



Miskolci Egyetem

Anyag- és Vegyészmérnöki Kar

Tudományos Diákköri Konferencia



**Nikkel-, kobalt- és mangán-ferrit típusú
mágneses nanorészecskék antibakteriális hatásának
és adszorpciós tulajdonságainak vizsgálata**

Investigation of the antibacterial effect and adsorption
properties of nickel-, cobalt- and manganese-ferrite type
magnetic nanoparticles

Szerző: Alberti Orsolya

Témavezető: Dr. Szőri-Dorogházi Emma
tudományos munkatárs

Kémiai Intézet

2024

Absztrakt

Napjainkban a szennyezett víz, legyen az ivóvíz vagy öntözővíz, egyre nagyobb globális egészségügyi problémát jelent, amely világszerte egyre több embert érint. Ennek egyik lehetséges megoldása a víztisztítás, amely lehetővé teszi a szennyezett víz újrahasznosítását a megfelelő kezelési folyamatok után. Az egyik ígéretes vízkezelési eljárás a mágneses nanorészecskék felhasználásán alapul. Ezek a nanorészecskék összetételüknek, valamint funkcionizált felületüknek köszönhetően képesek lehetnek (patogén) mikroorganizmusok reverzibilis megkötésére, illetve elpusztítására. A mágneses tulajdonságuk pedig megkönnyíti a részecskékhez kötött mikroorganizmusok elkülönítését a tisztított közegtől (pl. víztől). Azok az adszorbensek, amelyek egyszerre rendelkeznek mágneses és antimikrobiális tulajdonsággal, egyetlen lépésben nyújthatnak megoldást az adszorpcióval való tisztításra és a használt adszorbens dezinfekciójára is. Kutatásunk során különböző nikkel-, kobalt- és mangán-ferrit alapú, mágneses tulajdonságokkal rendelkező nanorészecskék kerültek tesztelésre. Ezek egy része kiváló adszorpciós képességeket mutatott, míg mások antibakteriális hatással is rendelkeztek. Eredményeink azt mutatták, hogy az általunk vizsgált, antibakteriális és adszorpciós tulajdonságokkal rendelkező nanorészecskék ígéretes jelöltek lehetnek új típusú vízkezelési technológiák fejlesztéséhez.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	2
2. Irodalmi áttekintés	3
2.1 Mágneses nanorészecskék	3
2.2 Alkalmazott modellorganizmus.....	5
2.3 Adszorpció.....	6
3. Célkitűzés	7
4. Anyagok és módszerek.....	7
4.1 Táptalaj	7
4.2 Tesztelt mágneses nanorészecskék.....	8
4.3 Baktérium szuszpenzió készítése és sejtkoncentráció meghatározás	9
4.4 Antibakteriális teszt	12
4.5 Adszorpciós teszt.....	13
5. Eredmények.....	18
5.1 Antibakteriális teszt	18
5.2 Adszorpciós teszt.....	21
5.3 Deszorpció	23
5.4 Regenerálás.....	24
6. Összefoglalás	25
7. Irodalomjegyzék.....	27
Ábrajegyzék.....	29
8. Mellékletek	30

1. Bevezetés

A megfelelő mennyiségű és minőségű ivóvíz biztosítása manapság komoly kihívást jelent a világ számos pontján, amit a növekvő népesség, az ipari fejlődés és az éghajlatváltozás együttes hatása tovább fokoz. A fogyasztásra szánt víz a különböző nehézfémek és kémiai szennyezőanyagok mellett gyakran patogén mikroorganizmusokat is tartalmaz, mely jelentős egészségügyi kockázatot jelent mindannyiunk számára. Ezek a baktériumok különböző fertőtlenítőszeres adagolásával eltávolíthatók a vízből (pl. klór, klór-dioxid) [1], azonban egy ilyen kezeléssel klór alapú melléktermékek maradnak vissza a vízben, melyek megengedhető mennyiségére szigorú követelmények vonatkoznak. A nem klórtartalmú fertőtlenítőszeres minőségének is meg kell felelnie a biocid termékek engedélyezésének és forgalomba hozatalának egyes szabályairól szóló 316/2013. (VIII. 28.) Kormányrendelet előírásainak. [2] A rendelet szerint felhasználásuk csak akkor engedélyezett, ha a hatóanyag az országos tisztifőorvos által jóvá lett hagyva, valamint a használat után a fertőtlenített vízben annak visszamaradó koncentrációja a meghatározott határértéken belül marad. A már említett, biocid anyagokon alapuló víztisztítási technikákkal szemben nagyobb előnyt jelentenek azok a módszerek, melyek során a tisztított vízben egyáltalán nem marad káros melléktermék. Egy ilyen technológia lehet a mágneses nanorészecskékkel való vízkezelés.

A mágneses nanorészecskék (MNP-k) egyedi tulajdonságaiknak köszönhetően egyre nagyobb figyelmet kapnak különböző tudományágak terén, például a biotechnológiában, a katalízis kutatásban vagy a mágneses rezonancia képalkotásban (MRI). Számos kísérlet irányult már arra is, hogy káros patogén baktériumokat távolítsanak el velük vizes közegekből. [3] Ezzel a technológiával kiküszöbölhető lehet a káros klórtartalmú maradékok jelenléte a fertőtlenített vízben. Egyes kutatások szerint, az amin funkcionális MNP-k a felületükön lévő pozitív töltéseknek köszönhetően képesek elektrosztatikus kölcsönhatások kialakítására a baktériumokat burkoló sejtfalon vagy sejtmembránon található negatív töltésekkel, így hatékonyan felhasználhatók mikroorganizmusok megkötésére szennyezett folyadékból. [4]

A MNP-k mágneses tulajdonságának az elválasztásnál van jelentősége, hiszen a MNP-k a hozzájuk kötött mikroorganizmusokkal együtt egy mágnes segítségével könnyedén elkülöníthetők a tisztított közegtől. Ha például szűrést, vagy egyéb szeparációs műveletet kellene alkalmazni, az elválasztás nehezen lenne megvalósítható egy minimális anyagvesztés nélkül. Szűréskor több okból is előfordulhat egy elenyésző anyagvesztés: a szűrendő anyag részecskéi rátapadnak a szűrő felületére/a szűrőpapírra, ha a szűrő pórusmérete és a szűrendő

anyag szemcsemérete közt akár mikronnyi eltérés van, a szemcsék átjuthatnak a szűrőn. Fontos az átfolyási sebesség megválasztása is, ugyanis a túl nagy áramlás könnyebben átviszi a szűrőn a részecskéket. A felsoroltakon kívül a szűrő felületén lévő sérülés/repedés is a szűrendő anyag átszivárgását eredményezheti. A mágneses szeparációval azonban az összes részecske megmarad. [5] A MNP-kel történő mikroorganizmus adszorpció egyelőre kísérleti fázisban van, de a folyamat körülményeinek és a technológia lépéseinek optimalizálásával hatékony víztisztítási technológia is válhat belőle.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Mágneses nanorészecskék

A nanorészecskék olyan részecskék, melyek legalább egy dimenziójukban kisebbek 100 nm-nél. [6] A nanorészecskék egy típusát a mágneses nanorészecskék alkotják, melyek általában valamilyen mágneses fémből (Fe, Co, Ni) vagy ezek oxidjaiból állnak. A mágneses nanorészecskéket napjainkban számos tudományág kutatói alkalmazzák, többek közt a biotechnológiában, katalízisben vagy a mágneses rezonancia képalkotásban. [7] Számos vas-oxid MNP katalizátor hordozóként alkalmas lehet például nitrobenzol, vagy dinitro-toluol katalitikus hidrogénezésére. A vas-oxid nanorészecskék dópolhatók átmeneti fémekkel, valamint alkáliföldfémekkel, és az így előállított vegyes-oxidok szintén rendelkeznek mágneses tulajdonsággal, ezek a ferritek. Ha az átmeneti fémekkel (pl. kobalttal) dópolt vas-oxid nanorészecskék felületére nemesfém (pl. palládium) részecskéket választanak le, az így kapott anyagok a már említett aromás nitrovegyületek hidrogénezési reakciójában kiválóan alkalmazhatók katalizátorként. [8] A MNP-k széles körű felhasználásra azért van lehetőség, mert funkcionizált burokkal rendelkezhetnek, melyek a kívánt tulajdonság elérését segítik elő, katalizátorok esetén például az -NH₂ funkciós csoportok jelentősége, hogy javítják az aktív fém és a hordozó közötti kölcsönhatás erősségét, valamint fokozzák az anyag vizes közegben történő diszpergálhatóságát. [8]

A szakirodalomban fellelhető számos mágneses nanorészecskékkel végzett antibakteriális és adszorpciós kísérleti leírás is. 2010-ben Yan-Feng Huang és munkatársai amin funkcionizált mágneses nanorészecskéket teszteltek mikroorganizmus adszorpció szempontjából, mely során az *E. coli* baktériumsejteket 88,5-99,1%-os hatékonysággal sikerült megkötniük a részecskékkel a vizsgált víz-, ital- és vizeletmintákból. [4] Weijun Fang és munkatársai 2016-ban végezték el különböző triaminopropil-alkoxi-szilánnal funkcionizált,

valamint polietiléniminnel (PEI) bevont szilícium-oxid tartalmú Fe_3O_4 nanorészecskék vizsgálatát, mely során a PEI-MNP-k háromszor nagyobb bakteriális befogási kapacitást mutattak az *E. coli* esetében. Ennek háttérében az állt, hogy a PEI-MNP-ken lévő kationos amincsoportok nagyobb számának köszönhetően erősebb elektrosztatikus kölcsönhatás alakulhatott is az MNP és a negatív töltésű bakteriális sejtfal között. [9] Raghvendra A. Bohara csapatával felületmódosított kobalt-ferrit részecskéket vizsgált. Tanulmányuk kimutatta, hogy a funkcionizált kobalt-ferrit nanorészecskék hatékonyan befogták a bakteriális kórokozókat, különösen az *Escherichia coli* és a *Staphylococcus aureus*. [10]

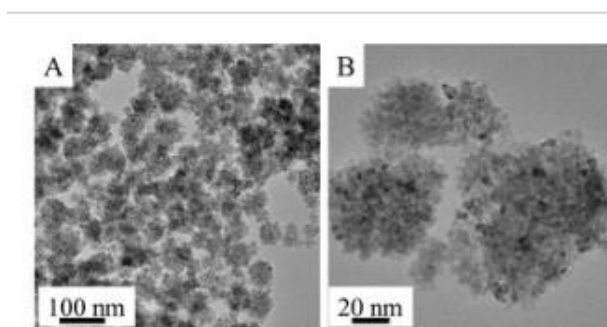
A CoFe_2O_4 -Ag antibakteriális hatását Sandhya Punyasamudram és munkatársai vizsgálták 2023-ban. A tesztelt MNP antibakteriális tulajdonságokat mutatott mind Gram-pozitív, mind Gram-negatív baktériumok esetében: *E. coli*-t alkalmazva a minta körül kialakult feltisztulási zóna 19.8 ± 1.6 mm volt. [11]

Az általam tesztelt nanorészecskéket Dr. Vanyorek László és csoportja szintetizálta egyetemünk Kémiai Intézetében. A vizsgált anyagok a kobalt-ferrit (CoFe_2O_4), a nikkel-ferrit (NiFe_2O_4) és a mangán-ferrit (MnFe_2O_4), illetve ezek ezüsttel dópolt változatai (CoFe_2O_4 -Ag, NiFe_2O_4 -Ag, MnFe_2O_4 -Ag) voltak. Ezek a szerkezetükben megjelenő vas atomok miatt mágneses tulajdonságokkal rendelkeznek, ezáltal mágneses mező segítségével befolyásolhatóak. A mágneses anyagok alapvetően lehetnek gyengén- vagy rendezetten mágnesesek. A gyengén mágneses anyagok csoportjába a dia-és paramágneses, míg a rendezett mágneses anyagok közé a ferri-, antiferri- és ferromágneses anyagok sorolhatók. Köztük a különbség a mágneses momentumuk elrendeződésében, illetve külső mágneses tér hatására történő viselkedésükben rejlik. Az általam vizsgált MNP-k szuperparamágneses tulajdonságokat mutatnak, és így jellemző rájuk, hogy külső mágneses tér hatására gyorsan mágnesesződnek, azaz az atomok mágneses momentumai a mágneses térnek megfelelő irányba állnak be, ez a rendezettség viszont mágneses tér hiányában megszűnik. [8] A mágneses tulajdonság viszonylag gyorsan és egyszerűen lehetővé teszi egy diszperzióból való elkülönítésüket.

A MNP-ket jellemezhetjük a zéta potenciállal, mely a nanorészecske nyírási felületén mért elektromos potenciál, ami jelezheti egy szuszpenzió vagy emulzió stabilitását. Általánosságban elmondható, hogy ha a zéta potenciál magas (pozitív vagy negatív irányban egyaránt), a részecskék stabilak maradnak, mert a hasonló töltésű felületek taszítják egymást, így nem tapadnak össze. Alacsony zéta potenciál esetén viszont a vonzó erők dominálhatnak,

ami a részecskék aggregációját okozza. A tesztelt részecskéket tekintve az átlagos zéta-potenciál a NiFe_2O_4 esetében $-12,6$ mV, a CoFe_2O_4 esetében $-8,7$ mV. [12]

Az amin-funkcionalizált nikkel-és kobalt-ferrit MNP-k átlagos részecskeméretét és morfológiáját HRTEM nagyfelbontású transzmissziós elektronmikroszkóppal való vizsgálat során állapították meg, a felvételt az 1. ábra szemlélteti. A $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ átlagos részecskemérete 51 ± 8 nm, a $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-NH}_2$ részecskemérete pedig 42 ± 13 nm. [13]



1. ábra Kobalt-ferrit MNP-k HRTEM felvétele

A MNP-k szintézise többféle módszerrel történhet: szolvotermikus szintézis, klasszikus koprecipitáció, hidrotermális reakciók, szol-gél szintézis, hőbontás, mikrohullámú szintézis, szonokémiai reakciók, elektropray szintézis és lézerpirolízis. [14] A szintézis módszerének és a prekursorok koncentrációjának változtatásával különböző méretű, morfológiájú, tisztaságú és kristályosságú MNP-k állíthatók elő, így a MNP-k könnyen beállíthatók az alkalmazás igényei szerint. A rendelkezésemre bocsájtott mágneses nanorészecskék előállítása vas(III)-, valamint Co-, Ni- és Mn-sókból történt szonokémiai kezeléssel és termális oxidációval. [15]

2.2 Alkalmazott modellorganizmus

Az antibakteriális és adszorpciós tesztekhez *Escherichia coli* 25922 baktériumtörzset alkalmaztam. Az *E. coli* egy Gram-negatív típusú baktérium, melynek veszélytelen törzsei az emésztőrendszer normális flórájához tartoznak, K2-vitamint termelnek és jelenlétükkel gátolják más kórokozók elszaporodását. Azonban olyan változatai is léteznek, melyek az emberi szervezetben bélrendszeri gyulladásokat és azok súlyos szövődményeit okozzák. Az *E. coli* fertőzés forrása lehet állat vagy az ember: a kórokozó ürülékkel kerül a külvilágba, és szennyezheti a vizet, talajt, élelmiszert. A baktériumok optimális szaporodási hőmérséklete 37°C , de túlélnek a hűtést és a fagyasztást, viszont alapos hőkezelés során elpusztulnak. Az *E. coli* fekáli indikátor mikroorganizmus, azaz jelenléte talaj-, fürdő-, vagy ivóvízben, élelmiszerben azok esetleges szennyvíz eredetű szennyezettségét jelenti, és annak

valószínűségét, hogy további potenciálisan szennyvíz eredetű kórokozó (pl. vírus, parazita) is van a vizekben vagy élelmiszerben. [16]

2.3 Adszorpció

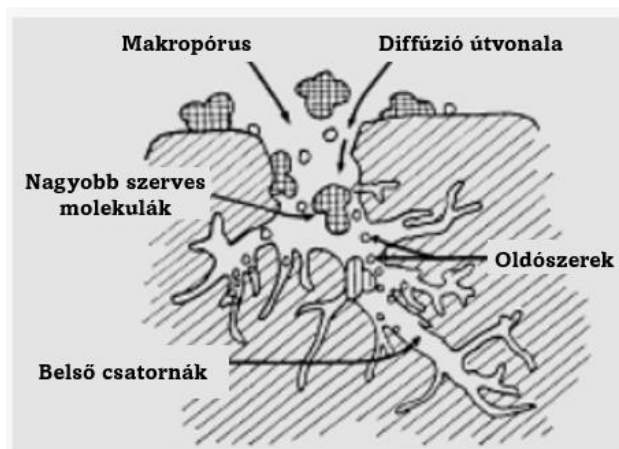
Adszorpcióról akkor beszélünk, ha valamilyen gáz, gőz, folyadék vagy adott esetben szilárd anyag szilárd felületen kötődik meg. Adsorbensnek nevezzük azt az anyagot, amely megköti a folyadék vagy gáz közegben lévő molekulákat. A megkötött anyag az adsorbátum. A folyamat ellentéte a deszorpció, mely során az adsorbátum távozik az adsorbens felületéről. Az adszorpciónak nagy jelentősége van a különböző iparágakban gázok és folyadékok tisztítása során, valamint például a mágneses nanorészecske típusú adszorbensek, adott esetben, nemkívánatos szennyeződések (baktériumok) megkötésére is alkalmazhatók (2. ábra). Az adszorpciót például a víztisztítás során is alkalmazzák, ahol aktív szén adszorbens segítségével kötik meg a vízben lévő nemkívánatos íz- és szaganyagokat [17].



2. ábra Adszorpció mechanizmusa

Az adszorpció lejátszódásához arra van szükség, hogy az adszorbens az adszorbeálni kívánt molekulának (vagy sejtnak) megfelelő kialakítású kötőhelyekkel rendelkezzen. A mechanizmust a 3. ábra szemlélteti: első lépésként az adsorbátum molekulák az adszorbens felületére, majd a pórusokba diffundálnak, ahol az alkalmas kötőhelyen megtörténik az adszorpció. A deszorpció során pedig az adsorbátum távozik az adszorbens felületéről, és kидiffundál a folyadékba. A folyamat az adszorpciós kinetikával jellemezhető, mely az adszorpciós folyamat időbeli lefolyását és sebességét tanulmányozza a megkötődés, valamint a diffúzió idejének figyelembevételével. Egy összetett folyamat esetén a sebesség-meghatározó lépésnek nevezzük. Az adszorpciós folyamatok során a diffúzió sebessége legtöbbször az adszorpció sebességétől elmarad, így ezek a részfolyamatok határozzák meg a megkötődés

sebességét. Az adszorpciós kinetikát számos tényező befolyásolja, ideértve az adszorbens és az adszorbátum koncentrációját, a hőmérsékletet, a reakcióelegy minőségét és pH-ját stb. [18] [19]



3. ábra Adszorbens felülete

3. Célkitűzés

Az elvégzett munkáim során az irodalmi adatokat alapul véve célom volt a Kémiai Intézetben szintetizált vastartalmú mágneses nanorészecskék antibakteriális hatásának tesztelése, továbbá kimutatható antibakteriális hatás esetén a legkisebb gátló koncentráció meghatározása. Ezen túl feladataim közé tartozott a mágneses nanorészecskék adszorpciós képességének vizsgálata, valamint sikeres adszorpció esetén a deszorpció, illetve a regenerálás optimális körülményeinek meghatározása is. Tehát az irodalmi adatokat szerettem volna összevetni az általam tesztelt MNP-k tulajdonságaival.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Táptalaj

A táptalajok a mikroorganizmusok szaporodásának és életképességének fenntartására szolgálnak, miközben fedezik a mikrobák változatos tápanyag- és energiaforrás igényét, valamint biztosítják a kívánt fizikai-kémiai körülményeket. A táptalajoknak tartalmazniuk kell mindazokat az anyagokat, amelyekre a mikroorganizmusoknak szüksége van, és maguk szintetizálni nem képesek. A feltétlenül szükséges táptalajkomponensek közé tartozik a víz, valamilyen szén- és energiaforrás, nitrogénforrás, továbbá különféle ásványi anyagok.

Az adszorpciós és antibakteriális tesztek során az *E. coli* baktériumok növekedéséhez LB (Luria Broth) agar táptalajt és tápoldatot alkalmaztam. E kettő közti különbség abban rejlik, hogy az LB agar szilárd, baktériumok felszíni tenyésztésére alkalmas, ezzel szemben az LB oldat folyékony halmazállapotú, baktérium szuszpenzió tenyésztésére ideális. Az LB táptalajok összetevőit az 1. táblázat szemlélteti.

1. táblázat LB tápoldatok összetevői

Összetevők	LB agar	LB oldat
Trypton	10 g	10 g
Élesztő	5 g	5 g
NaCl	10 g	10 g
Agar	15 g	-
Víz	1000 ml	1000 ml

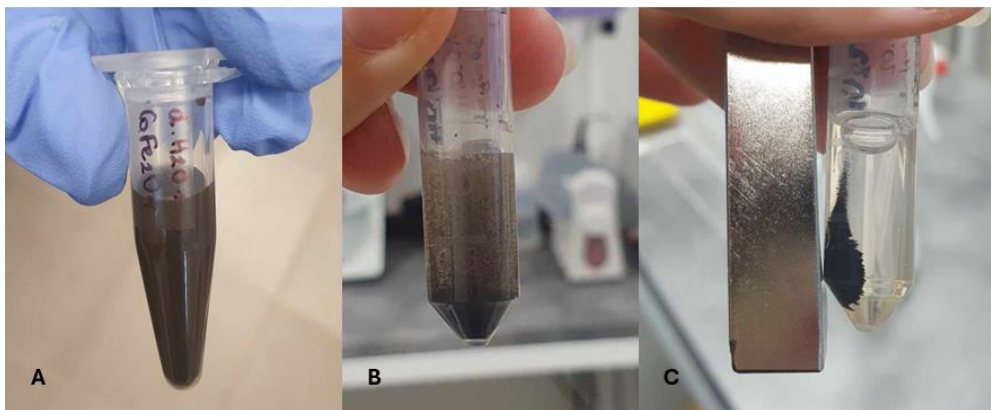
Mindkét tápközeg elkészítését a laboratóriumban végeztem. Első lépésként analitikai mérleg segítségével kimértem a száraz összetevőket, majd ultratiszta víz hozzáadása után mágneses keverővel homogenizáltam az oldatot. Ezt követően az LB-t és az LB agart (amikor szilárd táptalajt szerettem volna készíteni) 121 °C-on 108 kPa nyomáson sterilizáltam, majd 50 °C-os vízfürdőbe helyezve a felhasználási hőmérsékletre hűtöttem vissza. [20]

LB agar esetén a végsőlépésként steril fülkében steril műanyag Petri-csészékbe öntöttem ki még folyékony állapotában a táptalajt, majd a fülkében hagytam a lemezeket dermedésig. A vízfürdőre azért van szükség, hogy a táptalajt ne forrón öntsük a Petri-csészébe, ugyanis, ha a forró táptalaj párologni kezd, lecsapódik a Petri-csésze tetején, ez a lecsapódó víz apró vízcseppek formájában jelenik meg a megszilárdult táptalaj felületén, mely kedvezhet a szennyező mikroorganizmusoknak/gombáknak. Az agar tartalmú táptalaj a kihűlését közben megszilárdul, ezzel alkalmassá válik a szilárd fázisú vizsgálatokhoz. Amikor folyékony tápoldatra volt szükségem, az előkészített LB tápoldatot 30 ml-es adagokban először lombikokba öntöttem, papírdugóval és alufóliával lefedtem a lombikok tetejét, majd ezt követően került sor az autoklávós sterilizálásra.

4.2 Tesztelt mágneses nanorészecskék

A vizsgálatra választott MNP-k amin funkcionáliszt burokkal rendelkeznek, eredetileg desztillált vízben voltak diszpergálva, azonban a mikroorganizmus sejtek számára ez nem a legoptimálisabb közeg. Számukra valamilyen sótartalmú közeg megfelelőbb. Ez az ozmotikus egyensúllyal magyarázható: a megfelelő sókoncentráció biztosítja, hogy ne kerüljön túl sok víz

a sejtekbe, hiszen ez a sejtek „szétduzzadásához” vezet, illetve megakadályozza, hogy sejtek túl sok vizet veszítsenek, mely a zsugorodásukat eredményezi. Az említett folyamatok elkerülése érdekében mágnest alkalmazva eltávolítottam a desztillált vizet az MNP diszperzióból, majd fiziológias sóoldatban újradiszpergáltam őket (4. ábra). Az MNP-ket érintő, szemmel tapasztalható változás nem történt e műveletet követően.



4. ábra A) Homogenizált $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-d.H}_2\text{O}$ diszperzió;
 B) A mágneses nanorészecskék adott idő után spontán ülepedni kezdenek;
 C) Az elválasztás mágnessel felgyorsítható: a MNP-k teljesen elkülönülnek a diszpergálószerből

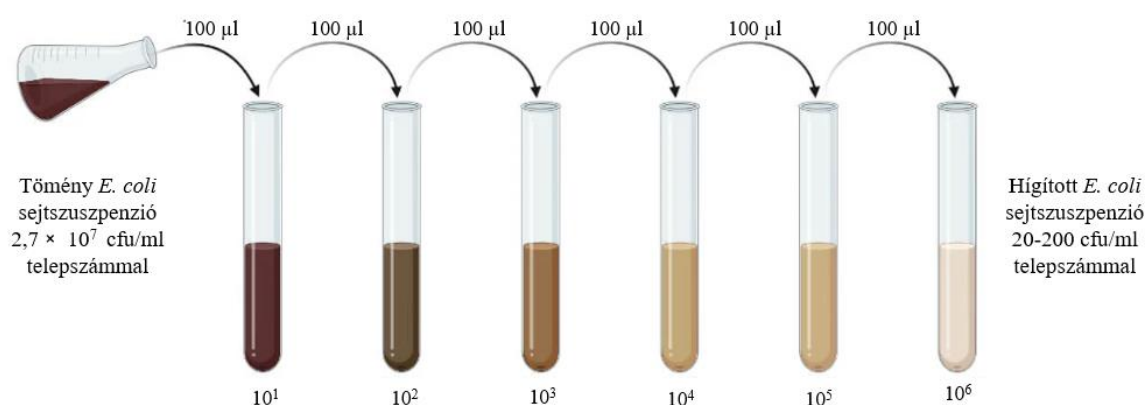
4.3 Baktérium szuszpenzió készítése és sejtkoncentráció meghatározás

Mind az antibakteriális, mind az adszorpciós kísérleteket steril körülmények között végeztem ügyelve arra, hogy a környezetből semmilyen külső szennyeződés ne kerüljön a felhasznált anyagokhoz. Ennek érdekében a vizsgálatok azon részét, melyben a mintatartókat nyitott állapotban kellett tartanom, vagy folyadékokat kellett áthelyeznem egyik mintatartóból a másikba, mindig steril fülkében végeztem.

A tesztek kivitelezéséhez minden alkalommal szükségem volt egy *E. coli* tenyésztetre, azaz szilárd táptalajon fenntartott baktérium telepekre. A baktérium telep egyetlen baktériumsejt osztódásából származó összes utódsejt együttesét jelenti, mely a szilárd felületen egy „pöttyöt” képez. Angolul a colony forming unit (cfu) jelenti a szilárd lemezen megjelenő telepeket, melyek számát egységnyi térfogatra (ml) megadva kapjuk meg egy sejtszuszpenzió koncentrációját, azaz egységnyi térfogatban jelen lévő sejtek számát (cfu/ml). Tehát munkám mindig azzal kezdődött, hogy LB agar lemezen felnőtt különálló *E. coli* telepekből egyet oltókacs segítségével belemostam egy 30 ml LB táplevest tartalmazó lombikba, majd 37 °C-os rázóinkubátorba helyeztem azt 24 órára, hiszen ez az optimális hőmérséklet és időintervallum

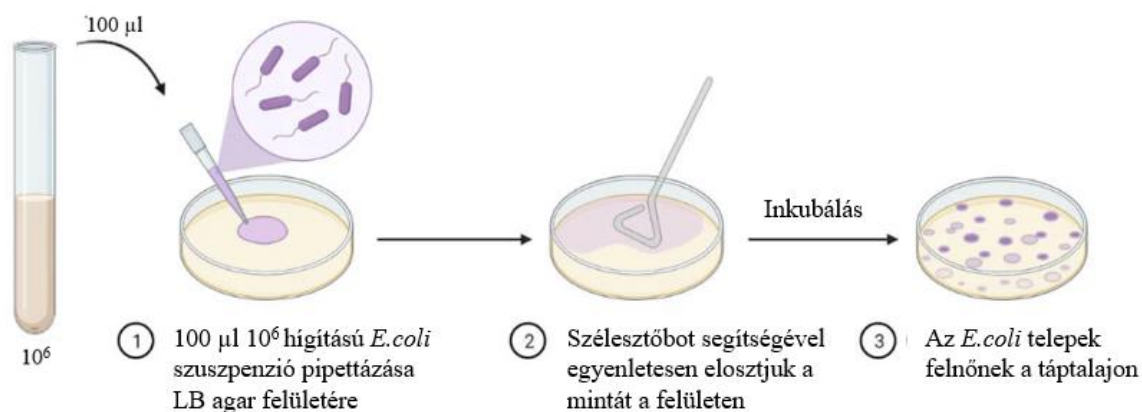
az *E. coli* mikroorganizmusok megfelelő növekedéséhez és szaporodásához. Az inkubálási idő leteltével spektrofotométerrel megmértem a baktériumszuszpenzió optikai denzitását 600 nm hullámhosszúságú fény felhasználásával (OD₆₀₀ mérés). Erre a sejtsűrűség meghatározás érdekében volt szükség, ugyanis minél nagyobb egy baktérium szuszpenziójánál mért optikai denzitás, az azt jelenti, hogy annál több baktériumsejt van az oldatban (hiszen több fény szóródik vagy nyelődik el a sejtek miatt). [21] Az optikai denzitás értéke méréseim során 5-5,9 közé esett. Annak érdekében, hogy a teszteket mindig egységnyi sűrűségű baktériumszuszpenzióval végezzem, a szuszpenziókat mindig 0,1-es OD értékűre hígítottam.

Továbbiakban az OD₆₀₀=0,1-re hígított sejtsuszpenzióhoz tartozó sejtkoncentráció pontos meghatározása is fontos volt. Ugyanis az optikai denzitás mérésével a baktérium kultúra zavarosságát határozzuk meg, amit a folyadékban lévő élő és élettelen sejtek együttese ad meg. Azonban egy anyag adszorpció és az antibakteriális hatékonyságának meghatározásához az élő sejtek mennyiségének ismeretére van elsősorban szükség, amit LB agar lemezeket alkalmazva, szélesztési módszerrel tudunk meghatározni. Laboratóriumi munkáim tapasztalata alapján már tudtam, hogy a tömény sejtsuszpenzióból szélesztett lemezen megszámlálhatatlanul sok telep fog kialakulni. Így sterilizált Eppendorf (1,5 ml-es mintatartó) csövekben egy hattagú hígítási sorozatot készítettem a tömény baktériumszuszpenzióból. A hígítást 1 ml végtérfogatban alakítottam ki, melyben az egyes tagok tízszeresen hígítottak voltak. Hígítószerként LB tápoldatot alkalmaztam (5. ábra).



5. ábra Hígítási sor készítése

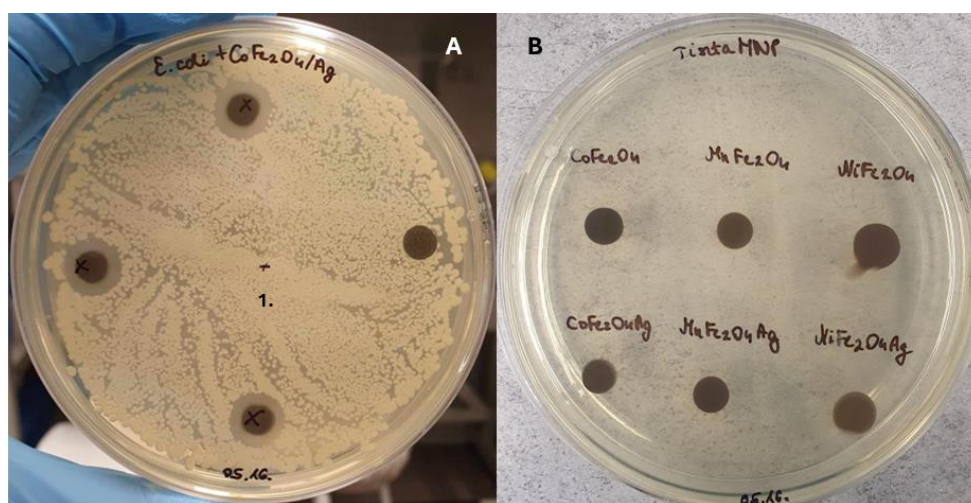
A hígítási sor utolsó (10^6) tagjából 100 μ l-t pipettáztam egy steril LB agar felületére, majd szélesztő bot segítségével a felületi szélesztés módszerét alkalmazva egyenletesen eloszlatam a baktériumszuszpenziót a lemez felületén, melyet a 6. ábra szemléltet. Így az inkubálást követően egyedülálló telepeket kaptam. A tömény baktériumszuszpenzióból készített tízes léptékű hígítási sor 10^6 -os tagja azért volt megfelelő, mert a belőle szélesztett lemezeken a kapott telepszám 20 és 200 közé esik, ami pontos számolást tesz lehetővé. [22] Ha a lemezen a telepszám ennél kisebb vagy jelentősen több, az pontatlan sejtszám, és így pontatlan sejtkoncentráció meghatározást von maga után. Minden esetben három párhuzamos mérést végeztem, azaz három lemezre szélesztettem a 10^6 -os hígításból, és a három lemezen számolt telepszám átlagából határoztam meg a kiindulási (tömény) sejtszuszpenzió sejtkoncentrációját.



6. ábra Felületi szélesztés módszere

4.4 Antibakteriális teszt

A tesztelt mágneses nanorészecskék antibakteriális hatásának konkrét vizsgálatához arra volt szükségem, hogy az alkalmazott lemezek felületén a baktériumok egy összefüggő réteget alkossanak. Ennek eléréséhez a hígítási sor 10^2 -os tagját használtam. Itt is először felületi szélesztés módszerét alkalmaztam, majd megvártam, míg a sejtszuszpenzió kissé rászárad a lemez felületére. Ezt követően a tesztelni kívánt MNP diszperzióból 10-10 μ l-t vittem fel (automata pipettával cseppentettem) a lemezre ügyelve arra, hogy lehetőleg egy pontban maradjanak a minták. A 7. ábra (A) szemlélteti, hogy a lemez közepére a diszpergálószerből (ultraszűrőssel tisztított víz) is vittem fel annak bizonyítására, hogy diszperzióban nem a víz (vagy az esetlegesen benne lévő szennyezőanyagok) hanem a nanorészecskék rendelkeznek antimikrobiális hatással. Baktériummentes táptalajra is vittem fel a MNP diszperziókból a 7. ábra (B) által szemléltetett módon, hiszen meg kellett győződnöm arról, hogy maga a diszperzió sejtmentes-e. Száradásig a steril fülkében hagytam a lemezeket, majd 37 °C-os inkubátorba helyeztem őket 24 órára. Másnap történt az eredmények kiértékelése.



7. ábra A) A lemezen 1-gyel jelölve az: ultraszűrő víz, mint kontroll
B) Baktériummentes táptalajra felvitt minták, melyek az alkalmazott MNP-k steril voltát bizonyítják.

Az antibakteriális hatással rendelkező MNP-k körül egy gátlási zóna jelenik meg a lemezen: ez arra utal, hogy a tesztelt anyag közvetlen környezetében elpusztultak a baktériumsejtek. A kiértékelés során a megjelenő gátlási zónák átmérőjét mértem le vonalzó segítségével. Egy minta esetén négy darab átmérőt mértem meg (négy irányban), ezeket az értékeket átlagoltam, majd levontam a megfelelő következtetéseket az anyagok antibakteriális hatásával kapcsolatban.

4.5 Adszorpció teszt

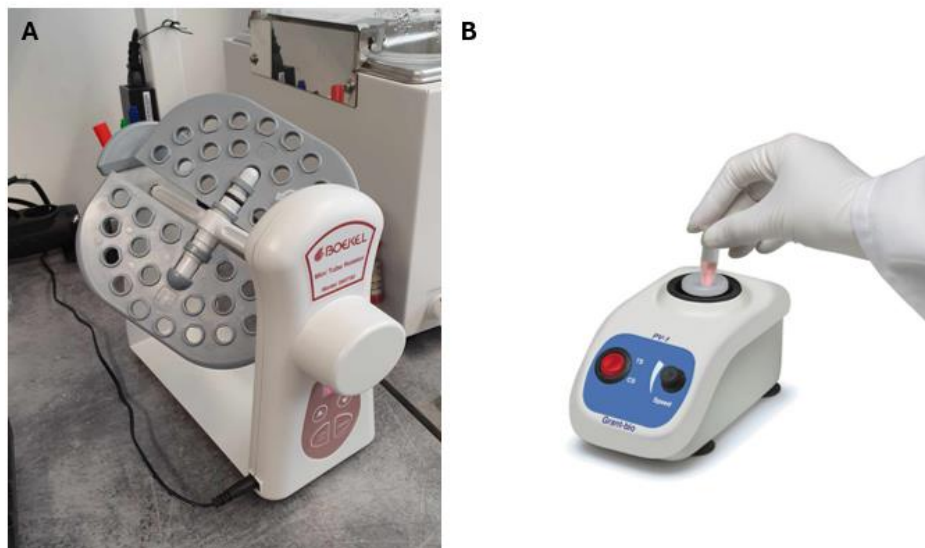
Az adszorpció teszt kivitelezéséhez az antibakteriális kísérletekhez hasonlóan szükségem volt egy kiindulási baktériumszuszpenzió elkészítésére, melynek optikai denzitását szintén 0,1-re állítottam be annak érdekében, hogy a vizsgálatok során egyforma sejtsűrűségű baktériumkultúrákkal dolgozzak. Ebben az esetben is LB agar lemezre szélesztéssel meghatároztam az $OD_{600}=0,1$ -es értékhez tartozó sejtkoncentrációt, ahogy azt a korábbi fejezetben már leírtam.

Csoportunk korábbi kutatásaiból tudjuk, hogy egy adszorbens baktérium kötő hatékonyságát túlságosan tömény szuszpenzióval nem tudjuk vizsgálni, így az elkészített $OD_{600}=0,1$ -es sejtsuszpenzióból az adszorpció vizsgálatokhoz is szükség volt hígítási sor készítésére. Ebben az esetben is 1 ml végtérfogatban készítettem el a tízes léptékű, hattagú hígítási sort, azzal a különbséggel, hogy most LB tápoldat helyett fiziológiás sóoldatot használtam hígítószerként. A hígítási sor 10^6 -os tagjából először a sejtkoncentráció meghatározás céljából szélesztettem ki LB agarra (10. ábra 1. mintavétel). Az így meghatározott sejtkoncentráció adta a kiindulási *E. coli* sejtszámot (kiindulási sejtkoncentrációt). Ez alapján tudtam a későbbiekben meghatározni a vizsgált adszorbensek baktérium adszorpció hatékonyságát.

A tesztekhez szükséges mágneses nanorészecske diszperziót oly módon alakítottam ki, hogy a por formában kimért részecskéket 900 μ l fiziológiás sóoldattal vittem diszperzióba, majd az *E. coli* hígítási sor 10^5 -es tagjából 100 μ l-t pipettáztam a fiziológiás sóoldatban diszpergált ferrit nanorészecskékhez. Ezzel a baktérium sejtekre nézve a diszperzió 10^6 -ra hígult. A diszperzió a MNP-k szempontjából pedig 30 mg/ml koncentrációjú volt. Ezt az elegyet vortex (kémcsőkeverő) segítségével homogenizáltam (8. ábra B), majd 3×100 μ l-t szélesztettem ki LB agarra (10. ábra 2. mintavétel). Ez a mintavétel tehát abban különbözött az elsőtől, hogy a minta *E. coli* baktériumok mellett mágneses nanorészecskét is tartalmazott.

Ezt követően következett a mágneses nanorészecskék és a baktérium sejtek közös inkubációja. Mivel nem voltak előzetes ismereteim, hogy mennyi idő szükséges az adszorpció lejátszódásához, így a mintát tartalmazó Eppendorf csöveket rotátor készülékre (olyan eszköz, mely folyamatosan 360° -ban forgatja el a ráhelyezett csöveket, 8. ábra A) helyeztem 30 percre, mely lehetővé tette, hogy az inkubációs idő teljes időtartama alatt a diszperzió homogén maradjon, ne történjen meg a részecskék idő előtti ülepedése, ami esetleg aggregátumok képződéséhez, és így az adszorpció hatékonyságának csökkenéséhez vezethetne. Fél óra

elteltével ismét $3 \times 100 \mu\text{l}$ mintát vettem, melyet újabb 3 db LB lemezre szélesztettem ki (10. ábra 3. mintavétel). Ez a mintavétel abban tér el a 2.-tól, hogy itt feltehetően már megtörtént az adszorpció, de még a diszperzióban együttesen vannak jelen a mágneses részecskék és a baktériumsejtek.



8. ábra A) Rotátor keverő B) Vortex keverő

A tesztfolyamat következő lépéseként mágneses tartóra helyeztem a mintát tartalmazó Eppendorf csöveket (9. ábra), és újabb 30 percet hagytam a két fázis elkülönülésére.

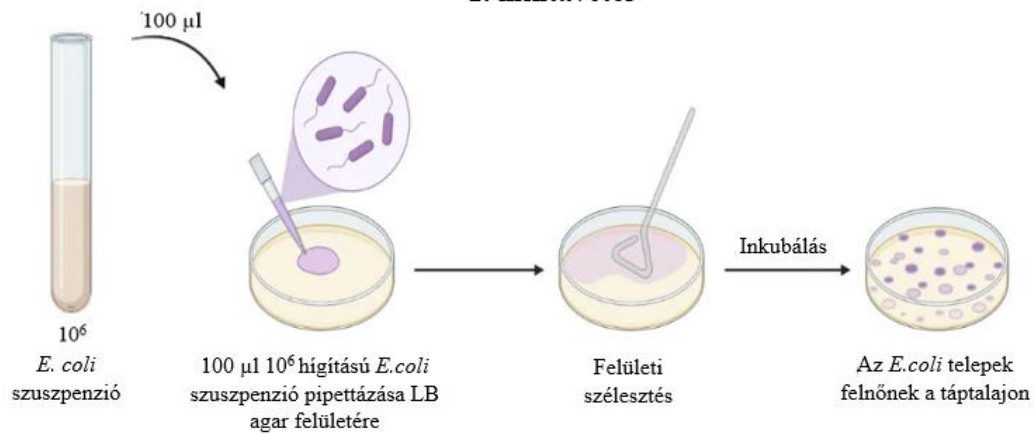


9. ábra Mágneses tartó: Eppendorf-csöveket belehelyezve lehetővé teszi a MNP-k és a felülúszó folyadék elválasztását

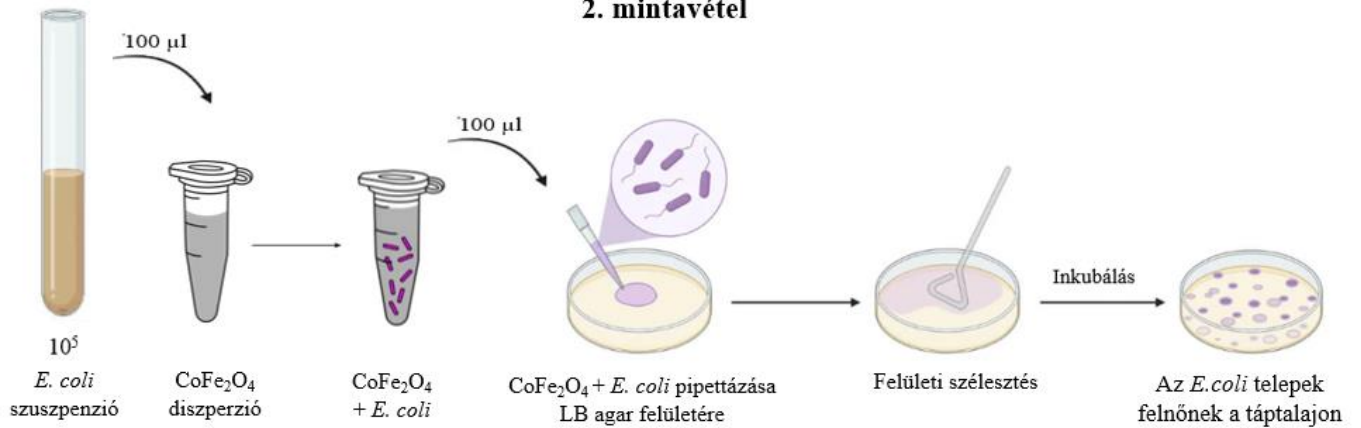
Az inkubációs idő elteltével a MNP-k a mágneshez csoportosultak az Eppendorf csövek aljában, a felülúszó (a felső folyadék fázis) pedig szépen kitisztult. Utolsó lépésként $3 \times 100 \mu\text{l}$ mintát vettem a tiszta felülúszóból (10. ábra 4. mintavétel) miközben a mintát a mágnesen hagytam, és LB agarra szélesztettem ki azt. Ezen mintavétel után a lemezen kisebb sejtkoncentráció megjelenését vártam, hiszen amennyiben az adszorpció megtörtént, az adszorbeálódott sejtek a mágneses részecskékkel együtt a mágneshez rögzülve maradtak, és így a felülúszóba nem, vagy csak kevés sejt kerül.

Az összes mintavételből szélesztett lemezeket inkubátorba helyeztem a mikroorganizmusok növekedése céljából. A lemezeken megjelenő telepeket a 24 órás inkubáció után értékeltem ki. A későbbiekben kiderült, hogy a 2. és 3. mintavételből (amikor a baktérium sejtek és a mágneses részecskék közös diszperzióban vannak) szélesztett lemezek eredményei sok esetben nem voltak reprodukálhatóak, így arra jutottam, hogy a későbbiekben ez a két közbülső mintavételt elhagyom, és csak a tesztfolyamat elején (10. ábra 1. mintavétel) és a legvégén (10. ábra 4. mintavétel) fogom monitorozni a sejtkoncentráció adszorpció következtében való változását a diszperziós közegben. Az adszorpciós tesztek folyamatát a 10. ábra és 11. ábra együttesen mutatja be.

1. mintavétel

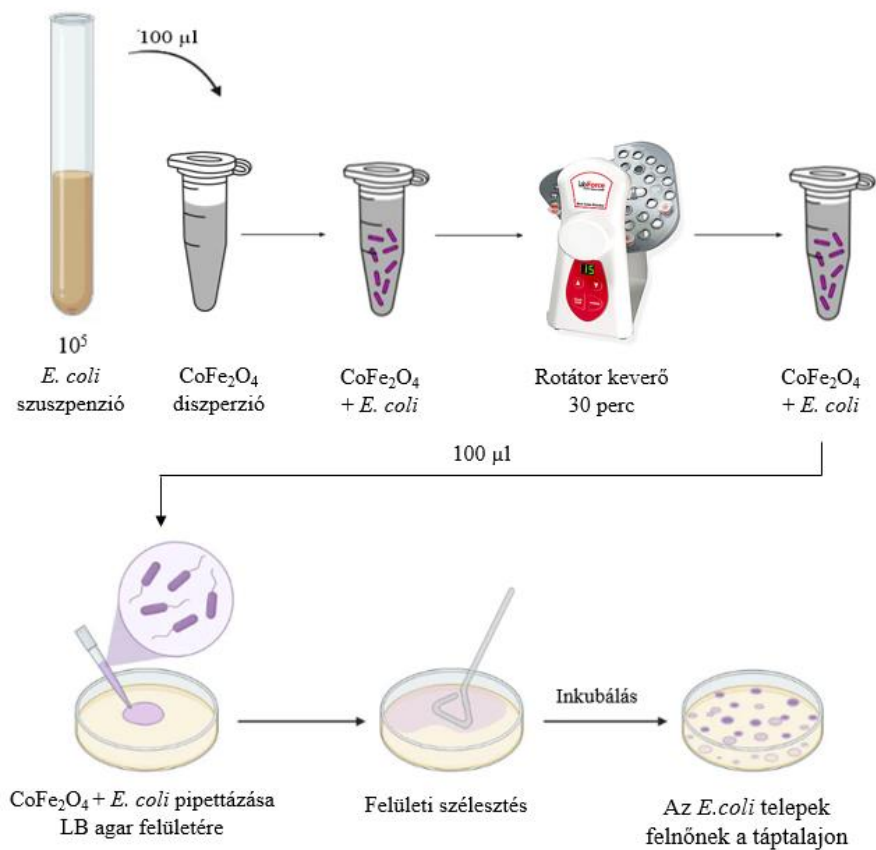


2. mintavétel

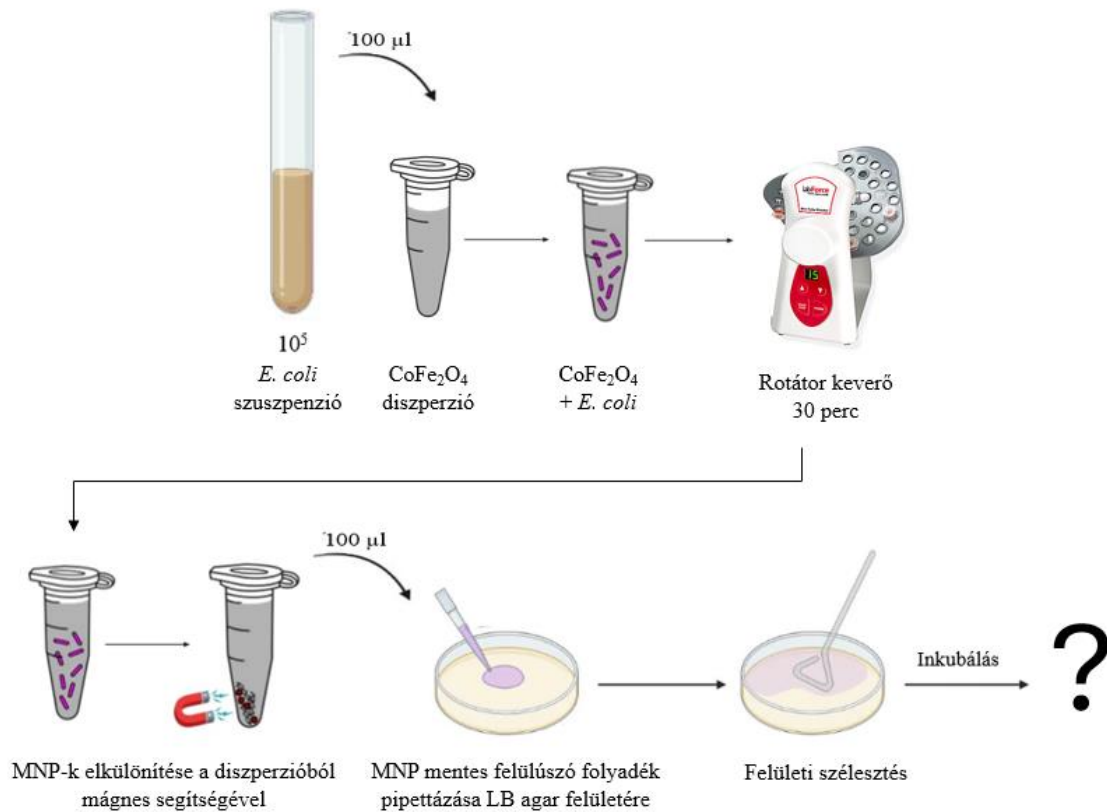


10. ábra Adszorpciós teszt folyamatára /1.

3. mintavétel



4. mintavétel

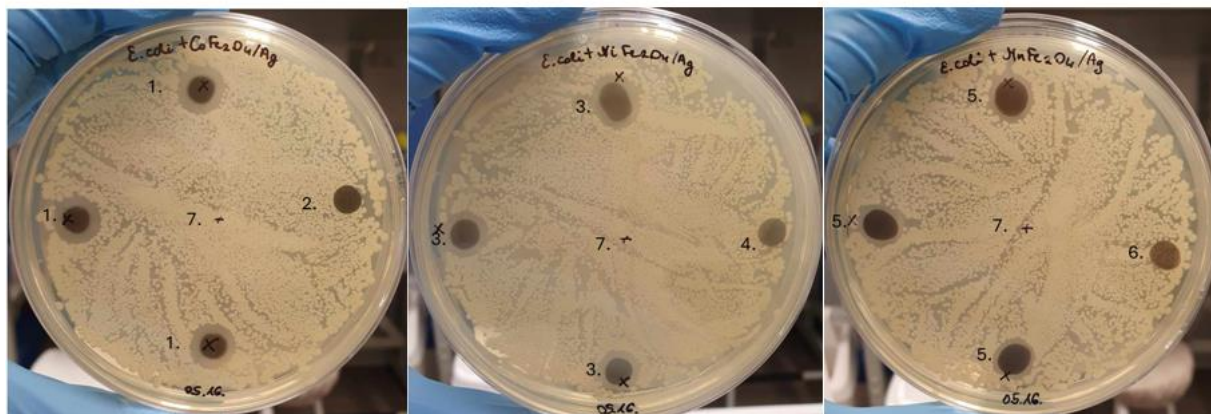


11. ábra Adszorpció teszt folyamatára /2.

5. Eredmények

5.1 Antibakteriális teszt

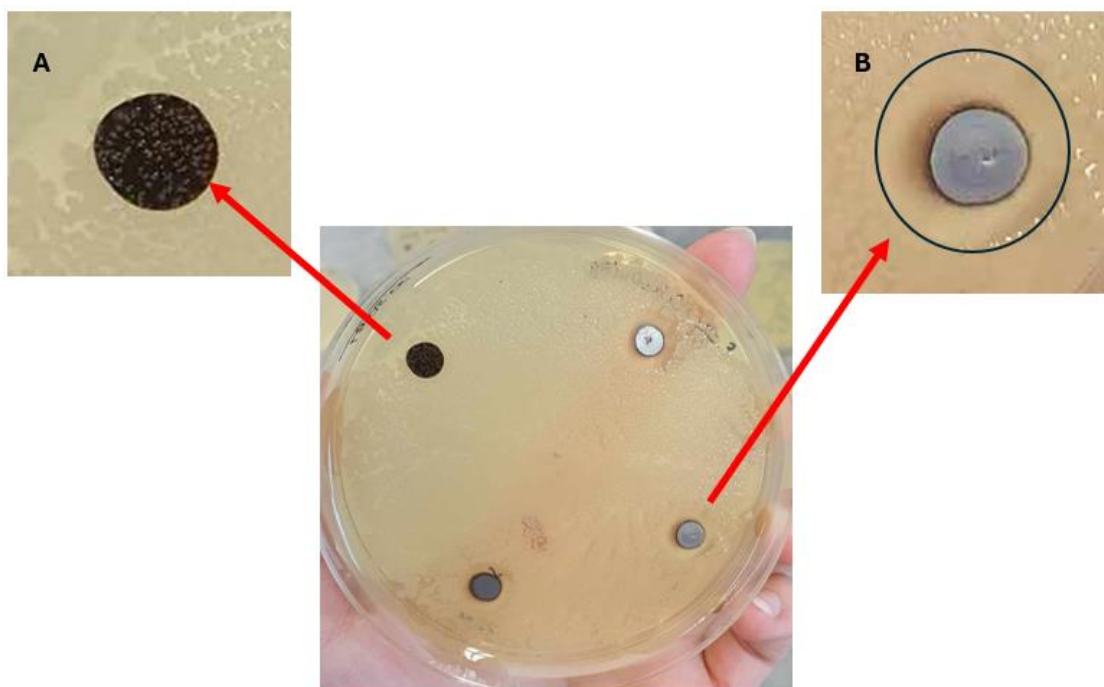
Az antibakteriális tesztekhez használt tömény sejtszuszpenziók sejtkoncentrációja $2,7 \times 10^7$ és $3,8 \times 10^7$ cfu/ml (telepet adó sejtek ml-enkénti száma) közé esett. Az ebből készített és a lemezre szélesztett *E. coli* mikroorganizmus szuszpenzió 10^2 hígítási tagja még összefüggő vajszerű bevonatot képezett. A lemezre felvitt MNP minta körül áttetsző zóna jelenik meg, amennyiben a MNP antimikrobiális hatással rendelkezik, ugyanis a minta közvetlen közelében a mikroorganizmusok növekedése gátolt, és a vajszerű *E. coli* telepek helyett az LB agar alapszíne látható (pl. 12. ábra 1-gyel jelölt mintahelye). Ha a tesztelt anyag nem rendelkezik mikroorganizmus gátló tulajdonsággal, akkor körülötte változatlanul láthatóak lesznek a baktérium telepek (pl. 12. ábra 2-vel jelölt mintahelye). Az antibakteriális hatást vizsgálva az eredmények azt mutatták, hogy csak az ezüsttartalmú mágneses nanorészecskék rendelkeznek mikroorganizmus gátló tulajdonsággal. Ahogy a 12. ábra is mutatja, csak a felcseppentett $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Ag}$, $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-Ag}$, $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Ag}$ minta körül jelent meg gátlási zóna, mely nem tartalmaz *E. coli* baktériumokat.



12. ábra Tesztelt MNP-k *E. coli* réteget tartalmazó táptalajon.
A felcseppentett mágneses részecske diszperziók a következők voltak:

- 1.) $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Ag}$, 2.) CoFe_2O_4
- 3.) $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-Ag}$, 4.) NiFe_2O_4
- 5.) $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Ag}$, 6.) MnFe_2O_4
- 7.) kontrollként alkalmazott utratizta víz minta

A 13. ábra azt is szemlélteti, hogy az ezüstös MNP-kkel végzett tesztek során az ezüst kivált a felcseppentett minta felületén, egybefüggő ezüstréteget alkotva. A „sima”, ezüstöt nem tartalmazó MNP-knél egyik esetben sem volt megfigyelhető antibakteriális hatás, ugyanis az *E. coli* telepek ránőttek a felvitt MNP diszperziós cseppekre, tehát nem alakult ki feltisztulási zóna.



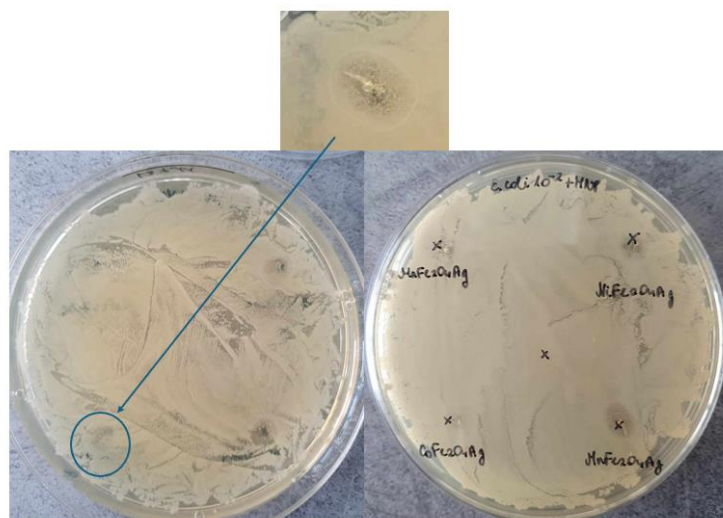
13. ábra A) Az ezüstöt nem tartalmazó minták esetében látható, hogy a baktériumtelepek
ránőttek a felvitt MNP-kre
B) Az ezüstöt tartalmazó minták esetén látható a folt körüli gátlási zóna, valamint megfigyelhető a
felületre kirakódott ezüstréteg is.

A vizsgált MNP-ket több koncentrációban is teszteltem, ugyanis célom annak a legkisebb MNP koncentrációnak a meghatározása volt, amely még mikroorganizmus gátló hatással bír. Először 30 mg/ml koncentrációban teszteltem a mintákat, majd azon MNP-k esetében, melyeknél antibakteriális hatást tapasztaltam, csökkentettem a koncentrációt, így a további vizsgált koncentrációk 3 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml és 0,1 mg/ml voltak. Az is megfigyelhető volt, hogy a gátlási zóna átmérője a tesztelt MNP koncentrációjának csökkenésével egyre kisebb lett (2. táblázat).

2. táblázat Antibakteriális tesztek eredményei (A nanorészecskéként mért adatokat a mellékletben szereplő 5. táblázat tartalmazza)

Vizsgált minta	Feltisztulási zóna átlagos átmérője [mm]	Szórás
CoFe ₂ O ₄ Ag [30 mg/ml]	11,625	2,4775
NiFe ₂ O ₄ Ag [30 mg/ml]	10,250	1,4097
MnFe ₂ O ₄ Ag [30 mg/ml]	9,2000	0,9923
CoFe ₂ O ₄ Ag [3 mg/ml]	8,9063	1,1176
NiFe ₂ O ₄ Ag [3 mg/ml]	8,6250	1,4536
MnFe ₂ O ₄ Ag [3 mg/ml]	8,2188	1,4307
CoFe ₂ O ₄ Ag [1 mg/ml]	6,6875	0,5543
NiFe ₂ O ₄ Ag [1 mg/ml]	6,6875	0,7042
MnFe ₂ O ₄ Ag [1 mg/ml]	5,9375	0,7719
CoFe ₂ O ₄ Ag [0,5 mg/ml]	6,8750	0,8062
NiFe ₂ O ₄ Ag [0,5 mg/ml]	7,1875	0,5439
MnFe ₂ O ₄ Ag [0,5 mg/ml]	7,1875	0,6551

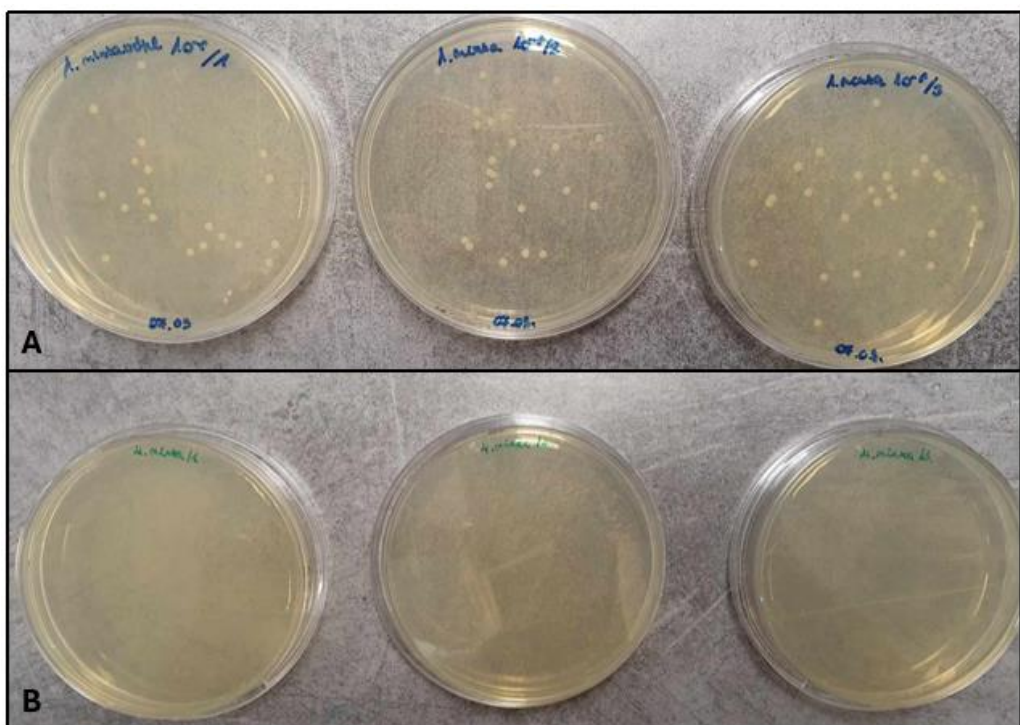
A 2. táblázat az antibakteriális tesztek eredményeit foglalja össze. Tartalmazza a vizsgált MNP típusát és koncentrációját, illetve a lemezen körülötte kialakult feltisztulási zóna átmérőjét. A 0,5 mg/ml után 0,1 mg/ml-es koncentrációjára hígítottam a mágneses nanorészecskéket, azonban ebben itt már egyik esetben sem volt megfigyelhető antibakteriális hatás, viszont a felcseppentett minták helyén halványabban jelentek meg a baktériumtelepek ahogy azt a 14. ábra is mutatja. Ez alapján elmondható, hogy a tesztelt ezüsttartalmú MNP-k minimális antibakteriális koncentrációja 0,1-es 0,5 mg/ml közé tehető.



14. ábra A 0,1 mg/ml koncentrációjú tesztelt MNP-k már nem mutatnak antibakteriális tulajdonságot, a felvitt minták helye ugyan látszik halványan (keretezett és kinagyított részlet), de már megjelentek a baktériumtelepek a felvitt minta felületén.

5.2 Adszorpció teszt

A mágneses nanorészecskék adszorpció tulajdonságait egyelőre csak a kobalt-ferrit részecskék esetén teszteltem. A kísérlet során, amennyiben a tesztelt részecske rendelkezik adszorpció tulajdonsággal, akkor megköti a hozzáadott mikroorganizmusokat, vagy legalább a mikroorganizmusok egy részét, majd a mágneses szeparáció elvégezéssel a tiszta felülúszót kapjuk, melyben a sejtkoncentrációnak a kiindulási sejtkoncentrációhoz képest sokkal kevesebbnek, a legoptimálisabb esetben nullának kell lennie. Kísérleteimben a kezdeti (adszorbenssel való homogenizálás előtti) sejtkoncentráció $1,0 \times 10^7$ és $2,9 \times 10^7$ cfu/ml között volt. Az adszorpció teszteknél az derült ki, hogy minden esetben, miután a mágneses részecskéket és a baktériumsejteket közösen inkubáltam, majd a baktérium-MNP diszperziót a mágneses tartóra helyezve megtörtént a szilárd (adszorbens) fázis és a felülúszó (folyékony) fázis elkülönülése, a felülúszóban a sejtkoncentráció nullára csökkent, tehát a felülúszó nem tartalmazott *E. coli*-t. A kísérletekből ezért arra következtettem, hogy a baktériumok minden bizonnyal a MNP-khez kötve maradtak és a mágneses részecskékkal együtt a mágneshez „horgonyzódtak”. A kísérletek eredményeit szemléltető LB lemezeket a 15. ábra mutatja, a számszerű koncentráció értékeket pedig a 3. táblázat tartalmazza.



15. ábra A) Első mintavétel: 100 µl 10⁻⁶-os hígítású *E. coli* sejtuszpenzió (2×10^7 cfu/ml sejtkoncentrációjú tömény szuszpenzióból hígítva)
 B) Adsorpciót követően a mágneses tartón tartott diszperziók felülúszójából történt mintavétel (a kapott sejtkoncentráció 0 cfu/ml, azaz nem volt telepkező egység a felülúszóban)

3. táblázat Adsorpció tesztek eredményei (többször megismételt tesztek eredményei)

CoFe ₂ O ₄ koncentráció: 30 mg/ml	Adsorpció előtti sejtkoncentráció [cfu/ml]	Adsorpció utáni felülúszó fázis sejtkoncentráció [cfu/ml]
	$2,8 \times 10^7$	0
	$1,8 \times 10^7$	0
	$1,2 \times 10^7$	0
	$1,7 \times 10^7$	0
	$1,9 \times 10^7$	0
	$2,7 \times 10^7$	0
	$1,0 \times 10^7$	0
	$2,9 \times 10^7$	0

A fenti tesztek eredményei azt mutatták, hogy a 30 mg/ml koncentrációjú CoFe₂O₄ diszperzió képes adszorbeálni az *E. coli* baktériumokat, ezáltal lehetővé teszi ezen mikroorganizmusok eltávolítását folyadék közegből.

5.3 Deszorpció

A CoFe_2O_4 mágneses nanorészecskékkel elvégzett tesztek során mindegyik esetben sikeresnek bizonyult az adszorpció, tehát feltételezhető volt, hogy az adszorpciót követően az *E. coli* sejtek a kobalt-ferrithez kötött állapotban maradtak. Ennek vizsgálatára deszorpciós tesztet terveztem. A deszorpció során az adszorbenshez kötött adszorbátum eltávolítása történik, ily módon felszabadítjuk az adszorbens kötőhelyeit. A folyamat jelentősége egyrészt az adszorpció folyamatának igazolása, az adszorpciós kölcsönhatás erősségének megállapítása, valamint az adszorbens további (újbóli) felhasználhatóságának tesztelése. Így tehát a következő feladatom a mikroorganizmus sejtek deszorpciója volt a mágneses nanorészecskék felületéről. Ezt úgy terveztem megvalósítani, hogy az adszorpció után (amikor a baktérium-MNP diszperziót tartalmazó csövek a közös inkubációt követően a mágneses tartón voltak) az összes felülúszót lepipettáztam a MNP adszorbensről, majd 1 ml friss fiziológiás sóoldattal újra szuszpendáltam a mágneses részecskéket. Az egyenletes és teljes elkeveredés érdekében ehhez a lépéshez is vortex keverőt használtam. 10 perc várakozás után mintát vettem a kevert állapotú szuszpenzióból, majd mágneses tartóra helyeztem az Eppendorf csöveket, és miután megtörtént a fázisszéttválás, a kialakult tiszta felülúszó teljes térfogatát kiszélesztettem. Feltételezésem az volt, ha a deszorpció valóban megvalósult, az adszorbens felületéről az addig kötött baktériumsejtek a keverés során lemosódnak, és ismét a folyadék fázisba kerülnek. Ebben az esetben pedig ennek a folyadék fázisnak a sejtkoncentrációja kezdeti sejtkoncentrációhoz kell nagyban hasonlítani.

Eredményeim azt mutatták, hogy a felülúszó fázisból szélesztett lemezeken egyetlen baktériumtelep sem nőtt fel. Mindebből arra következtettem, hogy a deszorpció nem történt meg, az *E. coli* sejtek továbbra is a kobalt-ferrit mágneses részecskékhez kötötten vannak.

Ezzel szemben, azokon a lemezeken, melyekre a kevert szuszpenzióból történt a szélesztés (azaz mikor a friss fiziológiás sóoldatban diszpergált mágneses részecskék diszperziójában még nem történt meg a fázisszéttválasztás) *E. coli* telepek jelentek meg, de a kiindulási sejtszámnál egy nagyságrenddel kisebb mennyiségben. Ez az eredmény nem teljesen tükrözte elvárásaimat. Először arra gondoltam, hogy nem hagytam elegendő időt a deszorpció lejátszódásához, így megismételtem a kísérletet úgy, hogy a friss fiziológiás sóoldattal való felszuszpendálás után 2 órát hagytam a rotátoron a baktérium-MNP diszperziót. Azonban ebben az esetben sem kaptam sejteket a fázisszéttválasztást követően kialakult felülúszó frakcióból szélesztett LB agar lemezeken, így végül 24 órát forgattam a rotátoron a diszperziókat, de még

így sem sikerült lemosni a baktérium sejteket a kobalt-ferrit mágneses részecskékről. Ez rávilágított arra, hogy a probléma valószínűleg nem a deszorpcióra hagyott idő mennyiségében, hanem valami másban rejlik. Feltételezhető, hogy a kobalt-ferrit részecskék az adszorpcióval egyidejűleg el is pusztítják az *E. coli* sejteket, és ezért nem tudtam élő sejteket kimutatni a felülúszóból. Mindenképpen arra a következtetésre jutottam, hogy a deszorpció kérdéskörének megválaszolásához még további vizsgálatok lesznek szükségesek.

5.4 Regenerálás

A regenerálásra az adszorbens újbóli felhasználása érdekében van szükség. Ennek során megtisztítják az adszorbenst a kötött anyagoktól, illetve eltávolítják róla a szennyeződések. Adszorpciós tesztek során fontos kérdés, hogy az adszorbens regenerálható-e, illetve, hogy egy adszorbensen hányszor végezhető el a regenerálási lépés anélkül, hogy az veszítene adszorpciós hatékonyságából. A legtöbb patogén mikroorganizmus 70-80 °C körüli hőmérsékleten végzett hőkezelést követően elpusztul, így ennél a kísérletsorozatnál a regenerálás viszonylag egyszerűen kivitelezhető volt. [23] A folyamatot úgy végeztem, hogy az adszorpciós kísérlet után a felülúszó lehető legnagyobb részét eltávolítottam, majd a mágneses nanorészecskéket 120 °C-os szárítószekrénybe helyeztem 2 órára. Ez az idő elegendő, hogy a felülethez kötődött baktériumok biztosan elpusztuljanak.

A CoFe_2O_4 mágneses részecskék regenerálását és a regenerált részecskékkel az adszorpciós tesztek egymás után öt alkalommal végeztem el, és minden regenerálás után azt tapasztaltam, hogy az adszorpció újra és újra teljes hatékonysággal megtörténik, tehát a kobalt-ferrit részecskék nem veszítenek adszorpciós hatékonyságukból. A tesztek eredményeit a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat Regenerált MNP-vel végzett adszorpciós kísérletek eredményei

	Adszorpció előtti sejtkoncentráció [cfu/ml]	Adszorpció utáni felülúszó fázis sejtkoncentráció [cfu/ml]
1. regenerált CoFe_2O_4	4×10^7	0
2. regenerált CoFe_2O_4	$2,4 \times 10^7$	0
3. regenerált CoFe_2O_4	$2,2 \times 10^7$	0
4. regenerált CoFe_2O_4	$2,9 \times 10^7$	0
5. regenerált CoFe_2O_4	$3,4 \times 10^7$	0

6. Összefoglalás

Nikkel-, kobalt- és mangán-ferrit nanorészecskéket, illetve ezek ezüsttel dópolt változatait vizsgáltam antibakteriális hatásuk szempontjából. A tesztekhez laboratóriumi, nempatogén *E. coli* szuszpenziót alkalmaztam. Először a mágneses nanorészecskék tömény diszperziójával dolgoztam (30 mg/ml), majd fokozatosan csökkentettem a koncentrációkat (3 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, illetve 0,1 mg/ml-re). Az eredmények azt mutatják, hogy csak az ezüsttartalmú MNP-k rendelkeznek antibakteriális hatással, ugyanis esetükben az *E. coli*-t tartalmazó lemezen a felcseppentett minta körül egy feltisztulási zóna jelent meg, mely arra utal, hogy képesek elpusztítani a körülöttük lévő mikroorganizmusokat. Ez a hatás pedig vélhetően a szerkezetükben található ezüst ionoknak köszönhető. A MNP diszperziók MNP koncentrációjának csökkentésével a feltisztulási zóna átmérője is csökkent. 0,1 mg/ml-es koncentrációnál már egyik MNP esetében sem volt tapasztalható antimikrobiális hatás, azaz nem alakult ki gátló zóna a minta körül. Ez alapján elmondható, hogy a tesztelt $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Ag}$, $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-Ag}$, $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Ag}$ nanorészecskék *E. coli* baktériumokkal szembeni legkisebb gátló koncentrációja 0,1 mg/ml és 0,5 mg/ml közé tehető.

Az adszorpciós kísérleteknél egyelőre csak a kobalt-ferrittel végeztem tesztek, melyekben a részecskét 30 mg/ml-es koncentrációban alkalmaztam fiziológias sóoldatban diszpergálva azt. A tesztekhez laboratóriumi *E. coli* tenyészetet alkalmaztam, melyből egy kezdeti sejtkoncentrációt tudtam meghatározni. Ezt követően összekevertem a megfelelő mennyiségű baktérium szuszpenziót a tesztelni kívánt mágneses részecskékkel, majd a rotátoron zajló homogenizálás és a mágneses tartón történő fázisszétválás után mintát vettem a felülúszóból. A kezdeti nagy sejtszámhoz képest a felülúszóban minden egyes alkalommal nulla sejtszám volt tapasztalható, tehát a mikroorganizmus sejtek adszorbeálódtak a kobalt-ferrithez, ezzel megtisztítva az oldatot.

Jövőbeli terveim közé tartozik az antibakteriális tesztek megismétlése Gram-pozitív baktériumtörzsekkel (pl. *Enterococcus faecalis* vagy *Micrococcus luteus*), ezáltal meg lehetne mondani azt is, hogy a tesztelt MNP-k az összes típusú baktériummal szemben rendelkeznek-e gátló tulajdonságokkal, vagy csak bizonyos típusú mikroorganizmusok ellen hatékonyak. Az adszorpciós vizsgálatok tekintetében mindenképp érdemes lenne a nikkel-és a magnézium-ferritre is elvégezni a kísérleteket, illetve az antibakteriális tesztekhez hasonlóan fontos lenne megnézni, hogy Gram-pozitív baktériumok képesek-e adszorbeálódni a részecskék felületére. Ezentúl szeretném megvizsgálni azt is, hogy a kobalt-ferrit esetén alacsonyabb MNP

koncentrációkkal is működik-e az adszorpció, és amennyiben igen, változik-e az adszorpció hatékonysága a MNP koncentrációjának csökkentésével. A jövőben mindenképpen szeretném optimalizálni a deszorpció tesztek körülményeit, illetve tervezem az ezüsttel dópolt MNP-kel is elvégezni az adszorpció tesztek annak érdekében, hogy megállapítsam, hogy az adszorpcióval egyidejűleg megtörténik-e a sejtek elpusztulása is. Ebben az esetben ugyanis ezek a típusú MNP-k egyidejűleg nyújtanának megoldást a szennyezett vízből a mikroorganizmusok megkötésére és elpusztítására és így a használt adszorbens fertőtlenítésére is.

7. Irodalomjegyzék

- [1] Galal-Gorchev, H. (2006). Chlorine in Water Disinfection. *Pure and Applied Chemistry*.
- [2] *Wolters Kluwer Hungary Kft.* Forrás: 316/2013. (VIII. 28.) Korm. rendelet a biocid termékek engedélyezésének és forgalomba hozatalának egyes szabályairól
- [3] M. Pinto, P. R. (2020). Application of magnetic nanoparticles for water purification. *Environmental Advances*.
- [4] Yan-Feng Huang, Y.-F. W.-P. (2010). Amine-Functionalized Magnetic Nanoparticles for Rapid Capture and Removal of Bacterial Pathogens. *Environmental Science & Technology*.
- [5] Nickel ferrite decorated noble metal containing nitrogen-doped carbon nanotubes as potential magnetic separable catalyst for dinitrotoluene hydrogenation – V. Hajdu, E. Sikora, G. Muránszky, F. Kristály, Z. Kaleta, M. Nagy, B. Viskolcz, B. Fiser, L. Vanyorek– *Scientific Reports*
- [6] *Britannica* - Nanoparticles: <https://www.britannica.com/science/nanoparticle>
- [7] An-Hui Lu, E. L. (2007). Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application.
- [8] László, V. Környezetbarát és katalitikus folyamatok gyak. jegyzet.
- [9] Weijun Fang, C. H. (2016). Preparation of amino-functionalized magnetic nanoparticles for enhancement of bacterial capture efficiency. *The Royal Society of Chemistry*
- [10] Raghvendra A. Bohara, N. D. (2017). Surface-Modified Cobalt Ferrite Nanoparticles for Rapid Capture, Detection, and Removal of Pathogens: a Potential Material for Water Purification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.
- [11] Sandhya Punyasamudram, R. P. (2023). Multifunctional characteristics of biosynthesized CoFe₂O₄@Ag nanocomposite by photocatalytic, antibacterial and cytotoxic applications. *Chemosphere* .
- [12] Ilosvai M Á, V. L. (2023). Mágneses tulajdonságú ferrit nanorészecskék szintézise és alkalmazásuk glikán-analízisben. Miskolci Egyetem.
- [13] Palladium Decorated, Amine Functionalized Ni-, Cd- and Co-Ferrite Nanospheres as Novel and Effective Catalysts for 2,4-Dinitrotoluene Hydrogenation - V. Hajdu, E. Sikora, G. Muránszky, F. Kristály, Z. Kaleta, M. Nagy, B. Viskolcz, B. Fiser, L.

- [14] Viktória Hajdu, Á. P. (2023). Amine Functionalization Leads to Enhanced Performance for Nickel- and Cobalt-Ferrite-Supported Palladium Catalysts in Nitrobenzene Hydrogenation. *Catalysts: Design, Synthesis, and Molecular Applications*.
- [15] Timea B.G., Ágnes M.I., Gergely Sz., Milán Sz., Csaba V., Béla V., László V., Emma Sz.D. -A Simplified and Efficient Method for Production of Manganese Ferrite Magnetic Nanoparticles and Their Application in DNA Isolation (2023)
- [16] James B. Kaper, J. P. (2004). Pathogenic Escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology* .
- [17] Aktív szerek a víztisztításban - Bulátkó Anna (BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR)
- [18] Tamás, M. L. (2008). Környezettechnológiai műveletek, gépek és folyamatok. ELTE Kémiai Intézet.
- [19] Gitashree Darabdhara, P. K. (2017). Magnetic nanoparticles towards efficient adsorption of gram positive and gram negative bacteria: An investigation of adsorption parameters and interaction mechanism. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*.
- [20] B.V., T. E. Operation and Maintenance Manual - Electronic Laboratory Autoclaves Models 5050, 5075 EL-MD/EL-D.
- [21] Portia Mira, P. Y. (2022). Estimating microbial population data from optical density
- [22] Dahal, P. (2022). *Microbe Notes*. Forrás: Spread Plate Method- Definition, Principle, Procedure, Uses: <https://microbenotes.com/spread-plate-technique/>
- [23] *World Health Organization*. (2018). Forrás: *E. coli*: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>

Ábrajegyzék

1. ábra Kobalt-ferrit MNP-k HRTEM felvétele	5
2. ábra Adsorpció mechanizmusa.....	6
3. ábra Adsorbens felülete	7
4. ábra CoFe_2O_4 -d. H_2O diszperzió	9
5. ábra Hígítási sor készítése	10
6. ábra Felületi szélesztés módszere.....	11
7. ábra A) Diszpergálószer kontroll B) Negatív kontroll	12
8. ábra A) Rotátor keverő B) Vortex keverő	14
9. ábra Mágneses tartó.....	14
10. ábra Adsorpciós teszt folyamatára /1.	16
11. ábra Adsorpciós teszt folyamatára /2.	17
12. ábra Tesztelt MNP-k <i>E. coli</i> réteget tartalmazó táptalajon.	18
13. ábra Az ezüsttel dópolt és ezüstöt nem tartalmazó minták különbségei	19
14. ábra 0,1 mg/ml koncentrációjú tesztelt MNP-k	21
15. ábra Adsorpciós tesztek (1. és 4. mintavétel)	22

8. Mellékletek

Az azonos színű táblázatok azonos típusú mágneses nanorészecskéket tartalmaznak eltérő koncentrációban. Az első három táblázatban a vizsgált MNP-k koncentrációja 30 mg/ml, a második három táblázat esetén 3 mg/ml, a következő három táblázat esetén 1 mg/ml, az utolsó három táblázatban pedig 0,5 mg/ml. A felső sor a felcseppentett MNP minta sorszámát jelöli, alatta találhatóak a feltisztulási zóna négy helyen mért átmérői. Minden táblázathoz tartozik átlag és szórás is, melyeket a dolgozatban szereplő 2. táblázatban foglaltam össze.

5. táblázat Antibakteriális tesztek eredményei

CoFe ₂ O ₄ Ag 30 mg/ml	Minta sorszáma	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
	Feltisztulási zóna átmérője [mm]	11	9	10	11	9	9	16	15	14	16
		10	10	10	10	10	9	15	13	15	14
		10	9	9	9	10	9	15	12	14	15
		11	10	9	10	10	10	15	13	14	15
	átlag: 11,625										
	szórás: 2,4775										

NiFe ₂ O ₄ Ag 30 mg/ml	Minta sorszáma	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
	Feltisztulási zóna átmérője [mm]	9	10	10	9	10	11	12	11	12	11
		10	9	9	10	10	11	10	13	11	12
		9	8	8	9	9	9	11	11	12	12
		8	8	9	10	9	10	12	12	13	11
	átlag: 10,250										
	szórás: 1,4097										

MnFe ₂ O ₄ Ag 30 mg/ml	Minta sorszáma	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
	Feltisztulási zóna átmérője [mm]	8	9	8	9	9	9	10	11	9	10
		10	7	9	9	8	8	10	10	10	10
		10	10	10	9	9	8	10	11	9	11
		9	10	7	8	8	9	10	9	9	9
	átlag: 9,200										
	szórás: 0,99228										

CoFe₂O₄Ag 30 mg/ml	Minta sorszáma	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
	Feltisztulási zóna átmérője [mm]	11	11	8	9	9	8	9	9
		9	9	8	8	8	8	8	8
		10	10	7	10	9	8	8	8
		11	11	10	10	8	8	8	9
		átlag: 8,9063							
		szórás: 1,1176							

NiFe₂O₄Ag 3 mg/ml	Minta sorszáma	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
	Feltisztulási zóna átmérője [mm]	11	6	8	7	10	9	8	8
		8	13	7	8	10	9	8	9
		10	8	9	8	9	10	7	7
		9	7	9	7	9	11	8	9
		átlag: 8,6250							
		szórás: 1,4536							

MnFe₂O₄Ag 3 mg/ml	Minta sorszáma	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
	Feltisztulási zóna átmérője [mm]	8	7	8	6	8	9	8	9
		7	8	6	8	7	9	10	8
		10	8	7	9	7	9	9	10
		11	9	7	7	8	9	9	8
		átlag: 8,2188							
		szórás: 1,4307							

CoFe₂O₄Ag 1 mg/ml	Minta sorszáma	1.	2.	3.	4.
	Feltisztulási zóna átmérője [mm]	7	7	6	7
		7	6	7	7
		8	6	7	6
		8	6	6	6
		átlag: 6,6875			
		szórás: 0,5543			

NiFe₂O₄Ag 1 mg/ml	Minta sorszáma	1.	2.	3.	4.
	Feltisztulási zóna átmérője [mm]	6	6	7	6
		6	6	6	5
		5	7	6	6
		6	6	7	6
		átlag: 6,6875			
		szórás: 0,7042			

MnFe₂O₄Ag 1 mg/ml	Minta sorszáma	1.	2.	3.	4.
	Feltisztulási zóna átmérője [mm]	5	6	7	6
		5	5	6	6
		6	5	7	5
		6	6	7	7
		átlag: 5,9375			
		szórás: 0,7719			

CoFe₂O₄Ag 0,5 mg/ml	Minta sorszáma	1.	2.	3.	4.
	Feltisztulási zóna átmérője [mm]	7	6	7	8
		6	6	7	6
		7	6	8	7
		8	6	8	7
		átlag: 6,875			
		szórás: 0,8062			

NiFe₂O₄Ag 0,5 mg/ml	Minta sorszáma	1.	2.	3.	4.
	Feltisztulási zóna átmérője [mm]	8	8	7	7
		7	7	7	6
		8	7	8	7
		7	7	7	7
		átlag: 7,1875			
		szórás: 0,5439			

MnFe₂O₄Ag 0,5 mg/ml	Minta sorszáma	1.	2.	3.	4.
	Feltisztulási zóna átmérője [mm]	7	8	8	7
		8	6	7	8
		7	7	8	7
		6	7	7	7
		átlag: 7,1875			
		szórás: 0,6551			