



Vörösiszapból izolált mikroorganizmusok potenciális biotechnológiai hasznosítása

TDK dolgozat

Készítette:

Röhberg Melinda

Biomérnök BSc hallgató

Témavezető:

Dr. Feigl Viktória, egyetemi docens

BME VBK ABÉT Környezeti Mikrobiológia és Biotechnológia Kutatócsoport

Budapest, 2024

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	3
2. Irodalmi áttekintés.....	4
2.1. Vörösiszap keletkezése, tulajdonságai, összetétele.....	4
2.2. Vörösiszap felhasználása, hasznosítása.....	6
2.3. Vörösiszap mikroflórája.....	7
2.3.1. Vörösiszapban található mikroorganizmusok.....	8
2.3.2. Vörösiszap metagenom elemzése.....	9
2.3.3. Extremofilek jelentősége.....	10
3. Anyagok és módszerek.....	12
3.1. Vörösiszap jellemzői, tulajdonságai.....	12
3.2. Mikroba törzsekhez felhasznált szénforrások, táptalajok.....	13
3.3. Mikroba izolálása, fenntartása.....	14
3.4. Mikroszkopikus vizsgálat.....	16
3.5. Mikroba identifikálása.....	17
3.6. Sótűrés vizsgálata.....	18
3.7. Hőmérséklettűrés vizsgálata.....	20
3.8. A pH-tűrés vizsgálata.....	21
3.9. Savtermelés vizsgálata.....	23
3.10.EPS-termelés vizsgálata.....	23
3.11.Sziderofór termelés vizsgálata.....	24
3.12.Statistikai analízis.....	26
4. Eredmények és értékelésük.....	27
4.1. Vörösiszap jellemzői, tulajdonságai.....	27
4.2. Mikroba izolálása, fenntartása.....	29
4.3. Mikroszkopikus vizsgálat.....	30
4.4. Mikroba identifikálása.....	32
4.5. Sótűrés vizsgálata.....	35
4.6. Hőmérséklettűrés vizsgálata.....	38
4.7. A pH tűrés vizsgálata.....	40
4.8. Savtermelés vizsgálata.....	42
4.9. EPS-termelés vizsgálata.....	43
4.10.Sziderofór termelés vizsgálata.....	43
4.11.Potenciális hasznosíthatóság.....	44
4. Összefoglalás.....	45
5. Irodalomjegyzék.....	46

1. Bevezetés

A világon az alumíniumból készült termékekre egyre nagyobb a kereslet, hiszen könnyűfém, nagy szilárdsággal rendelkezik, jól megmunkálható, így elengedhetetlen az autógyártáshoz, az építőiparban könnyű szerkezetek kialakításához, illetve csomagolóipari felhasználáshoz. Az alumínium-oxidot (timföldet), mely az alumíniumgyártás alapanyaga, bauxitból Bayer-eljárás segítségével állítják elő, melynek hulladéka a vörösiszap. Ez az erősen lúgos, magas fémtartalmú hulladék potenciálisan káros hatással van a környezetre és az egészségre. Tárolt mennyisége évente jelentős mennyiségben, 120–150 millió tonnával növekszik, jelenlegi mennyiségét 4 milliárd tonnára becslik. Tárolása nagy földterületet foglal el, nem megfelelő elhelyezése esetén talaj-, illetve talajvízszennyezést okozhat. Mennyisége, vas- és tápelemtartalma, illetve kritikus nyersanyag-tartalma miatt is egyre nagyobb figyelmet fordítanak a másodlagos nyersanyagként való felhasználás kihasználhatóságára. Többféle technológiai eljárást, például gravitációs szeparáció, biológiai kioldás, szulfatálás-pörkölés-lúgozás alkalmaztak már, ezek általában 1-2 fém, például vas, titán, szkandium visszanyerésére összpontosítottak.

A vörösiszap magas pH-értéke és sótartalma miatt extrém élőhelynek számít, illetve ezen kívül az élőlények számára toxikus fémeket tartalmaz és alacsony a szervesanyag tartalma. Ennek ellenére saját mikroflórával rendelkezik, extrémofil mikroorganizmusokat izolálhatunk belőle, amelyek ebben a szélsőséges környezetben is megélnek, mint például halofil vagy halotoleráns (nagy sókoncentrációt tűrő) és alkalofil vagy alkalitoleráns (magas pH-t tűrő) mikrobák. Ezeknek az élőlények olyan tulajdonságait használhatjuk ki az iparban, mint például magasabb hozam termelése, toxikus anyagok lebontása vagy akár enzimkészletük lúgos eljárásokban való alkalmazása.

Kutatásom célja görög és magyar vörösiszapból olyan mikroorganizmusok izolálása és DNS-alapú azonosítása, melyek potenciális biotechnológiai hasznosításra lehetnek alkalmasak. Az izolálás során létrehozott törzsgyűjteményből hat mikróba törzs (három baktérium és három gomba) pH-, só-, illetve hőmérséklet-tűrőképességének, szerves sav, exopoliszacharid (EPS) és sziderofór termelésének vizsgálatát végeztem, melyek a későbbiekben alkalmasak lehetnek értékes fémek biológiai kioldására akár a vörösiszapból magából is.

2. Irodalmi áttekintés

Az irodalmi áttekintés során bemutatom a vörösiszap keletkezését, tulajdonságait és összetételét. Áttekintést írok a vörösiszap felhasználásáról, hasznosításáról, amelyeket a mennyiségének csökkentése érdekében alkalmaznak. Bemutatom a vörösiszap mikroflóráját, az eddigi kutatások során talált törzsek is felsorolásra kerülnek.

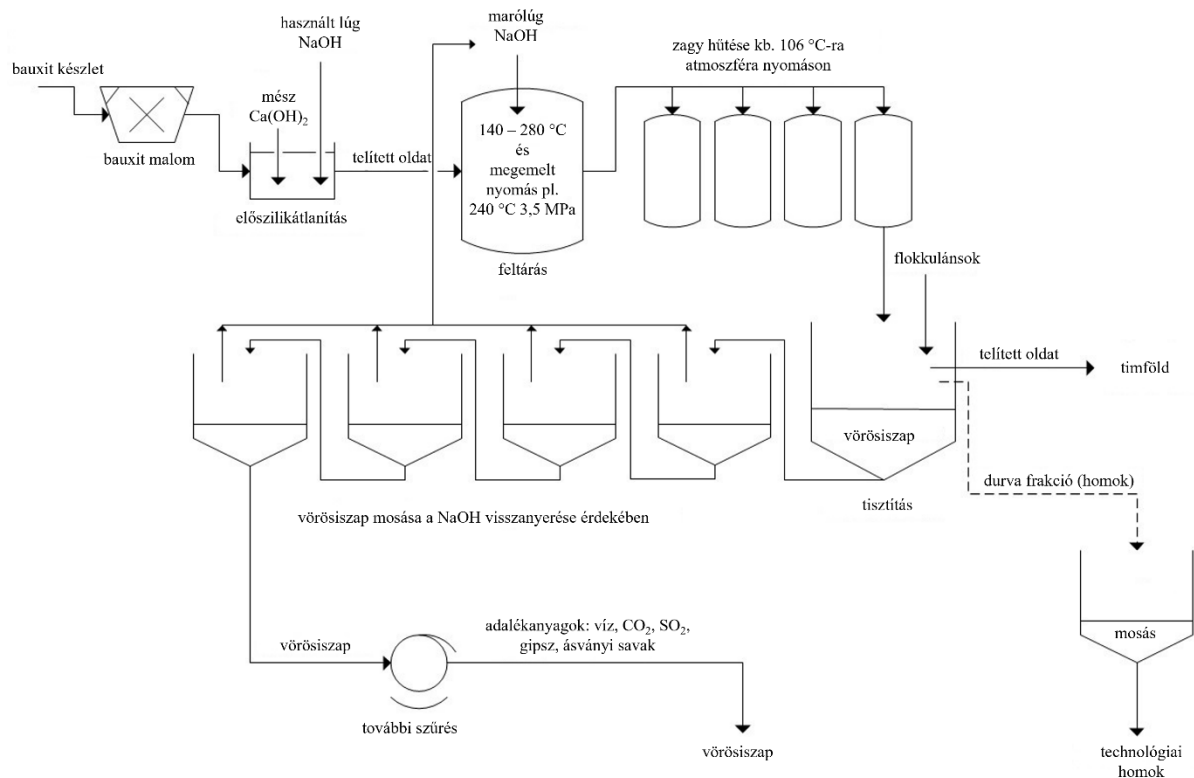
2.1. Vörösiszap keletkezése, tulajdonságai, összetétele

A vörösiszap a bauxit ércből történő timföldgyártás során nátrium-hidroxiddal magas nyomáson történő melegítés után visszamaradt lúgos, magas fémtartalmú hulladék. A timföldgyártás fő ipari technológiai közé tartozik a Bayer-eljárás, a világon megtalálható vörösiszap 90%-a a Bayer eljárásból származik.

A bauxit fő alkotói közé tartoznak az alumíniumásványok, vasásványok, titánérc, illetve szilikátok, mely közetnek két típusát különböztetjük meg: lateritbauxit és karsztbauxit. A feldolgozás során a bauxitot tömény lúgban magas hőmérsékleten és nyomáson tárják fel, az érc típusától függően (laterites bauxit: 130–140 °C, 1–3 atm nyomás; karsztbauxit: 200–240 °C, 3–6 atm nyomás). Ennek következtében az alumíniumásványok mellett szilícium-dioxid és titán-dioxid is reagál a lúggal, így aluminátlúg képződik, melyben különböző mennyiségű szodalit és nátrium-titanát is jelen lehet. Az aluminátlúgot Dorr-ülepítőben két anyagáramra választják szét, az egyik az aluminátlúg, míg a másik pedig a nem oldódott alkotókat tartalmazó vörösiszap, melyet több lépcsőben mosnak annak érdekében, hogy lúgmentesítsék. A mosást követően kivezetik a vörösiszap tárolókba. Az eljárás folyamatát az *1. ábra* szemlélteti.

Az aluminátlúgból hűtés, nyomáscsökkentés hatására leválasztják az alumínium-hidroxidot, melyet Al(OH)_3 oltókristály adagolásával segítenek elő, majd hőkezeléssel timfölddé alakítják át. Az oldatban maradt NaOH-ot bepárlást követően visszavezetik a folyamat elejére a feltáráshoz (Szépvölgyi és Kótai, 2011).

Minden tonna timföld előállításakor 0,8–1,5 tonna vörösiszap keletkezik. A timföldgyártás gyors ütemű fejlődése miatt a világon felhalmozott mennyisége meghaladta a 4 milliárd tonnát és az ipar megfelelő kiszolgálása érdekében évi 120–150 millió tonnával nő a mennyisége (Pan et al., 2023a).



1. ábra: Bayer-eljárás folyamatábrája (<https://körinfo.hu/en/node/13182>)

A vörösiszap fizikai tulajdonságai közül említésre méltó, hogy az agyaghoz viszonyítva nagyobb nedvességtartalommal rendelkezik, jobb a vízmegkötő képessége, illetve erősebb a kationcserélő kapacitása is. A vörösiszap fajlagos felülete eltérő lehet az ércben található ásványi anyagok eloszlásának, illetve rácsszerkezetének különbözőségei miatt, viszont jó adszorpciós tulajdonságait kihasználva gyakran alkalmazzák nehézfém-ionok megkötésére.

Kémiai tulajdonságai az ásványi anyagok összetételétől, illetve az alumínium-oxid kinyerési folyamatától is függ. A különböző országokban különböző összetételű bauxit van jelen, melyet az 1. táblázatban szemléltetnek. A komponensek eloszlása a legnagyobbtól a legkisebb mennyiségig: Fe_2O_3 , CaO , TiO_2 , SiO_2 , Al_2O_3 , Na_2O (Pan et al., 2023b).

1. táblázat: A világ különböző országainak vörösiszap mintáiban található fő komponensek (wt%) (Pan et al., 2023a)

Ország	Fe ₂ O ₃	CaO	TiO ₂	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Na ₂ O
Görögország	40–50	10–20	4–8	5–10	15–25	<4
Magyarország	35–45	6–20	2–6	7–15	11–15	3–10
Ausztrália	35–60	<4	3–7	5–25	15–24	1–10
Németország	25–45	2–4	9–15	5–10	16–25	5–10
Olaszország	30–40	1–8	4–12	4–10	8–20	5–15
Spanyolország	30–40	4–6	20–25	5–10	10–20	4–5

2.2. Vörösiszap felhasználása, hasznosítása

A vörösiszap globális hasznosítási aránya 15%, mely a magas termelés és alacsony felhasználás mellett hatalmas földterületeket foglal például a mezőgazdasági területekből. Felhasználható az építőiparban, másodlagos nyersanyagként fémek kinyerésére, katalizátorként a vegyipar területén, a környezetvédelemben adszorbensként a vízkezelésben vagy fémekkel szennyezett talajok kezelésében, mikroorganizmusok által végrehajtott fémek biológiai kioldására, talajok javítására.

A vörösiszap a környezetvédelemben is hasznosítható, például szennyvíztisztításban, ahol nehézfémek, fenolok és festékek eltávolítására alkalmazzák. A vörösiszap alacsony költségű és erős adszorpciós képességű, amely savazással, hőkezeléssel vagy szintézissel kezelve hatékonyan csökkenti a másodlagos szennyezést (L. Wang et al., 2019).

Fémek által okozott talajszennyezés esetén is alkalmazható, mivel a fémek kémiai stabilizálásával történő immobilizálást segíti elő, ennek köszönhetően felhasználható remediációs technológiákban. A vörösiszapnak köszönhetően a fémek immobilizált, vízben oldhatatlan, nem szállítható, illetve biológiailag nem hozzáférhető formában maradnak, ezáltal kisebb kockázatot jelentenek (Feigl et al., 2012). A bauxitmaradvány talajjavító hatású anyag a savas talajok (homok) számára, hiszen semlegesíti a pH-értékét a benne található magas CaCO₃ tartalom, amely növeli a talaj pufferteljesítményét. Ezen kívül javítja a talaj textúráját, illetve növeli a vízmegkötő képességét is (Ujaczki et al., 2016).

A fémek visszanyerésére egy zöldebb és olcsóbb megoldás a biológiai kioldás, amelyet autotróf és heterotróf mikroorganizmusok végezhetnek. Az autotróf mikrobák szervesen savak

jelenlétében biooxidációs-redukciós ciklusokkal mobilizálják az elemeket. A heterotróf mikrobák szerves savakat (például almasavat, citromsavat, borostyánkőssavat) termelnek, és kelátok képzésével oldják fel a fémvegyületeket (Pedram et al., 2020). Az autotróf biológiai kioldásra képes faj az *Acidiferrobacter thiooxydans*, *Acidithiobacillus albertensis*, míg heterotróf mikrobákra példa a *Pseudomonas putida*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* (Sarkodie et al., 2022).

A biológiai kioldás során a szerves savakat termelő mikroorganizmusok két fő mechanizmust használnak: acidolízist és komplexolízist. Az acidolízis, vagy proton-indukált fémszolítáció, közvetett kioldási folyamat, amelyben a mikrobák protonokat szabadítanak fel az ásvány felületéről, így a fémionok leválnak és oldódnak. Az erősebb savak több protont termelnek, ami növelheti a kioldási sebességet. Ez a gyors és gyakori mechanizmus különösen gombák és heterotróf baktériumok esetében jellemző (Sarkodie et al., 2022), mint például *Acidiphilium sp.* (Yang et al., 2013). A komplexolízis, vagy ligandum-indukált fémszolítáció, az acidolízissel együttműködve egyensúlyba hozza a fémionokat az oldatban. Ebben a folyamatban mikrobiális kelátorok és fémek között komplexek képződnek az ásványok felszínén, elősegítve a fémek felszabadulását és a kationos komponensek kivonását az ásványi rácsból. A fő fémkelátorok alacsony molekulatömegű szerves savak, mint a citrát, oxalát és glükonát, amelyeket a mikroorganizmusok bocsátanak ki (Cornu et al., 2017). A komplexképződésre példák: az oxálsav komplexet képez az alumíniummal, vassal és magnéziummal, vagy a citromsav a kalciummal és magnéziummal képes komplexet képezni. A kioldási sebességet a szerves sav komplexitása és a komplex stabilitása befolyásolhatja. A komplexolízisben részt vevő mikroorganizmusok például *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa* (Sarkodie et al., 2022).

2.3. Vörösiszap mikroflórája

A vörösiszap extrém élőhelynek számít, mivel magas pH-érték és sótartalom jellemzi, illetve toxikus fémek találhatók benne, rossz vízmegkötés, szervesanyag és számos tápanyaghiány korlátozhatja a mikrobiális növekedést, illetve vegetáció kialakulását (Krishna et al., 2014). Ennek ellenére saját mikroflórával rendelkeznek, melyek extremofil élőlények (Feigl et al., 2024). A szélsőséges környezetek egyedi ökoszisztémát képviselnek, olyan környezetben léteznek, ahol a fizikai vagy kémiai paraméterek a legtöbb élőlény számára tipikus tartományon kívül esnek (Y. Wang et al., 2024), ezeken a területeken extrém körülmények uralkodnak, mint

például sótartalom (halofilek: 0,5–5,2 M NaCl), hőmérséklet (pszikrofilek: -20 °C–20 °C, termofilek: 60–115 °C), pH (acidofilek: pH < 4, alkalofilek: pH > 9) (Feigl et al., 2024).

2.3.1. Vörösiszapban található mikroorganizmusok

Elsőként kanadai vörösiszaptól izoláltak egy alkalofil törzset, *Evensella vedderi* (eredeti nevén: *Bacillus vedderi*) néven, melynek optimális növekedési hőmérséklete 40 °C, optimális pH-érték 10, sótűrése maximum 7,5 w/v% (Agnew et al., 1995).

Az alkalofil mikroorganizmusok optimálisan vagy nagyon jól növekednek 9-es pH-érték felett (gyakran 10–12 pH-értékek között), illetve lassan vagy nem képesek növekedni a 6,5-ös, közel semleges pH-értéknél (Horikoshi, 1999). Előfordulnak obligát alkalofilek, melyek nem tudnak jól növekedni 8-as pH-értéken vagy az alatt, vagy fakultatív alkalofilek, melyek jól növekednek 8-as pH-n, illetve az alatt. Az alkalitoleráns mikroorganizmusok optimális növekedése 8-as pH alatt történik, de képesek lúgos pH-n is növekedni (Feigl et al., 2024).

Sokféle alkalofil mikroorganizmust izoláltak különböző környezetekből, beleértve az extrém, illetve nem extrém élőhelyeket is, köztük azonosítottak *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* nemzetségbe tartozó baktériumokat, illetve az eukarióták közül élesztőket, fonalas gombákat is (Horikoshi, 1999). Anaerob termofil alkalofileket is izoláltak például Yellowstone Nemzeti Parkból származó víz- és talajmintákból, melyek Gram-pozitív, pálcá alakú baktériumok optimális növekedési hőmérséklete 57 °C, pH-értéke 8,5 (Engle et al., 1995).

A sejteknek az extrém körülményekhez adaptálódniuk szükséges, alkalmazkodási stratégiát alakítanak ki. Az alkalofil szervezetek negatív töltésű, savas másodlagos sejtfallal rendelkeznek, nátrium- és kálium antiportereket alkalmaznak, illetve savakat termelnek (Coker, 2023).

A vörösiszapban található magas sótartalomnak köszönhetően halotoleráns alkalofilek is megjelenhetnek az izolált fajok között (Krishna et al., 2014). A halofil mikroorganizmusok két stratégiát alkalmaznak az adaptációhoz: sókiürítést és sófelvételt. Az acidofilek és alkalofilek sókiürítők, amelyek nagy mennyiségű szerves ozmolitot termelnek és halmoznak fel, hogy egyensúlyt teremtsenek a membrán két oldala között. Ez energiaigényes folyamat, de az ozmolitokat csökkenő sótartalom esetén újra hasznosíthatják energiaforrásként. A sófelvevők stabil sótartalmú környezetben élnek, és sejtmembránjukon belül 3 moláris vagy annál magasabb ionkoncentrációval rendelkeznek (Coker, 2023).

2.3.2. Vörösiszap metagenom elemzése

Elsőként az indiai vörösiszap biológiai sokféleségét vizsgálták, ahol a tenyészthető baktériumokat 16S rDNS szekvenálással elemezték, illetve a nem tenyészthető baktériumok esetén a vörösiszapból DNS-t vontak ki és 16S rDNS klón könyvtárat hoztak létre. A bauxitmaradványból 10 baktériumfajt izoláltak, melyek mindegyike alkalitoleráns, egy vagy több enzimaktivitásra pozitívak voltak, képesek szerves savak termelésére, illetve képesek széles spektrumú szénalapú szubsztrát oxidálására (Krishna et al., 2014).

Braziliában 3 *Bacillus* törzset izoláltak: *B. cohnii*, *B. pseudofirmus*, *B. clarkii* (Nogueira et al., 2017). Indiában *Trichoderma* szelektív táptalajon 5 morfológiailag különböző gombát izoláltak, melyek különböző szintű toleranciát mutattak a különböző nehézfémekkel. Ebből a *T. asperellum* az egyik identifikált faj, amely egy erősen sós-lúgos bauxitmaradványokkal szennyezett területen fejlődő bermudafű gyökérszónájából izoláltak (Anam et al., 2019). Kínában *Bacillus* törzseket izoláltak, *B. thuringiensis* (Wu et al., 2019), illetve *B. alkalicellulosilyticus* törzset (Liu et al., 2021). A gomba törzsekkel kapcsolatban kevesebb publikáció található, a fent említett *T. asperellum* fajon kívül két *Penicillium* törzset izoláltak: *P. oxalicum* (Liao et al., 2018), *P. tricolor* (Qu et al., 2019).

Metagenom elemzéseket is végeztek, melynek során a vörösiszap teljes genomjának DNS vizsgálatát is elkészítették. Az elemzés során Írországból *Beijerinckiaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Acetobacteraceae*, illetve *Chitinophagaceae* taxonómiai csoportokat találtak (Schmalenberger et al., 2013). Egy Ausztrália publikáció szerint az elemzés során a gombaközösségek esetén az *Ascomycota* és *Basidiomycota* taxonok, míg a baktériumok között *Proteobacteria* és *Firmicutes* törzsek domináltak (Santini, Warren, et al., 2015). Indiai vörösiszap tanulmányozása során *Kurthia*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Ochrobactrum*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Slinococcus* nemzetségeket találtak (Dey, 2022). Kínai jelentés szerint *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes*, *Firmicutes* és *Actinobacteria* populációt írtak le (Wu et al., 2020). Franciaországi bauxitmaradvány elemzése során a domináló baktériumtörzsek között szerepelt: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*, *Firmicutes* (Macías-Pérez et al., 2022).

2.3.3. Extremofilek jelentősége

Az alkalofil és haloalkalofil fajok megtalálhatók természetes és mesterséges lúgos környezetekben, például lúgos tavakban, hidrotermális nyílásokban, vagy olyan tavakban, amelyeket emberi tevékenység, például acél- és bauxitfeldolgozás hozott létre. Ezek a mikrobák alkalitoleráns enzimek (például proteáz, amiláz, celluláz, lipáz, xilanáz, pektináz) termelésére képesek, és vegyületeket is előállíthatnak, mint antibiotikumok, sziderofórok, exopolimerek, karotinoidok, lipidek és szerves savak (Sarethy et al., 2011).

Az extremofilek a szélsőséges környezetekben fellépő stressz kezelésére alacsony molekulatömegű extermolitokat termelnek, amelyek védik a makromolekulákat a denaturáló hatásoktól. Védő hatásuk miatt bőrápoló termékekben és napvédő krémekben is alkalmazzák őket, valamint fehérjék és sejtek stabilizálására is használják. Robosztus enzimeiket lignocellulóz anyagok hidrolízisére, fermentálható cukrok előállítására, és biodízel gyártásához, lipázokkal a lipidek átalakítására is alkalmazzák (Mamo & Mattiasson, 2020).

A sziderofórok kis molekulatömegű szerves vegyületek, amelyeket mikroorganizmusok, illetve növények is termelnek, legfőképpen a vasban szegény környezetben. Elsődleges funkciójuk, hogy megkössék a vasat [Fe(III)], ezáltal elérhetővé teszik azt a mikroorganizmusok, növények számára. A sziderofórok biokontrollként, bioszenzorként, bioremediációs és kelátképző ágensként is működhetnek, illetve fontos szerepet játszanak a talajásványok mállásában, növények növekedésének serkentésében (Ahmed & Holmström, 2014).

Az extracelluláris polimereket baktériumok és gombák termelik, amelyek javítják a túlélést, tapadást, sejtek közötti kohéziót, és védelmet nyújtanak a biocidok és szélsőséges környezeti feltételek ellen. Ezek főként poliszacharidokból, fehérjékből, nukleinsavakból és lipidekből állnak. A polimerek segítik a bauxitmaradványok bioremediálását, javítják a részecskék aggregációját és stabil talajszerkezetet fejlesztenek (Santini, et al., 2015). Az exopoliszacharidok (EPS) nagy molekulatömegű biopolimer csoport, melyek monoszacharidokból épülnek fel. A mikroorganizmusok a sejtfelületükhöz kapcsolva, kapszulát képezve vagy a környezetbe kibocsátva is előállíthatják. Nem mérgező, biokompatibilis, biológiailag lebomló anyag. Minden baktériumtörzs különböző biológiai aktivitással rendelkező EPS-t termel. A termelő törzs, a tenyésztő tápközeg összetétele, termelési körülmények is befolyásolják termelt EPS mennyiségét, kémiai szerkezetét és bioaktivitását is. Önállóan vagy más anyagokkal kombinálva széleskörűen alkalmazzák biomedicinálás, illetve gyógyszerészeti területen (Zaghloul & Ibrahim, 2022).

Az EPS-t az élelmiszeriparban, gyógyászatban és kozmetikában használják, mivel gélképzők, viszkózusak és ellenállóak. Például a hialuronsav sebgyógyításra és bőr hidratálására, a cellulóz sebgyógyászatban, míg a xantán gyógyszerekben és kozmetikumokban hasznos. Az élelmiszeriparban gellánnal készítenek géleket, ehető filmeket és dzsemeket. A jövőben előtérbe kerülhet prebiotikus és probiotikus tejtermékek gyártásában (Hussain et al., 2017). A környezeti biotechnológiában veszélyes anyagokat tartalmazó szennyvizek kezelésére alkalmazzák. Ilyen hulladékok közé tartoznak az azo festékek, vagy a mérgező, mutagén hatású, leggyakoribb ipari vegyi anyagok közé tartozó nitroaromás vegyületek. A szénhidrogének és származékaikkal szennyezett környezet helyreállításában is nagy szerepet vállalnak (Mamo & Mattiasson, 2020).

A bauxitmaradvány felhasználásához a legtöbb esetben szükség van a semlegesítésére. A biológiai kioldás során nem csak értékes fémeket lehet kinyerni, hanem semlegesíteni is lehet a pH-értéket például *Sulfobacillus thermosulfidoxidans* baktérium által katalizált kén oxidációján keresztül (Zhang et al., 2022).

Jelenleg az ökológiai helyreállítási projekteknél széles körben alkalmazzák a növényi növekedést serkentő baktériumokat (PGPB, plant growth promoting bacteria). A PGPB-k olyan mikroorganizmusok, melyek a növények gyökérszónájában, gyökérfelszínén találhatók. Képesek a növény számára hasznos összetevőket felvenni a gyökérszóna környezetéből, ezzel javítják a növények környezeti ellenállóságát, mellyel támogatják a növények növekedését (Chen et al., 2022).

Az extrémofilek nagy jelentőséggel bírnak az NGIB (next-generation industrial biotechnology - következő generációs ipari biotechnológia) területén, melynek során alacsony költségű biológiai feldolgozási technológia kidolgozása a lényege, ahol extrémofil sejteket használnak fel nyílt, nem steril környezetben. Ennek hatására energiát és erőforrást takarítanak meg, illetve magas koncentrációjú termékeket állítanak elő egyszerű szétválasztási műveletek mellett. Az extrém környezettel szembeni ellenállóságuk miatt hatékonyabbak az ipari folyamatokban, minimalizálják a toxikus melléktermékek képződését, illetve az üzemeltetési költségeket is (Wang et al., 2024).

3. Anyagok és módszerek

A méréseink során 4 vörösiszap mintával dolgoztunk: 3 minta a Görögország egyik legnagyobb timföldgyárából, illetve 1 minta a magyar Ajkai Timföldgyár X-es kazettájából származtak. A görög minták mintavétele 2024.02.06-án történt, a friss minta (0 hónapos, görög 0M) a szűrőprésből, az 1 hónapos minta (görög 1M) a vörösiszap tárolóban 1 hónapon keresztül állt, míg a 3 hónapos minta (görög 3M) a tárolóban 3 hónapon keresztül állt. A magyar vörösiszap (magyar) egy magyar vörösiszap feldolgozó cégtől származott 2024. márciusából. A fejezetben bemutatom az általunk vizsgált vörösiszapok jellemzőit, az alkalmazott kísérleti összeállításokat, valamint a mikrobák tulajdonságainak vizsgálatára alkalmazott módszereket.

3.1. Vörösiszap jellemzői, tulajdonságai

A vörösiszapoknak meghatároztuk a pH-értékét, vezetőképességét, nedvességtartalmát az MSZ 21470/2-81 (1982) Környezetvédelmi talajvizsgálatokra vonatkozó szabvány szerint végeztük el, illetve az elemtartalmát is meghatároztuk az alább ismertetett módszerek alapján.

pH-és vezetőképesség mérés

A vörösiszap mintákból lamináris fülke alatt – a befertőződés elkerülése miatt – steril körülmények között mintát vettünk üveg Petri-csészékbe, szobahőmérsékleten hagyva kiszáritottunk. A szárítást követően mozsárban porítottuk és drótvázás finomszűrő segítségével <1 mm-es méretre szitáltuk. A pH méréshez csavaros tetejű üvegekbe 4-4 g-ot mértünk be ((3 párhuzamos mérés), 10 ml desztillált vizet adtunk hozzá, majd a szuszpenziót 30 percen át 200 rpm-en ráztuk. Ezt követően a mintákat redős szűrőpapírral kémcsőbe szűrtük, majd pH-Electrode Sentix típusú üvegelektóddal WTW pH 330-as típusú mérőműszerrel megmértük a minták pH értékét. A mérés megkezdése előtt két pontos (pH 4,01 és 7,00) kalibrálást végeztünk a rendelkezésre álló kalibráló pufferek segítségével.

A vezetőképesség méréshez 16 g mintához 40 ml desztillált vizet adtunk, 30 percen át 200 rpm-en ráztuk, Falcon-csövekbe szűrtük, majd WTW Cond 3110-es típusú készülékkel mértük meg a minták vezetőképességét.

Nedvességtartalom mérés

A nedvességtartalom méréshez használt izzítótégelyek tömegét előzetesen lemértük analitikai pontossággal. Minden tégelybe kb. 2-2 g eredeti nedvességtartalmú vörösiszap mintát mértünk be, analitikai pontossággal feljegyeztük a tömegét. A mérést 3 párhuzamos méréssel végeztük

el minden vörösiszap típusra. A mintákat 105 °C-os szárítószekrénybe helyeztük, majd 24 órán át tömegállandóságig szárítottuk. Ezután exsikkátorban lehűtöttük a mintákat és visszamértük a tömegüket. A nedvességtartalmat az alábbi képlet segítségével határoztuk meg:

$$x = 100 - \frac{m_{\text{szárított}} - m_{\text{tégely}}}{m_{\text{bemért}}} \cdot 100$$

ahol: x = nedvességtartalom, $m_{\text{szárított}}$ = szárított vörösiszap és izzítótégely tömege (g), $m_{\text{tégely}}$ = izzítótégely tömege (g), $m_{\text{bemért}}$ = bemért vörösiszap minta tömege (g)

Elemtartalom mérés

A szobahőmérsékleten szárított vörösiszap mintákat mozsárban porítottuk, majd 1 mm-es átmérőjű drótvázás finomszűrő segítségével üveg Petri-csészére szitáltuk, így finom szemcsés porított mintákat kaptunk. A porított mintákat átlátszó lezárható tasakba tettük, majd NITON XL3t 600 hordozható XRF (röntgen-fluoreszcenciás) műszer segítségével mértük meg a fémtartalmat néhány centiméter vastag mintából. Minden minta esetén 3 párhuzamos mérést végeztünk, a műszeren található ravasz 135 mp-ig való folyamatos nyomvatartásával, a mérések között rázogatóssal homogenizáltuk a mintákat.

3.2. Mikroba törzsekhez felhasznált szénforrások, táptalajok

A vörösiszaphoz történő mikroorganizmusok izolálását két körben valósítottunk meg, először a görög, majd a magyar mintából, melyeket közösen végeztünk el Hegedűs Henrikkel és Masa Kingával.

Az első izolálás alkalmával 9 féle táptalajra szélesztettük a mintákat. Maláta és nutrient agarból 9-es és 10-es, Horikoshi agarból 10-es és 11-es kémhatású, míg Ashby-féle mannitol agarból, Pikovskaya-agarból és Halofil-agarból 9-es kémhatású táptalajt készítettünk. A táptalajok összetételét a következőkben mutatom be.

Általános táptalajok:

Maláta agar összetétele: 20,0 g maláta kivonat, 1,0 g pepton, 5,0 g glükóz, 20,0 g agar, 1000 ml csapvíz. *Nutrient-agar összetétele:* 15,0 g pepton, 3,0 g élesztő kivonat, 6,0 g NaCl, 1,0 g dextróz, 15,0 g agar, 1000 ml csapvíz. *Horikoshi agar összetétele:* 10,0 g glükóz, 1,0 g élesztőkivonat, 0,2 g K_2HPO_4 , 0,2 g $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$, 10,0 g Na_2CO_3 , 20,0 g agar, 1000 ml csapvíz.

Speciális táptalajok:

Ashby-féle mannitol agar összetétele: 20,0 g mannitol, 5,0 g CaCO_3 , 0,2 g KH_2PO_4 , 0,2 g MgSO_4 , 0,1 g K_2SO_4 , 16,0 g agar, 1000 ml csapvíz. *Pikovskaya-agar összetétele:* 10,0 g glükóz, 5,0 g $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, 0,5 g élesztőkivonat, 0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g KCl, 0,1 g MgSO_4 , 0,0001 g MnSO_4 , 0,001 g FeSO_4 , 16,0 g agar, 1000 ml csapvíz. *Halofil-agar összetétele:* 10,0 g kazein hidrolizátum, 10,0 g élesztőkivonat, 5,0 g pepton, 3,0 g nátrium-citrát, 2,0 g KCl, 25,0 g MgSO_4 , 250,0 g NaCl, 20,0 g agar, 1000 ml csapvíz. *Sabouraud-agar összetétele:* 10,0 g pepton, 40,0 g glükóz, 15,0 g agar, 1000 ml csapvíz (2. izolálásnál alkalmaztuk).

Az általános táptalajokat Török Ádám szakdolgozata (Török, 2017) alapján készítettük el, azzal az eltéréssel, hogy az autoklávozás előtti pH-értéket kiterjesztettük 9-es és 10-es értékig, az alkalofil mikroorganizmusok izolálása miatt. A nutrient agar általános táptalaj, egyaránt alkalmazható baktériumok és gombák tenyésztésére is, a maláta agar legfőképpen gombák számára hasznosítható, míg a Horikoshi agart alkalofil baktériumok tenyésztésére használják (Horikoshi, 1999).

A speciális táptalajokkal specifikusabb mikroorganizmusok izolálását céloztuk meg: az Ashby-féle mannitol táptalajt nitrogén-fixálók, a Pikovskaya-agart foszfát mobilizálók (Berkl, 2018), míg a halofil-agart (himedialabs.com) extrém halofil baktériumok tenyésztésére alkalmazzák.

A táptalaj összetevőit összekevertük, majd NaOH-val beállítottuk a megfelelő pH-t, amit pH-papírral ellenőriztünk. Ezt követően hozzáadtuk az agart, és vízfürdőn addig melegítettük, amíg az teljesen fel nem oldódott. Hasas pipettával 10 ml-t adagoltunk kémcsövekbe, majd 121 °C-on, 1 bar nyomáson 20 percig autoklávoztuk.

A második izolálás során gombákat szerettünk volna izolálni, ezért gombákra specifikus táptalajokat választottunk. A maláta agart kétféleképpen alkalmaztuk: egyik esetben pH 9-re állítottuk, a másik esetben az eredeti pH-t hagytuk meg. A harmadik táptalajként Sabouraud agart, valamint malátalevet készítettünk, amely a maláta agar összetételével megegyezett, de agar nélkül.

3.3. Mikrobák izolálása, fenntartása

A görög vörösiszapból háromféle mintát használtunk: friss, 1 hónapos és 3 hónapos. Mindegyik mintából steril körülmények között 3 db üveg Petri-csészébe vettünk mintát, és elvégeztük az izolálást és fizikai-kémiai méréseket. A mintavétel előtt steril kesztyűt húztunk, és kézfertőtlenítőt alkalmaztunk. Steril vegyszeres kanállal vettük ki a mintát, ügyelve arra, hogy

az izolálásra szánt vörösiszap a minta belsejéből származzon. Steril lombikba 1 g vörösiszapot mérve 10 ml 0,85%-os NaCl oldatot adtunk hozzá, majd 30 percig 180 rpm-es sebességgel ráztuk.

A rázatást követően 10-es léptékű hígítási sort készítettünk. A hígításhoz 4,5 ml steril 0,85%-os NaCl oldatokat használtuk. Minden oldathoz 500 µl mintát adtunk és ezt a folyamatot még 2 alkalommal megismételtük. Így az elkészült a 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 -es hígítási sor, melyből csak az utóbbi három hígítást használtuk az izoláláshoz. Minden hígítási mintából 100 µl-t pipettáztunk mindegyik táptalajra, és szélesztőbot segítségével eloszlattuk. Az elkészített Petri-csészéket 30 °C-on 72–96 órán keresztül inkubáltuk.

Az inkubálás után a különböző morfológiájú telepeket kiválasztottuk, majd oltókacs segítségével 1-1 telepet vettünk és tisztító szélesztést végeztünk. Az első tisztító szélesztést követően a morfológiailag hasonló mikrobák közül csak egyet tisztítottunk meg újra. A második tisztító szélesztés után, ha a tenyészetek nem voltak kevertek, ferde agarra oltottuk őket. Az első izolálás során összesen 46 mikrobát sikerült elkülöníteni, melyekből létrehoztuk a törzsgyűjteményt.

A második izolálás során a különböző mintákból (görög vörösiszap 0, 1 és 3 hónapos, valamint magyar vörösiszap) steril körülmények között 1-1 g-ot mértünk ki, hozzáadtunk 20 ml maláta levest és 200 µl tetraciklin antibiotikumot (50 µg/ml), majd 24 órán keresztül ráztuk őket 22 °C-on.

Készítettünk antibiotikum mentes oldatokat is, melyhez a 4 mintából ismét kimértünk 1-1 g-ot, majd hozzáadtunk 10 ml 0,85%-os NaCl oldatot. A mintákat 30 percen keresztül 180 rpm-en ráztuk. Ennek elkészítését az antibiotikumos rázás lejártaéhoz időzítettük

A tömény mintákból készítettünk egy 10x-es hígítást 0,85%-os NaCl oldattal, majd 100 µl mintát 3 féle (eredeti maláta, pH=9-es maláta és Sabouraud agar) agarra szélesztettük. A morfológiailag különböző mikrobákat esetén két tisztítószélesztést végeztünk, majd ferde agarra oltottuk át őket. Az izolálás során 27 mikrobát különítettünk el, így összesen 76 mikroorganizmusból áll a törzsgyűjteményünk.

A második szélesztést követően elnevezésre kerültek a törzsek. A nevek elején található G betű a görög, míg az M betű a magyar mintára utal. Ezt követően 3 jegyű számot kapott minden mikroba, melynek első számjegye azt jelöli, hogy hány hónapos mintából sikerült az izolálás (0: friss, 1: 1 hónapos, 3: 3 hónapos). A másik 2 számjegy a sorszámot jelöli. Például G322

törzs a három hónapos görög vörösiszapból izolált 22., M021 törzs a magyar vörösiszapból izolált 21. mikroba.

A törzsgyűjtemény elkészítését követően a további vizsgálatokat önállóan végeztük, saját mikroorganizmusokkal. A meglévő mikrobák közül kiválasztottam 3 baktérium és 3 gomba törzset választottam ki. Kiválasztott baktérium törzsek: G313, G319, G322, Kiválasztott gomba törzsek: M006, M010, M021, M023A. A nyári időszakot követően nem sikerült az M023A törzset fenntartani, így a további mérésekhez az M006-ot választottam ki.

3.4. Mikroszkopikus vizsgálat

Az izolálás során megfigyeltük a mikroba telepek morfológiai jellemzőit: alak, méret, felszín, telepek széle, pigmentáció.

A kiválasztott törzsek mikroszkópos vizsgálatát zsírtalanított tárgylemezen végeztem, egy vízcseppbe szuszpendálva a mikrobákat. A vizsgálatot 400x-os nagyítással sztereomikroszkóppal végeztem, megfigyelve a baktériumok méretét, alakját és szerveződését. Gram-festést is alkalmaztam a baktériumok sejtfal szerinti osztályozására, így a baktériumokat Gram-pozitív és Gram-negatív csoportokba soroltam.

A baktériumokat zsírtalanított tárgylemezen vízben szuszpendáltam, majd lámpaburán kiszáritottam és hővel rögzítettem. Gram-festés során először kristályibolyával festettem 2 percig, majd vízzel leöblítettem. Ezután Lugol-oldattal kezeltem 2 percig, majd aceton-etanol eleggyel tisztítottam, hogy eltávolítsam a felesleges festéket. A Gram-negatív sejtek elszíntelenedtek, míg a Gram-pozitívak kékes színűek maradtak. Végül safraninnal kontrasztfestettem 3 percig, és fedőlemezt helyezve 400x-os nagyítással mikroszkóppal megvizsgáltam a sejteket.

Gram-pozitív baktériumok esetén sötétkékes-ibolya, míg Gram-negatív baktériumoknál rózsaszínes-pirosas színű sejteket figyeltem meg. Az elszíneződés a sejtfal szerkezetétől, különösen a lipoid vegyületektől függ, amelyek a Gram-negatív sejtfalban találhatók. A festék komplexet a vékony, áteresztőbb Gram-negatív sejtekből könnyen ki lehet mosni, így azok safraninnal rózsaszínűvé válnak. A festést friss, 48 órás tenyészeteknél végeztem, mivel a sejtek Gram-jellege a korukkal változhat.

3.5. Mikrobák identifikálása

A törzsek nemzetség és faj szerinti besorolásához rRNS és ITS régiók alapján DNS szekvenálást végeztem. Ehhez először a sejteket a Platinum™ Direct PCR készlettel lizáltam. Készítettem egy lízis törzsoldatot 20 µl Lysis Buffer és 0,6 µl Proteinase K oldat keverékével. 20 µl törzsoldatot pipettáztam steril Eppendorf-csőbe, majd 48-72 órán át inkubáltam 30 °C-on. A mintát 1 percig szobahőmérsékleten, majd 98 °C-os vízfürdőben 5-10 percig inkubáltam. A végén 13000 rpm-en 1 percig centrifugáltam.

A PCR reakció előtt előkészítettem a PCR Reaction Mix-et. Egy nagyobb térfogatú mixet készítettem a következő komponensekből: 10 µl Platinum™ Direct PCR Universal Master Mix (1x végső koncentráció), 1-1 µl Forward és Reverz Primer (0,5 µM végső koncentráció), és 7 µl nukleáz-mentes víz. A mixből 19 µl-t pipettáztam PCR Eppendorf-csővekbe, majd hozzáadtam 1-1 µl lizált minta felülúszót. Az oldatot összekevertem, és 10000 rpm-en néhány másodpercig centrifugáltam. A PCR készülékbe (Eppendorf Mastercycler Nexus Gradient) a beállított programot alkalmaztam. A program beállítása (2. táblázat) után behelyezzük a PCR csöveket a gépbe, elindítjuk a programot.

2. táblázat: A PCR programban beállított ciklusszámok, hőmérsékletek, tartási idők

Lépés neve	Ciklusok száma	Hőmérséklet	Tartási idő
Aktiváció	1	94 °C	2 perc
Denaturáció	40	94 °C	15 mp
Betapadás		60 °C	15 mp
Növekedés		68 °C	20 mp/kb
Tartás	1	10 °C	

A PCR program futása alatt előkészítettem az agarózt a gélelektroforézishez. 1 g agarózhoz 100 ml 1x TBE puffert adtam, majd mikrohullámú sütőben víztiszta oldatot készítettem. Lassú csapvíz alatti hűtés után 100 µl 100 µg/ml etídium-bromid oldatot adtam hozzá. A fésűt a gélöntő formába helyeztem, majd buborékmentesen beleöntöttem a gélt. 20 perc alatt megszilárdult, és a futatókádba tettem. 5 µl létrát és 20 µl PCR terméket



2. ábra: A DNS agarózból való kivágása előtt látható a gél (balról jobbra: létra, G106, G110, G301, G322 törzsek PCR-terméke)

pipettáztam a zsebekbe, majd 80 V feszültséggel 1–1,5 órán át (2. ábra), futtattam, figyelve a festék útját.

A futtatást követően az Eppendorf-csövek tömegét lemértem, majd UV-fény alatt, szikével kivágtam a géldarabokat. A vágás előtt és után sterilizáltam a szikét etanolba mártva, leégetve. A kivágott géldarabokat Eppendorf-csövekbe tettem, és újra lemértem őket, korrigálva a csövek súlyával, hogy megkapjam a DNS-t tartalmazó géldarab tömegét.

A tisztítást NucleoSpin® készlettel végeztem. 100 mg agaróz gélhez 200 µl NTI puffert adtam, és 50 °C-on, 5-10 percig inkubáltam. Ezt követően mosókolonnákba pipettáztam a mintákat, centrifugáltam őket, és 700 µl NT3 puffert adtam hozzá, hogy eltávolítsam a gélmарadványokat, majd újra centrifugáltam a tisztítás érdekében.

A következő lépésben a mosó oszlop alján lévő szilika membránt szárítottam, hogy eltávolítsam a felesleges mosó puffer maradványokat. Ehhez 13000 rpm fordulatszámon 1 percig centrifugáltam a mintákat. Ezt követően új, steril Eppendorf-csőbe helyeztem a mosó kolonnát, majd 20 µl NE Buffert adtam a membránra, és 1 percig szobahőmérsékleten inkubáltam. A lépést 13000 rpm-en 1 perc centrifugálás követte, így az Eppendorf-cső tartalmazza az izolált, tisztított DNS mintát.

A mintákat a Eurofins Genomics céghez küldtem DNS szekvenálásra. A minták koncentrációját a Thermo Scientific NanoDrop spektrofotométer segítségével határoztam meg 260 nm-en. A szekvenáláshoz szükséges oldat koncentrációja 5–10 ng/µl és 15 µl térfogat volt. Az előállított oldat 10 ng/µl koncentrációjú lett, és a primerekkel 17 µl-es térfogatú mintát küldtünk el. A kapott eredmény 200–400 bp hosszúságú szekvenciák voltak, melyek alapján nem sikerült minden törzs faji meghatározása. Ezt követően a DNS mintákat a Eurofins BIOMI Kft.-hez küldtük, ahol a G313 törzset sikerült faji szinten beazonosítani, a másik kettő esetén ismét rövid szekvenciákat kaptunk.

A Eurofins BIOMI Kft. Petri-csészére kitenyészített törzsek esetén vállalja a szekvenálást a PCR-reakciótól egészen a faji azonosításig a teljes folyamat végrehajtását, így a G319-es és G322-es törzset ilyen módon küldtük el számukra, melynek köszönhetően sikerült a faji meghatározásuk.

3.6. Sótűrés vizsgálata

A sótűrés vizsgálatot tápoldatban végeztem el Bombolya Nelli diplomamunkájában (Bombolya, 2017) található módszer alapján. Baktériumokhoz nutrient tápoldatot (10 g pepton,

5 g glükóz, 3 g élesztő kivonat, 1000 ml csapvíz), míg a gombákhoz maláta tápoldatot (20 g maláta kivonat, 5 g glükóz, 1 g pepton, 1000 ml csapvíz) készítettem, majd a pH értéket 8-ra állítottam be. A vizsgálatot a 3. táblázatban szereplő sókoncentrációk mellett végeztem. A tesztrendszerben 20%-os a hígulást, így ezt is figyelembe véve az oldatok készítésénél a 3. táblázatban szereplő NaCl mennyiségeket mértem be.

Először a tápoldat komponenseit mérőlombikban összemértem, majd beállítottam a pH-t. A tápoldatot 100 ml-es csavaros üvegedényekbe szétmértem, majd hozzáadtam a szükséges sókat mind a nutrient, mind a maláta tápoldathoz. Ezután az üvegeket 121 °C-on, 1 bar nyomáson 20 percen át autoklávoztam.

3. táblázat: A sókoncentrációkhoz bemért NaCl mennyisége

sókoncentráció [%]	100 ml oldatba mért só mennyisége [g]	hígulást figyelembe véve 100 ml oldatba mért só mennyisége [g]
0,0	0,0	0,00
0,6	0,6	0,72
1,2	1,2	1,44
3,0	3,0	3,60
5,0	5,0	6,00
7,0	7,0	8,40
8,8	8,8	10,56
10,0	10,0	12,00
12,0	12,0	14,40
14,4	14,4	17,28
16,0	16,0	19,20

A beoltást mikrotitrátor lemezben végeztem, melyet 72 órán át 30°C-on sötétben inkubáltam, ferde agarra oltott mikrobákból. Egy steril kémcsőbe 4 ml 0,6%-os tápoldatot mértem, majd 2 kacsnyi mikrobát szuszpendáltam benne. Az optikai denzitás (OD) mérését DIALAB EL-800 típusú ELISA olvasóval végeztem, 0,1–0,2 OD értékre állítottam be 490 nm-en. Egy mikrotitrátor lemezbe 200 µl tápoldatot és 50 µl mikroba szuszpenziót mértem össze, 4 párhuzamos mérést végeztem. Kontrollként minden lemezen beoltatlan tápoldatokat mértem be, az adott sókoncentrációjú tápoldatokkal.

A mikrobák szaporodásának nyomon követését OD mérés segítségével végeztem 0, 24, 48 és 72 óra elteltével, mikrotitrátor lemezeken 30°C-on inkubálva. A méréseket 405, 450, 490 és 630 nm-en végeztem, de a 490 nm-es eredményeket használtam kiértékeléshez, mivel a sárga

színű tápoldatok esetén ez a legmegbízhatóbb módszer a laborban. A mikrotitrátor lemezen a gombák benőtték a mélyedés teljes felületét, ami megnehezítette az OD mérést, ezért kémcsöves mérést is végeztem, hogy a gombáknak több helyet biztosítsak a növekedéshez. A kémcsöves mérés nem mindig volt pontos, mivel 48 órás inkubálás után nehéz volt homogén mintát venni, és a gombák a tápoldat tetején kezdtek növekedni, vortexelés hatására sem keveredtek jól.

A mikroba szuszpenziót a fentebb leírtaknak megfelelően készítettem el. Steril kémcsövekbe kimértem 5-5 ml steril 0–16% sókoncentrációjú tápoldatokat. Minden sókoncentrációból 3-3 párhuzamos mérést végeztem. A kémcsövekbe 100 µl mikroba szuszpenziót mértem be. Kontrollként beoltatlan tápoldatokat alkalmaztam (3. ábra). Ezt



3. ábra: Kémcsövekben megismételt sótűrés mérés

követően egy mikrotitrátor lemezbe 100-100 µl-t mértem ki, majd megmértem az optikai densitását. A kémcsöveket 30 °C-on inkubáltam. Az OD mérést 0, 24, 48, 72 óra inkubálás után ismételtam meg.

A mikrotiteres mérések kiértékelése során az optikai densitás átlagainak változását 6 csoportba soroltam be: <0,4: szaporodás minimális, 0,4–0,6: kis mértékben szaporodik, 0,6–0,8; 0,8–1,0: közepes mértékben szaporodik, 1,0–1,2; 1,2<: nagymértékű szaporodást mutat. A kémcsöves mérések kiértékelése során az optikai densitás átlagainak változását 6 csoportba soroltam be.: <0,02: szaporodás minimális, 0,02–0,04: kis mértékben szaporodik, 0,04–0,06; 0,06–0,08: közepes mértékben szaporodik, 0,08–0,1; 0,1<: nagymértékű szaporodást mutat-

3.7. Hőmérséklettűrés vizsgálata

A hőmérséklet tűrés vizsgálatát 0,6%-os sókoncentrációjú nutrient és maláta tápoldatokkal végeztem. A 2 kacsnyi mikrobát 4 ml tápoldatban szuszpendáltam, majd mikrotitrátor lemezen 50 µl-t mértem ki, és 200 µl tápoldatot adtam hozzá. A mikrobaszaporodást 6 különböző hőmérsékleten vizsgáltam: 5°C-on a hűtőben, 15°C-on, 22°C-on, 30°C-on, 37°C-on és 42°C-on, a hőmérsékletekhez megfelelő inkubáló környezetekben. A 30°C-os mérést a sótűrés esetén elvégzett kísérletekben alkalmazott 0,6%-os sókoncentrációjú tápoldatban végeztem, így ennek az eredménye megegyezett a sótűréses méréssel. Az OD mérést a sótűrésnél ismertetett módszer alapján hajtottam végre.

A mikrotitrátor lemez rossz mérhetősége miatt a gombák esetén a hőmérséklettűrés mérést is megismételtém kémcsövekben. Minden kémcsőbe 5-5 ml 0,6%-os sókoncentrációjú maláta tápoldatot mértem ki, melybe 100-100 µl gomba szuszpenziót oltottam be. Kontrollként beoltatlan tápoldatokat használtam. A minták inkubálását a mikrotitrátor lemezes módszernél ismertett hőmérsékleteken végeztem. Az OD mérést mikrotitrátor lemezben végeztem, melyhez 100-100 µl mintát mértem ki az egyes kémcsövekből a mélyedésekbe.

3.8. A pH-tűrés vizsgálata

A pH-tűrés vizsgálatához biológiai puffereket használtam, melyeket Bombolya Nelli (Bombolya, 2017) a diplomamunkájában alkalmazott. A pufferekkel vizsgált pH értékek: 5, 6, 7, 8, 9 és 10.

A felhasznált puffer oldatok összetevői:

Citrát-foszfát puffer:

Törzsoldatok:

A-oldat: 0,1 M citromsav-monohidrát (21,01 g/l)

B-oldat: 0,2 M Na₂HPO₄·2H₂O (35,6 g/l)

Puffer rendszer összeállítása:

pH=5 esetén: 23,3 ml A-oldat + 26,7 ml B-oldat → 100 ml-re hígítva tápoldattal

pH=6 esetén: 16,9 ml A-oldat + 33,1 ml B-oldat → 100 ml-re hígítva tápoldattal

Foszfát puffer:

Törzsoldatok:

A-oldat: 0,2 M NaH₂PO₄·H₂O (27,6 g/l)

B-oldat: 0,2 M Na₂HPO₄·2H₂O (35,6 g/l)

Puffer rendszer összeállítása:

pH=7 esetén: 28,0 ml A-oldat + 72,0 ml B-oldat → 200 ml-re hígítva tápoldattal

Tris-(hidroximetil)-aminometán (TRIS) puffer:

Törzsoldatok:

A-oldat: 0,2 M TRIS (24,2 g/l)

B-oldat: 0,2 M HCl

Puffer rendszer összeállítása:

pH=8 esetén: 50 ml A-oldat + 21,9 ml B-oldat → 200 ml-re hígítva tápoldattal.

A recept alapján összemért pH = 8-as puffer rendszer pH-értéke 2 – 3 körül mozgott többszöri összemérés, illetve friss oldatkészítés után is. Így a megismételt kémcsöves mérés esetén 10 ml TRIS oldathoz folyamatos pH-mérés mellett HCl-t adagoltam, amíg a pH-érték el nem érte a

8,2-t. A klávozást követően pH-érték csökkenésre számítottam, emiatt nem állítottam be a 8,0-ás pH-értéket.

Karbonát-bikarbonát puffer:

Törzsoldatok:

A-oldat: 0,2 M vízmentes nátrium-karbonát (21,2 g/l)

B-oldat: 0,2 M nátrium-hidrogén-karbonát (16,8 g/l)

Puffer rendszer összeállítása:

pH=9 esetén: 38,5 ml A-oldat + 11,5 ml B-oldat → 200 ml-re hígítva tápoldattal

pH=10 esetén: 45,0 ml A-oldat + 5 ml B-oldat → 200 ml-re hígítva tápoldattal

A törzsoldatok és az alap nutrient, illetve maláta tápoldatok elkészítését követően 121°C-on, 1 bar nyomáson 20 percen át autoklávoztam az oldatokat. A puffer rendszereket ezt követően állítottam össze, a nutrient és maláta tápoldatokkal hígítva is elkészítettem.

A 2 kacsnyi mikrobát 4 ml tápoldatban szuszpendáltam, majd a mikrotitrátor lemezbe ebből 50 µl-t mértem ki és 200 µl összeállított puffert adtam még hozzá.

Az OD mérést a sötűrésnél ismertetett módszer alapján hajtottam végre (4. ábra).



4. ábra: 72 órás mérés 22 °C-on inkubált hőmérséklet tűrés mikrotitrátor lemeze

A mikrotitrátor lemez rossz mérhetősége miatt itt is megismételtem a mérést a gombok esetén kémcsövekben, melyekhez friss puffer oldatokat készítettem. A kémcsövekbe minden pH-érték esetén 3 párhuzamos mérést végeztem, melyhez 5-5 ml tápoldatot mértem ki. Az inkubálást és az OD mérést a sötűrésnél, illetve hőmérséklet tűrésnél leírtak alapján végeztem.

A mérés összeállítását követően egy mikrotitrátor lemezbe 250 µl-t mértem ki mindegyik oldatból, hogy lemérjem az oldatok végső pH-értékét, ami a klávozás következtében változhatott (4. táblázat).

4. táblázat: pH-tűrés vizsgálata során elérni kívánt pH-értékek alakulása a mérés során

Elérni kívánt pH-érték	Húslé tápoldat végső pH-értéke	Maláta tápoldat végső pH-értéke
5	5,55	5,13
6	6,20	6,04
7	7,05	6,54
8	3,00	7,9
9	9,20	8,64
10	9,31	8,37

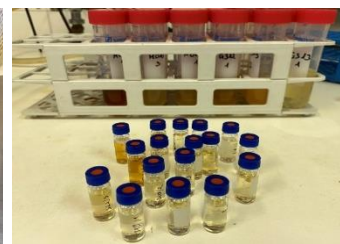
3.9. Savtermelés vizsgálata

A savtermelés vizsgálatot szacharózos oldatban végeztem melynek elkészítéséhez 100 g/l szacharózt, 0,5 g/l KNO_3 -ot, 0,5 g/l KH_2PO_4 -ot, 2 g/l élesztőkivonatot és 2 g/l húspeptont mértem össze. A méréshez Erlenmeyer lombikokat alkalmaztam, melyeket vattadugóval lezártam. Az oldatot és a lombikokat 121 °C-on, 1 bar nyomáson, 20 percen át autoklávoztam a sterilitás biztosítása érdekében. Az autokláválás után steril fülke alatt 30 ml szacharóz oldatot mértem ki minden lombikba, melybe 1 kacsnyi mikrobát szuszpendáltam. Mikrobánként 3-3 párhuzamos mérést végeztem. A tenyészeteket ezután egy Thermo Scientific MaxQ 800 típusú rázótermosztátba helyeztem, ahol 7 napon keresztül, 30 °C-on, 120 rpm sebességgel rázattam őket (5. ábra).



5. ábra: A savtermelés vizsgálatához összeállított minták rázótermosztátba való behelyezése

A rázást követően a mintákat autoklávoztam, majd Falcon-csővekbe szűrtem. A szűrletből fecskendővel 1,5 ml mintát 0,25 µm-es nitrocellulóz szűrőn keresztül HPLC üvegfiolába szűrtem (6. ábra).



6. ábra: 7 nap rázást követően az M021 törzs savtermelés mintái (balra), a minták szűrését követően a HPLC fiolákba átszűrt minták (jobbra)

A mintákat fagyasztóban, a maradék szűrletet hűtőben tároltam.

A HPLC mérések során Aminex ionkizárásos HPX-87H kationcserélő (BioRad, Hercules, CA, USA) kolonnát használtunk, amelynek hőmérséklete működés közben 65 °C volt. Eluensként 5 mM kénsavat alkalmaztunk, melynek áramlási sebessége 0,5 ml/perc volt, detektorként Shimadzu RID-10A (Shimadzu, Kyoto, Japan) típust használtunk.

3.10. EPS-termelés vizsgálata

Az exopoliszacharid termelést Bombolya Nelli (Bombolya, 2017) dolgozatában leírt módszer alapján végeztem.

A mérés megkezdése előtt készítettem egy alap oldatot, illetve egy nyomelem oldatot.

Alap oldat összetétele:

80 g szacharóz, 5,1 g KNO_3 , 1 g K_2HPO_4 , 0,8 g KH_2PO_4 , 0,4 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g CaCl_2 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -val helyettesítettem), 0,01 g MnSO_4 ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -

val helyettesítettem), 1 g NaCl, 0,1 g élesztőkivonat, 0,1 g tripton, 0,1 g szója pepton, 1 ml/l nyomelem oldat

Az alap oldat pH-értékét az összeállítás után pH=7-re állítottam be, majd 121 °C-on 1 bar nyomáson 20 percen át sterilizáltam.

Nyomelem oldat összetétele:

0,3 g H_3BO_3 , 0,2 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,003 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,002 g $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,001 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 liter 1M HCl oldat

A sterilizálás után az oldatot 30 ml-ként steril Falcon-csőbe mértem ki, majd az 1 héten keresztül inkubált ferde agaron lévő mikrobákból végeztem el a beoltást. A recept szerint a minimum beoltási sejtszám 10^9 CFU/ml, így 3 kacsnyi mikrobával végeztem el a Falcon-csövekben található alap oldat beoltását. Ezt követően 7 napig 30 °C-on 300 rpm-en rázattam a törzseket. Kontrollként az 30 ml alap oldatot alkalmaztam.

A rázatást követően 35 percen keresztül 8000 rpm-en centrifugáltam a mintákat. Ezt követően a felülúszóból 2,5 ml-t kémcsőbe mértem ki, majd 2,5 ml desztillált vízzel hígítottam. A kémcsöveket lezártam, majd 40 °C-os vízfürdős termosztátba helyeztem 2 órára, 10–15 percenként vortexeltem a kémcsöveket a megfelelő kevertetés elősegítése miatt. A vízfürdőből való kivétel után 7,5 ml 2-propanolt adtam hozzá a kémcsövekhez.

Az EPS-termelést azonnali fehér opálos szín megjelenése, viszkozitásváltozás jelezte.

3.11. Sziderofór termelés vizsgálata

A sziderofór termelés vizsgálatát Bombolya Nelli diplomamunkája (Bombolya, 2017) alapján végeztem el néhány módosítással.

A mérés megkezdése előtt 6 M-os HCl-oldatot készítettem, mellyel minden üvegeszközt elmostam, amelyet a mérés során használtam, hogy megszabaduljak a kis mennyiségben jelenlévő fémektől. Ezt követően ultra tiszta vízzel öblítettem át az eszközöket.

Kék festék elkészítése:

1. oldat: 0,06 g CAS (Chrome azurol S) 50 ml ultra tiszta vízben feloldva
2. oldat: 0,0027 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 ml 10 mM-os HCl-ban feloldva
3. oldat: 0,073 g HDTMA (hexadecil-trimetil-ammónium-bromid, más néven cetrimonium-bromid) 40 ml ultra tiszta vízben feloldva

Az 1. 50 ml-es oldathoz hozzáadtam 9 ml-t a 2. oldatból, majd ehhez hozzáadtam a 3. 40 ml-es oldatot, így egy liláskék oldatot kaptam, amelyet 121 °C-on, 1 bar nyomáson, 20 percen át autoklávoztam.

Keverék oldat elkészítése:

- MM9 sóoldat: 3 g KH_2PO_4 -ot, 5 g NaCl -ot és 10 NH_4Cl -ot 100 ml ultra tiszta vízben oldottam fel.
- NaOH-oldat: 25 g NaOH -ot 150 ml ultra tiszta vízben oldottam fel (pH~12)
- tripton oldat:
3 g tripton 27 ml ultra tiszta vízben oldottam fel. A tripton oldat vastalanítását kloroformban végeztem el 3%-os 8-hidroxi-kinolin oldat extrakciójával. Az extrakciót rázótolcsér segítségével hajtottam végre. Az extrahálást 3x végeztem el, amelyhez összesen 90 ml kloroform oldatot használtam. A vastalanítás hatására a tripton oldat színe sötétebb lett. Az oldatot sterilen szűrtem 0,45 μm -es szűrőn keresztül.
- glükóz oldat: 4 g glükózt 20 ml ultra tiszta vízben oldottam fel, majd a felhasználás előtt 0,45 μm -es szűrőn sterilen szűrtem.

Agar elkészítése:

- 750 ml ultra tiszta vízhez 100 ml MM9 sóoldatot adtam hozzá
- 32,24 g PIPES-t (piperazin-N,N'-bis(2-etánszulfonsav)) feloldottam az előzőleg összeállított oldatban
 - a PIPES pH=5 alatt nem oldódik fel
 - az oldat pH-értékét 6-ra felemltem, majd lassan (3 részletben) hozzáadtam a PIPES-t folyamatos keverés mellett
 - a PIPES oldásával a pH csökkenni kezdett, az oldat kitisztult
 - keverés közben lassan 6,8-ra emeltem az oldat pH-értékét, amelyet túllépve az oldat színe zöldre változik, így nem használható fel
- 15 g agart adtam hozzá az oldathoz
- 121 °C-on, 1 bar nyomáson 20 percen át autoklávoztam, majd vízfürdő segítségével 50 °C-ig hűtöttem és ott tartottam az agar hőmérsékletét
- az 50 °C-os vízfürdőből kivettem az oldatot, majd hozzáadtam steril körülmények között 30 ml steril tripton-oldatot és 10 ml steril glükóz oldatot, majd 100 ml kék festéket is folyamatos kevergetés közben

- pipetta segítségével minden Petri-csészébe 10 ml agart pipettáztam, majd hagytam megszilárdulni.

A beoltást frissen végeztem el a ferde agarra oltott 72 órán keresztül 30 °C-on inkubált mikroorganizmusokkal. Egy Petri-csészét 3-felé osztottam fel, majd mindegyik részét ugyanazzal a törzsszel oltottam be.

A beoltott agarokat 30 °C-on inkubáltam 72–96 órán át, majd kiértékeltem a sziderofór termelést. Ezt követően még 5 napig szobahőmérsékleten tároltam a Petri-csészéket, hogy megfigyeljem történik-e változás.

A mérés elve, hogy a CAS és a HDTMA indikátorok szoros komplexet képeznek a vas-ionokkal, amellyel kék színű oldatot kapunk. Ha egy erős vas-kelátor, például sziderofór „kihúzza” a vasat a festék komplexből, akkor a szín kékről citromsárgára, narancssárgára vagy rózsaszínűre változik.

3.12. Statisztikai analízis

A vörösiszap jellemzőinek meghatározása esetén, illetve a só-, hőmérséklet- és pH-tűrés mérések során a mintákban bekövetkező változások szignifikanciájának vizsgálatához statisztikai analízist alkalmaztam.

Az ANOVA vizsgálatot StatSoft® Statistica 7 programmal végeztem, melyben egy egyváltozós (one-way) variancia-analízist (ANOVA: ANalysis Of VAriance) használtam fel. Az adatok normális eloszlás ellenőrzésének vizsgálatához a Cochran C, Hartley, Barlett homogenitási tételt alkalmaztam. Ha az adatok megfeleltek a követelmények a mérések összehasonlítására a Fisher LSD (least significant difference – legkisebb szignifikáns differencia) statisztikai próbát használtam. Ha a követelmények nem teljesültek, abban az esetben a Neuman-Keuls-féle tesztet alkalmaztam, amely inhomogén sokaság vizsgálatára alkalmazható. Az átlagok kontrolltól való eltérését $p < 0,05$ -ös szignifikanciaszinten vizsgáltam.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Vörösiszap jellemzői, tulajdonságai

A 4 féle vizsgált vörösiszap minta pH-értékének, vezetőképességének, nedvességtartalmának eredményeit a 5. táblázatban összesítettem.

5. táblázat: A vizsgált vörösiszap minták pH-értéke, vezetőképessége, nedvességtartalma

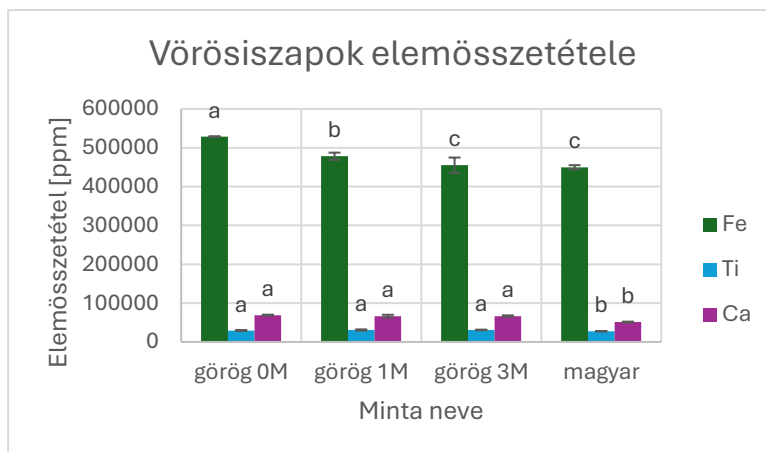
Minta	pH [-]	Vezetőképesség [mS/cm]	Nedvességtartalom [%]
görög 0M	10,25±0,13 a	1,68±0,05 a	29,77±0,7 a
görög 1M	9,55±0,12 a	1,79±0,01 b	17,02±0,17 b
görög 3M	9,62±0,02 a	1,46±0,03 c	17,60±0,32 b
magyar	9,84±0,02 a	7,02±0,06 d	14,02±0,23 c

Az 1 és 3 hónapos görög, illetve a magyar vörösiszap minták pH-értéke között nincs szignifikáns különbség, a friss görög vörösiszap mintához képest 7%-os csökkenést mutatnak, de így is 10-es pH érték körül mozognak, amely a vörösiszapban a lúgmentesítő mosást követően visszamaradt NaOH-nak köszönhető.

A minták vezetőképességének értékei között a magyar vörösiszapé volt a legmagasabb, minden minta vezetőképessége között szignifikáns különbség állapítható meg.

A görög vörösiszap minták esetén a nedvességtartalom a vártak megfelelően alakult. A friss minta nedvességtartalma a legmagasabb, míg az 1 hónapos és 3 hónapos minta esetén nincs szignifikáns különbség. A magyar vörösiszap nedvességtartalma a legalacsonyabb, szignifikáns eltérést mutat az 1 és 3 hónapos görög minta eredményétől.

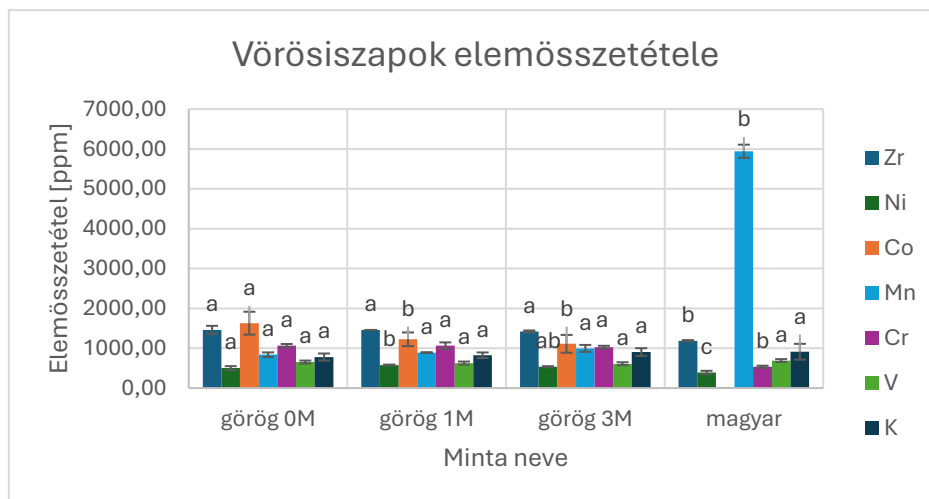
A NITON XRF röntgenfluoreszcens spektrométerrel végzett elemtartalom mérés esetén a fémek eloszlásából jól látszik, hogy mennyiségüket befolyásolja, hogy milyen, honnan származó bauxit volt a timföldgyártás alapanyaga. Legnagyobb mennyiségben vasat tartalmaztak a minták, ezt követi a kalcium, ami megegyezik az irodalmazási fejezetben bemutatott összetétel adatok alapján várttal.



1. diagram: A 3 legnagyobb mennyiségben megtalálható (Fe, Ti, Ca) elem eredményének ábrázolása

A 3 legnagyobb mennyiségben található elemről (1. diagram) elmondható a statisztikai vizsgálat elvégzését követően, hogy a görög vörösiszap Fe tartalma szignifikánsan csökken a tárolás során, ezzel ellentétben a Ti és a Ca elemek mennyisége állandónak mondható. A magyar vörösiszapban található Fe mennyisége a 3 hónapos görög mintáéval egyezik meg, míg a Ti 11%-kal és a Ca pedig 23%-kal kisebb mennyiségben van jelen.

A görög minták esetén a Zr, Mn, Cr, V, illetve K esetén nem figyelhető meg szignifikáns változás a tárolás idejének előrehaladtával (2. diagram). A Ni mennyiségében emelkedés figyelhető meg az 1 hónapos mintában, majd a 3 hónaposban a két érték közé esik. Ez az ingadozás a bauxit közet inhomogenitásának valószínűsíthető. A Co mennyisége ezzel ellentétben csökkenést mutat a tárolás során.



2. diagram: A Zr, Ni, Co, Mn, Cr, V, K mennyiségi eredményének ábrázolása

A magyar vörösiszap esetén 18,5%-kal kevesebb Zr-t, 32,5%-kal kevesebb Ni-t tartalmaz, a Co mennyisége a mérési határnál alacsonyabb értékű. A Mn 6,5x magasabb koncentrációban van jelen a görög vörösiszaphoz képest, míg a Cr koncentrációja 50%-kal kisebb. A V és a K nem mutat szignifikáns különbséget a görög mintához képest.

Ezen a nagy mennyiségben jelenlévő fémek visszanyerése a vörösiszapból egy fontos cél lehetne újrahasznosítás céljából. A ritkaföldfémek jelenlétének vizsgálata szintén egy fontos tulajdonságát mutatja meg a bauxitmaradványnak, amelyet a méréseink során mi nem vizsgáltunk, a jövőben ezzel is érdemes kutatásokat végezni.

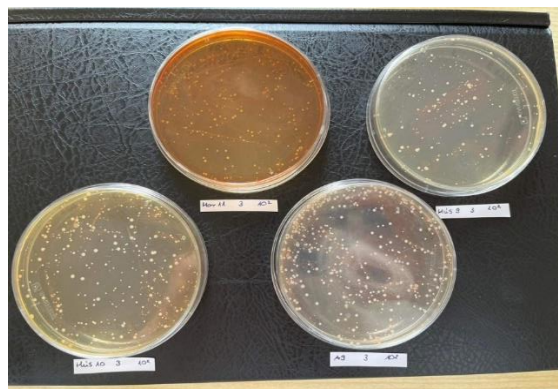
A ritkaföldfémek közül a vörösiszapban jelentősebb mennyiségben található szkandium. Az XRF nem méri pontosan a Sc mennyiségét, viszont egy publikáció alapján a görög vörösiszap 120 ppm, míg a magyar 80 ppm ritkaföldfémeket tartalmaz (Ujaczki et al., 2018).

Az alacsony koncentrációjú Sc bányászati, illetve az ipari minőségű előállítása jelentős környezeti terhelést okoz. SCALE (Scandium Aluminium Europe Project) EU H2020 kutatási projekt keretében kifejlesztettek egy új Sc termelési útvonalat, amely 100 ppm koncentrációjú ritkaföldfém kinyerését teszi lehetővé korszerű, környezetbarát módon. A folyamat során tiszta ScF_3 -ra és Sc_2O_3 -ra koncentrálnak és tovább finomítják 2%-os Sc-tartalmú alumínium-szkandium mesterségesített alakítva (Hengevoss et al., 2024).

4.2. Mikrobák izolálása, fenntartása

Az első izolálás során 46 morfológiailag különböző mikrobát sikerült elkülönítenünk, izolálnunk a mintákból.

A friss, 0 hónapos mintából 2 törzs izolálása sikerült csak 10^4 -es hígítás esetén, kevés baktériumtelep nőtt ki a Petri-csészék felületén. Az 1 hónapos vörösiszapból már több mikroba izolálása sikerült, melynek során 14 mikroba elkülönítése sikerült mind a 10^2 , 10^3 , 10^4 -es hígítások esetén. A legtöbb mikrobát a 3 hónapos mintából sikerült izolálnunk, többségében 10^2 és 10^3 -os hígításokból (7. ábra). Ez az eredmény



7. ábra: Első izolálás során 48 óra 30 °C-on való inkubálás után kinőtt telepek

megfelelt a vártnak: a környezetbe kikerült vörösiszapon feltehetőleg megtelepedtek az onnan bekerülő mikroorganizmusok.

A táptalajok közül a Halofil agaron nem nőttek ki a mikrobák, a táptalajon 1 hét inkubáció után sókiválásokat figyeltünk meg. A Pikovskaya-agarról 2 törzs izolálása volt sikeres. A további táptalajokat nagyobb diverzitás, illetve telepszám jellemezte.

A második izolálás során 13 telepet sikerült elkülönítenünk az antibiotikummal kezelt mintákból való szélesztést követően, az összesen 27 izolált mikrobából. Mindegyik táptalaj esetén kb. 8–9 db mikrobát különböztettünk meg a törzsgyűjteményünkbe (8. ábra).



8. ábra: 9-es pH-értékű maláta és Sabouraud-agaron kifejlődött telepek 72 óra 30 °C-on történő inkubálását követően

A törzsgyűjteménybe bekerült mikroorganizmusok között megtalálható volt fehér, citromsárga, piszkosfehér, halvány barna, színtelen, rózsaszín színű ép, szabálytalan, lebenyes szélű telepek is.

Az izolálást követően 2 tisztító szélesztés (9. ábra) elvégzése után oltottuk át őket ferde agarra. A nyár előtt május végén végeztünk egy nagy, minden törzset érintő törzsfenntartáshoz szükséges átoltást. Augusztus végén-szeptember elején a szünet leteltével megismételtük a törzsek átoltását, mely során a fajoknak több idő kellett a kifejlődésükhöz, így a jövőben érdemes 1-2 havonta felfrissíteni a sejteket. Az átoltások során néhány fajt nem tudtunk megtartani, próbálkoztunk esetlegesen másik táptalajra való átoltással is. A törzseket érdemes lenne glicerinben -40 °C-on lefagyasztva tárolni a mutációk és törzselvesztés megelőzése érdekében.



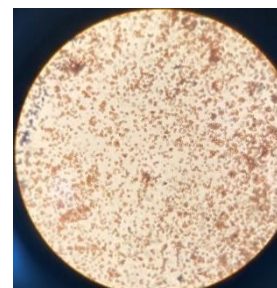
9. ábra: Az általam kiválasztott M021 törzs az 1. tisztító szélesztést követően

4.3. Mikroszkopikus vizsgálat

G313-as törzs

A törzset az első izolálás alkalmával sikerült elkülönítenünk 10²-os hígított minta szélesztéséből, Pikovskaya-agarról. A telepek fehér-halvány sárga színűek, kicsi a méretük, ép széllel rendelkező kör alakúak, nyálkás a felületük. A ferde agarra történő átoltások során lassabban (3–4 nap alatt) fejlődnek ki a telepek.

A Gram-festés során a sejtek alakját a megfestődés miatt jobban meg tudtam figyelni, kokkusz alakú sejtek jellemzik a törzset, amelyek között diplokokkuszokat, illetve tetrádokat is véltem felfedezni. A festődés során a sejtek rózsaszínűek voltak, amely Gram-negatív baktériumokra utal (10. ábra).

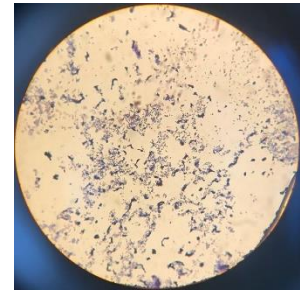


10. ábra: G313-as törzs Gram-festésének mikroszkópos felvétele 400x-os nagyításon

G319-es törzs

A törzset az első izolálás alkalmával sikerült elkülönítenünk 10^3 -os hígított minta szélesztéséből 9-es pH-értékű húslé agarról. A telepek halvány rózsaszín színűek, az öregedés során a színük élénk rózsaszínné vált. A ferde agarra történő átoltások során gyorsan, 24–48 óra alatt telepet képez.

A Gram-festés során a sejtek rövid pálca alakú, Gram-pozitív sejteket figyeltem meg (11. ábra).

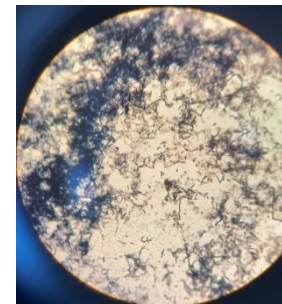


11. ábra: G319-es törzs Gram-festésének mikroszkópos felvétele 400x-os nagyításon

G322-es törzs

A törzset az első izolálás során különítettük el 10-es pH értékű húslé agarról, 10^3 -os hígításból. A telep színe üveges, halványfehér színű. A ferde agarra történő átoltások során gyorsan, 24–48 óra alatt.

A Gram-festés során pálca alakú, Gram-pozitív sejtek voltak megfigyelhetők, ahol a sejtek több helyen is összetapadva hosszú láncot képeztek (12. ábra).



12. ábra: G322-es törzs Gram-festésének mikroszkópos felvétele 400x-os nagyításon

M006-os törzs

A törzset a második izolálás alkalmával sikerült elkülönítenünk 9-es pH-értékű maláta agaron, a tömény mintából szélesztettük ki. Külső megjelenésre telepei fehéres-narancssárgás színűek, melyen opálos színű gombaszerű kidomborodások figyelhetők meg (13. ábra).



13. ábra: M006-os törzs ferde agaron

M010-es törzs

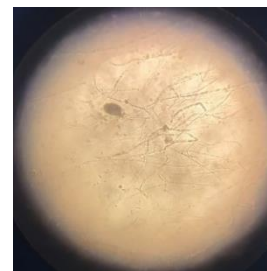
A törzset a második izolálás során sikerült elkülönítenünk 9-es pH-értékű maláta agaron, melyet tömény mintából szélesztettünk. Telepei aprók, fekete színűek. A mikroszkópos képen megfigyelhető a törzs spóratartó tokja (14. ábra).



14. ábra: M010-es törzs mikroszkópos felvétele 400x-os nagyításon

M021-es törzs

A törzset a második izolálás során sikerült eredeti pH-értékű Sabouraud-agarra széleszteni 10x-es hígításból. Telepei fiatal korában fehérek, majd krémszínűvé válnak, megjelennek a spóratartó tokok. A mikroszkópos képen megfigyelhető a gomba fonalas felépítése (15. ábra).



15. ábra: M021-es törzs mikroszkópos felvétele 400x-os nagyításon

4.4. Mikrobák identifikálása

A mintát 4 irányból szekvenálták meg, hogy a belső régiók is 2x-es lefedettségben legyenek jelen. A cégtől az EzBioCloud programba való feltöltés után kapott fajnevet, illetve a szekvenciákat kaptuk meg.

6. táblázat: A törzs szekvenciájának egyezése, bázispár eltérése az adatbázisban talált faj szekvenciájához képest

Törzs	Faj	Egyezés a szekvenciával [%]	Bázispár eltérés [db]
G313	<i>Micrococcus luteus</i>	99,70	1314/1318
G319	<i>Dietzia cercidiphylli</i>	100	1397/1397
G322	<i>Peribacillus frigoritolerans</i>	99,93	1427/1428
M006	<i>Sarocladium kiliens</i>	100	523/523
M010	<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	99,79	470/471
M021	<i>Aspergillus iizukae</i>	99,82	541/542

A 6. táblázatban összefoglaltam, hogy az adatbázisban lévő szekvenciákkal a törzseim milyen mértékben egyeztek, illetve hány darab bázispárban tért el egymástól a két szekvencia. Minden esetben 99,7% feletti egyezést találtam, a bázispár eltérés 1-2 db volt. Két esetben (*Dietzia cercidiphylli* G319 és *Sarocladium kiliens* M006 törzsek) a szekvenálás eredménye 100% egyezést mutatott az adatbázisban megtalálható szekvenciákkal.

G313-as törzs

A G313-as a baktérium szekvenciája a *Micrococcus luteus* fajjal egyezik meg.

A G313-as törzs a *Micrococcaceae* családba tartozik. Gram-pozitív vagy Gram-változékony (Lee et al., 2020), kokkusz alakú opportunist, amely mozgásra nem képes, obligát aerob sejtlegzéssel rendelkezik. Megtalálható talajban, porban, vízben, illetve az emberi bőr flórájában. Képes nagy dózisú UV-sugárzást elviselni, valamint szennyezőanyagokat, mint például benzint képes lebontani (wickhammicro.co.uk), tolerálja a fémek jelenlétét. Képes aranyat kicsapni a felületén, amely alacsony koncentrációjú aranyércek feldolgozása esetén alkalmazható (Akbar et al., 2014) illetve képes nyugalmi állapotot mutatni spóráképzés nélkül. (wickhammicro.co.uk). A kolóniák kör alakúak, sárga színűek, domború és sima felszínnel. Optimális növekedési hőmérséklete 25 °C–37 °C, de 45 °C-on és 10% NaCl koncentrációban is képes növekedni (blog.microbiologics.com). Képes életképes, de nem tenyésztett baktériumokat életre kelteni egy kisméretű, reszuszcitációt elősegítő fehérje szekréciójával (Y. Li et al., 2021).

A Gram-festés során rózsaszínűre festődött meg a sejt, amely a Gram-változékonyására utal. A mikroszkópos képen diplokokkuszokat és tetrádokat is megfigyeltem.

G319-es törzs

A G319-es törzs a *Dietzia cercidiphylli*.

Felszíni sterilizáláson átesett növényi szövetekből izolálták Kína délnyugati részén (Y. Li et al., 2021). A faj vöröses narancssárgás kolóniákat képez triptikus szója agaron, a sejtek rövid pálca alakúak. Aerob, Gram-pozitív, nem mozgékony, kataláz enzimet termel. Negatív eredményt ad a következő tesztekben: oxidáz, Voges-Proskauer, metilvörös, H₂S és indol termelés, illetve zselatin és keményítő hidrolízis. Pozitív ureáz hidrolízis próbát ad. Optimális növekedési hőmérséklete 28 °C, de 10–37 °C közötti hőmérsékleten és a 10%-os NaCl-t is tolerálja. Optimális pH-értéke 7,0, de pH 6,0–9,0 között is nő (J. Li et al., 2008). Venezuelából származó nehezen lebomló olajjal szennyezett talajból is izolálták, képes lebontani ezeket az extra-nehezen lebomló olajokat, így talaj bioremediációjában lehet majd alkalmazni a jövőben (Dai et al., 2017).

Az általam meghatározott Gram-festődés szintén Gram-pozitív baktériumot mutatott, illetve a mikroszkópos felvételen a rövid pálca alakú sejteket is meg tudtam figyelni.

G322-es törzs

A G322-es minta a *Peribacillus* törzsbe tartozik, legvalószínűbb fajra pedig *Peribacillus frigoritolerans* kapták az adatbázisból.

Pálcika alakú, Gram-pozitív baktérium, eredetileg *Brevibacterium frigoritolerans* néven volt besorolva. Serkenti a növények növekedését és elnyomja a fitopatogének által okozott betegségeket (Świąteczak et al., 2023). Osztriga fehér színű telepeket képez, optimális növekedési hőmérséklete 28 °C, de 25–37 °C között is nő. Maximálisan 7,5%-os NaCl-t toleráló, aerob, obligát aerob baktérium. Negatív eredményt ad indol, illetve H₂S képzésre, viszont pozitív tesztet ad acetoin termelésre (bacdiva.dsmz.de).

Egy tanulmány a Thar-sivatagban található növényfajták tápanyagban szegény rizoszférájából származó baktériumok izolálását célozta, amelyek elősegítik a növények növekedését (PGPB faj), illetve a szárazságtűrést. Ezen fajok közül az egyik a *Peribacillus frigoritolerans* faj volt, melynek biokémiai tulajdonságai közé tartozik a foszfát, vas és nitrogén oldása, illetve exopoliszacharidok és auxin termelése (Marik et al., 2023).

A Gram-festés során én is Gram-pozitív baktériumot sikerült meghatároznom, melynek pálcá alakját is sikerült megfigyelnem a mikroszkópizálás során.

M006-os törzs

Az M006-os minta a *Sarocladium kiliense* fajba tartozik, amelyet korábban *Acremonium kiliense* néven ismerték. Mindenütt megtalálható talajszaprofita, de alkalmanként embereket is megfertőzhet (Fernández-Silva et al., 2014). Különböző táptalajokon különböző szín jellemzi őket. Glükóz-pepton agaron 30 °C-on lapos kolóniát alkotnak, amelyek szürkés-narancssárgás színűek. Mikroszkóp alatt a hosszú, vékony fiálidák végén ovális klamidiospórák helyezkednek el (Campbell et al., 2013). A faj a biotechnológiában korábban a *Cephalosporium* nemzetségbe tartozott, cefalosporin C-t termel, amely a penicillinhez hasonló antibiotikum. Képes a poliszacharidokat bontani, mint például lebontja a keményítőt, illetve épes lehet a talajban mangán oxidálására, valamint lúgos proteázok és amilázok termelésére is (*Sarocladium Kiliense*).

A mikroszkópizálás során jól megfigyelhetőek voltak számomra is a hifák, illetve az ovális klamidiospórák.

M010-es törzs

A faji meghatározás során *Gibellulopsis nigrescens* eredményt kaptuk. A faj egy növényi patogén, amelyet a talajból, illetve a növények szárának alsó részeiből izolálhatják. Átlátszó, vegetatív hifákkal, verticillium-szerű konídiumtartókkal, illetve pigmentált terminális vagy interkaláris klamidiospórákkal rendelkezik (Nguyen et al., 2018).

A mikroszkóp alatt nekem is sikerült megfigyelnem a hifákat, konídiumtartókat, illetve a pigmentált klamídióspórákat.

M021-es törzs

A faji meghatározás esetén a legvalószínűbb egyezésnek az *Aspergillus iizukae* fajt kaptam eredményül. A faj világszerte megtalálható a talajban, Romániában barlangi üledékből is izolálták. A kolóniák világos szürkés sárgásbarnás színűek, kiválasztott váladékot termelhetnek, mely sárgás, narancssárgás vagy akár barna színű is lehet. A konidiofejek fehérek, halványbarnák vagy barnák lehetnek (*Aspergillus iizukae*).

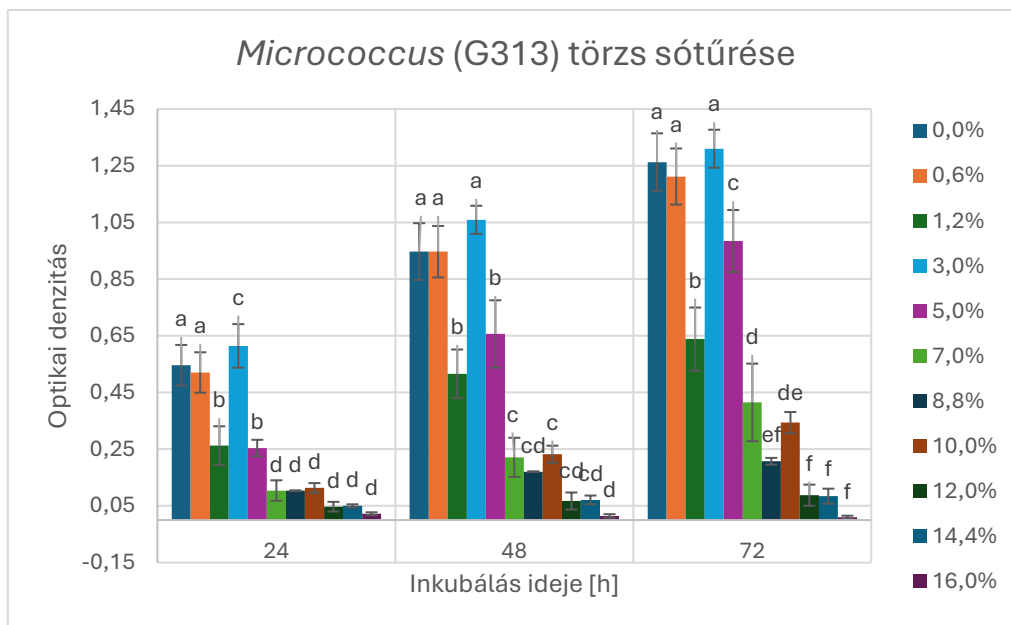
A saját törzsem sárgás folyadékot termelt. A mikroszkópos felvételen megfigyeltem a gomba hifáit, illetve a barna színű konidiofejeket is.

4.5. Sótűrés vizsgálata

A sótűrés kiértékelések során a baktériumokat, illetve a gombákat elkülönítve kezeltem a statisztikai elemzés során.

A mikrotiter lemezes mérés kiértékelése:

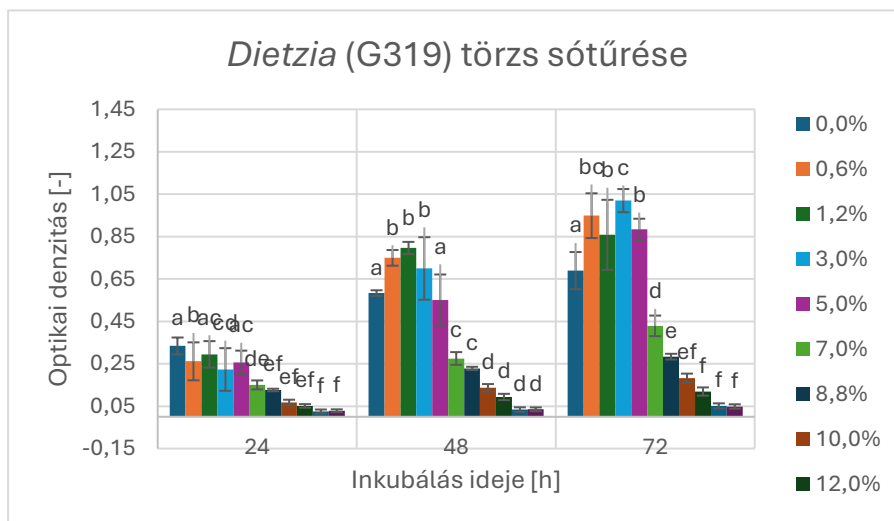
A *Micrococcus* (G313) törzs esetén 24 óra elteltével az optikai denzitások között szignifikáns változás figyelhető meg a 0–5%-os NaCl oldatok esetén (kivéve: 0–0,6%), míg az 5% feletti esetben az OD értékek nem tértek el egymástól és 0,1 OD alatt maradt az értékük, vagyis nem tapasztaltam szaporodást (3. diagram). A 48 órás inkubálási időnél mért eredmények esetén 0–0,6% és 3% NaCl oldatok esetén közepes mértékben szaporodott el a törzs, viszont az 1,2% és 5% esetén az OD szignifikánsan megegyezik, előbbi esetben kis mértékű szaporodás figyelhető meg, míg utóbbi esetben már közepes a szaporodás mértéke.



3. diagram: A *Micrococcus* (G313) törzs sóútírása esetén mért optikai denzitás értékeinek ábrázolása

A 72 órás inkubálást követően a 7–10%-os NaCl oldatban a mikrobák növekedése szignifikánsan eltért a 12–16%-os értékekhez képest, amelyek az előző mérésekben nem különböztek egymástól, viszont a szaporodás minimálisnak mondható. A 0; 0,6 és 3%-os sóoldatok esetén szignifikáns eltérés nem figyelhető meg az optikai denzitás növekedésében, de a 24 órás méréshez képest az értékük megnőtt, nagymértékű szaporodás figyelhető meg, míg 1,2%-os és 5%-os sókoncentráció esetén közepes mértékű a szaporodás.

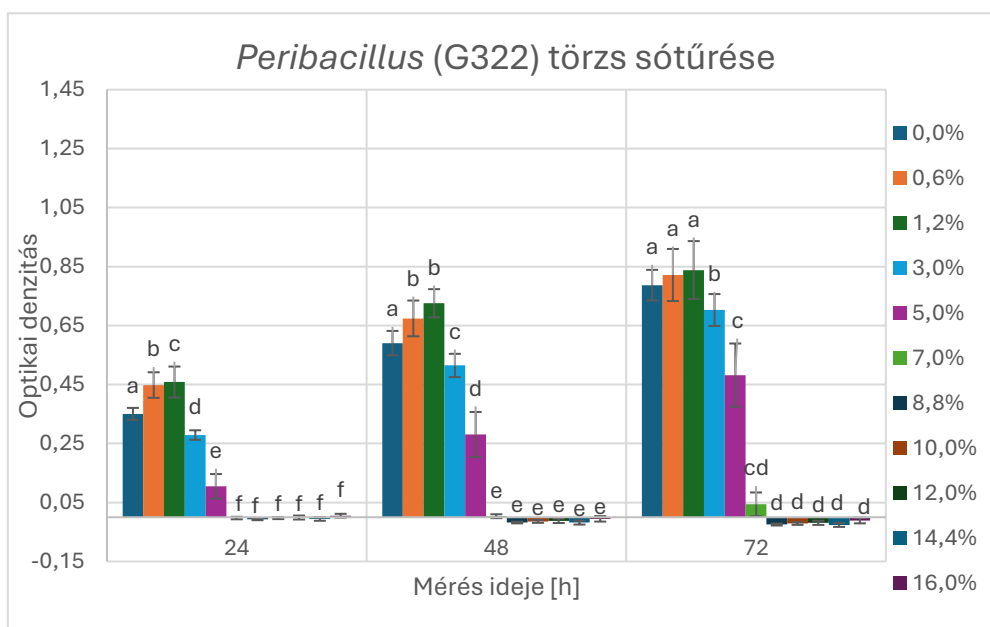
A *Dietzia* (G319) törzs esetén 24 óra elteltével 0–12%-os sótartalom esetén szignifikáns különbségek figyelhetők meg az optikai denzitásban, míg 12% fölött az értékek közel azonosnak mondhatók (4. diagram). A 48 órás inkubáció leteltével szignifikánsan megyezik az OD értéke 0% és 5% esetén, 0,6–3% között, 7–8,8%-nál.



4. diagram: A *Dietzia* (G319) törzs sóútírása esetén mért optikai denzitás értékeinek ábrázolása

Közepes mértékű a szaporodás a 0–5% sótartalom mellett. A 14,4–16% sótartalomnál a mérés ideje alatt szignifikáns növekedés nem figyelhető meg. A törzs sótűrés szempontjából megfigyelhető növekedési optimuma 0,6–5% NaCl koncentrációra tehető, amely esetén nagymértékű szaporodási kategóriába sorolható.

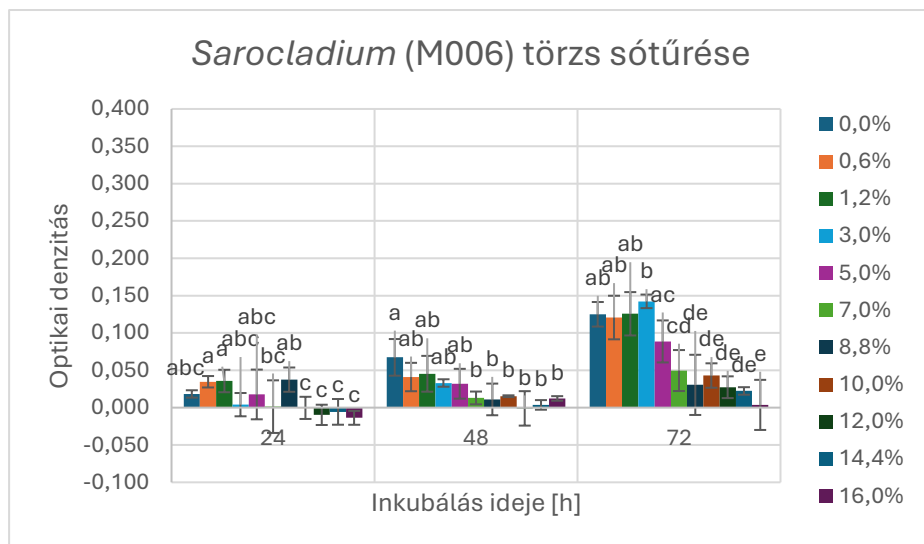
A *Peribacillus* (G322) törzs esetén a teljes mérés ideje alatt nem figyelhető meg változás az optikai denzitásban a 8,8–16%-os sótartalmú oldatok esetén (5. diagram), ezeknél a NaCl koncentrációknál nincs szaporodás. Szignifikánsan különbözött a 24 órás mérés során a 0%-os, 0,6%-os, 1,2%-os, 3%-os, illetve az 5%-os oldat optikai denzitása is. Ezek az értékek a 72 órás inkubálás végére úgy változtak meg, hogy 0–1,2%-os sótartalomnál nem figyelhető meg eltérés, míg a 3–7% között szignifikáns különbség adódott. A törzs 0–1,2%-os koncentrációjú oldatban mutatja a legnagyobb OD-értéket, amely a közepes szaporodás kategóriába esik bele.



5. diagram: A *Peribacillus* (G322) törzs sótűrése esetén mért optikai denzitás értékeinek ábrázolása

A kémcsöves mérés kiértékelése:

Az *Sarocladium* (M006) törzs esetén 48 óra inkubálás elteltével a 0,6–5% közötti sóoldatok szignifikánsan megegyeznek, míg a 0%-os szignifikánsan eltér és 7% feletti oldatok optikai denzitása is megegyezik (6. diagram). 72 órás inkubálást követően a 0–1,2% közötti mérések szignifikánsan megegyeznek, az optikai denzitás a 16%-os oldat esetén nem változik csak, a többi oldat esetén figyelhető meg növekedés. A kategóriákba való besorolás esetén 0–3% sótartalom esetén mutat nagymértékű növekedést.



6. diagram: A *Sarocladium* (M006) törzs sóútérése esetén mért optikai densitás értékeinek ábrázolása

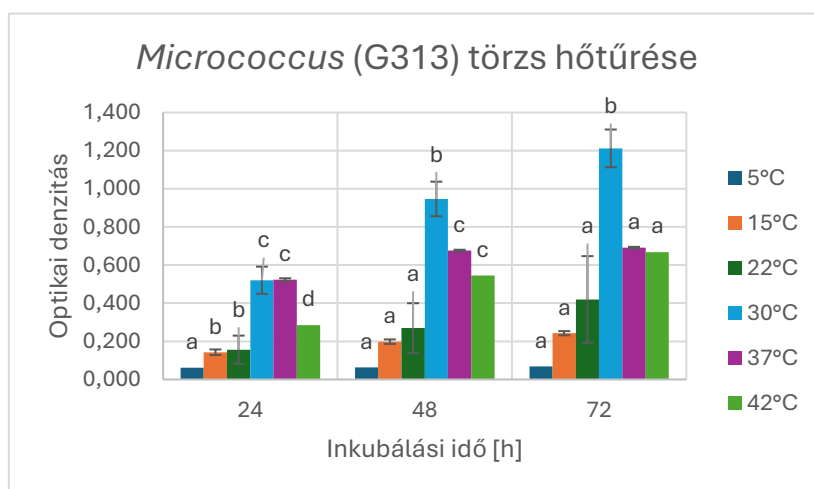
A *Gibellulopsis* (M010) törzs esetén szignifikáns különbség nem figyelhető meg a sóútérés értékek között (ezért az ábrát jelen dolgozatban nem mutatom be). Az *Aspergillus* (M021) törzs esetén a 72 órás mérés elteltével szintén nincs szignifikáns különbség az oldatokban szaporodó mikrobák OD-értéke között.

4.6. Hőmérséklettűrés vizsgálata

A hőmérséklet tűrés kiértékelését a sóútérésnél leírtak alapján végeztem el.

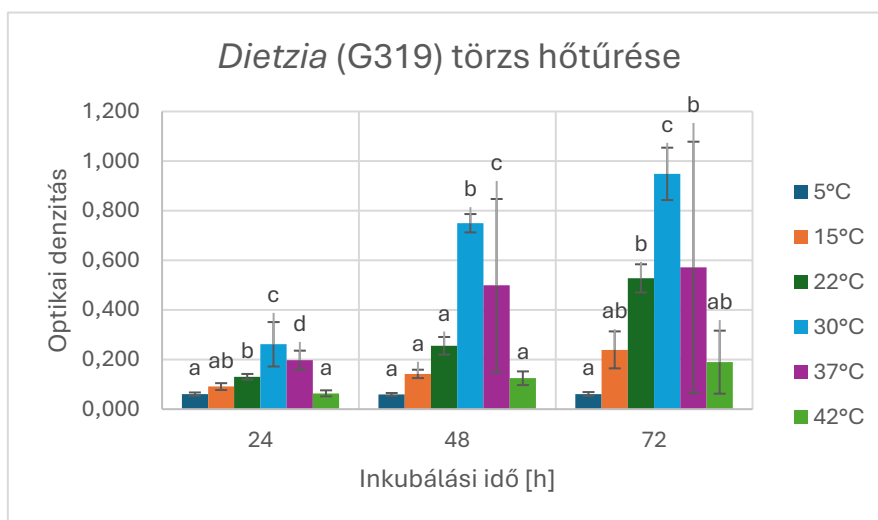
A mikrotiter lemezes mérés kiértékelése:

A *Micrococcus* (G313) baktérium esetén 24 óra inkubálás elteltével a 15 és 22 °C, illetve a 30 és 37 °C esetén szignifikánsan megegyezett az OD (7. diagram). 48 óra elteltével 30 °C-on volt mérhető a legnagyobb OD, illetve 5–22 °C és 37–42 °C esetében figyelhető meg OD egyezés.



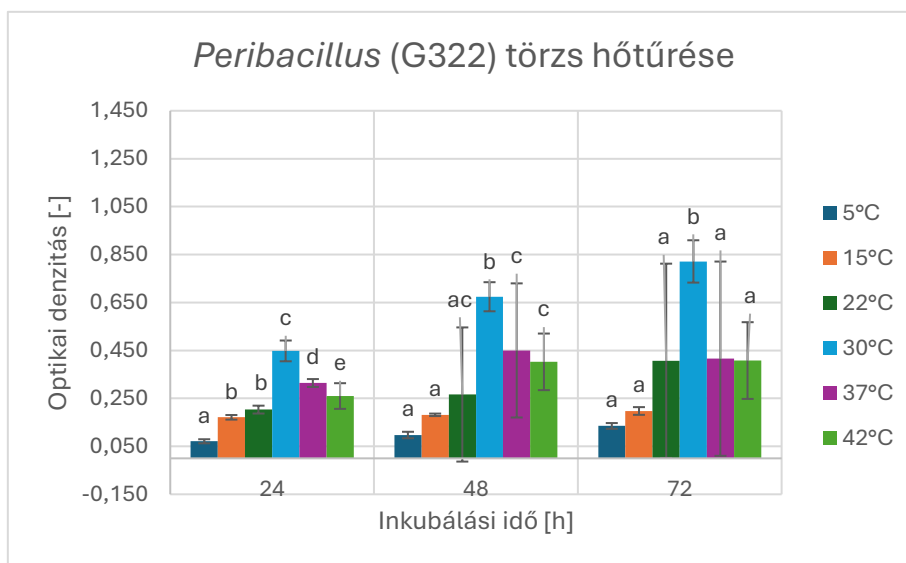
7. diagram: A *Micrococcus* (G313) törzs hőmérséklet-tűrés esetén mért optikai densitás értékeinek ábrázolása

72 óra inkubálás elteltével 30 °C esetén figyelhető meg szignifikáns eltérés, amelynél a kategóriába sorolás esetén 30 °C-on jelentős mértékű szaporodást mutatott. A 37 °C és 42 °C esetén közepes szaporodást mutatott a törzs.



8. diagram: A *Dietzia* (G319) törzs hőmérséklet-tűrés esetén mért optikai densitás értékeinek ábrázolása

A *Dietzia* (G319) törzs esetén 48 elteltével szignifikánsan megegyezett az OD 5–22 °C és 42 °C esetén, míg szignifikánsan különbözött a 30 °C és a 37 °C, melyek esetén közepes mértékű szaporodást mutat a törzs (8. diagram). 72 óra inkubálás után a legmagasabb OD érték 30 °C-on volt, illetve szignifikánsan azonosak voltak az OD értékek 15 °C-nál és 42 °C-nál, ahol a szaporodás minimálisnak mondható, illetve 22 °C-nál és 37 °C-nál sem figyelhető meg szignifikáns különbség. 30 °C-on nagymértékű szaporodást mutatott a törzs 72 óra inkubáció után, míg 22 °C és 37 °C esetén közepes szaporodást mutatott.

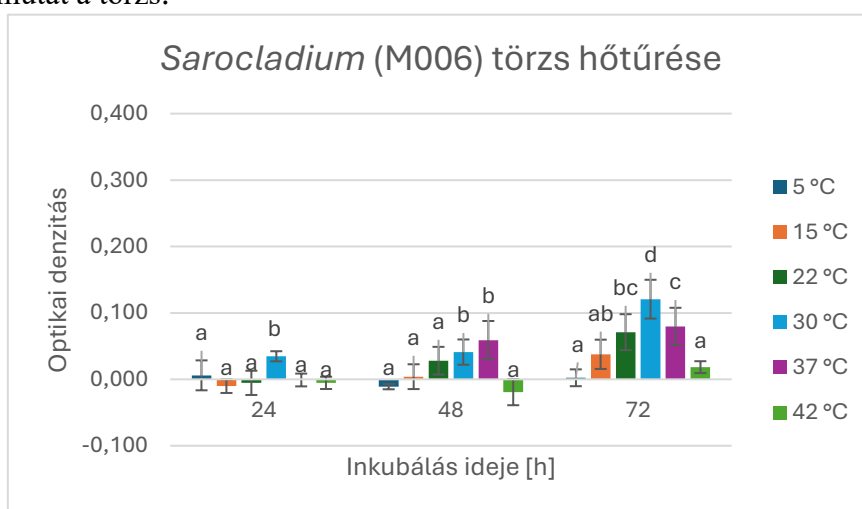


9. diagram: A *Peribacillus* (G322) törzs hőmérséklet-tűrés esetén mért optikai densitás értékeinek ábrázolása

A *Peribacillus* (G322) törzsnél 24 óra elteltével 30 °C, 37 °C és 42 °C esetén is észrevehető OD változás következett be, amelyek egymástól szignifikánsan eltértek (9. diagram). 48 óra inkubálást követően 30 °C-on közepes szaporodását mutatott. 72 óra inkubálás után szignifikánsan csak a 30 °C esetén tért el az OD értéke, amely hőmérsékleten nagymértékű szaporodást mutatott.

A kémcsöves mérés kiértékelése:

A *Sarocladium* (M006) törzs 24 óra elteltével csak 30 °C-on mutatott OD növekedést, majd a 48 órás mérés során 30 °C-on és 37 °C-on is (10. diagram). A 72 óra inkubálást követően szignifikánsan különbözik az OD értéke (kivéve 5 °C és 42 °C). 22 °C–37 °C-on magas szaporodást mutat a törzs.



10. diagram: A *Sarocladium* (M006) törzs hőmérséklet-tűrés esetén mért optikai densitás értékeinek ábrázolása

A *Gibellulopsis* (M010) törzs csak 72 óra inkubálás után mutatott szignifikáns különbséget az OD növekedés esetén (a diagramot jelen dolgozatban nem mutatom be). 22 °C és 37 °C-on mutatott nagymértékű szaporodást. Az *Aspergillus* (M021) törzs 72 óra inkubálást követően sem mutatott szignifikáns különbséget a különböző hőmérsékleteken való szaporodást illetően.

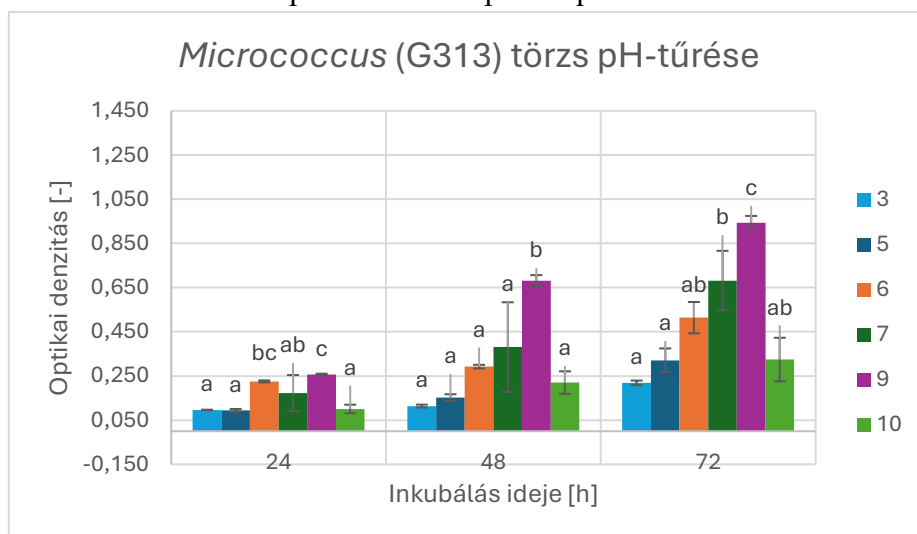
4.7. A pH tűrés vizsgálata

A pH-tűrés kiértékelését is a sőtűrésnél leírtak alapján végeztem el.

A mikrotiter lemezes mérés kiértékelése:

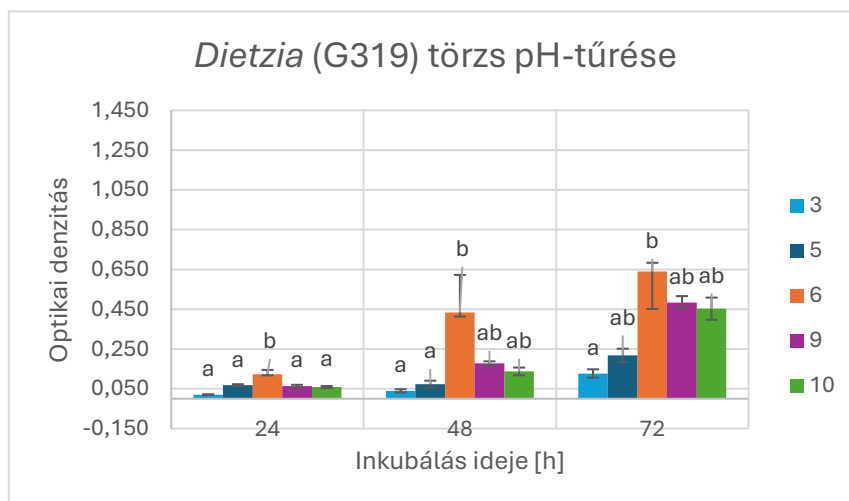
A *Micrococcus* (G313) törzs esetén 24 óra elteltével pH 6-os, 7-es és 9-es értéknél különbözött az OD szignifikánsan a többi pH értéken mért OD értéktől (11. diagram). 48 óra után 9-es pH tért el a többi mintától. 72 óra inkubálást követően 3–5-ös, 6-os és 10-es pH érték esetén nem figyelhető meg eltérés az OD értékben.

A törzs a 9-es pH értéken mutatott nagymértékű szaporodást, ez tekinthető a pH optimumnak a mikroba számára. A 6-os és 7-es pH esetén közepes szaporodást mutatott.



11. diagram: A *Micrococcus* (G313) törzs pH-tűrés esetén mért optikai densitás értékeinek ábrázolása

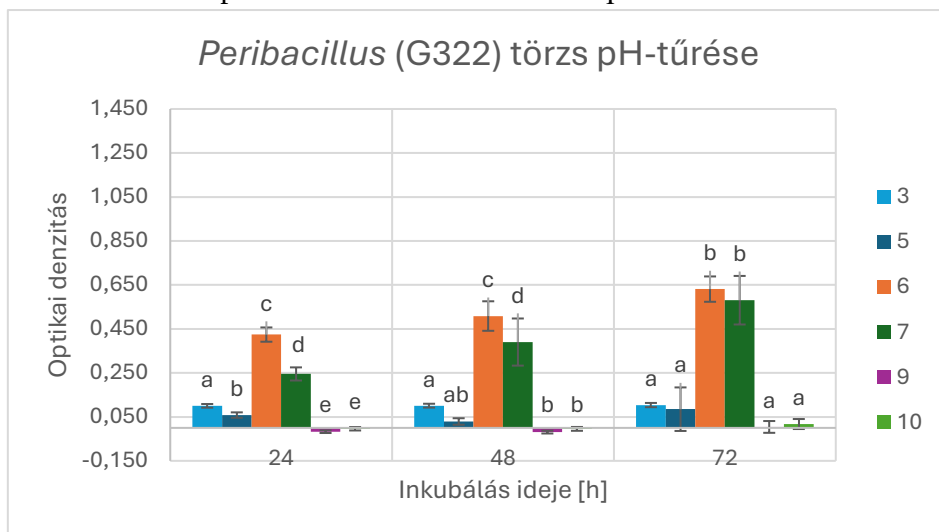
A *Dietzia* (G319) törzs 24 óra inkubálás után a 6-os pH-értéken mért OD különbözött szignifikánsan a többi pH értéken mért értéktől (12. diagram). 48 órát követően a 3–5-ös, illetve 9–10-es pH-értékek esetén az OD szignifikánsan azonosnak mondható. A 72 órás mérés során az 5-ös és 9–10-es pH-értéken az OD szignifikánsan megegyezett. A törzs közepes növekedést mutatott 6-os, 9-es és 10-es pH-értéken, ezen a pH-értékek mindegyike megfelelt a törzs számára.



12. diagram: A *Dietzia* (G319) törzs pH-tűrés esetén mért optikai densitás értékeinek ábrázolása

A *Peribacillus* (G322) törzs 9-es és 10-es pH-értéken nem mutatott OD változást, ezeken az értékeken nem tudott szaporodni (13. diagram). A 6-os, illetve 7-es pH-értéken szignifikánsan

azonosnak mondható a mért OD 72 óra inkubálási idő letelte után, melyeken közepes szaporodást mutatott. Ez a pH-érték tekinthető számára optimálisnak.

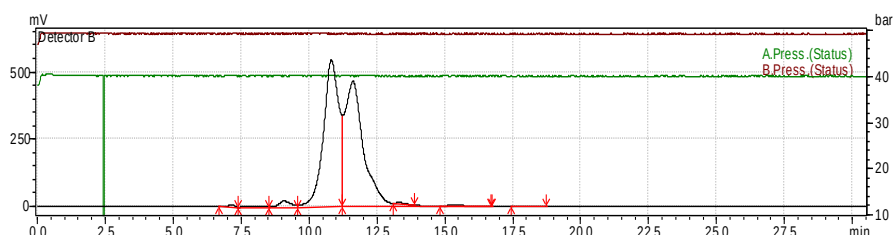


13. diagram: A *Peribacillus* (G322) törzs pH-tűrés esetén mért optikai densitás értékeinek ábrázolása

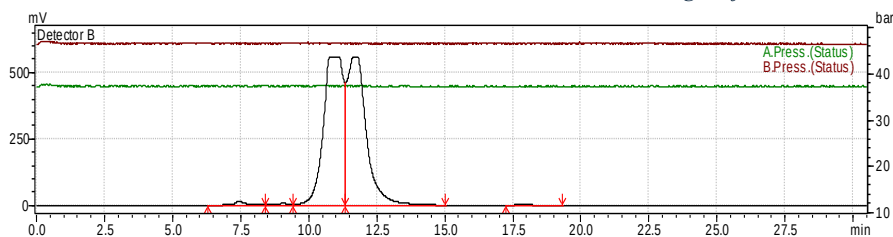
A *Saricladium* (M006) törzs 48 óra inkubálást követően a pH-tűrés esetén nem mutat szignifikáns eltérést (jelen dolgozatban a diagramot nem mutatom be). A *Gibellulopsis* (M010) törzs esetén minden inkubálási idő után szignifikáns egyezés látható az OD értékek között. Az *Aspergillus* (M021) törzs 72 óra inkubálás után minden pH-érték esetén az OD értékek megegyeznek.

4.8. Savtermelés vizsgálata

A HPLC eredmények azt mutatják, hogy a G322-es (16. ábra), M006-os, M010-es, M021-es törzs termelt ecetsavat (17,7–17,8-as retenciós időnél), illetve az M010-es törzsnél tejsav figyelhető meg a kromatogramon 13,3-as retenciós időnél (17. ábra). A többi törzs esetében nem mértünk savtermelést.



16. ábra: A G322 törzs által termelt ecetsav kromatogramja



17. ábra: Az M010 törzs által termelt tejsav kromatogramja

4.9. EPS-termelés vizsgálata

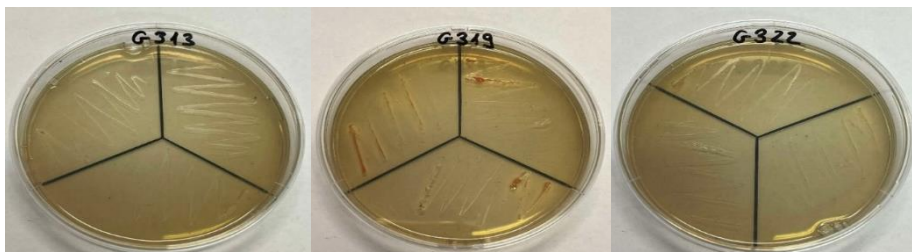
A 2-propanollal kicsapott EPS világos színű csapadékot képezett, opálossá vált az oldat. A választott 6 mikroba közül csak az egyik, a G322-es törzs termelt nagy mennyiségben EPS-t (18. ábra). A többi mikroba esetén nem történt színváltozás, illetve gélszerű anyag megjelenés sem.



18. ábra: Az EPS-t jelző opálos szín megjelenése a kémcsőben (bal), kontroll minta áttetsző színe (jobb)

4.10. Sziderofór termelés vizsgálata

A sziderofór termelés 48–72 óra elteltével volt megfigyelhető. A kiértékelést 72 óra inkubálást követően végeztem el.



19. ábra: Sziderofórt termelő baktériumok: G313 (-), G319 (citromsárga), G322 (narancssárga)

A baktériumok közül a G313-as törzs nem termelt sziderofórt, míg a G319-es törzs esetén citromsárga színű elváltozás, a G322-es törzs esetén pedig narancssárga színű elváltozás volt megfigyelhető (19. ábra).

A gombák esetén mind a 3 törzs termelt sziderofórt. Az M006-os törzs citromsárga színű, míg az M010-es és M021-es törzs esetén narancssárga elszíneződés volt megfigyelhető (20. ábra).



20. ábra: Sziderofórt termelő gombák: M006 (citromsárga), M010 (narancssárga), M021 (narancssárga)

4.11. Potenciális hasznosíthatóság

Az alábbi táblázatban összefoglaltam a mikrobák potenciális biotechnológiai hasznosíthatóság szempontjából az eredményeket (7. táblázat).

7. táblázat: Mikrobák potenciális hasznosíthatóságának eredményei: zöld szín a legjelentősebb mértékű szaporodást, a piros szín pedig a szélsőségeket mutatja (*: ecetsav termelés, **: tejsav termelés)

	Sótűrés [%]												Hőmérséklet-tűrés [°C]						pH-tűrés [-]						Savter- melés	EPS
	0	0,6	1,2	3	5	7	8,8	10	12	14,4	16	5	15	22	30	37	42	5	6	7	8	9	10			
G313	+++	+++	++	+++	++	+								+	+++	++	++		+	++		++				
G319	++	+++	++	+++	++	+								+	++	+			++	+		+	+			
G322	++	++	++	++	++									+	++	+	+		++	+				+	+	
M006	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	++	+	+		+	++	+++	+++			+++	+++	+++	++	++	+++	+	+	
M010				+						+	+		+++		+++				+	+					++	
M021	+++	++	+++	++	+++	++	++	+++	++	+	+	++	+++	++	++			+++	+++	++	++	+			+	

Jól megfigyelhető, hogy a baktériumok 7%-os sótartalom mellett kismértékben szaporodtak, míg a gombák akár 16%-os sótartalom esetén is mutattak kismértékű szaporodást. A mikrobák 3–14,4%-os sótartalomnál történő szaporodásnál mérsékelten halofil törzsnek számítanak, míg 14,4% NaCl koncentráció feletti szaporodásnál az extrém halofil kategóriába sorolhatók (Feigl et al., 2024). A G313-as törzs 42 °C-on közepes mértékű szaporodást mutatott, amely az összes mikroba közül a legmagasabb szaporodást mutatta ezen a hőfokon. A baktériumok esetén 9-es és 10-es pH-értéken kis- és közepes mértékű szaporodást figyeltem meg, amely már alkalitoleránsnak mondható. Az M021-es törzs az összes mikroba közül a legnagyobb mértékben szaporodott 15 °C-on, amely esetén közepes mértékű szaporodást mutatott. Az M006-os törzs nagymértékű szaporodást mutatott 10-es pH-értéken.

Köszönetnyilvánítás

A kutatás a Nemzeti Kutatási és Fejlesztési Hivatal OTKA FK 146542 Vörösiszapban található kritikus fontosságú nyersanyagok biológiai kioldásának mechanizmusai című projekt anyagi támogatásával valósult meg.

4. Összefoglalás

A vörösiszap sokoldalú felhasználási lehetőségei megjelennek az építőiparban, fémiparban, mezőgazdaságban, vegyiparban, emellett fontos szerepet tölt be a környezetvédelmi eljárásokban is, így számos kutatás kiindulópontját képezheti.

A bauxitmaradványból összesen 73 törzset sikerült izolálnunk. Az általam vizsgált mikrobák közül a „G” jelű baktériumokat az első izolálás alkalmával görög vörösiszapból, míg az „M” jelű gombákat a második izolálás alkalmával a magyar mintából sikerült elkülönítenem.

A mikrobák között a *Sarocladium kiliense* M006 és az *Aspergillus iizukae* M021 törzsek magas pH- és sótoleranciával rendelkeznek, valamint olyanok is, amelyek egyszerre képesek mindkét szélsőséget elviselni, azaz poliextremofilek. Exopoliszacharid termelésére a fajok közül csak 1 mikroba volt képes, a *Peribacillus frigoritolerans* G322-es törzs, míg 4 törzs termelt ecet- vagy tejsavat: *Peribacillus frigoritolerans* G322, *Sarocladium kiliense* M006, *Gibellulopsis nigrescens* M010 és *Aspergillus iizukae* M021. Sziderofór termelésre mindegyik mikroba képes volt (kivéve G313), amelyek citromsárga és narancssárga színnel jelentek meg. A biokémiai, illetve tápanyag bontási kapacitás közül az anaerob glükóz és a foszfor-mobilizációs próbát mindegyik törzs adta, illetve H₂S, aerob glükóz, ureáz és keményítő bontási próba mindegyik gomba törzs esetén pozitív lett.

Ezek alapján a potenciális biotechnológiai hasznosítás szempontjából a legérdekesebb törzseknek a baktériumok közül a tűrőképesség kapcsán a *Micrococcus luteus* G313, míg sav- és exopoliszacharid termelés esetén a *Peribacillus frigoritolerans* G322. A gomba törzsek esetén a tűrőképesség kapcsán a *Sarocladium kiliense* M006 és az *Aspergillus iizukae* M021 a két kiemelkedő törzs.

Ezek az extremofil mikroorganizmusok nemcsak extrém körülmények között képesek életben maradni, fejlődni, hanem egyedi enzimek, vegyületek előállítására is képesek, amelyek a biotechnológiai folyamatokban használhatók. Kiválóan alkalmazhatók például bioüzemanyagok előállításában, toxikus anyagokat tartalmazó szennyvizek kezelésében, vagy akár új antioxidánsok vagy biopolimerek fejlesztésében is. Ezen kívül, mivel gyakran ellenállnak a szélsőséges hőmérsékletnek vagy pH-értéknek, ezen mikroorganizmusok által termelt enzimek különösen értékesek lehetnek olyan iparágaknak, ahol extrém körülmények között szükséges a hatékony katalízis. A dolgozatomhoz végzett kutatások nemcsak új, extremofil mikroorganizmus törzsek felfedezését segítette elő, hanem a vizsgált mikrobák biotechnológiai lehetőségeit is feltárta.

5. Irodalomjegyzék

- Agnew, M. D., Koval, S. F., & Jarrell, K. F. (1995). Isolation and Characterization of Novel Alkaliphiles from Bauxite-Processing Waste and Description of *Bacillus vedderi* sp. nov., a New Obligate Alkaliphile. *Systematic and Applied Microbiology*, 18(2), 221–230. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80392-9](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80392-9)
- Ahmed, E., & Holmström, S. J. M. (2014). Siderophores in environmental research: Roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7(3), 196–208. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117>
- Akbar, A., Sitara, U., Ali, I., Muhammad, N., & Khan, S. A. (2014). Isolation and Characterization of Biotechnologically Potent *Micrococcus luteus* Strain From Environment. In *Pakistan J. Zool* (Vol. 46, Issue 4). <https://cabidigitallibrary.org>
- Anam, G. B., Reddy, M. S., & Ahn, Y. H. (2019). Characterization of *Trichoderma asperellum* RM-28 for its sodic/saline-alkali tolerance and plant growth promoting activities to alleviate toxicity of red mud. *Science of the Total Environment*, 662, 462–469. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.279>
- Ashby agar. (n.d.). Retrieved December 10, 2024, from https://www.microxpress.in/uploads/product/ashby's-mannitol-agar_technicaldetails_10620230916.073046.pdf
- Aspergillus iizukae*. (n.d.). Retrieved December 9, 2024, from <https://www.mycobank.org/details/26/67577>
- bacdiv.dsmz.de*. (n.d.). Retrieved October 30, 2024, from <https://bacdiv.dsmz.de/strain/1846>
- Berkl, Z. (2018). *Vörösiszappal kezelt homoktalajok mikrobaközösségének vizsgálata mikrokozmosz kísérletben*. blog.microbiologics.com. (n.d.). Retrieved October 29, 2024, from <https://blog.microbiologics.com/environmental-isolate-case-files-micrococcus-luteus/>
- Bombolya, N. (2017). *Vörösiszappból izolált mikroorganizmusok tulajdonságainak vizsgálata potenciális biotechnológiai alkalmazásuk céljából*.
- Borra, C. R., Mermans, J., Blanpain, B., Pontikes, Y., Binnemans, K., & Van Gerven, T. (2016). Selective recovery of rare earths from bauxite residue by combination of sulfation, roasting and leaching. *Minerals Engineering*, 92, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2016.03.002>
- Campbell, C. K., Johnson, E. M., & Warnock, D. W. (2013). *Identification of Pathogenic Fungi*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118520055>
- Catauro, M., Tranquillo, E., Barrino, F., Dal Poggetto, G., Blanco, I., Cicala, G., Ognibene, G., & Recca, G. (2019). Mechanical and thermal properties of fly ash-filled geopolymers. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 138(5), 3267–3276. <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08612-y>
- Chen, L., Cheng, Q., Zhang, X., Zhu, M., Hartley, W., & Zhu, F. (2022). Novel Plant Growth-Promoting Bacteria Isolated from Bauxite Residue: The Application for Revegetation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 109(1), 3–12. <https://doi.org/10.1007/s00128-021-03433-y>
- Coker, J. A. (2023). “All About” Extremophiles. *Faculty Reviews*, 12, 27. <https://doi.org/10.12703/r/12-27>
- Cornu, J. Y., Huguenot, D., Jézéquel, K., Lollier, M., & Lebeau, T. (2017). Bioremediation of copper-contaminated soils by bacteria. In *World Journal of Microbiology and*

- Biotechnology* (Vol. 33, Issue 2). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2191-4>
- Dai, X., Yan, G., & Guo, S. (2017). Characterization of *Dietzia cercidiphylli* C-1 isolated from extra-heavy oil contaminated soil. *RSC Advances*, 7(32), 19486–19491. <https://doi.org/10.1039/C7RA00786H>
- Dey, S. (2022). Microbial Resources of Alkaline Bauxite Residue and Their Possible Exploitation in Remediation and Rehabilitation. *Geomicrobiology Journal*, 39(3–5), 219–232. <https://doi.org/10.1080/01490451.2021.1977433>
- Engle, M., Li, Y., Woese, C., & Wiegel, J. (1995). Isolation and Characterization of a Novel Alkalitolerant Thermophile, *Anaerobranca horikoshii* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(3), 454–461. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-3-454>
- Feigl, V., Anton, A., Uzniger, N., & Gruiz, K. (2012). Red mud as a chemical stabilizer for soil contaminated with toxic metals. *Water, Air, and Soil Pollution*, 223(3), 1237–1247. <https://doi.org/10.1007/s11270-011-0940-4>
- Feigl, V., Medgyes-Horváth, A., Kari, A., Török, Á., Bombolya, N., Berkl, Z., Farkas, É., & Fekete-Kertész, I. (2024). The potential of Hungarian bauxite residue isolates for biotechnological applications. *Biotechnology Reports*, 41. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2023.e00825>
- Fernández-Silva, F., Capilla, J., Mayayo, E., Sutton, D., & Guarro, J. (2014). In vitro evaluation of antifungal drug combinations against *Sarocladium* (*Acremonium*) *kiliense*, an opportunistic emergent fungus resistant to antifungal therapies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(2), 1259–1260. <https://doi.org/10.1128/AAC.02131-13>
- Hengevoss, D., Misev, V., Feigl, V., Fekete-Kertész, I., Molnár, M., Balomenos, E., Davris, P., Hugi, C., & Lenz, M. (2024). Life cycle assessment of a novel production route for scandium recovery from bauxite residues. *Cleaner Waste Systems*, 7. <https://doi.org/10.1016/j.clwas.2024.100129>
- himedialabs.com*. (n.d.). www.himedialabs.com
- Horikoshi, K. (1999). Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. In *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS* (Vol. 63, Issue 4).
- Hussain, A., Zia, K. M., Tabasum, S., Noreen, A., Ali, M., Iqbal, R., & Zuber, M. (2017). Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: A review. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 94, pp. 10–27). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.104>
- Jovičević-Klug, M., Souza Filho, I. R., Springer, H., Adam, C., & Raabe, D. (2024). Green steel from red mud through climate-neutral hydrogen plasma reduction. *Nature*, 625(7996), 703–709. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06901-z>
- Krishna, P., Babu, A. G., & Reddy, M. S. (2014). Bacterial diversity of extremely alkaline bauxite residue site of alumina industrial plant using culturable bacteria and residue 16S rRNA gene clones. *Extremophiles*, 18(4), 665–676. <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0647-8>
- Krulwich, T. A., Liu, J., Morino, M., Fujisawa, M., Ito, M., & Hicks, D. B. (2011). Adaptive Mechanisms of Extreme Alkaliphiles. In *Extremophiles Handbook* (pp. 119–139). Springer Japan. https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1_7
- Lee, S., An, Y.-W., Choi, C.-H., Yun, M.-R., Kim, S., Cheong, H., Choi, Y. S., & Kim, D.-W. (2020). Complete Genome Sequences of *Micrococcus luteus* Strains NCCP 15687 and

- NCCP 16831, Isolated in South Korea. *Microbiology Resource Announcements*, 9(9). <https://doi.org/10.1128/MRA.01558-19>
- Li, J., Zhao, G.-Z., Zhang, Y.-Q., Klenk, H.-P., Pukall, R., Qin, S., Xu, L.-H., & Li, W.-J. (2008). *Dietzia schimae* sp. nov. and *Dietzia cercidiphylli* sp. nov., from surface-sterilized plant tissues. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 58(11), 2549–2554. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.2008/000919-0>
- Li, Y., Sun, Z. Z., Rong, J. C., & Xie, B. Bin. (2021). Comparative genomics reveals broad genetic diversity, extensive recombination and nascent ecological adaptation in *Micrococcus luteus*. *BMC Genomics*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07432-5>
- Liao, J., Jiang, J., Xue, S., Qingyu, C., Wu, H., Manikandan, R., Hartley, W., & Huang, L. (2018). A novel acid-producing fungus isolated from bauxite residue: the potential to reduce the alkalinity. *Geomicrobiology Journal*, 35(10), 840–847. <https://doi.org/10.1080/01490451.2018.1479807>
- Liu, G. H., Narsing Rao, M. P., Wang, X. Y., Chu, T. W., Liu, B., & Li, W. J. (2021). *Bacillus alkalicellulosilyticus* sp. nov., isolated from extremely alkaline bauxite residue (red mud) site. *Archives of Microbiology*, 203(2), 719–723. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02063-y>
- Macías-Pérez, L. A., Levard, C., Barakat, M., Angeletti, B., Borschneck, D., Poizat, L., Achouak, W., & Auffan, M. (2022). Contrasted microbial community colonization of a bauxite residue deposit marked by a complex geochemical context. *Journal of Hazardous Materials*, 424. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127470>
- Mamo, G., & Mattiasson, B. (2020). *Alkaliphiles: The Versatile Tools in Biotechnology* (pp. 1–51). https://doi.org/10.1007/10_2020_126
- Marik, D., Sharma, P., Chauhan, N. S., Jangir, N., Shekhawat, R. S., Verma, D., Mukherjee, M., Abiala, M., Roy, C., Yadav, P., & Sadhukhan, A. (2023). *Peribacillus frigoritolerans T7-IITJ, a potential biofertilizer, induces plant growth-promoting genes of Arabidopsis thaliana*. <https://doi.org/10.1101/2023.12.09.570910>
- Nguyen, T. T. T., Pangging, M., Lee, S. H., & Lee, H. B. (2018). Four new records of ascomycete species from Korea. *Mycobiology*, 46(4), 328–340. <https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1550169>
- Nogueira, E. W., Hayash, E. A., Alves, E., Lima, C. A. de A., Adorno, M. T., & Brucha, G. (2017). Characterization of Alkaliphilic Bacteria Isolated from Bauxite Residue in the Southern Region of Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60(0). <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2017160215>
- Pan, X., Wu, H., Lv, Z., Yu, H., & Tu, G. (2023a). Recovery of valuable metals from red mud: A comprehensive review. In *Science of the Total Environment* (Vol. 904). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166686>
- Pan, X., Wu, H., Lv, Z., Yu, H., & Tu, G. (2023b). Recovery of valuable metals from red mud: A comprehensive review. In *Science of the Total Environment* (Vol. 904). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166686>
- Pedram, H., Hosseini, M. R., & Bahrami, A. (2020). Utilization of *A. niger* strains isolated from pistachio husk and grape skin in the bioleaching of valuable elements from red mud. *Hydrometallurgy*, 198. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2020.105495>
- Pikovskaya agar*. (n.d.). Retrieved December 10, 2024, from <https://www.himedialabs.com/as/m520-pikovskayas-agar.html>

- Qu, Y., Li, H., Wang, X., Tian, W., Shi, B., Yao, M., Cao, L., & Yue, L. (2019). Selective parameters and bioleaching kinetics for leaching vanadium from red mud using *Aspergillus niger* and *Penicillium tricolor*. *Minerals*, 9(11).
<https://doi.org/10.3390/min9110697>
- Rawway, M., Ali, S. G., & Badawy, A. S. (2018). Isolation and Identification of Cellulose Degrading Bacteria from Different Sources at Assiut Governorate (Upper Egypt). *Journal of Ecology of Health & Environment*, 6(1), 15–24.
<https://doi.org/10.18576/jehe/060103>
- refractorymetal.org*. (n.d.-a). Retrieved October 27, 2024, from
<https://www.refractorymetal.org/uses-of-titanium/>
- refractorymetal.org*. (n.d.-b). Retrieved October 27, 2024, from
<https://www.refractorymetal.org/uses-of-zirconium/>
- refractorymetal.org*. (n.d.-c). Retrieved October 27, 2024, from 7 Uses of Cobalt You Mightn't Know
- Samal, S. (2021). Utilization of red mud as a source for metal ions—a review. In *Materials* (Vol. 14, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ma14092211>
- Santini, T. C., Kerr, J. L., & Warren, L. A. (2015). Microbially-driven strategies for bioremediation of bauxite residue. In *Journal of Hazardous Materials* (Vol. 293, pp. 131–157). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.03.024>
- Santini, T. C., Warren, L. A., & Kendra, K. E. (2015). Microbial diversity in engineered haloalkaline environments shaped by shared geochemical drivers observed in natural analogues. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(15), 5026–5036.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01238-15>
- Sarethy, I. P., Saxena, Y., Kapoor, A., Sharma, M., Sharma, S. K., Gupta, V., & Gupta, S. (2011). Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(7), 769–790.
<https://doi.org/10.1007/s10295-011-0968-x>
- Sarkodie, E. K., Jiang, L., Li, K., Yang, J., Guo, Z., Shi, J., Deng, Y., Liu, H., Jiang, H., Liang, Y., Yin, H., & Liu, X. (2022). A review on the bioleaching of toxic metal(loid)s from contaminated soil: Insight into the mechanism of action and the role of influencing factors. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1049277>
- Sarocladium kiliense*. (n.d.). Retrieved December 9, 2024, from
https://en.wikipedia.org/wiki/Sarocladium_kiliense#cite_note-Domnsch1980-5
- Schmalenberger, A., O'Sullivan, O., Gahan, J., Cotter, P. D., & Courtney, R. (2013). Bacterial communities established in bauxite residues with different restoration histories. *Environmental Science and Technology*, 47(13), 7110–7119.
<https://doi.org/10.1021/es401124w>
- Świątczak, J., Kalwasińska, A., & Brzezinska, M. S. (2023). Plant growth-promoting rhizobacteria: *Peribacillus frigoritolerans* 2RO30 and *Pseudomonas sivasensis* 2RO45 for their effect on canola growth under controlled as well as natural conditions. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1233237. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1233237>
- Szépvolgyi, J., & Kótai, L. (2011). *Az ajkai vörösiszap-ömlés, Első rész - A vörösiszap képződése, tulajdonságai és tárolása*. www.mkl.mke.org.hu
- Török, Á. (2017). *A vörösiszap mikroflórájának vizsgálata: izolálás és identifikálás*.

- Ujaczki, É., Feigl, V., Farkas, É., Vaszita, E., Gruiz, K., & Molnár, M. (2016). Red mud as acidic sandy soil ameliorant: A microcosm incubation study. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91(6), 1596–1606. <https://doi.org/10.1002/jctb.4898>
- Ujaczki, É., Feigl, V., Molnár, M., Cusack, P., Curtin, T., Courtney, R., O'Donoghue, L., Davris, P., Hugi, C., Evangelou, M. W., Balomenos, E., & Lenz, M. (2018). Re-using bauxite residues: benefits beyond (critical raw) material recovery. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(9), 2498–2510. <https://doi.org/10.1002/jctb.5687>
- unacademy.com. (n.d.). Retrieved October 29, 2024, from <https://unacademy.com/content/neet-ug/study-material/chemistry/uses-of-iron/>
- Wang, L., Hu, G., Lyu, F., Yue, T., Tang, H., Han, H., Yang, Y., Liu, R., & Sun, W. (2019). Application of red mud in wastewater treatment. In *Minerals* (Vol. 9, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/min9050281>
- Wang, Y., Qian, J., Shi, T., Wang, Y., Ding, Q., & Ye, C. (2024). Application of extremophile cell factories in industrial biotechnology. *Enzyme and Microbial Technology*, 175, 110407. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2024.110407>
- wickhammicro.co.uk. (n.d.). Retrieved October 29, 2024, from <https://wickhammicro.co.uk/knowledge-and-education/micrococcus-luteus>
- Wu, H., Chen, L., Zhu, F., Hartley, W., Zhang, Y., & Xue, S. (2020). The dynamic development of bacterial community following long-term weathering of bauxite residue. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 90, 321–330. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2019.12.001>
- Wu, H., Liao, J. xin, Zhu, F., Millar, G., Courtney, R., & Xue, S. guo. (2019). Isolation of an acid producing *Bacillus* sp. EEEL02: Potential for bauxite residue neutralization. *Journal of Central South University*, 26(2), 343–352. <https://doi.org/10.1007/s11771-019-4006-x>
- Xue, S. guo, Wu, Y. jun, Li, Y. wei, Kong, X. feng, Zhu, F., William, H., Li, X. fei, & Ye, Y. zhen. (2019). Industrial wastes applications for alkalinity regulation in bauxite residue: A comprehensive review. In *Journal of Central South University* (Vol. 26, Issue 2, pp. 268–288). Central South University of Technology. <https://doi.org/10.1007/s11771-019-4000-3>
- Yang, Y., Diao, M., Liu, K., Qian, L., Nguyen, A. V., & Qiu, G. (2013). Column bioleaching of low-grade copper ore by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in pure and mixed cultures with a heterotrophic acidophile *Acidiphilium* sp. *Hydrometallurgy*, 131–132, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2012.09.003>
- Zaghloul, E. H., & Ibrahim, M. I. A. (2022). Production and Characterization of Exopolysaccharide From Newly Isolated Marine Probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* EI6 With in vitro Wound Healing Activity. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.903363>
- Zakira, U., Zheng, K., Xie, N., & Birgisson, B. (2023). Development of high-strength geopolymers from red mud and blast furnace slag. *Journal of Cleaner Production*, 383. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135439>
- Zeng, H., Lyu, F., Sun, W., Zhang, H., Wang, L., & Wang, Y. (2020). Progress on the industrial applications of red mud with a focus on China. In *Minerals* (Vol. 10, Issue 9, pp. 1–28). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/min10090773>
- Zhang, D., Chen, H., Xia, J., Nie, Z., Zhang, R.-Y., & Pakostova, E. (2022). Efficient dealkalization of red mud and recovery of valuable metals by a sulfur-oxidizing bacterium. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.973568>