

Érzékenyítéshez: nátrium-tiosulfát (0,2 g/l)

Előhívó folyadék: nátrium-karbonát (30 g/l), nátrium-tiosulfát (10 mg/l) és formaldehid (0,7 ml/l) 1 liter desztillált vízben feloldva,

Előhívás leállítására: 5% ecetsav

### Enzimaktivitás méréshez használt anyagok

Alkalikus foszfatáz aktivitás mérése esetén: 0,1M Tris-HCl (pH=7,5); 0,005M para-nitrofenil foszfát (0,1M Tris-HCl-ben feloldva); 1 M NaOH

Savas foszfatázok mérése esetén: 10mM Tris-citrát (pH=5,3), 10mM para-nitrofenil foszfát (25mM-os Tris-citrátban oldva); 1M NaOH

## **3.2. Módszerek**

### **3.2.1. Sejtenyészet létrehozása, fenntartása, előkultúra készítése**

A kísérletek során használt *E. coli* törzs növesztésére és fenntartására LB táplemezt használtam, amely elegendő mennyiségű szerves anyagot és ásványi tápelemet biztosít a sejtek szaporodásához. A lemezen szélesztett tenyészetet egy napig szobahőmérsékleten hagytam nőni, majd felhasználásig 4°C-on tároltam.

A kísérletek összeállítását megelőzően erről a lemezeről vettem steril fülke alatt inokulumot. Ezt egy 100 ml-es Erlenmeyer lombikban lévő LB tápoldatba helyezve indítottam starter kultúrát, melyet szobahőmérsékleten egy napig 150 rpm sebességgel rázatva növesztettem.

Egy nap inkubációs időt követően spektrofotométerrel, 600 nm-en megmértem a starter kultúra optikai denzitását (OD), melyhez referenciaként a sejtmentes LB oldat szolgált. A kultúrák optikai denzitását OD<sub>600</sub>=1,0 értékre állítottam, felhasználásuk előtt. (Ehhez a sejteket 10 percig, 4°C-on és 13.000 rpm sebességgel centrifugáltam majd a felülúszó leöntése után a sejteket annyi foszfátmentes minimál tápoldatban szuszpendáltam fel, hogy optikai denzitásuk OD<sub>600</sub>=1,0 legyen). Ebből a sejtszuszpenzióból a későbbiekben a kísérleti

elegyekbe 1% (v/v)-ban mértem be. Ezzel biztosítottam, hogy minden független kísérletemhez és párhuzamos mintáimhoz azonos mennyiségű sejtet használjak fel.

### **3.2.2. A kísérleti elegy összeállítása, a tápoldatok vizsgálata**

A minták összeállítása során 100 ml Erlenmeyer lombikokba 0,28%(m/V) csontszenet mértem, majd ezeket kuktázással sterilizáltam. Ezt követően a lombikokba belemértem 20 ml foszfátmentes minimál tápoldatot, továbbá 1% (V/V) sejtszuspenziót. Szénforrásként 1% (m/V) glükózt vagy citrátot használtam.

A mintákat egy napig szobahőmérsékleten, 150 rpm sebességgel rázattam, majd vizsgáltam a tápoldat foszfát és kalcium tartalmát, a minták kémhatását, valamint a tápoldatok szerves savtartalmát.

#### A foszfát mennyiségének mérése

A foszfát tartalom meghatározást standard módszer alapján végeztem (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1992).

A foszfátmérés előtt ismert koncentrációjú törzsoldatból kalibrációs egyenest készítettem. A kalibráció elkészítéséhez 1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  oldatot használtam. A kalibrációs pontokat úgy vettem fel, hogy 0 – 10 – 20 – 40 – 60  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációban tartalmazzanak foszfort. A minták foszfát tartalmának meghatározásához a kalibrációs egyenes egyenletét használtam fel.

Foszfát mérés során a mintáimból egyenként 1200  $\mu\text{l}$ -t mértem centrifugacsövekbe, majd 5 percig 13.000 rpm sebességgel centrifugáltam, hogy a sejtek és a csontszén nem zavarja a mérést. A felülúszókból 900  $\mu\text{l}$ -t eppendorf csövekbe pipettáztam, majd kiegészítettem 256  $\mu\text{l}$  VMR-reagenssel, 128  $\mu\text{l}$  desztillált vízzel valamint 10  $\mu\text{l}$  kénsavval. Az összeállított reakcióelegyeket alaposan elkevertem (kémcsőkeverőn), majd 10 perc várakozás után spektrofotométerrel 405 nm-en mértem a felszabadult foszfát mennyiségét. A háttér alapként szolgáló vak elegy 900  $\mu\text{l}$  desztillált vízből és a fenti három reagensből állt.

#### A kalcium mennyiségének mérése

A kalcium mérés esetén szinténkalibrációs egyenest készítettem ismert koncentrációjú törzsoldatból. A kalibráció elkészítéséhez 100 mM  $\text{CaCl}_2$  törzsoldatot használtam. A mérésekhez használt kalciumteszt érzékenysége 0-4  $\mu\text{g/ml}$ . Ezt figyelembe véve a

kalibrációhoz a következő  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációjú pontokat vettem fel: 0,5 – 1 – 2 – 3 – 4  $\mu\text{g/ml}$ . A minták kalcium tartalmát a kalibrációs egyenes egyenletéből számoltam ki.

A kalcium tartalom meghatározásához a mintákból 1200  $\mu\text{l}$ -t pipettáztam eppendorf csövekbe, majd 5 percig 13.000 rpm sebességgel centrifugáltam. A sejt- és csontszénmentes felülúszókból 1000  $\mu\text{l}$ -t kimértem és a Merck kalciumteszt első, majd második reagenséből is 100-100  $\mu\text{l}$ -t adtam hozzá. Alapos keverés és 5 perc várakozás után a minták fényelnyelését 565 nm-en mértem a spektrofotométerrel. Vak oldat esetén a mintát desztillált vízzel helyettesítettem.

#### A tápoldatok kémhatásának mérése

A minták kémhatását pHenomenal 110 (ECN: 662-1156) típusú készülékkel határoztam meg.

#### A tápoldatok szerves savtartalmának meghatározása

A minták (sejt- és csontszénmentes) felülúszójának szerves savtartalmát folyadékkromatográf (HPLC) segítségével határoztam meg.

A HPLC típusa Hitachi Chromaster 5450. Paraméterei: 5110-es grádiens pumpa, 5210 automata mintaadagoló, 5450 RI detektor, L2350 kolonna termosztát, Transgenomic IC Sep 64H kolonna, 50 °C-os kolonnatér, 0,8 ml/min áramlási sebesség, 41 °C-os detektorcella, 70 bar nyomás. A használt eluens  $\text{H}_2\text{SO}_4$  volt, a rendszerhez tartozó program neve EZChrom Elite Enterprise.

### **3.2.3. A sejtek fehérjemintázatának vizsgálata**

A kísérletek során nem csak a minták felülúszójának paramétereit, hanem a foszfátmobilizáló sejtek fehérjemintázatát is vizsgáltam.

#### Sejtfeltárást megelőző kezelés:

A minták csontszéntartalmát szűrőpapír segítségével eltávolítottam majd a tápoldatot 13.000 rpm (10 perc, 4 °C) centrifugáltam elválasztva ezzel a sejteket a tápoldattól. A felülúszó leöntése után a sejteket 6 ml SET pufferben felfuszpendáltam. A szuszpenziót 5 percig 13.000 rpm sebességgel centrifugáltam, majd a felülúszó leöntése után a sejteket 1,5 ml 5 mM Tris-HCl pufferben (pH=8,0) vettem fel. Utóbbi lépést kétszer megismételtem, a sejteket végezetül 1ml Tris-HCl pufferben vettem fel a sejtfeltárást megelőzően.

#### Sejtfeltárás:

Az előkezelt sejteket szonikálással tártam fel. Ehhez Bandelin Sonoplus típusú ultrahangos szonikátort használtam MS 72 szonikáló fejjel, 4 perc 10 másodperces ciklusokat alkalmazva. A glükóz szubsztrátot tartalmazó mintákat kétszer, míg a nátrium-citrát tartalmaúakat egyszer szonikáltam. A szuszpenzió túlmelegedését megelőzendő a csöveket törtjégbe állítva stabilizáltam, így védve a fehérjéket.

Szonikálás után a mintákat 20 percig 4°C-on és 13.000 rpm sebességgel centrifugáltam leülepítve ezzel a sejtörmelékét.

#### Citoplazma- és membránfrakciók szétválasztása:

A szonikálással feltárt minták felülúszóját ultracentrifuga csövekbe töltöttem és Sorvall WX Ultra Series 90 típusú ultracentrifugájával (TFT 80.4 rotor, 4°C, 90 perc, 38.000 rpm) szétválasztottam a citoplazma és membrán frakciót.

#### Fehérje mennyiségi meghatározása Micro-Lowry módszerrel:

Az egyes frakciók fehérjetartalmának mérését megelőzően 0 - 5 - 10 - 25 - és 50 µg/µl koncentrációjú borjú szérum albumin (BSA) oldatból kalibrációt készítettem.

A fehérjetartalom meghatározása során a mintákból 10 µl-t 190 µl desztillált vízzel egészítettem ki, majd 800 µl 0,25 M NaOH-ot adtam hozzájuk és 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltam. Az inkubáció után a frissen elkészített 'C' reagensből adtam a mintákhoz 300 µl-t úgy, hogy minden pipettázás között 30 másodpercet vártam és a 15 perces inkubálási idő a 'C' reagens első mintához való hozzáadáskor indult. Ennek a precíz és pontos hozzáadásnak kulcsfontosságú szerepe van. Az inkubációs idő lejártakor 100 µl 'D' reagenst adtam a mintákhoz és hasonló módon, mint a 'C' reagens esetén és a reagens hozzáadását követően 30 percig inkubáltam a mintákat. A reakcióelegyek fényelnyelését spektrofotométerrel, 750 nm-en mértem. A vak minta desztillált víz volt.

#### Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis

Az ismert fehérje koncentrációjú mintákat egységes koncentrációra hígítottam, majd futtatás előtt 30 µl mintát 10 µl felvivő pufferrel egészítettem ki, mely elegyet 5 percig 95°C-on inkubáltam, hogy az alegységek disszociáljanak. A fehérjék molekulatömeg szerinti elválasztásának céljából nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-

PAGE) végeztem, melyhez 1,5 mm-es, 10%-os géleket készítettem a gélöntéssel kapcsolatos biztonsági előírásokat betartva. Az elektroforézist TGS pufferben végeztem 60 V-on kezdve, majd miután a minták átjutottak a szeparáló gélbe és egy sorba rendeződtek, 120 V-on folytattam. A futtatás során Prosieve Unstained Protein Marker II-t használtam markerként.

#### Gélfestés ezüst-nitráttal

A gélben lévő fehérjéket az elektroforézist követően ezüst nitrát festéssel tettem láthatóvá. Először fixáló oldatba helyeztem másfél órára, majd 20%-os etanollal és desztillált vízzel mostam 10-10 percig. A gél mosás után 2 percre érzékenyítő folyadékba tettem, majd ezt is lemostam róla desztillált vízzel (2x20 mp). 30 percre ezüst-nitrát oldatba helyeztem a gél, és 10 másodperces desztillált vizes öblítés után, frissen készített előhívó folyadékkal kezeltem, amíg a gélkép elérte a kívánt intenzitást. Ha ez megtörtént, 5%-os ecetsavval leállítottam az előhívást, 2 perc után desztillált vízre cseréltem az ecetsavat, és ebben tároltam a gél.

#### Enzimaktivitás mérése

A mérés elve azon alapszik, hogy a foszfatáz enzimek megfelelő kémhatású környezetben képesek bontani a para-nitrofenil-foszfátot (pNPP), miközben anorganikus foszfát és para-nitrofenol (pNP) keletkezik. Ez a pNP lúgos közegben sárga színű, fényelnyelési maximuma 410 nm.

Kísérleteim során mind savas, mind alkalikus foszfatázok mérését elvégeztem. A kísérletek kivitelezését megelőzően azonban kalibrációkat készítettem mind a savas, mind az alkalikus foszfatázok későbbi mennyiségi meghatározása miatt.

A kalibrációk elkészítése során alkalikus foszfatáz esetén 0,1 M Tris-HCl törzsoldattal, míg savas foszfatáz esetén 10 mM Tris-citrát oldattal dolgoztam. A törzsoldat 0 - 0,004 - 0,01 - 0,02 - 0,03 - 0,04 - 0,05 - 0,06 mM koncentrációban tartalmazta a pNP-ot. A későbbiekben az éles minták foszfatáz tartalmára a kapott kalibrációs egyenesekből tudtam következtetni. A szonikálással és ultracentrifugálással szétválasztott citoplazma- és membránfrakciók mellett az eredeti minták felülúszójának enzimaktivitását is mértem. Ezt megelőzően a felülúszóból a fehérjéket Amicon Ultra 4 10K ultraszűrő segítségével koncentráltam.

A mintákban jelenlevő foszfatáz enzimek aktivitásának mérése, a reakcióelegyek összeállítása:

Savas foszfatáz enzimek esetén: 250 ml enzimet tartalmazó minta; 250 ml 10mM-os pNPP (25mM Tris-citrátban feloldva); 250 ml 25 mM Tris-citrát (pH=5,3)

Alkalikus foszfatáz enzimek esetén: 150 ml enzimet tartalmazó minta; 480 ml 0,1M Tris-HCl (pH=7,5); 120 ml 0,005M pNPP (0,1M Tris-HCl-ben feloldva)

Mindkét mérés esetén a mintákat 1 órán át 37°C-on inkubáltam és ezt követően 1M-os NaOH-dal állítottam le a reakciót.

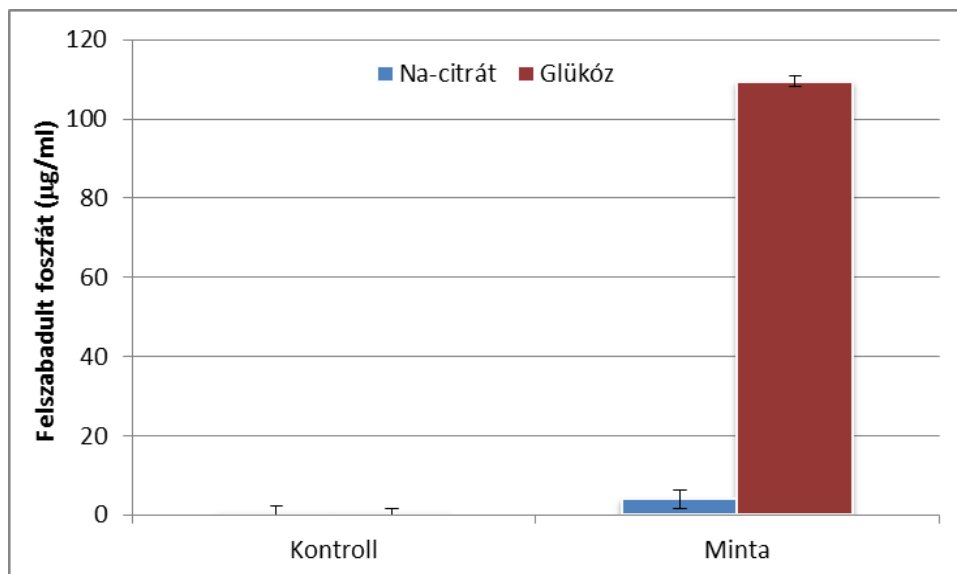
## 4. Eredmények és értékelésük

Céljaimnak megfelelően olyan élelemiszeripari hulladékot (csont pirolizált formája) választottam foszforforrásként, melyben a foszfor vegyületei a növények számára felvehetetlen, nem vízdoldékony formában vannak jelen. A mikrobiális foszformobilizálás bizonyítása érdekében elvégeztem néhány alapvető kísérletet. Ahhoz, hogy a sejtek aktívan részt vegyenek a foszfor vízdoldékony formára alakításában, szükséges a tápoldatot szerves szén- és energiaforrással kiegészíteni, mely esetemben a glükóz, illetve a Na-citrát volt. Előzetes kísérletek során bebizonyosodott, hogy az *F1 törzs* mindkét komponenst képes jó hatékonysággal hasznosítani szén-, és energiaforrásként. A két szubsztrát hasznosítása, a sejtek anyagcseréje és ennek eredményeként a környezet paraméterei is több ponton eltérhetnek egymástól. Az ismertetett kísérletekben ezen eltérések okait igyekeztem felderíteni.

### 4.1 Az *F1 törzs* foszfát és kalciummobilizáló képességének igazolása

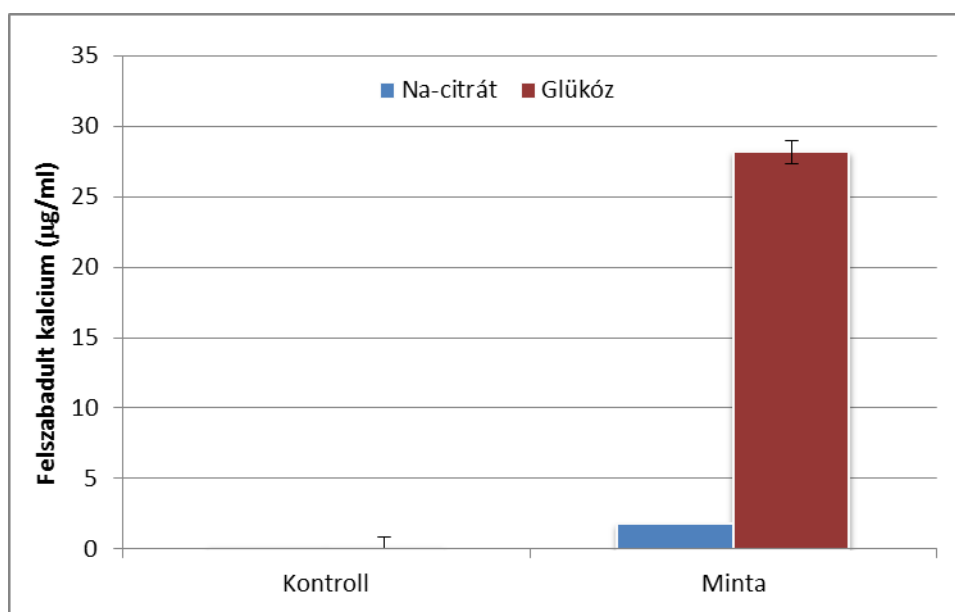
A kísérletek során arra kerestem választ, hogy a foszfátmentes tápoldatban a *Pseudomonas sp. F1* 1 nap szobahőmérsékletű inkubáció során képes-e az általam használt csontszénből a foszfát és a kalcium felszabadítására. Az eredményeket az 1. és 2. számú diagram mutatja.

Azokban a mintákban, melyekben glükóz volt a szénforrás (1. diagram), sokkal nagyobb mértékű foszfát-felszabadulás volt mérhető, mint a Na-citrátot tartalmazó tápoldatok esetén. Ennek oka feltehetően a glükóz szerves savvá történő átalakítása, mely megjelenik a tápoldatban, és a közeg kémhatásának csökkenését okozza, így segíti a foszfor oldódását. Alacsony foszfáttartalmat mértem Na-citrát esetén, ami arra utal, hogy a tápoldat lúgosodott, így az apatitból nem tudott a vizes fázisba oldódni annak foszfáttartalma. A sejtek a foszfát szükségletük biztosítására valószínűleg alternatív megoldást választva, enzimkatalizálta reakciók révén, csak az életfolyamataikhoz szükséges mennyiségű foszfátot mobilizálták.



**1. diagram: Az *F1* törzs által a csontszénből felszabadított foszfor mennyisége egy nap inkubációs idő után**

Az 1. diagram eredményeivel összhangban glükóz szénforrás esetén jelentős kalcium-felszabadulás figyelhető meg a sejtmentes kontroll mintához képest, míg Na-citrát szénforrás esetén csak csekély mértékű felszabadulás detektálható.



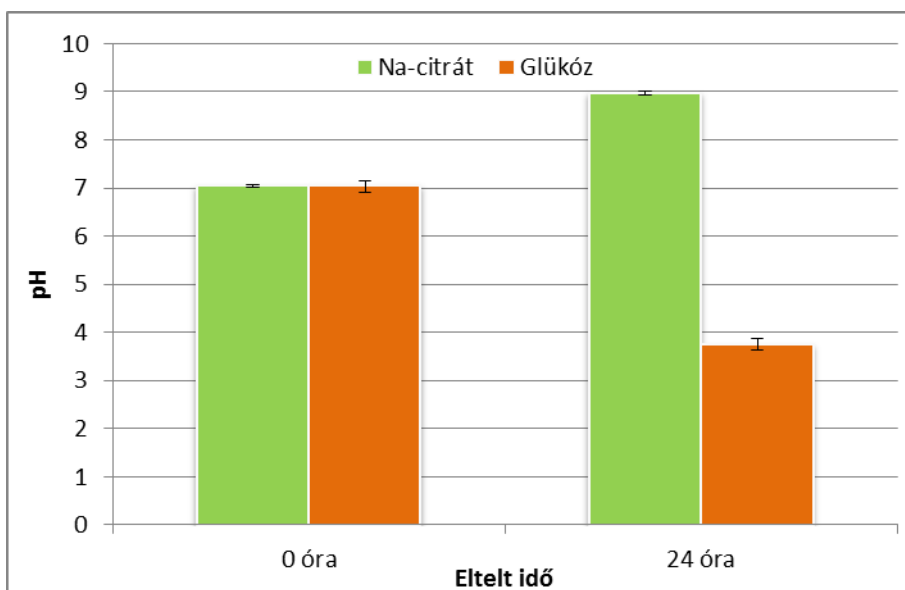
**2. diagram: Az *F1* törzs által a csontszénből felszabadított kalcium mennyisége egy nap inkubációs idő után**

Annak igazolására, hogy Na-citrát szubsztráton a sejtek szaporodása a tápoldat alacsony foszfáttartalmának ellenére jelentős, a kalcium- és a foszfátméréssel párhuzamosan mértem a

minták optikai denzitását is 600 nm-en. Na-citrát szénforrás esetén a kultúra nagyon zavaros,  $OD_{600}=1,6$  volt, míg glükóz szénforrás esetén alacsonyabb,  $OD_{600}=1,2$ . Az eredmények alátámasztják korábbi feltételezéseinket, miszerint a sejtek Na-citrát szénforrás esetén is aktív anyagcserét folytatnak nem vízzoldékony foszfát forrás biztosítása esetén is.

#### 4.2 A tápoldat kémhatásának vizsgálata különböző szubsztrátok jelenlétében

A fenti kísérletben kapott eredmények alátámasztására egy napos inkubációs időt követően mértem a glükózt és Na-citrátot tartalmazó tápoldatok kémhatását. A pH-méréseket az indokolta, hogy a foszfor a glükózos mintákban vélhetően az elsavasodott közeg miatt tudott nagyobb mértékben felszabadulni a csontszénből. A 3. diagram eredményein látható, hogy a kiindulási állapothoz képest milyen mértékű pH-különbségek alakultak ki az egyes tápoldatok között. Na-citrátot tartalmazó minták kémhatása alkalikus irányba tolódott el, amit a szénforrásból felszabadult és sejtek által fel nem használt nátrium jelenléte okozhatott. Glükóz esetén a tápoldat pH-ja lecsökkent, ami megkönnyítette a kalcium- és foszfát oldódását. Az eredmények tehát bizonyítják korábbi felvetést, miszerint a pH nagyban befolyásolja a foszfátoldást.



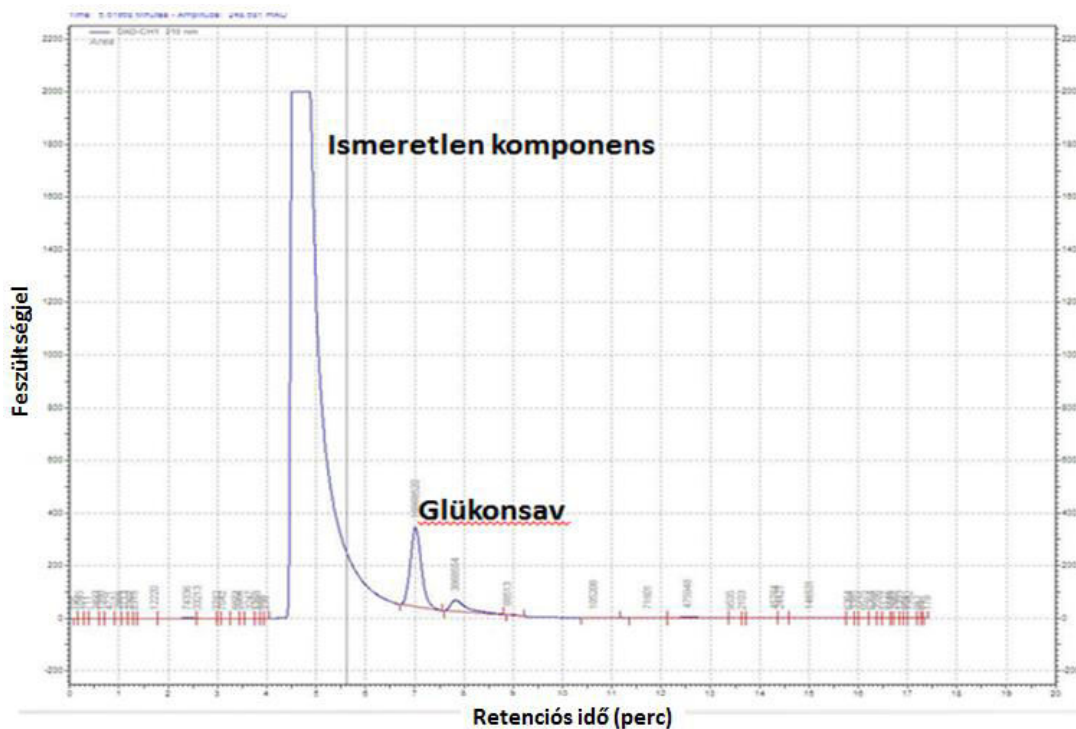
3. diagram: A tápoldatok kémhatásának változása Na-citrát és glükóz szénforrás esetén

### 4.3 A tápoldatok szerves savtartalmának alakulása

Irodalmi adatok alapján (Rodríguez és Fraga 1999) tudjuk, hogy a foszfátot mobilizáló mikrobák között általános mechanizmus a szerves savak kibocsátása és ezáltal a kémhatás olyan mértékű megváltoztatása, ami kedvez a foszfát oldódásának.

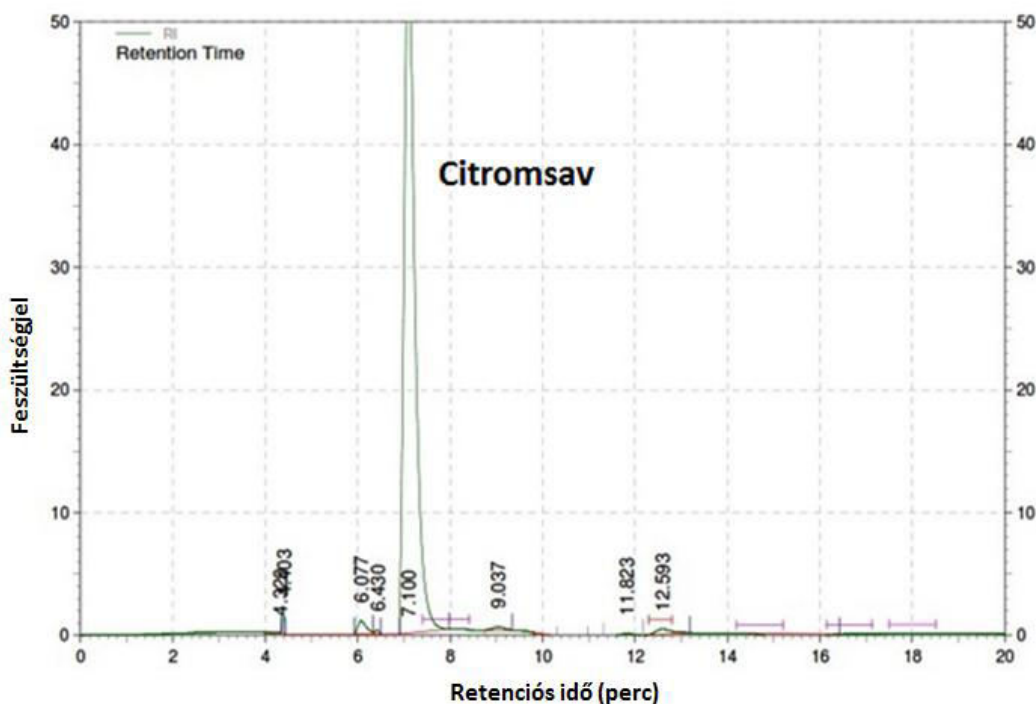
A 4.2. pontban bemutatott eredményeim alapján látható, hogy a pH savas tartományba tolódott glükóz szénforrás esetén, ami arra engedett következtetni, hogy a csontszénből a foszfát oldása valamilyen szerves savtermelés segítségével történik. Tudományos kutatások bizonyítják továbbá, hogy glükóz jelenlétében a sejtek a glükóz-dehidrogenáz enzim segítségével glükonsavat képesek előállítani (Rodríguez és Fraga 1999).

Ezen ismeretek birtokában jelen kísérlet során célom volt a minták szerves savtartalmának elemzése. Egy nap inkubációs idő után a glükóz-glükonsav átalakulás a tápoldatban a várttal ellentétben nem volt jelentős (1. ábra). A kromatogrammon a glükonsav csúcs előtt megfigyelhető egy markáns csúcs is, melynek azonosítása folyamatban van. Feltételezhetően egy rövid szénláncú szerves sav. Az eredmények alapján valószínűsíthető, hogy túlnyomó részt ez utóbbi komponens felelős a tápoldat kémhatásának változásáért.



1. ábra: Glükóz szubsztráton nevelt F1 törzs tápoldatának kromatogramja

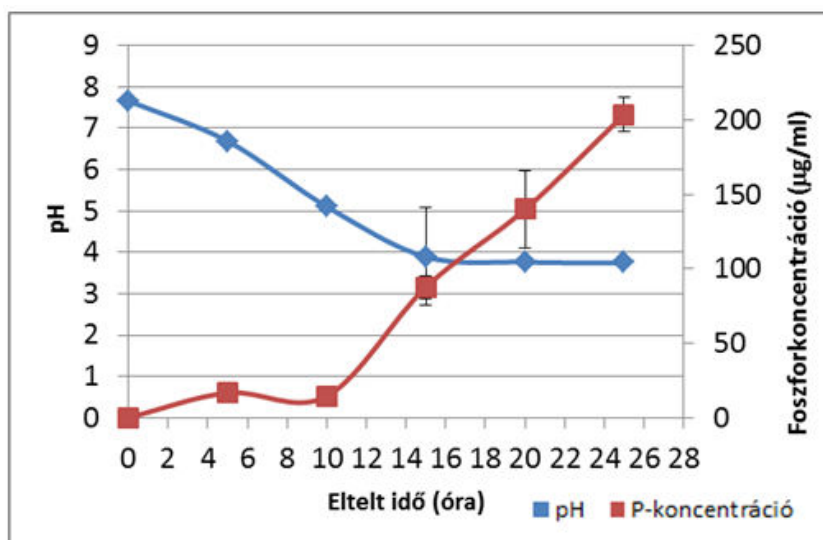
A Na-citrátot tartalmazó kultúrában (lásd 2. ábra) még jelentős mennyiségű citromsav volt detektálható egy nap inkubációt követően. Ez nem meglepő, hiszen a Na-citrát a citromsav nátriummal alkotott sója, így disszociációjakor ez az összetevő lesz jelen a tápoldatban. Egyéb szerves sav jelenlétére utaló csúcsot nem tapasztaltunk, ami alátámasztja azt a hipotézisünket, hogy citromsav szén- és energiaforrás esetén a sejtek más módon segítik elő a foszfát apatitból történő felszabadulását.



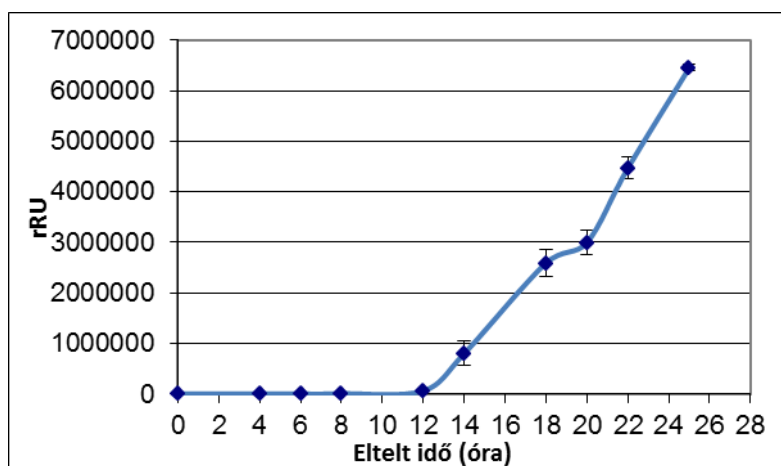
2. ábra: Na-citrátot tartalmazó minta kromatogramja

#### 4.4 A foszformobilizálás és a szervessav-termelődés kapcsolata

A foszfát mobilizálás folyamatának nyomonkövetése céljából a különböző szubsztrátokat tartalmazó minták végpontanalízise mellett gyakoribb mintavételt is végeztem, mely eredményeképp a felszabadult foszfor, a kémhatás és glükóz szénforrás esetén a korábban kimutatott ismeretlen komponens mennyiségének változása összehasonlíthatóvá vált az idő függvényében.

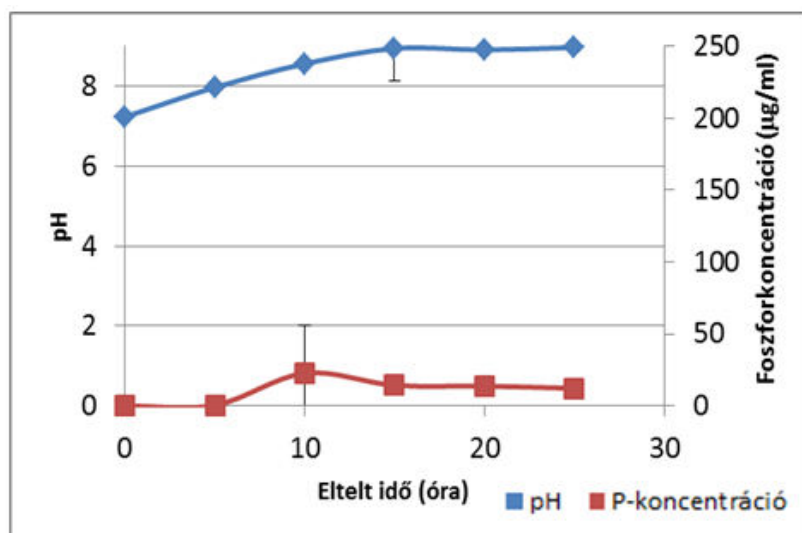


**4. diagram: A foszforfelszabadulás és kémhatás kapcsolata glükóz szénforrás esetén**



**5. diagram: Az ismeretlen komponens relatív mennyiségének változása**

A 4. és 5. diagram eredményei szemléletesen mutatják be a kémhatás nagymértékű csökkenésének hatására bekövetkező foszformobilizálódás növekvő ütemét és az ismeretlen komponens ezzel párhuzamosan emelkedő mennyiségét. Az oldott foszfát mennyisége a tápoldatban akkor ugrott meg, amikor annak kémhatása  $\text{pH} \leq 5,0$  csökkent. A közeg savanyodásáért a korábban tárgyalt mechanizmusok lehetnek felelősek, melyek során az oldat glükóztartalma glükonsavvá alakul és ezzel egyidőben a beazonosítatlan komponens is megjelenik a tápoldatban, majd mennyisége az oldott foszforral párhuzamosan emelkedik.



**6. diagram: A tápoldat foszfor tartalmának és kémhatásának alakulása Na-citrát jelenlétében**

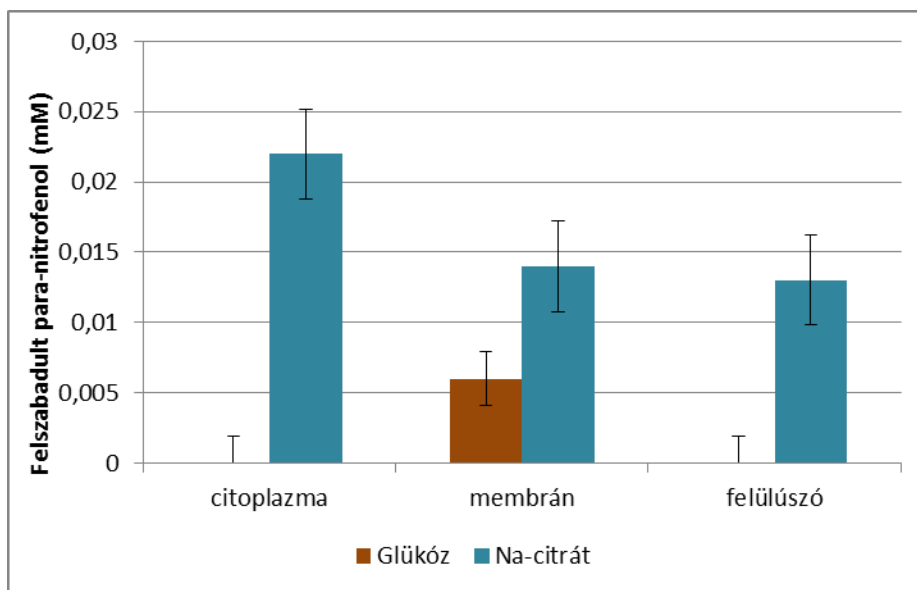
A 6. diagramon megfigyelhető a Na-citráttal ellátott mintákra jellemző, kisebb mértékű és egyenletes ütemű pH változás és foszformobilizálás. E folyamat hátterében a már szintén említett különböző foszfatázok aktiválódása állhat, amik segítségével a sejtek képesek a számukra szükséges mennyiségű foszfor felszabadítására. A kismértékű pH emelkedésért feltehetően a tápoldatban maradó nátrium ionok felelősek, melyeket a szénforrás metabolizálása során a sejtek nem hasznosítanak.

#### 4.5 Enzimaktivitás mérése az egyes frakciókban

A korábbi kísérleti eredményeim alapján látható volt, hogy a Na-citrátot tartalmazó mintákban egy nap inkubációs időt követően alacsony koncentrációban jelent meg foszfát a tápoldatban. A kultúra zavarossága azonban igazolta, hogy a sejtek képesek szaporodni és aktív anyagcserét folytatni a szénforrás esetén is. A szakirodalmi adatok (Rodríguez és Fraga 1999) arra engednek következtetni, hogy ebben az esetben más mechanizmus, vélhetően a foszfatázok jelenléte és aktivitása sejten belül vagy a sejten kívüli térben eredményezte a foszfát felszabadulását. Ennek bizonyítása érdekében mértem a minták felülúszójának, valamint a sejtek citoplazma- és membránfrakciójának foszfatáz aktivitását. Méréseimet mind alkalikus, mind savas foszfatázokra elvégeztem, melyhez para-nitrofenil-foszfát szubsztrátot használtam.

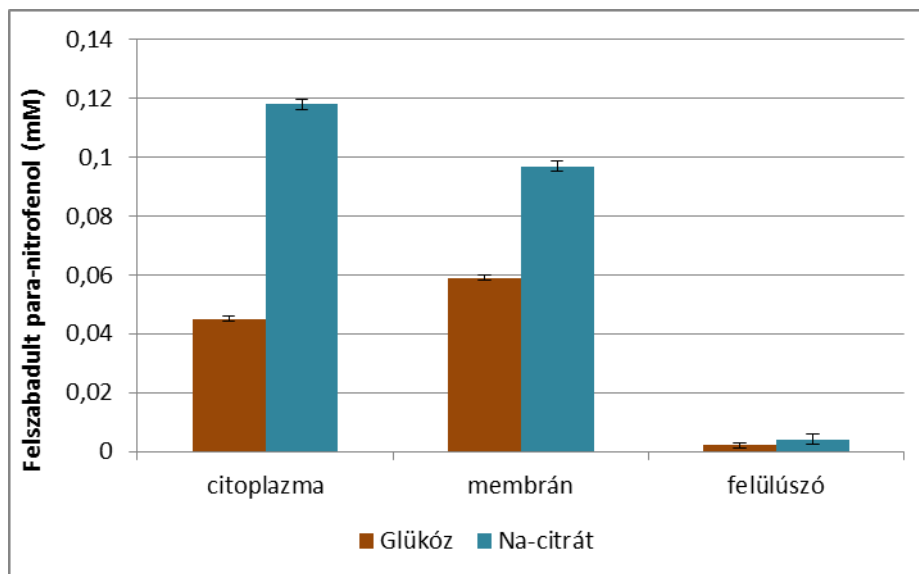
A 7. diagramon a glükózt és Na-citrátot tartalmazó minták egyes frakcióinak alkalikus foszfatáz aktivitása következtében felszabaduló para-nitrofenol (pNP) mennyisége látható. Az

eredményeikről elmondható, hogy Na-citrát szénforráson nevelt sejtek frakcióiban jóval több az enzimaktivitás következtében felszabaduló pNP az egyes frakciókban, mint glükóz szénforrás esetén. A legnagyobb aktivitást a várttal ellentétben a citoplazma frakcióban detektáltam. Koncentrált (Amicon Ultra 4 10K ultraszűrő) követően a sejt kultúra felülúszóban is kimutatható foszfatáz-aktivitás, mely egyértelműen extracelluláris foszfatáz jelenlétére enged következtetni. Glükózzal kiegészített minták esetén csak a membránfrakcióban volt tapasztalható az alkalikus foszfatáz aktivitás.



**7. diagram: Alkalikus foszfatáz aktivitás különböző szénforrásokon nevelt kultúra frakcióiban**

A 8. diagram ábrázolja a minták savas foszfatáz aktivitása következtében felszabaduló pNP mennyiségeket. A glükózt tartalmazó minták esetén a para-nitrofenil-foszfát bontás a membránfrakcióban és a citoplazma frakcióban is kimutatható volt. A Na-citráton szaporított sejtek savas foszfatáz aktivitása az alkalikushoz képest jelentősen nagyobb, kivéve a felülúszó frakciót, amiben savas foszfatázok aktivitása mindkét minta esetén nagyon alacsonynak mutatkozott.

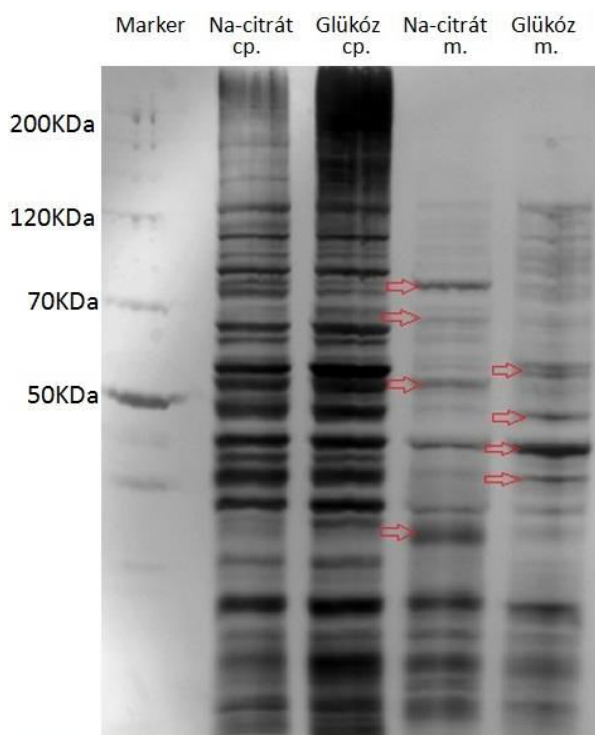


**8. diagram: F1 törzs savas foszfatáz aktivita különböző szénforrások esetén**

Összességében elmondható, hogy a Na-citráton nevelt kultúrák esetén magasabb foszfatáz aktivitás volt detektálható. Az alkalikus és savas foszfatázok aktivitását összehasonlítva jól látszik, hogy a savas foszfatázok nagyobb mennyiségben bontották a pNPP-ot. Megállapítható továbbá, hogy (a várttal ellentétben) a citoplazma frakció mutatta a legnagyobb aktivitást, amivel megmagyarázható az a megfigyelésem, miszerint nem szabadult fel feleslegben foszfát a citráton nevelt kultúrákban. A glükózos minták esetében savas foszfatázok aktivitása volt kimutatható a sejten belüli térben, ami egyéb anyagcsere folyamatokban játszhat fontos szerepet.

#### 4.6 A sejtek fehérjemintázatának vizsgálata

Az előző alfejezetekben részletezett eredmények alapján célom volt az egyes szubsztrátokon nevelt sejtek fehérjemintázatának vizsgálata, és távolabbi célként tűztem ki a feltételezett enzimátikus útvonalon történő foszfátmobilizálásban résztvevő foszfatázok kimutatását és jellemzését (mely ennek a dolgozatnak nem része). A gélkép kiértékelése során a minták között elsősorban a fehérjesávok megjelenésében, valamint azok intenzitásában vártam markáns különbségeket. Ezek a különbségek különböző környezetben aktiválódó fehérjéket jelezhetnek, melyek a savtermelésért vagy egyéb enzimátikus aktivitásért (pl. foszfatáz) lehetnek felelősek.



**3. ábra: Glükóz és Na-citrát jelenlétében növesztett sejtek fehérjemintázata**

cp: citoplazma frakciót, m: membránfrakció

A minták közötti különbségeket nyilakkal jelöltem (3. ábra). Az egyes szubsztrátokon nevelt kultúrák citoplazma frakciója között nem látható jelentős eltérés, ellentétben a membránfrakciókkal. Az eltérő körülmények között növesztett kultúrák membránfrakciójában egyértelmű különbségek figyelhetők meg, melyek alapján arra lehet következtetni, hogy ezek a fehérjék sokkal nagyobb mennyiségben expresszáálódtak, vagy az adott sáv magasságában többféle fehérje dúsult fel.

A fehérjék pontos azonosításához további vizsgálatok elvégzése szükséges.

## 5. Összefoglalás

- Kísérleteim során bebizonyosodott, hogy az *F1 törzs* képes húsipari melléktermékből – a csont szenesített formájából - a foszfor mobilizálására, így a folyamat pontosabb megismerését követően a jövőben alkalmazható lehet a növények foszfátutánpótlására.
- Vizsgálataim kiterjedtek a szubsztrátok és a foszfát-felszabadulás kapcsolatának tanulmányozására. A mérések során megállapítottam, hogy glükóz szénforrás esetén nagymennyiségű foszfát szabadul fel, ezzel ellentétben Na-citrát szénforrás esetén a tápoldatban megjelenő foszfát mennyisége kicsi. Irodalmi adatokra (Rodríguez és Fraga 1999) támaszkodva feltételezem, hogy glükóz szénforrás esetén a glükóz bontása során felszabaduló szerves sav oly mértékben csökkenti a közeg pH-ját, melynek következtében a foszfát oldatba megy. Ennek igazolása érdekében vizsgálataim a tápoldatok szerves savtartalmának elemzésére is kiterjedtek.
- A szerves savak kimutatására irányuló kromatográfiás vizsgálat eredményei a feltételezéseimet nem igazolták egyértelműen, mert ugyan sikerült glükonsavat kimutatnom a glükózt tartalmazó tápoldatban, azonban egy egyelőre azonosítatlan, markáns csúcs is megjelent. Feltételezhetően ez egy rövid szénláncú szerves sav, mely felelős lehet a közeg alacsony pH értékéért. További vizsgálatok szükségesek ezen állítás alátámasztásához, így jövőbeni terveim között szerepel az ismeretlen komponens azonosítása majd ezt követően mennyiségi meghatározása is.
- Na-citrát szénforrás esetén az eredmények alapján feltételeztem, hogy a foszfát-felszabadulást enzimatikus folyamatok, foszfatázok aktivitása befolyásolja. Ennek bizonyítása érdekében vizsgáltam a tápoldat felülúszójának-, valamint a sejtek citoplazma és membránfrakciójának foszfatáz-aktivitását. A vizsgálat során kiderült, hogy a Na-citrát jelenlétében növesztett sejtek foszfatáz aktivitása nagyobb, mint glükóz szénforrás esetén. A legjobb aktivitást a savas foszfatázok mutatták a citoplazma frakcióban, noha a környezet (tápoldat) kémhatása a lúgos tartományba tolódott el a citrát felvétele következtében.
- Vizsgálataim kiterjedtek a sejtek fehérjemintázatának vizsgálatára is. Az SDS-PAGE gélkép alapján megállapítható, hogy a minták membránfrakciójában jelentős intenzitásbeli különbségek vannak, melyek az eltérő kísérleti körülmények miatt eltérő mennyiségben

expresszálódó fehérjékre, vagy többféle azonos méretű fehérjére utalhatnak. A folyamatban résztvevő enzimek azonosítására további vizsgálatok szükségesek.

- A vizsgálatok eredményei alapján levonható a következtetés, hogy a csontszen alternatív foszfor forrásként szolgálhat a növények számára, így alkalmazása hozzájárulhat a foszforműtrágyák által okozott környezeti terhelés mérsékléséhez.
- Az eltérő szubsztrátokon elvégzett kísérletek alapján további következtetéseket vonhatunk le aszerint, hogy milyen kémhatású talajban kívánjuk felhasználni baktériumot és a csontszenet. Az eredmények alapján mind savas, mind lúgos körülmények között sikeres lehet a foszfor utánpótlása.