

4269/88

13281/90

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

50.944/DE

A

-52742-

K i v o n a t

Eljárás nitrifikálásra és nitrogén eltávolítására
nitrifikáló baktériumokkal

Tetra Werke Dr. rer.nat.Ulrich Baensch GmbH, Melle,

Német Szövetségi Köztársaság

A nemzetközi bejelentés napja: 1988. 07. 19.

Elsőbbsége: 1987. 07. 21. (P 37 24 027.7)

Német Szövetségi Köztársaság

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP 88/00651

A nemzetközi közzététel száma: WO 89/00547

A találmány tárgya javított eljárás nitrifikáció és nitrogén-eltávolítás végrehajtására, pl. derítőberendezésekben, vizes szuszpenziókban, a Nitrobacter genushoz tartozó mikro-organizmusok, előnyösen a Nitrobacter nov.spec.T3 új mikro-organizmus alkalmazásával.

1329 1/90

4769/88

S.B.G. & K.
Budapesti Nemzetközi Ügyvédi
és Szakértői Iroda
10: Budapest, Dalmatinus u. 10.
Telefon: 133-3733, 131-4800

50.944/DE

=52742-

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

A
N₂O₅ CO₂F 3/34
CO₂F 3/30
CO₂F 3/10
C 12H 1/20
C 12H 15/03

Eljárás nitrifikálásra és nitrogén eltávolítására

nitrifikáló baktériumokkal

Tetra Werke Dr. rer.nat.Ulrich Baensch GmbH, Melle,

Német Szövetségi Köztársaság

Feltaláló: Prof.dr.BOCK Eberhard, Hamburg,

Német Szövetségi Köztársaság

A nemzetközi bejelentés napja: 1988. 07. 19.

Elsőbbsége: 1987. 07. 21. (P 37 24 027.7)

Német Szövetségi Köztársaság

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP 88/00651

A nemzetközi közzététel száma: WO 89/00547

A találmány tárgya eljárás nitrifikálásra és nitrogén eltávolítására, nitrifikáló baktériumok segítségével.

A nitrifikálás az ammónia nitriten keresztül nitráttá való alakítását jelenti. A természetben általában két, ezért felelős baktérium-csoport fordul elő, amelyek mindegyik tagja nitrifikáló.. Ezek közül az egyik, az ammóniát oxidáló baktériumok csoportja az ammóniát nitritté oxidálja, míg a nitrit-oxidáló baktériumok - azaz a másik csoport - a nitritet nitráttá alakítja át.

A nitrifikáló baktériumok természetes anyagcsere tulaj-

donságaik alapján az iparban nagy jelentőségűek. Ezt az anyagcserét használják ki pl. a szennyvízüzemekben, amelyekben az egyes nitrifikálási lépések az ammónia átalakításához vezetnek.

Ennek az eljárásnak hátránya azonban az, hogy a nitrifikálás befejezése után a tényleges nitrogén-eltávolítás nem fejeződik be. A nitrogén ugyanis ekkor nitrát formájában van jelen. A nitrogén eltávolítása - az ún. denitrifikálás -, egy különleges és műszakilag bonyolult eljárás során következik be a nitrát további átalakítása. Ez az eljárás azonban rendkívül drága, azért csak néhány szennyvízfeldolgozóban alkalmazzák.

A találmány az előbbieken részletezett eljárás továbbfejlesztésére vonatkozik, azzal a céllal, hogy nitrifikáló baktériumok alkalmazása révén egy egyszerű és kevésbé költségigényes eljárás segítségével lehetővé váljék a nitrifikálás és a nitrogén-eltávolítás végrehajtása.

Ezenkívül az eljárás keretében lehetőség nyílik a kiindulási, a nitrifikáló baktériumokat metabolikusan aktív állapotban tartalmazó vizes szuszpenzió valamely hordozó anyagon való rögzítése és a baktériumok szárítása. Ez biztosítja a tárolási stabilitást.

Szükség esetén a hordozó anyagot/a baktériumokkal együtt/hozzuk érintkezésbe azzal a vizes oldattal, amelyből az ammóniát, nitritet és/vagy nitrátot el kell távolítani, mimellett a baktériumok - amelyek a vizeltávolítás folytán rövidebb-hosszabb időn át inaktivált állapotban voltak jelen a hordozón - reak-

tiválódnak. A baktériumok jellemző nitrifikáló enzim rendszere indukálódik és ismét megindul a nitrifikáció, mimellett a baktériumok még mindig rögzítve vannak vagy egyes mozgékony sejtek leválnak a hordozó anyagról.

A találmány további tárgya olyan nitrifikáló baktérium törzs kitenyésztése, amely képes nagy sejthozam elérésére és amely megfelelő körülmények között tenyésztve alkalmas arra, hogy lag-fázis nélkül legyen átvihető ásványi anyagokat vagy oldott szerves szubsztrátumokat tartalmazó közegekbe. Ez esetben a nitrifikálási folyamat azonnal beindul. A másik követelmény egy ilyen tenyésztési eljárással szemben, hogy az átvitelt követően ne következzen be a baktériumok teljes inaktiválódása.

A találmány szerinti eljárás keretében a probléma megoldása a következőképpen történik:

- a kiindulási vizes oldatban található nitrátokat nitrifikáló baktériumokkal redukáljuk,
- az így kapott reakciótermékeket (ammónia és nitrit) visszaalakítjuk nitráttá, ammónia- és nitrit-oxidáló baktériumok segítségével, folyamatos oxidációs eljárásban, amelynek során gázalaku nitrogén vegyületek (pl. N_2O vagy NO) szabadulnak fel, melynek során az általunk szelektált *Nitrobacter nov.spec.T3* mikroorganizmus törzset alkalmazzuk.

A nitrát-redukciót a nitrit-oxidáló baktériumok, különösen a *Nitrobacter* genushoz tartozó baktériumok végzik. Ha kizárólag ezeket az organizmusokat használjuk fel, az így kis mennyiségekben kapott ammónia nem oxidálódik újra.

A maximális mértékű nitrogén-eltávolítás érdekében azért előnyösen nemcsak nitrit-oxidáló, hanem ammónia-oxidáló baktériumokat is alkalmazunk, amilyenek pl. a Nitrosomonas, Nitrosovibrio vagy a Nitrospira genus tagjai. A nitrát ill. a nitrit redukciójából származó ammónia vagy az oldatban már eleve jelenlevő ammónia ekkor részt vesz a reakció-folyamatban.

Magas sejthozamok elérésére mindenekelőtt a legjobb táptalajt választjuk ki mindegyik törzshöz. A következő táptalajok vehetők figyelembe, de ezek összetétele változhat:

Táptalajok ammónia-oxidáló baktériumok számára:

Autotróf táptalaj (Krümmel és Harms, Arch. Microbiol. 1982, 133, p. 50-54):

10 mM NH_4Cl ;

0,1 mM KH_2PO_4 ;

1 mM KCl ;

0,2 mM MgSO_4 ;

1 mM CaCl_2 ;

Krezol-vörös mint indikátor;

0,2 μM MnSO_4 ;

0,8 μM H_3BO_3 ;

0,15 μM ZnSO_4 ;

0,03 μM $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}$;

3,5 μM FeSO_4 .

Ehhez a táptalajhoz 10-100 mM koncentrációban NaCl -t adhatunk.

Táptalajok nitrát-oxidáló baktériumok tenyésztéséhez:

1. Ásványi sókat tartalmazó táptalaj

0,5 g NaCl;

0,05 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$;0,15 g KH_2PO_4 ;7,0 g CaCO_3 ;0,05 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$;0,15 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$;

desztillált víz 1000 ml.

2. Autotróf táptalaj

Ásványi sókat tartalmazó táptalaj:

0,2-2,0 NaNO_2

pH 7,4-7,6 sterilizálás után

3. Mixotróf táptalaj

Ásványi sókat tartalmazó táptalaj:

0,2-2,0 g NaNO_2

0,55 g nátrium-piruvát

1,5 g élesztő-kivonat

1,5 g pepton

pH 7,4

4. Heterotróf táptalaj

Ásványi sókat tartalmazó táptalaj:

0,55 g nátrium-piruvát

1,5 g élesztő-kivonat

1,5 g pepton

pH 7,4.

Az ammóniát oxidáló baktériumok esetében csak litotróp táptalajokat használunk, mivel heterotróf ammónia-oxidáló baktériumokat mindeddig nem különítették el.

Az ammónia-oxidáló baktériumok tenyésztésére szolgáló táptalajok azonban különbözhetnek a sókoncentráció tekintetében. Ezen a csoporton belül általában földi, tengeri és karsztvizi törzseket különböztetünk meg. A mesterséges táptalajt ennek a felosztásnak megfelelően úgy állítjuk össze, hogy az a természetes körülményeknek feleljen meg.

Az ammónia-oxidáló baktériumokkal szemben a nitrit-oxidáló baktériumok szerves szubsztrátumok jelenlétében növekednek. Mixotróf vagy heterotróf tenyésztési körülmények között néhány species még éppen magasabb sejthozamokat is mutat, mint szigorúan vett kemolitoautotróf körülmények között.

Ez jellemző pl. a *Nitrobacter hamburgensis* (Arch. Microbiol. 136, p.281-283) speciesre. Mixotróf tenyésztési körülmények között a sejthozam 30-35 teljes sejt fehérje/liter. A sejthozam tehát több, mint tízszerese annak, amely szigorúan vett kemolitoautotróf viszonyok esetén elérhető.

Mindeddig nem ismeretesek olyan nitrit-oxidáló baktériumok, amelyek heteroautotróf körülmények között maximális növekedést mutatnának. Ezek első képviselője a találmány szerinti új species, a *Nitrobacter* nov. spec. T3.

A találmány szerinti eljárás alkalmazásához a nitrifikáló baktériumokból nagymennyiségű sejtre van szükség. A nitrifikáló

baktériumokat ezért a legkedvezőbb tenyésztési körülmények között szaporítjuk, majd a tenyészetet töményítjük, magas sejtsűrűség elérésére. A koncentrátumot szuszpendáljuk, általában olyan u.n. mosóoldatok alkalmazásával, amelyek összetétele megfelel a konkrét tenyésztőközegének, de amelyek nem tartalmazzák az energiaforrásként használt szubsztrátumot. A reszuszpéndálás során kitüntetett a 10^{11} - 10^{12} sejt/ml koncentráció beállítása. Ezeket a szuszpenziókat a hordozó anyagokra vihetjük fel, vagy ezeket közvetlenül felhasználhatjuk az eljárásban.

A találmány szerinti eljárásban a nitrifikáló baktériumok rögzítésére nyitott pórusu anyagokat alkalmazunk. Ilyen anyag pl. az $500-1500 \text{ m}^2/\text{g}$ belső felülettel rendelkező és előnyösen granulált aktív szén és a zeolit (egy szilikát).

A zeolitok különleges jellemzője az, hogy a hőmérséklet emelkedésekor vizet adnak le a kristálysírács üregeiből és lehűléskor vizet vesznek fel. Ezenkívül ioncserélő tulajdonságokkal rendelkeznek, mozgékony alkálifém-, alkáliföldfém- és ammónium-ionjaik révén és képesek adszorbeálni bizonyos szerves vegyületeket.

Végül hordozó anyagként használhatunk olyan ioncserélőket, amelyek szerves szilárdfázisú testekből állnak. Ezek általában hidrofíli gél szerkezetűek, és nagy felületűek, úgyhogy makropórusos ioncserélőként alkalmazhatók.

Hordozó anyagként alkalmazhatunk kerámiát is.

A hordozó anyagok baktériumokkal való feltöltése érdekében ezeket 10^{11} - 10^{12} sejt/ml koncentrációju baktérium-szuszpenziókban inkubáljuk. Az inkubálást $20-30^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérsékleten végezzük. A hordozó anyagra 1-5 ml baktérium-szuszpenziót viszünk fel (a hordozó anyag térfogata 10 cm^3), amíg a teljes mennyiség adszorbeálódik. Ha a felvevőkapacitás magas, az alkalmazott baktérium szuszpenzió térfogat növelhető, míg el nem érjük a hordozó anyag maximális felvevő kapacitását.

A baktérium-szuszpenziót tartalmazó hordozó anyagot ezt követően szárítjuk. Ennek érdekében az anyagot pl. 5 napon át $18-25^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérsékleten tároljuk oly módon, hogy a víz elpárolgása kiméletesen és egyenletesen menjen végbe. A szárítási folyamat gyorsítható oly módon, hogy a baktériumokat tartalmazó hordozó anyagot vákuum-edényekben, kis nyomáson szárítjuk. Ezzel a módszerrel a szárítási eljárás időtartama 24 órára rövidíthető.

Ha lehetséges, a szárított, a baktériumokat tartalmazó hordozót szárazon és levegő kizárásával kell tárolni. Ajánlatos ezt evakuált és szorosan záró műanyag-zsákokba helyezni és a zsákokat szobahőmérsékleten vagy 4°C -on tárolni.

A tenyészetet tartalmazó hordozóanyag kivánt esetben azonnal felhasználható. Ez úgy történik, hogy vizes oldatba helyezzük, és biztosítjuk a biológiai anyagcsere folyamatok számára az optimális növekedési hőmérsékletet. Az optimálisnál alacsonyabb hőmérsékleten a nitrifikálási folyamat lassabb.

A szárított anyagból aktiv előtenyészetek is előállíthatók, ha ezzel friss táptalajt oltunk be, amelyet ezután átviszünk a kezelendő vizes oldatba.

Egyik esetben sem szükséges a nitrifikálási folyamat megindításához, hogy a baktériumok rögzítve maradjanak a hordozón. Ezek elhagyhatják a hordozót és mozgékony sejtekként válhatnak anyagcsere-szempontról aktivvá.

A többlépéses szennyvizkezelési és ivóviz-tisztítási eljárások - amelyekben egy nitrifikálási lépés és egy ettől elkülönített denitrifikálási lépés szerepel - kombinálhatók. Ennek eredményeként a nitrogén-eltávolítás összköltsége jelentősen csökken.

Bizonyos körülmények között a nitrifikáló baktériumok a nitrát ill. a nitrit redukciója során olyan gázhalmazállapotú nitrogén vegyületeket szabadítanak fel, amelyek a N_2O -tól vagy a NO -tól különböznek. Ez azonban szükségszerű, az oxigén parciális nyomásának a táptalajban való csökkentése érdekében.

A nitrát- ill. a nitrit-redukció és a nitrifikáció párhuzamos folyamat, mimellett azokban a tenyészetekben, amelyeket nem vagy lassan kevertetünk, különböző - magas ill. alacsony oxigén parciális nyomással jellemezhető - zónák alakulnak ki. A nitrifikáció a magas parciális oxigén nyomású zónákban megy végbe, míg a nitrit- és a nitrát-redukcióra az alacsony oxigén parciális nyomású zónákban kerül sor.

A találmány szerint a rögzített nitrifikáló baktériumok

ugyancsak felhasználhatók egy olyan eljárás során, amely nitrifikálási és a nitrit- vagy nitrát-redukciós lépéseket tartalmaz. A rögzített sejtek különleges előnye abban áll, hogy a mikroorganizmusok meghatározott parciális oxigén nyomásoknak vannak kitéve, amelyen anyagcsere-folyamataikat megindíthatják. A nitrogén-eltávolítás ezért egy lépésben, egy viszonylag egyszerű módszerrel válik lehetővé, a környezet befolyásolása nélkül.

A nitrifikálási és nitrogén-eltávolítási eljárás azonban nemcsak szennyviz-kezelésre és ivóviz-tisztításra használható fel. Ez az eljárás alkalmazható csaknem minden olyan vízben, amely nitrogénnel erősen szennyezett. Kombinált nitrifikálás/nitrogén-eltávolítás hajtható végre ammóniával, nitrittel és/vagy nitráttal szennyezett természetes vagy mesterséges vizekben, a baktériumok in situ alkalmazása segítségével.

Egyre nagyobb érdeklődésre tart számot az akvakulturás eljárás. Az intenzív haltenyésztés rendszerint toxikus nitrit-koncentrációkhoz vezet, amelyek elpusztítják a halakat. Ha nitrifikáló baktériumokat alkalmazunk, a nitrit átalakítható, a vízben lévő nitrogén kombinált eltávolítása mellett.

Általában valamennyi nitrifikáló baktérium felhasználható a találmány szerinti eljárásban. A hatékony alkalmazáshoz azonban aránylag magas sejt-koncentrációkra van szükség. A litoautotróf tenyészetek esetében ilyen koncentrációk csak extrém és gazdaságtalan körülmények között érhetők el. Ezért ajánlatos a nitrifikáló baktériumok mixotróf vagy heterotróf módon végzett tenyésztése.

A sejt-kitermelés - amely a litoautotróf tenyésztéshez képest több, mint tízszeresre nő - elégséges a hordozó anyag feltöltéséhez.

A korábban elkülönített nitrifikáló baktériumok közül a legtöbb törzs alacsony nitrifikálási sebességet mutat, még magas sejt-koncentrációk mellett is. Ez a heterotróf táptalajról a közel litoautotróf körülményekre való váltással függ össze. A viszonylag magas oxigén parciális nyomás azonban - amelynek a baktériumok pl. az akváriumokban közvetlenül ki vannak téve és amely a viznek oxigénnel való csaknem teljes telítését idézi elő - ugyancsak befolyásolja a nitrifikálási eljárást, különösen a nitrit-oxidáló baktériumok esetében. Ez valamennyi ismert *Nitrobacter* speciesre érvényes.

Az új species, a *Nitrobacter* nov.spec.T3 teljesen eltérő tulajdonságokat mutat. Ezt az organizmust 1 év leforgása alatt különítettük el, szervetlen sókat tartalmazó táptalajon. Bár nem állapítható meg morfológiai különbség az eddig ismert speciesekhez képest, jelentős eltérések vannak a fiziológiai, biokémiai és genetikai tulajdonságok tekintetében.

A legfőbb jellegzetesség a növekedési képesség heterotróf táptalajokon és nitrit jelenlétében egyaránt. Ennek az organizmusnak a jellemző tulajdonságai a következők:

- inkább heterotróf, mint mixotróf és litoautotróf növekedés,
- heterotróf tenyésztés során magas sejt-kitermelés (pl. 50 mg teljes sejt fehérje/liter),

- túlélési képesség mikroaerób körülmények között, magára hagyott tenyészetben, hosszú időtartamokon (legalább 6 hónapon) át,
- oxigén-tolerálás mikroaerób heterotróf tenyésztés után oxigénnel telített táptalajban,
- nitrifikálás mikroaerób tenyésztés után, 2-4 nappal az oxigén-adagolást követően,
- jó reaktiválódás a találmány szerinti eljárás keretében,
- egy 80 ± 3 MD molekulatömegű plazmid jelenléte.

A DNS plazmid in vivo egy kovalensen zárt körkörös DNS szakasz, amelynek molekulatömege - 0,5%-os agaróz-gélben végzett elektroforetikus migrálási vizsgálatok szerint - 80 ± 3 MD. A plazmid az in vivo replikáció során képződik az előbbieken leírt, a *Nitrobacter* genushoz tartozó mikroorganizmusban, aerób, mikroaerób, litoautotróf, mixotróf, vagy heterotróf sejt-tenyésztés során. A plazmidok képesek azonos alakban replikálódni - további szelekciós nyomás alkalmazása nélkül - és átkerülni az utód-sejtekbe.

Az új mikroorganizmusnak ezeket a tulajdonságait, ill. további jellemzőit a következőkben az ábrák segítségével szemléltetjük. Ezek tárgya az alábbi:

- 1.-4. ábra. A *Nitrobacter nov.spec.* T3 növekedési görbéi, különböző nitrit-koncentrációk mellett végzett heterotróf tenyésztés után.
5. ábra. A *N.nov.spec.* T3 és a *N.hamburgensis* X14 membrán-proteinjei gélelektroforézis útján történő szétválasztásának

vázlatos összehasonlító ábrázolása.

6. ábra. A *N.nov.spec.T3* és a *N.hamburgensis X14* DNS-ének gélelektroforézis útján történő szétválasztása vázlatos összehasonlító ábrázolása.

Az 1. ábra a *Nitrobacter nov.spec.T3* növekedési görbét mutatja be, heterotróf tenyésztési körülmények között. A görbe kezdetén egy jellegzetes lag-fázis látható, amelyet egy logaritmikus fázis követ, majd végül, 45 nap elteltével egy stacionárius fázis látható. Az elért sejt-kitermelés 50 mg teljes sejt fehérje/liter, azaz kb. 60%-kal magasabb, mint a *N.hamburgensis* esetében elérhető. Ez az utóbbi törzs mutatja a legjobb növekedést az eddig ismert nitrifikáló baktérium törzsek közül.

Az új species, a *N.nov.spec.T3* egy további fiziológiai jellemzőjét a 2.-4. ábrán mutatjuk be. Ezeken az ábrákon az organizmus növekedési görbéi láthatók, különböző nitrit-koncentrációk mellett. Minden esetben megfigyelhető egy protein-koncentráció emelkedés, amely megfelel a nitrit koncentráció csökkenésének, mimellett a 45 nap után elért sejt-kitermelés alacsonyabb, mint a heterotróf tenyésztés mellett elérhető és csökken a kiindulási nitrit-koncentráció (0,5 g NaNO_2 /liter) növelése esetén. A sejt-hozam 45 nap alatt a kb. 36 mg teljes sejt fehérje/liter összehasonlítható értéket éri el és tovább növekszik, 38 mg teljes sejt fehérje/liter értékre.

A 3. ábrán látható növekedési görbe egy olyan kísérletnek felel meg, amelyet 1,0 g NaNO_2 /liter nitrit-koncentráció mellett

végzünk. A növekedési görbe szokatlan lefutásu: nem mutat logaritmikus fázist. A fehérje-tartalom lassan és szabálytalanul növekszik, és 45 nap alatt kb. 21 mg teljes sejt fehérje/liter értéket ér el. A kiindulási nitrit-koncentráció jelentősen gátolja a növekedést. A kiindulási nitrit-tartalom 29 nap után használódik fel.

A 4. ábrán rendkívüli növekedés-gátlás látható. Bár a nitrit átalakítás aránya kb. ugyanakkora, mint a 2. és a 3. ábrán bemutatott kísérletekben, a fehérje-tartalom alig növekszik. Végül, 39 nap elteltével, amikor a nitrit-koncentráció csupán 0,5 g NaNO_2 /liter, a fehérje-koncentráció lassu növekedése figyelhető meg. 45 nap múlva az összehasonlítható érték csak kb. 13 mg teljes sejt fehérje/liter, tehát kb. negyedakkora, mint a heterotróf növekedés esetében.

Ez a növekedési jellemző e species heterotróf minőségét szemlélteti, de a litoautotróf növekedést nem jellemzi. Ennek az organizmusnak a kemolitoautotróf növekedése hasonló az ugyanehhez a genushoz tartozó más törzsekéhez.

A N.nov.spec.T3 fontos jellemzője, hogy csak rövid adaptálódási időkre van szüksége - az oxigén parciális nyomásának változása, különösen növekedése után - a nitrifikálás megkezdéséhez.

Mint az előzőkben leírtuk, az ismert törzsek esetében megfigyelhető alacsony adaptációs képesség hátrányos körülmény, amely befolyásolja a találmány szerinti eljárást. Ez az első eset, amikor az "oxigén stressz" problémáját, amely a nitrifikáló

baktériumok esetében fennáll, az új baktériummal oldjuk meg.

Ugyancsak mérhető a nitrit-oxidoreduktáz aktivitás indukciója. A nitrit-oxidoreduktáz egy membránhoz kötött enzim, amely a nitrit-oxidációban kulcsszerepet játszik. Mint ez eddig ismert volt, nitrittel és nitráttal egyaránt indukálható. Az aktivitás azonban csak akkor növelhető, ha az oxigén parciális nyomását emeljük. A N.nov.spec.T3-mal végzett mikrokolorimetriás vizsgálatok arra mutatnak, hogy 8-10 óra elégséges a nitrit-oxidoreduktáz indukálásához, azt követően, hogy az oxigén parciális nyomását oxigénnel való telítésig növeljük. Ezt annak alapján határoztuk meg, hogy a nitrit-oxidáció során mérhető hő fejlődik.

A Nitrobacter genushoz tartozó valamennyi többi törzzsel összehasonlítva a N.nov.spec.T3 egy olyan biokémiai jellemzőt is mutat, amely a membrán-fehérjék gél-elektroforézissel történő szétválasztása során állapítható meg. Az 5. ábrán látható ezeknek a fehérjéknek az SDS-poliakrilamid gél-elektroforézise.

A nitrit-oxidoreduktáz egy nagy alegység: relatív molekulatömege 115.000. Ez azonos mindegyik eddig vizsgált törzs esetében. Ehhez képest ez a molekulatömeg a N.nov.spec.T3 esetében 130.000. Más membrán-fehérjék ugyancsak különböző molekulatömegűek. Így pl. a terminális oxidáz, a citokróm aa_3 relatív molekulatömege a N.nov.spec.T3-ban 27.000; ez az érték kb. 1000-rel alacsonyabb a többi törzshez viszonyítva. Másrészt a membránhoz kötött citokróm c a gél-elektroforézis

eredményei szerint valamivel a *N.hamburgensis* X14 megfelelő sávja fölött, amely a többi specieresre is jellemző, helyezkedik el.

A *N.nov.spec.T3* genetikai jellemzője egy nagy plazmid. A *Nitrobacter* genusban plazmidokat mindeddig csak a *N.hamburgensis*-hez tartozó törzsekben mutattak ki. Ugyanekkor valamennyi, a *N. winogradskyi* species-hez tartozó vizsgált törzs plazmidmentes. Az idők során ezt a tényt úgy értelmezték, hogy legalábbis egyes plazmidok (pl. a *N.hamburgensis*-hez hasonlóan) a specieresre jellemzők. Ennek a speciesnek két törzse azonos plazmid-szerkezetet mutat. Ez 3 különböző plazmidból áll (pPB11, pPB12, pPB13, ill. pPB21, pPB22, pPB23), amelyek molekulatömege: 76, 124 és 182 (Pohl, Thesis, Hamburgi Egyetem, 1986.)

Ezzel a plazmid-szerkezettel szemben a *N.nov.spec.T3* csak egyetlen plazmidot tartalmaz. Ennek a plazmidnak a relatív molekulatömege - gél-elektroforézissel meghatározva - 80 ± 3 MD.

A 6. ábra mutatja be vázlatosan a *N.hamburgensis* és a *N.nov.spec.T3* plazmidjainak gél-elektroforézissel végzett szétválasztását, cézium-klorid/etinium-bromid alkalmazásával történő sűrűség-grádiens centrifugálás után. A *N.nov.spec.T3*-ból származó pPB31 plazmid relatív mobilitása a pPB11 és pPB12 vonatkozási plazmidé közötti értéknek felel meg. Ennek alapján határoztuk meg a 80 ± 3 MD molekulatömeg értéket.

A *N.nov.spec.T3*-ra pontosan 1 plazmid jellemző. Ez a plazmid rendkívül stabil, még különböző tenyésztési körülmények

között is. Egyben nem mutatható ki a plazmid további szelekciós nyomás alkalmazása nélkül bekövetkező elvesztése. Még mutagén szerek segítségével sem állíthatók elő plazmidmentes mutánsok.

A metabolikusan fontos plazmidgének expressziója feltehetően akkor következik be, amikor a N.nov.spec.T3 törzset az előbbiekben leírt körülmények között tenyésztjük, úgyhogy szelekciós nyomás lép fel a plazmid-replikáció vonatkozásában.

Ennek a baktériumnak a fiziológiai jellemzői nyilvánvalóan a plazmid-funkciótól függenek, mivel a N.nov.spec.T3 genetikailag eltérő valamennyi eddig ismert nitrit-oxidáló baktériumtól. A lényeges anyagcsere-funkciók ezért nem lehetnek jelen egy plazmidmentes törzsben.

A N.nov.spec.T3 nemcsak a találmány szerinti eljárásban alkalmazva mutat előnyöket az ismert nitrit-oxidáló baktériumokkal szemben. Jellemzője, hogy hosszú időn át metabolikusan aktív marad nem-kevertetett tenyészetekben. A heterotróf táptalajokon tenyésztett mikroaerób sejtek pl. 3 hónap elteltével még mindig aktívak.

Ezen idő múltán vagy később litotróf módon tenyésztethetők oxigéndus táptalajban, amelyben néhány napon belül megindítják a nitrifikálást. Ez a jellegzetes anyagcsere-tulajdonság, a heterotróf körülmények között megfigyelhető kiváló növekedés

és az ezt követő, hosszú adaptáció nélküli litotróf nitrifikálás a baktérium jellegzetes tulajdonságait képviselik, akár csak a mikroaerób tenyésztés után jelentkező oxigén-toleráció.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás nitrifikálásra és nitrogén-eltávolításra nitrifikáló baktériumok alkalmazásával, azzal jellemezve, hogy egy nitrátot tartalmazó vizes oldatból kiindulva a nitrátot csökkentett oxigén parciális nyomás mellett nitrifikáló baktériumok segítségével redukáljuk, a reakció termékként keletkező ammóniát és nitritet folyamatos eljárásban ismét nitrátot oxidáljuk és ennek során gázalaku nitrogén-vegyületeket, mint N_2O -t vagy NO -t szabadítunk fel.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy ammóniát, nitritet és/vagy nitrátot tartalmazó természetes vagy mesterséges vizekben in situ kombinált nitrifikálást és nitrogén-eltávolítást végzünk, baktériumot tartalmazó anyag hozzáadása segítségével.
3. A 2. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a baktériumot tartalmazó anyag nitrifikáló baktériumokat jelent, amelyeket nyitott pórusu porózus hordozóra - amilyen az aktívszén, zeolit, kerámia vagy ioncserélő - rögzítettünk és végül szárítottunk.
4. A 3. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy nitrifikáló baktériumként a pl. a *Nitrobacter* genushoz tartozó nitrit-oxidáló baktériumokat alkalmazunk.
5. A 3. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy nitrifikáló baktériumként egyidejűleg nitrit-oxidálókat és ammónia-oxidálókat alkalmazunk.

6. A *Nitrobacter* genushoz tartozó mikroorganizmus - letét-be helyezve a DSM-ben DSM 4153 letéti számon -, amelyet talajmintából szelektív körülmények között izoláltunk, heterotróf módon tenyésztettünk a 20-30°C hőmérséklet-tartományban álló, nem-kevertetett és nem-ráztatott tenyészetben, azzal jellemezve, hogy

- a) gyorsabb heterotróf, mint mixotróf és litoautotróf növekedést mutat,
- b) heterotróf tenyésztés mellett magas sejthozamot - 50 mg össz-sejtfehérje/liter - eredményez,
- c) nyugvó tenyészetekben, mikroaerofil körülmények között hosszú időn - legalább 6 hónapon - át képes túlélni,
- d) mikroaerofil heterotróf tenyésztés során a közeg oxigénnel való telítése esetén tolerálja az oxigént,
- e) mikroaerofil tenyésztés során nitrifikációs aktivitása 2-4 nappal az oxigén adagolása után jelentkezik,
- f) a találmány szerinti eljárás alkalmazása során könnyen reaktiválható,
- g) egy 80 ± 3 MD molekulatömegű plazmidot tartalmaz.

7. A 6. igénypont szerinti, a *Nitrobacter* genushoz tartozó, DSM 4153 letéti számú mikroorganizmusból származó plazmid, azzal jellemezve, hogy a plazmid-DNS in vivo kovalensen záródó körkörös alakban fordul elő és 0,5%-os agaróz gélben végzett elektroforetikus migrációs vizsgálatok alapján molekulatömege 80 ± 3 MD.

8. A 7. igénypont szerinti plazmid-DNS, amely in vivo replikációval állítható elő a 6. igénypont szerinti, a Nitrobacter genushoz tartozó mikroorganizmusban, a sejtek litototróf, mixotróf vagy heterotróf tenyésztési körülmények között végzett aerób vagy mikroaerofil szaporításával.

A meghatalmazott

SBG & K
Budapesti Nemzeti Ügyvédi
és Szabványügyi Iroda
10 Budapest, Dózsa György út 10
Telefon: 163-3333/1-20

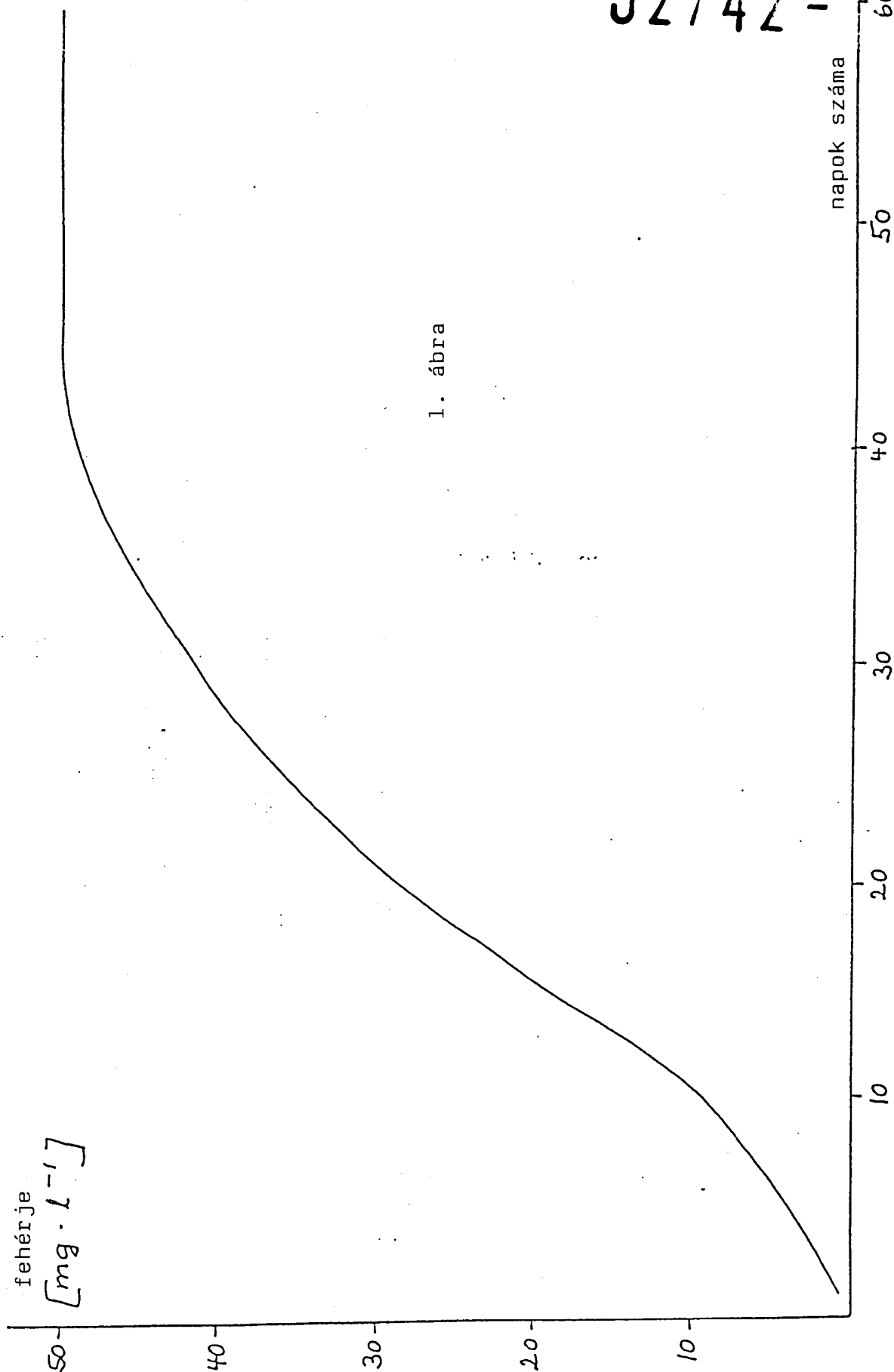
21 oldal + 6 ábrával
R. K. K.

4769/88

ÖSSZETÉTELI PÉLDÁNY

 $\frac{1}{6}$

-52742-



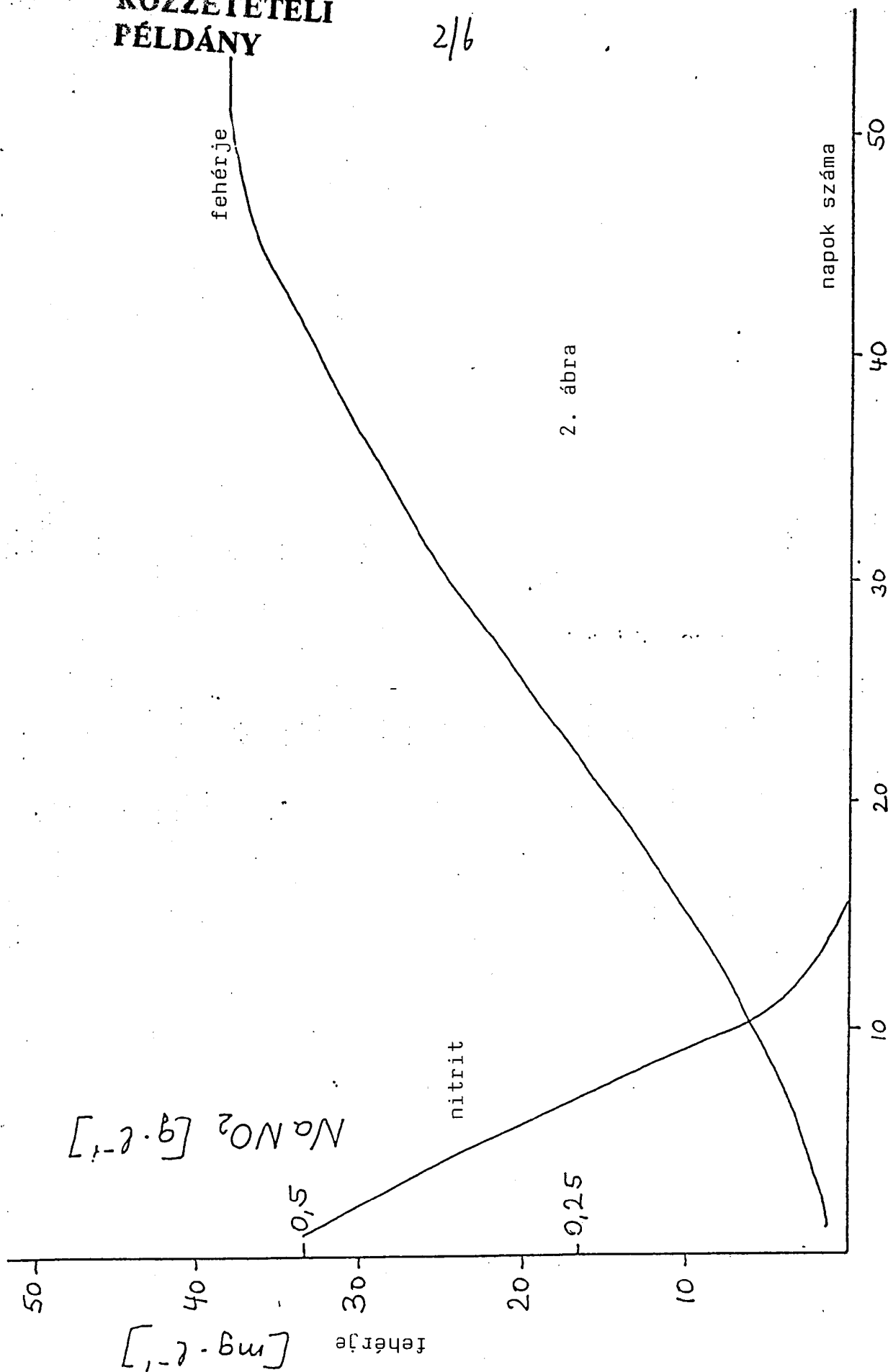
1. ábra

S&C & K.
Budapesti Nemzetközi Ügyvédi
és Szabadalmi Iroda
1011 Budapest, Deáktervez u. 10.
Telefon: 153-3733, 151-4900

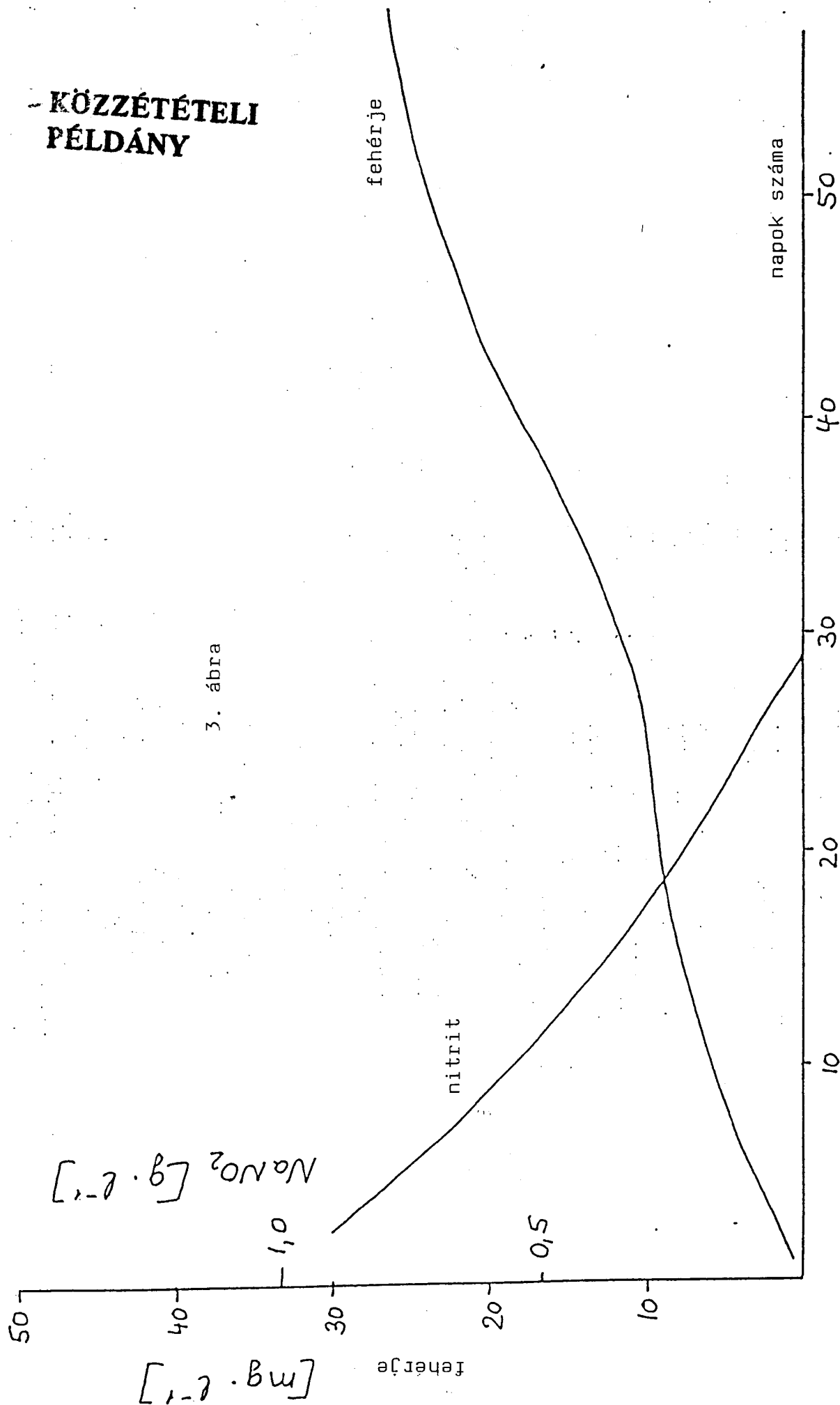
4.769/88

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

2/6

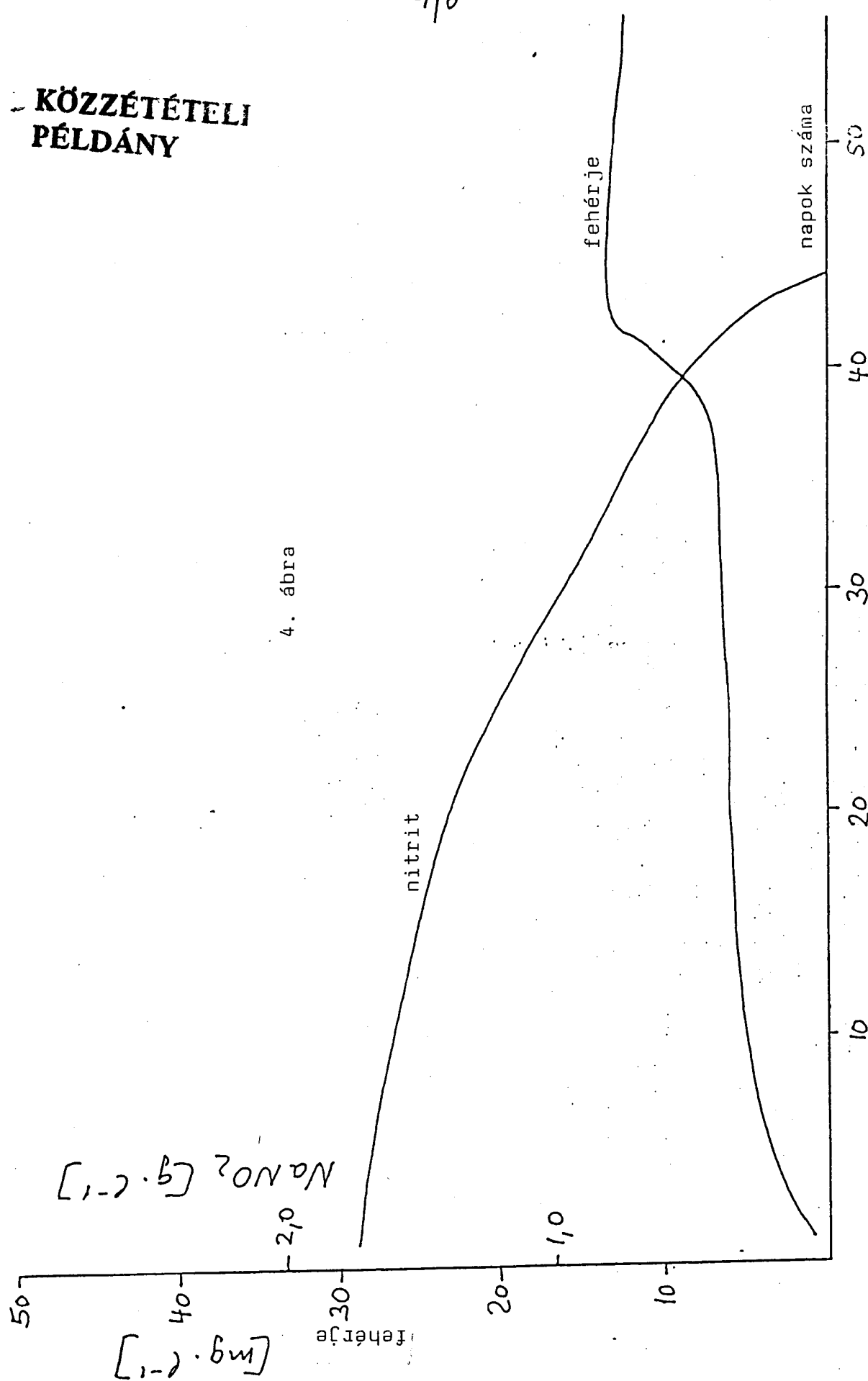


4269/28 3/6

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

4769/88

4/6

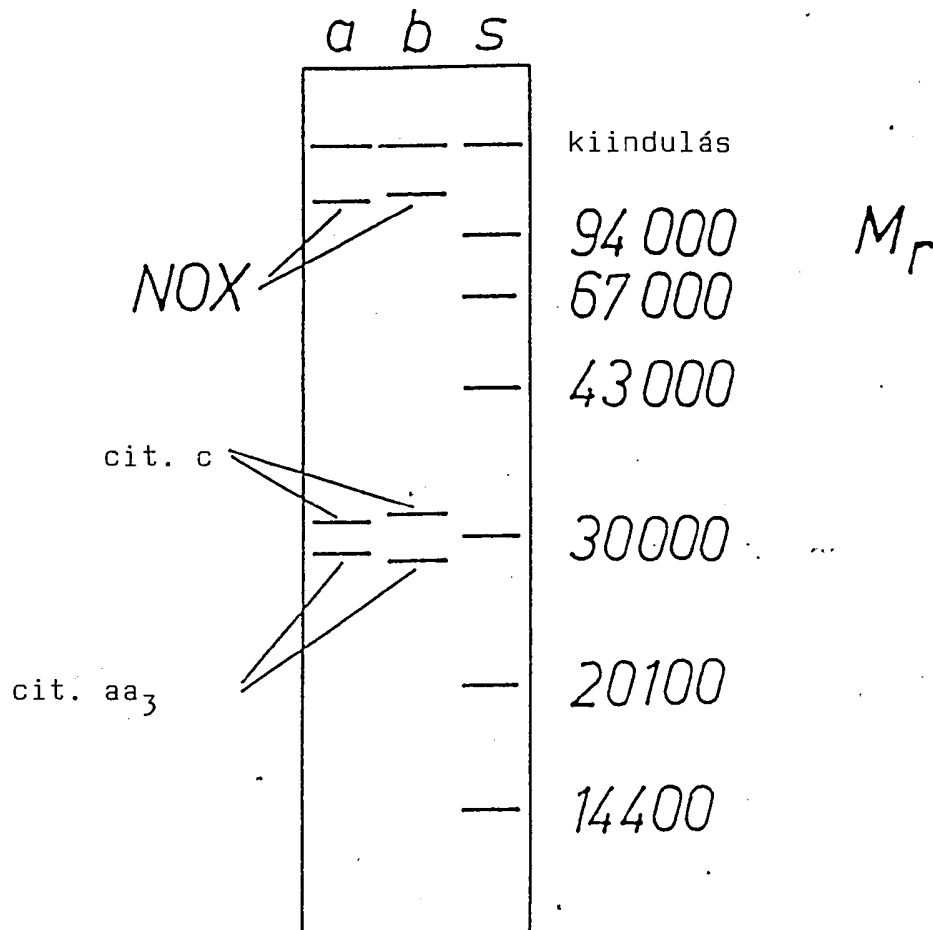
KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

S.R.G. & K.
 Budapesti Nemzeti Ügyvédi
 és Kereskedelmi Iroda
 10 Budapest, Dózsa u. 10.
 Telefon: 155-3754/14-4800

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

4769/88 5/6

5. ábra

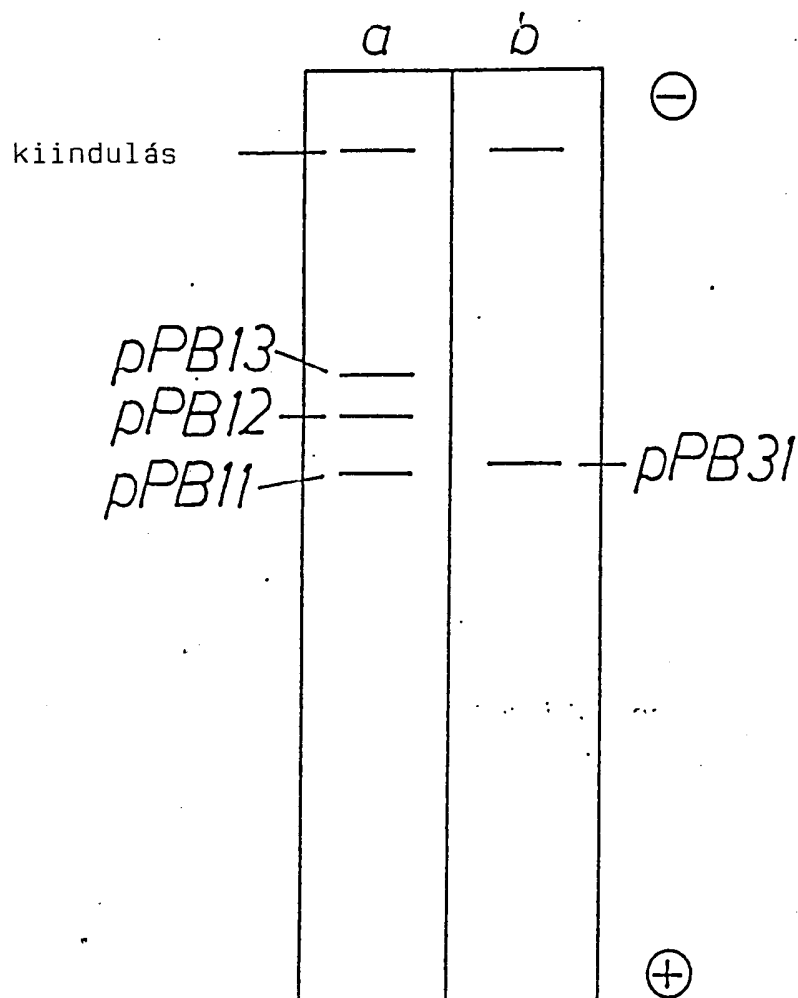
a: *N. hamburgensis* X14b: *N. nov. spec.* T3

S: referencia-fehérje

NOX: a nitritoxidoreduktázok
nagy alegysége

4769/8 6/6

6. ábra



b: N. nov. spec. T3