

36. OTDK Biológia Szekció

***Saccharomyces* sejtvonalak monokultúrás és kokultúrás fermentációja
szacharóz és keményítő szénforráson, nikkel(II)-ionok jelenlétében**

Debreceni Egyetem

Természettudományi- és Technológiai Kar

Multidiszciplináris Biotechnológiai és Sejtbiológiai Intézeti Részleg

Készítette:
Galambos Dóra Viktória
Biomérnök BSc 3. évf.

Konzulens:
Dr. Máthéné Dr. Szigeti
Zsuzsa
Adjunktus

Külső szakmai konzulens:
Kovásznai-Oláh Richárd
Biológus

Debrecen

2022

Tartalomjegyzék

1., Bevezetés és célkitűzés	4
2., Szakirodalmi áttekintés.....	6
2.1., Bio- és fitoremediáció.....	6
2.2., <i>Saccharomyces cerevisiae</i> és rokonfajok habitusa, főbb jellemzői.....	8
2.3., <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nikkel felvételét, transzportját és nikkel rezisztenciáját befolyásoló tényezők	11
2.3.1., Nikkel felvétele, transzportja és az ezt befolyásoló tényezők.....	12
2.3.2., Nikkel okozta változások a sejtfelszínen és az intracelluláris térben	13
2.4., Alkoholos fermentáció <i>Saccharomyces cerevisiae</i> felhasználásával	14
2.4.1., A nikkel hatása a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> alkoholos fermentációjára ...	15
2.4.2., Keményítő szénforrás alkalmazása alkoholos fermentáció során	16
2.5., <i>Bacillus subtilis</i> és rokonfajok habitusa, főbb jellemzői	17
2.6., <i>Bacillus subtilis</i> nikkel felvételét, transzportját és nikkel rezisztenciáját befolyásoló tényezők.....	18
3., Anyagok és módszerek	20
3.1., Hígító folyadékok és táptalajok előállítása	20
3.2., Felhasznált organizmusok.....	21
3.2.1., <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
3.2.2., <i>Saccharomyces</i> sp. (SC_NYH_1)	21
3.2.3., <i>Bacillus subtilis</i>	21
3.2.4., <i>Bacillus</i> sp.	22
3.3., Inokulációs sejtuszuspenzió előállítása.....	22
3.4., McFarland-féle relatív típusú sejtszámmeghatározás.....	22
3.5., Toxicitási teszt.....	23
3.6., Keményítő hasznosítási teszt	24
3.7., Fermentációs kísérlet	25
3.7.1., Fermentációs kísérlet a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> és az SC_NYH_1 sejtvonalakkal a nikkel koncentráció gradiens mentén	25
3.7.2., Fermentációs kísérlet az SC_NYH_1 és a <i>Bacillus</i> sp. sejtvonalakkal 37,5 mg/L nikkel koncentráció mellett	26
3.8., Gázkromatográfiás alkohol koncentráció meghatározás	27
3.9., Kiértékelés, statisztika	27

4., Eredmények.....	28
4.1., A toxicitási teszt eredményei	28
4.2., A keményítő hasznosítási teszt eredményei	31
4.3., A fermentációs teszt eredményei.....	32
5., Diskusszió	36
Hivatkozások.....	38

1., Bevezetés és célkitűzés

A jelenlegi technológiai fejlődés és iparosodás mellett környezetünk folyamatosan akkumulálódik különféle szennyező ágensekkel, többek között a nehézfémekkel. Természetes jelenlétük és széleskörű felhasználásuk miatt a nehézfémek mikro- és makroszennyeződések formájában elkerülhetetlenül jelen vannak a talajban, a levegőben és a természetes vizekben. A növényekben történő akkumuláció következtében a szennyeződések a táplálékláncba is könnyűszerrel bekerülhetnek, testünkben a szennyezett táplálék fogyasztásával felhalmozódhatnak. Ez különösen gondot jelent a nehézfémek esetén, melyek már alacsony koncentrációban is citotoxikusak lehetnek, az emberben pedig rákot okozhatnak [1]. Környezetünk és egészségünk védelmének érdekében szükséges az ember ipari tevékenysége által érintett területek rekultivációja.

A bioremediáció egy hulladékkezelési módszer, mely sokkal környezetbarátabb és költséghatékonyabb a konvencionális kémiai és fizikai módszerekkel összevetve, alkalmazása során élő organizmusok segítségével kármentesítjük a szennyezett területet. Ezen eljárás szűkebb területét képezi a fitoremediáció, mely valamilyen szennyező ágensre hiperakkumulátor növény segítségével teszi lehetővé a kontaminált terület helyreállítását.

A nehézfémeket a mikroorganizmusok és a növények változatos módon és mennyiségben képesek eltávolítani a talajból. Az eljárást követően az alkalmazott növények, valamint a biomassza feldolgozása elengedhetetlen, hiszen ezek a remediációt követően tartalmazzák a szennyező ágenszt. A biomassza feldolgozása az esetek jelentős részében égetéssel történik, míg a növények komprimációjával szénforrásban és nehézfémekben gazdag présnedv nyerhető. Kutatócsoportunk célul tűzte ki ennek további feldolgozására alkalmazható, hulladék keletkezését minimalizáló és egyben bioetanol előállítását lehetővé tevő eljárás kidolgozását.

Arra keresünk választ, hogy a kísérletek alapján meghatározott nikkel koncentráció mellett, magas keményítő tartalmú szintetikus táptalajon mekkora etanol kihozatal érhető el a keményítő enzimes előemésztése nélkül, savkatalizált hidrolízist követő monokultúrás, illetve kokultúrás fermentáció során.

Ennek megvalósításához az előkísérletek során számos tényezőt vizsgálunk meg, többek között az általunk használt törzsgyűjteményi *Bacillus subtilis*, a természeti mintából izolált *Bacillus sp.*, az ipari *Saccharomyces cerevisiae* és a vad típusú *Saccharomyces sp.* **SC_NYH_1** sejtvonalak keményítő hasznosítását és a nikkel(II)-ion toleranciáját.

Fő kísérletünkben összehasonlítjuk az ipari és vad típusú *Saccharomyces cerevisiae* sejtvonalak alkoholkimotozatalát szacharóz szénforrásból kiindulva, nikkel koncentráció gradiens

mentén. Megvizsgáljuk emellett a nikkel teljes gátlási koncentrációját figyelembe véve a vad típusú élesztő alkoholkimotozatalát keményítő szénforrásból kiindulva monokultúrásan, illetve az általunk izolált *Bacillus sp.*-szel kokultúrásan.

2., Szakirodalmi áttekintés

Jelen fejezetben áttekintjük a munkánk során előforduló kísérletek értelmezéséhez szükséges minimális elméleti háttérrel. Elsősorban áttekintjük a bioremediációval kapcsolatos alapismereteket, mely kutatási témánk alapvető motivációja, valamint ehhez kapcsolódóan kitérünk a nikkel hiperakkumulátor növényekre.

Ezt követően összefoglaljuk az általunk használt mikroorganizmusok morfológiáját, sejtciklusát, tápanyag szükségletüket, emellett a nikkel felvételével és nehézfém toleranciával kapcsolatos korábbi kutatások következtetéseit.

Mind ezután kitérünk a *Saccharomyces cerevisiae*-vel, mind monokultúrás, mind kokultúrás összetételben, különböző paraméterek mellett történő alkoholos fermentációra, mely a kutatócsoportunk által kidolgozott eljárás fő lépéséhez szolgál háttérinformációval.

Az áttekintés során használt szakirodalomra vonatkozó hivatkozásokat a dolgozatban szögletes zárójelbe tett arab számokkal jelöljük, és a dolgozat végén található „Hivatkozások” c. fejezetben adjuk meg.

2.1., Bio- és fitoremediáció

A bioremediáció tág fogalomként használatos, a természetbe került szennyeződések biológiai rendszerek felhasználásával történő kármentesítését foglalja magába, mely szükség esetén fizikai és kémiai kezelésekkel is kombinálható. A kármentesítésnek gyakran része egy redoxreakció, melynek segítségével a szennyezőanyagokat egy ártalmatlan vagy kevésbé toxikus, stabil, kevésbé mobilis vagy inert formába hozzuk [1].

Számos előnye között szerepel, hogy *in situ*, azaz a kontamináció helyén történő remedációra is alkalmas technológia, így a kármentesítés helyére történő szállítás kockázatai és költségei nem jelentenek problémát. Emellett noninvazív eljárás lévén az ökoszisztéma károsodása is jelentősen kisebb. Hátránya, hogy a kármentesítés sikeressége számos környezeti faktortól függ [1, 2]. Ezek közé sorolható a tápanyagok aránya (mely szennyezett területeken az általánostól eltérő, jellemzően a szénvegyületek (pl. aromás vegyületek, pl. antracén vízzoldható származékai, anilin származékok, nagy szénláncú alkánok) többszörös mennyiségben vannak jelen), a szennyező anyagok anyagi minősége (halmazállapot, toxicitás stb.), talajszerkezet (főként homok, iszap és agyag aránya), pH, nedvességtartalom, hőmérséklet, oxigénszint, mikrobiális diverzitás stb.

Egyaránt a bioremediáció részét képezik különféle mikroorganizmusok, valamint növények (és hozzájuk társult mikroorganizmusok) felhasználása az említett célra. Az előbbi kategóriába sorolható esetek mindegyikében más biológiai rendszer végzi a remediációt: bioszorpció esetén holt mikrobiális és mezőgazdasági biotömegt, biostimuláció esetén élő mikrobiális populáció, mycoremediáció esetén gombák, míg cyanoremediáció esetén cianobaktériumok végzik a remediációt [2].

A mikrobiális bioremediáció során kihasználhatók a mikrobákban zajló enzimikus átalakulások, melyek egyes fémionokat ártalmatlan, kevésbé toxikus vagy inert formába hoznak. A bioszorpció oldott komponensek alacsony költségű biológiai anyagokkal való eltávolítását jelenti. Ez lehet metabolizmus függő (pl. membránon keresztül történő transzport, csapadékképződés), valamint nem metabolizmus függő (pl. csapadékképződés, komplexképződés, ioncsere, fizikai adszorpció), míg a sejten belüli helye alapján lehet intracelluláris adszorpció (pl. membránon keresztüli transzport), sejtfelszíni adszorpció/csapadékképződés (pl. komplexképződés, ioncsere, fizikai adszorpció), valamint extracelluláris adszorpció (pl. csapadékképződés). A gombák nehézfém tolerancia kialakítása végett létrejött mechanizmusai közé tartozik az akkumuláció, intra- és extracelluláris csapadékképzés és a vegyértékváltás, így potenciális biokatalizátorok bioremediációs technológiákhoz [1].

Ha növényeket, valamint rizoférikus mikroorganizmusokat stimulálunk remediációra, akkor fitoremediációról beszélhetünk, mely egy környezetbarát *in situ* remediációs technológia, vagyis a szennyeződés helyén történik maga a kármentesítés is. A növények különféle mechanizmusok útján távolíthatják el a szennyezőanyagokat, többek között fitoextrakció, fitostabilizáció vagy fitoimmobilizáció, fitovolatilizáció, fitodegradáció és rizodegradáció segítségével [3, 4].

A fitoextrakció esetén a szennyezőket a gyökéren keresztül veszi fel a növény, melyet fitostabilizáció (például a hajtásokban történő akkumuláció) követ, melynek köszönhetően a szennyeződések ezáltal nem kerülhetnek bele a talajvizekbe és/vagy a táplálékláncba. A fitovolatilizáció során az illékony nehézfémek (pl. Se és Hg) gőz formájában elpárologhatnak a levelek felszínéről. Fitodegradáció a szövetek belsejében történő, enzimek által katalizált reakció, melynek során történhet csapadékképzés, komplexképzés vagy átmeneti fémek esetén vegyértékváltása is. Rizodegradáció esetén a rizoszférában élő mikroorganizmusok akkumulálják a fémeket.

A talaj szennyezettségének mértéke, valamint az alkalmazott növény fémionfelvételi képessége meghatározzák a fitoremediáció sikerességét. Ezen technológia során alkalmazott

növények ún. hiperakkumulátor növények, melyek magas nehézfém akkumulációs potenciállal rendelkeznek [1]. Ilyen növények általában hosszú távon nehézfém szennyezett területen találhatók. A hiperakkumulátor növényekben a nehézfémek raktározása és a komplexképzés rendszerint jelentősen eltér a nem-hiperakkumulátor növényekétől. A fémionok jelenős része ligandumokhoz és alacsony moláris tömegű proteinekhez kötődik, így csak töredékük van szabad ionként jelen. A nikkel például elsősorban a hisztidinnel képez komplexet az *Alyssum lesbiacum* nikkel hiperakkumulátor növényben, ahol a nikkel felvételt követően a szabad hisztidinszint folytonos növekedése volt megfigyelhető, míg az *Alyssum montanum* nem hiperakkumulátor rokonfajnál ez nem volt tapasztalható. Amint a rokonfajt hisztidinnel kezelték, a növény nikkel toleranciája megemelkedett [5].

A nikkel hiperakkumulátor növényekre nagy hangsúly került nemrégiben, egyrészt a könnyen elérhető monitorozási tesztnek, másrészt a globális szinten bőséges nikkel szennyezett területeknek köszönhetően. A legtöbb növényben bizonyos nehézfémkoncentrációt elérve a hajtásokban – nikkelt tekintve megközelítőleg 50-100 µg/g esetén –, a fitoextrakció kihozatala csökken a fitotoxicitás miatt [5, 6]. A van der Ent által meghatározott követelmény szerint nikkelre tekintve hiperakkumulátor növénynek számít, melynek szárított levele legalább 1000 µg/g koncentrációban tartalmaz nikkelt [5, 7, 8]. Csak a korábban említett *Alyssum* nemzetségben 48 különböző nikkel hiperakkumulátor fajt fedeztek fel, melyek levelének száraz biomasszája 1000-30000 µg/g nikkelt tartalmaz, például az *Alyssum murale* 20000 µg/g nikkelt képes akkumulálni [6], míg az *Alyssum bertolonii* megközelítőleg 10000 µg/g-t [8]. Az utóbbi hiperakkumulátor esetén megfigyelték, hogy a talaj nikkeltartalma és a nikkelfelvétel között jelentős mértékű pozitív összefüggés állapítható meg. Emellett megfigyelték, hogy a nyomelemek elérhetősége szerpentin talajokban a pH emelkedésével exponenciálisan csökken. Ezek mellett a *Thlaspi goesingense* hiperakkumulátor növény száraz tömege 9490 µg/g nikkelt tartalmaz [4], a *Streptanthus polygaloides* 14800 µg/g-t [8].

2.2., *Saccharomyces cerevisiae* és rokonfajok habitusa, főbb jellemzői [9]

A *Saccharomyces cerevisiae* a *Fungi* országba, az *Ascomycota* törzsbe, ezen belül a *Saccharomycetaceae* család *Saccharomyces* nemzetségébe tartozó eukarióta egysejtű mikroorganizmus. Vad típusa fellelhető érett gyümölcsök felületén, rovarok és melegvérű állatok gyomor- és bélrendszerében és testük felszínén, valamint a talajban és természetes vizekben világszerte. Igen kedvelt modellszervezet, mivel eukarióta létére könnyen

tenyésztethető és elemezhető, akár a baktériumok. Mindemellett mitokondriális útvonalai nem térnek el lényegesen más eukariótákétól.

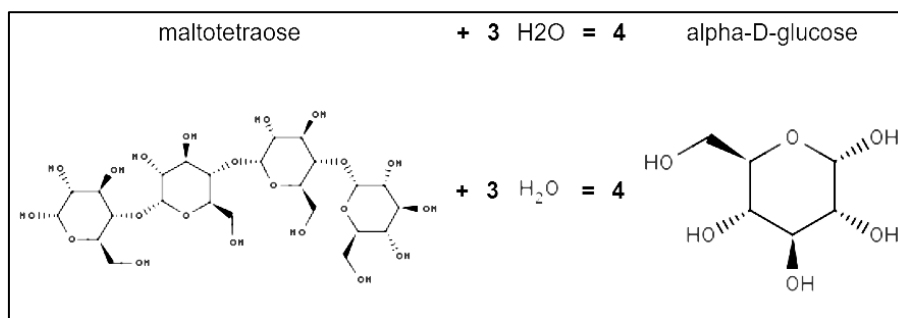
A 10-14 napon át inkubált sejtek élesztőkre jellemző morfológiájú, krémszínű, domború, középen csúcsos és ép szélű telepeket hoznak létre. A sejtek szabálytalan alakja tipikusan élesztőkre jellemző. Gram festés módszere adaptálható élesztőgombákra, ennek során lilára festődnek, mivel sejtfaluk egy vastag peptidoglikán réteget tartalmaz, így hasonlít a Gram-pozitív bakteriális sejtfalra. A sejtekben a biokémiai folyamatok szegregációját a belső membránrendszer teszi lehetővé.

Haploid és diploid formában is stabilan nőnek. A kettő között az ivaros szaporodás, valamint a meiózis jelent átmenetet. Az ivartalan szaporodás mind haploid és diploid formában lehetséges mitózissal, azon belül sarjzaddal történik, melynek során az anyasejt csúcsáról egy kisebb leánysejt fűződik le, egy anyasejt általában nem több, mint 20-30 sarjsejtet alkot. A lefűződés helyén keletkező heg a Berkeley test, mely a *Saccharomyces cerevisiae* sejtekre jellemző. A Sabouraud-féle dextrózos vonalon, valamint Yeast Extract-Pepton-Dextrose (YPD) médiumon jól tenyésztethető.

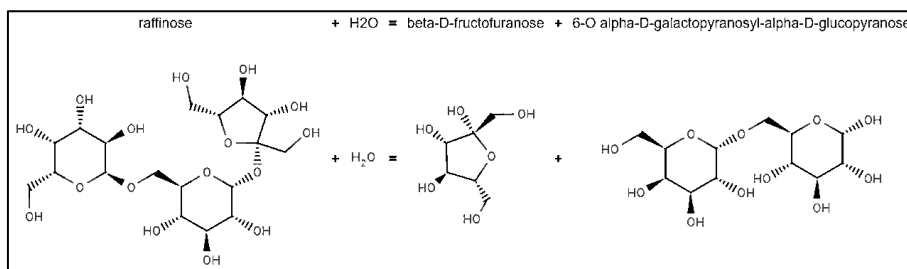
A *Saccharomyces cerevisiae* fakultatív anaerob, így respiráció során a terminális elektron akceptor lehet O_2 vagy ettől különböző vegyület is. Oxigén jelenlétében a glükóz a mitokondriális légzési elektron transzport lánc segítségével CO_2 -dá és vízzé alakul. Anaerob körülmények között egyedül a glikolízis során nyerhető energia, így a mikroorganizmus nem nő olyan gyorsan, ekkor alkoholos fermentáció során a glükóz etanollá, valamint CO_2 -dá és egyéb melléktermékekké, például glicerollá alakul.

Mivel kemoorganotróf fajról van szó, így szénforrásként szerves vegyületeket használ, melyeket széleskörűen tud hasznosítani. Kizárólag 3, 6 és 9 szénatomos cukrokat hasznosít. A glükóz a fő szénforrás, melyből glikolízis és citromsavciklus folyamán nyer ATP-t. A glükóz, a fruktóz és a mannóz felvételére egy transzportrendszer áll rendelkezésre, a galaktóz, az α -metil-D-glükózid, a maltóz és a maltotrióz számára indukálható transzportrendszerek elérhetőek. Míg a négy előbbi nem igényel energiát, az utóbbi három aktív transzportként jellemezhető.

A cukorhasznosítás során az első lépés egyike a következőknek: 1) a cukor transzportja a sejtmembránon keresztül, 2) a cukor extracelluláris hidrolízise után a termékek vagy azok egy része bejut a sejtbe. A maltóz transzportja például független, indukálható úton történik, majd a maltáz intracellulárisan bontja két glükózzá. A szacharózt extracellulárisan glükózzá és fruktózzá bontja az invertáz enzim, ezután kerül sor a termékek transzportjára. A két enzim reakciósémáját lásd az **1. és 2. ábrán**.



1. ábra Maltáz enzim reakciósémája (forrás: BRENDA Enzyme Database nyílt forráskódú adatbázis, <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.20> , utolsó hozzáférés: 2022. 11. 17.)



2. ábra Az invertáz enzim reakciósémája (forrás: BRENDA Enzyme Database nyílt forráskódú adatbázis, <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.26&Suchword=&reference=&UniProtAcc=&organism%5B%D=Saccharomyces+cerevisiae> , utolsó hozzáférés: 2022. 11. 17.)

Az élesztők azonosítására alkalmas auxanográfias vizsgálatok (**API 20 C AUX** vagy **API Candida** teszt sorozat) meghatározási táblázatai információt adnak arról, hogy egyedüli szénforrásként mely vegyületeket hasznosítja jól (lásd **1. táblázat**), milyen cukrokat fermentál, mindemellett a vizsgált enzimek közül melyeket tartalmazza (lásd **2. táblázat**) a *Saccharomyces cerevisiae*.

1. táblázat API 20 C AUX auxanográfias teszt sorozat meghatározási táblázata. Az eredmények *Saccharomyces cerevisiae*-re vonatkoznak, melynek 352-es koraipari törzse és annak tizedgenerációi külön vannak feltüntetve (1, 2). Felső sor, balról jobbra: glükóz, glicerol, 2-keto-D-glükonát, L-arabinóz, D-xilóz, adonitol, xilitol, galaktóz, inozitol, szorbitol hasznosítása. Alsó sor, balról jobbra: α -metil-D-glükózid, N-acetil-D-glükózamin, cellobióz, laktóz, maltóz, szacharóz, trehalóz, melezitóz, raffinóz hasznosítása.

	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR
1	+	+/-	-	-	-	-	-	+	-	+/-
2	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	HYPH
1	+/-	-	-	-	+	+	+	+/-	+	+/-
2	+	-	-	-	+	+	+/-	+	+	+/-

2. táblázat: API Candida auxanográfiás teszt sorozat meghatározási táblázata. Az eredmények *Saccharomyces cerevisiae*-re vonatkoznak. Felső sor, balról jobbra: glükóz-, galaktóz-, szacharóz-, trehalóz-, raffinózból történő savtermelés. Alsó sor, balról jobbra: β -maltozidáz-, α -amiláz-, β -xylosidáz-, β -glükuronidáz-, ureáz-, N-acetil-b-glükózaminidáz-, β -galaktozidáz enzimek kimutatása. Az aláhúzott vizsgálatokat anaerob körülmények között, inokulációt követően ásványi olajjal lefedve kell végezni.

GLU	GAL	SAC	TRE	RAF	β MAL
+	+	+	+/-	+	-
α AMY	β XYL	β GUR	URE	β NAG	β GAL
-	-	-	-	-	-

2.3., *Saccharomyces cerevisiae* nikkelfelvétel, transzportja és nikkerezisztenciáját befolyásoló tényezők

A nikkelfelvétel egy bivalens átmeneti fém, mely a ferromágneses elemek közé tartozik. Természetesen jelen van tengerekben, meteoritokban, valamint a földkéregben, jellemzően más elemekkel, oxidokkal és szulfidokkal egyidejűleg. Biológiai rendszerekben jellemzően +2-es oxidációs számmal fordul elő. Kedvező fizikai és kémiai tulajdonságainak köszönhetően az ipar számos területén hasznosításra kerül, többek között a kohászat, az ötvöztetés, a galvanizálás és a nikkelfelhalmozó akkumulátorok gyártása során – mely mostanában háttérbe szorult. A gyártási folyamatok mellett az újrahasznosítás és az ipari hulladékkezelés által is a környezetbe kerülhet.

Az átmeneti fémek fizikai (például oldhatóság) és kémiai (például ionok oxidációs állapota, valamint komplexstabilitási állandó) tulajdonságai kedvezővé teszik őket a biokémiai felhasználás szempontjából, általuk fontos szerepet játszhatnak például az elektrontranszportban.

Ugyanezek a tulajdonságok azonban lehetőséget adnak a citotoxicitásra is, mely számos formában megnyilvánulhat fémiontól és fajtól függően. Lehetséges többek között enzimek inaktiválása (konformációjuk megváltoztatása, denaturálásuk), membrán transzporterek szerkezetének megváltoztatása, egyéb biológiailag jelentős molekulák funkcionális csoportjának vagy transzportútjának blokkolása, szerkezetük megváltoztatása [1, 10]. A Ni^{2+} -ről ismert, hogy magasabb koncentrációban szerves savakkal, nukleotidokkal, aminosavakkal és foszfolipidekkel kölcsönhatásba lép, valamint potenciálisan gátolja a makromolekulák például proteinek vagy nukleinsavak szintézisét, így zavarva a sejt biokémiai folyamatait [11]. A bivalens kationok között ráadásul a nikkelfelvétel az egyik legstabilabb komplexeket képezi [12].

2.3.1., Nikkel felvétele, transzportja és az ezt befolyásoló tényezők

Egy fémion toxicitását nagyban befolyásolja, hogy milyen módon képes bejutni a sejtbe. Kísérleti tapasztalatok alapján a *Saccharomyces cerevisiae* fémionfelvétele számos tényezőtől függ, köztük a pH-tól, a kezdeti fémionkoncentrációtól, egyéb fémionok jelenlététől, valamint kis mértékben a hőmérséklettől [13]. A mikroorganizmusok sejtmembránja vagy sejtfala fiziológiásan negatív töltésű a jelen lévő funkciók csoportoknak (karboxil-, hidroxil-, amino-, és foszfátcsoport) köszönhetően [14]. Ennek következtében a kationok és a sejtfal között elektrosztatikus vonzóerő van jelen, mely serkenti az említett ionok kötődését a sejt felszínéhez, mely egy reverzibilis folyamat. A fémionkoncentráció emelkedésével a sejt felszíne egyre kevésbé lesz negatív töltésű, ezt bizonyítja, hogy a Chen és mtsai. által végzett mérések során a Ni^{2+} és Cu^{2+} koncentrációját 10^{-7} M-ról lépcsőzetesen 10^{-3} M-ra növelve csökkent a sejtek elektroforetikus mozgékonyasága [14].

A bivalens kationok azonban képesek bejutni a sejt belsejébe, ráadásul több tanulmányozott mikroorganizmus, köztük a *Saccharomyces cerevisiae* esetében a sejt felszínén kötött fémionok mennyisége elenyésző, ahhoz a mennyiséghez képest, amit a sejt energiaigényes folyamatok során képes felvenni [15]. A fémionfelvételt azonban megfelelő mennyiségű anion felvételével vagy kation kiáramlásával kompenzálni kell, hogy a sejt töltése kifelé továbbra is semleges maradjon. Bivalens kationok felvétele során, tápanyagelvonási stressz mellett a H^+ kiáramlásában nem volt megfigyelhető változás, a K^+ kiáramlás, mely általában alacsony, viszont jelentősen megnőtt [16]. Fuhrmann és Rothstein megállapították, hogy a *Saccharomyces cerevisiae*-ben a Ni^{2+} , Zn^{2+} és a Co^{2+} , Rothstein és mtsai. által korábban leírt Mg^{2+} és Mn^{2+} transzportútvonalat használják [16, 17]. Az említett útvonal még kevésbé ismert, azonban az aktív transzportrendszerek számos tulajdonságaival rendelkezik. Működése csökkent tápanyagelvonási stressz mellett, inorganikus foszfát jelenlétében viszont képes volt regenerálódni.

A kezdeti fémionkoncentráció, valamint a jelen lévő egyéb ionok egyaránt hatással vannak a fémionfelvételre. Chen és mtsai. a korábban említett kísérletük során megállapították, hogy a pillanatnyi fémionfelvétel egyenesen arányos a kezdetben hozzáadott fémion koncentrációval [14]. Szintén megfigyelhető volt, hogy a részfelvételt egyértelműen serkentette a nikkel jelenléte, fordított helyzetben viszont nem volt hasonló hatás megfigyelhető.

A pH erősen befolyásolja a fémek oxidációs állapotát és komplexstabilitási állandóit az oldatban. A toxicitás szempontjából döntő fontosságú a pH, minden mikroorganizmusnál más pH tartományon figyelhető meg toxicitás. Ezek mellett megfigyelhető, hogy az élesztők

bioszorpciós képessége a pH növelésével, bár nem lineáris összefüggés szerint, de alapvetően nő [13]. Padmavathy és mtsai. megállapították egy nikkellel és *Saccharomyces cerevisiae*-vel végzett kísérlet folyamán, hogy a fémionok adszorpciója a sejtfelszínen lévő negatív töltésű funkciók csoportok ionizálásával történik, ezáltal a pH hatása feltehetően abban nyilvánul meg, hogy a hidroxidionok versengenek a fémionokkal az aktív kötési helyekért [18]. Továbbá, alacsony pH esetén az oxóniumionok mennyisége magasan meghaladta a nikkel ionokét, így az utóbbi nem tudott kötődni a sejtfalhoz. A pH növekedésével az oxóniumionok affinitása csökkent, így nőtt a nikkel adszorpciós képessége. Túl magas pH értékeken nem végezték el a kísérletet, hogy elkerüljék a nikkel kiválását csapadék formájában. A nikkel adszorpciós kapacitásának maximumát pH 6,75 értéken érte el, mely 11,4 mg/g volt. A túl alacsony pH a *Saccharomyces cerevisiae* esetében például pH 5 alatt jelentős csökkenés tapasztalható a nikkelfelvételben [16].

2.3.2., Nikkel okozta változások a sejtfelszínen és az intracelluláris térben

A fémion bejutásának sejt belső terébe számos következménye lehet, beleértve a sejt felületének töltésében, a sejtmembrán integritásában, az intracelluláris aminosavkészletben vagy az ion homeosztázisban megfigyelt változásokat. Egy korábban említett kutatás során a fémionok koncentrációjának 10^{-7} M-ról 10^{-3} M-ra való fokozatos emelésével a *Saccharomyces cerevisiae* sejtek felszínének töltése egyre pozitívabb lett, mindemellett a nikkel kötődése a sejtfalhoz változtatott a sejtfelszín integritásán [14]. Joho és mtsai. a *Saccharomyces cerevisiae* **0605-S6** vad típusú és **N08** Ni-rezisztens mutáns sejtvonalait vizsgálva a szabad aminosavkészlet kapcsán tapasztaltak összefüggéseket. A legtöbb aminosav szintje mindkét sejtvonal esetén csökkent nikkellel kiegészített tápoldatban, míg a hisztidinszint a nikkel koncentrációjának emelkedésével nőtt, ezzel fenntartva egy állandó hisztidin-nikkel moláris arányt, mely megközelítőleg 1,4-1,8 [19]. A *Saccharomyces cerevisiae*-ben az aminosavak jelentős része a vakuólumokban található [20], tehát feltehetőleg az **N08** nikkel-rezisztens sejtvonal esetén a nikkel a citoszolból egy vakuólumba kerül és hisztidinnel komplexet képez [21].

A nehézfémrezisztenciához köthető mechanizmusok Joho és mtsai. szerint két csoportba sorolhatók:

- 1) az akkumuláció csökkentése kelátképző ágensek vagy a transzportútvonallal elégtelensége által, vagy

- 2) a fémion intracelluláris eloszlásának megváltoztatása intracelluláris molekulákhoz való kötődéssel [11]. Nikkel rezisztens *Saccharomyces cerevisiae* mutánsok például az 1.

kategóriának megfelelően csökkentik a nikkelfelvételt a magnézium transzportrendszerén keresztül. Ezek a mutánsok gyakran a kobaltra is rezisztensek, mivel a kobalt ugyanazt a transzportrendszert használja, mint a nikkel. A vakuólumok az intracelluláris pH, az ionok és a metabolitok szabályozásában betöltött szerepüknek köszönhetően a 2. kategória kapcsán nagy jelentőségük van. Hibás vakuoláris funkcióval rendelkező *Saccharomyces cerevisiae* mutánsok esetén befejezetlen morfológiai fejlődést és a H^+ -ATPáz aktivitásban való változásokat tapasztaltak. Ezek a mutánsok stresszes körülmények között, például alapvető aminosavak többlete esetén, vagy nehézfémionok jelenléte mellett nem tudtak nőni. Ez alátámasztja, hogy a vakuólumoknak fontos szerepe van a fémionokkal szembeni rezisztenciában.

Küçükgöze és mtsai. egy nikkel-hiperrezisztens *Saccharomyces cerevisiae* populációból, mely 5,3 mM $NiCl_2$ -dal szemben is képes ellenállni, 12 egyedülálló mutánst (**M1-M12**) vizsgáltak, melyek közül az **M9** nikkelre kiemelten rezisztens volt és emellett kobaltnak, vasnak, cinknek és mangánnak is ellenállt [22]. Glükózon történő anaerob növekedés során 0,15 mM $NiCl_2$ jelenléte semmilyen jelentős hatással nem bírt a maximális specifikus növekedési rátára az **M9** mutáns esetén, míg a referenciaként használt sejtvonalnál 40%-os csökkentést tapasztaltak. Az etanol-, a glicerol- és az ecetsavtermelésre a nikkel csak a referencia sejtvonala esetén volt hatással. Ezek mellett szintén tapasztalták, hogy a trehalózsint, mely nikkel hiányában megközelítőleg egyezik az **M9**-ben és a referencia sejtvonalba, nikkel stressz esetén az **M9**-ben háromszorosára, míg a referencia sejtvonala esetén csupán másfélszeresére nőtt. Az egész genomot érintő transzkriptomikai elemzés alapján megállapították, hogy a vas-homeosztázishoz, a stresszválaszhoz és az oxidatív károsodáshoz kapcsolódó gének expressziója erőteljesebbé vált. A nikkel kémiaiailag hasonlít a rézhez, a kobalthoz és a cinkhez, így képes kiszorítani ezeket a sejtéből, mindemellett beavatkozik a vasfelvételbe, valószínűleg a vas-homeosztázishoz köthető gének túlzott expresszióját eredményezve.

2.4., Alkoholos fermentáció *Saccharomyces cerevisiae* felhasználásával

A *Saccharomyces cerevisiae* fakultatív anaerob mikroorganizmus lévén oxigén hiányában a glikolízis végtermékét, a piruvátot hasznosítja, mint terminális elektron akceptort. Ezt a folyamatot a piruvát dekarboxiláz enzim katalizálja és acetaldehid mellett szén-dioxidot eredményez. Az acetaldehid tovább alakul enzimatis úton alkohollá, így etanol keletkezik. A redukció során a hidrogénforrás a NADH redukált kofaktor.

2.4.1., A nikkel hatása a *Saccharomyces cerevisiae* alkoholos fermentációjára

Az élesztősejtek által felvett kationok két kategóriába sorolhatók. Egy részük a sejtfelszínen lévő anionos helyekhez kötődnek. Ezek könnyen helyettesíthetők más kationokkal, így az állapotuk reverzibilis. Másik részük a sejt belsejébe transzportálódnak és csak nehezen, vagy egyáltalán nem távolíthatók el.

Fuhrmann és Rothstein kutatásuk során azt vizsgálták, hogy kizárólag a sejt belsejében lévő nikkel ionok milyen hatással vannak az alkoholos fermentációra [23]. Kutatásuk során megállapították, hogy a fermentáció gátlásában többféle mechanizmus is szerepet játszhat.

Azt feltételezték, hogy a nikkel fermentációt gátló mechanizmusa glikolitikus enzimek gátlásában valósul meg, így a 12 órája tápanyagelvonási stressz alatt lévő élesztőket háromszor átmosták desztillált vízzel, ezzel eltávolítva a sejtfelszínhez kötött nikkel ionokat. Méréseik során megfigyelték, hogy az anaerob körülmények között hozzáadott nikkel gátló hatása függ attól, hogy a glükóz hozzáadásához képest mikor adtak nikkelt a szuszpenzióhoz. A gátlás akkor volt a legmagasabb, ha a nikkelt 30 perccel a glükóz előtt adták hozzá, és akkor volt a legkisebb, ha 5 perccel a glükóz hozzáadása után került a szuszpenzióba. Véggkövetkeztetésük az volt, hogy a nikkel az alkohol dehidrogenáz enzim működését gátolja.

Mindemellett megfigyelték, hogy a pH csökkentése jelentős hatással volt a nikkel fermentációt gátló hatására, pH 5,5 esetén ugyanis a gátlás jelentős volt, míg pH 3,3 esetén a fermentáció nagyrészt ugyanúgy zajlott, mint a kontrollban. Az eredetileg használt 0,5 mM koncentrációt 100 mM-ra emelve sem tapasztaltak jelentős gátlást pH 3,3 esetén, ezzel bizonyítva, hogy a különbséget nem a sejtfelszínhez kötődő nikkel mennyisége jelenti, hiszen ilyen magas koncentrációnál feltehetőleg minden lehetséges aktív helyre kötődött már nikkel. Bár a gátlás helye nem elérhető az extracelluláris pH számára, de a nikkel transzportja pH-tól függő folyamat.

Ugyanezen kutatás folyamán Fuhrmann és Rothstein arra lettek figyelmesek, hogy ha a fermentáció légterét nitrogénnel, CO₂-dal vagy levegővel folyamatosan mosták, a nikkel cukorfelvételt gátló hatása csökkenésnek indult, azonban az öblítés megállításával a gátló hatás ismét jelentkezett. Egy párhuzamosan zajló fermentáció légterét csupán megtöltötték nitrogéngázzal, majd lezárták, ekkor a 73 %-os gátló hatás változatlanul megfigyelhető volt.

A légtér mosásának hatása az egyik illékony reakciótermék eltávolításához volt köthető. Mivel a CO₂-dal való mosás során hasonló megfigyeléseik voltak, mint nitrogénnel való mosás során, így valószínűtlen volt, hogy ennek hiánya hatott volna a nikkel gátló hatására. Az acetaldehidnek és az etanolnak a nikkel jelenléte nélkül nem volt észlelhető hatása a

fermentációra, azonban nikkell jelenlétében az acetaldehid a gátló hatás csökkenését eredményezte, míg az etanol növelte azt. Ennek ismeretében arra a következtetésre jutottak, hogy az etanol eltávolítása áll összefüggésben a légtér mosásával. Az acetaldehid és az etanol fordított hatása azt feltételezte, hogy a gátlás az alkohol dehidrogenáz enzimet érinti, mely a két szubsztrát közötti egyensúlyt tartja fenn.

2.4.2., Keményítő szénforrás alkalmazása alkoholos fermentáció során

A keményítő számos növény által szintetizált glükóz biopolimer, mely amilopektinből és amilózból épül fel. Az előbbi egy elágazó polimer, mely nagy mennyiségű rövidebb szálát tartalmaz, míg az utóbbi kevesebb, hosszabb láncból áll. A keményítő szerkezete több szintre osztható, melyek között a molekuláris méret tesz különbséget, ezek a következők: a lánchossz-eloszlás (1. szint), a teljes elágazó molekulaméret (2. szint), a kristályos és amorf lamellák (3. szint), a blokkok (4. szint), a növekedési gyűrű (5. szint) és a szemcseszerkezet (6. szint) [24].

A makromolekula lebontása glükóz monomerekre savkatalizált hidrolízis segítségével megvalósítható. Ennek mechanizmusa több lépést foglal magába. Elsőként az oxóniumion elektrofil támadása megy végbe az $\alpha(1-4)$ glikozidos kötés oxigénjére, mely így parciálisan pozitív töltésű lesz. Ennek következtében a C-O kötés σ -elektronjai az oxigénre kerülnek, és kialakul egy nagy energiájú, reaktív karbokation intermedier, mely egy Lewis-sav, a vízzel (mely Lewis-bázis) reakcióba lépve regenerálódik a hidroxil csoportja [25]. A savhidrolizált keményítő szerkezete és tulajdonságai változhatnak az alkalmazott sav minőségével, mennyiségével és a hidrolízis idejével [24].

A keményítő bontását biológiai rendszerekben két enzim - α -amiláz és glükoamiláz - együtműködése eredményezi [24]. A glükoamiláz a keményítő szemcsék felszínén apró lyukakat hoz létre, ahol az α -amiláz be tud jutni a granulák belsejébe és a keményítő glükóz monomerei között lévő α -1-4 glikozidos kötéseket hasítja véletlenszerűen.

A keményítő szénforrásból kiinduló etanol előállításra konvencionális módszer négy lépésből áll: 1., a keményítő előfőzése 105 °C-on, 2., a keményítő elfolyósítása termotabilis α -amiláz segítségével 80-90 °C-on, 3., elcukrosítás glükoamiláz segítségével 65 °C-on pH 4,5 mellett, mely cukrot eredményez, 4., ennek fermentációja 30-37 °C-on az utolsó lépés [24].

A módszer hátránya, hogy az egyes lépések közötti hőmérsékletkülönbséget a reakcióközeg lehűtésével lehet megszüntetni, mely a bioetanol előállítás költségeinek 10-20%-át teszi ki, emellett az üzemeltetési költség 40-50%-át jelenti, ezzel jelentősen rontva a költséghatékonyságot [24]. Ennek a módszernek egy alternatívája az ún. hideg módszer, mely nyers keményítőt lebontani képes enzimeket használ alacsonyabb hőmérsékleten. Ma már

terveznek olyan rekombináns élesztőket, melyekbe klónozás segítségével bejuttatják a nyers keményítő bontó enzimeket kódoló géneket, melyek expresszáldva lehetővé teszik a keményítő direkt fermentációját egyetlen organizmus segítségével [24].

Abouzied és Reddy kutatásuk során összehasonlították az amilolitikus *Aspergillus niger* monokultúrás, valamint az *A. niger* és a *S. cerevisiae* kokultúrás fermentációkat, melyek során keményítőből állítottak elő etanolt direkt módon [26]. Méréseik során megfigyelték, hogy mind a keményítő hasznosítás, az amilolitikus aktivitás és az etanol kihozatal jelentősen magasabb volt a kokultúrás fermentáció során, a két faj együttműködő metabolizmusának köszönhetően.

A monokultúrás fermentáció során nagyobb biomasszatömeget tapasztaltak, mely azt feltételezi, lényegesen több szénforrás fordítódott a sejtömeg előállítására, mint a fermentációra. A kísérlet során az etanoltermelés optimuma pH 5 és 6 között volt, míg a keményítő hidrolízisnek pH 5 és 8 közé esett. A kísérlet során aerob inkubációs körülmények esetén az alkoholkhozatal minimális volt, ellenben a biomassza kihozatal magasabb volt, mint bármilyen más körülmény között. A keményítő koncentráció változtatásával (5-10%) az alkoholkhozatal jelentősen nem változott, így a továbbiakban a lehető legmagasabb, 10% keményítő koncentrációval végezték a kísérleteket. A kiindulási inokulum mennyiségének a szükséges fermentációs idő jelentősen csökkent. Az alkoholkhozatal két napon belül elérte az elméleti maximum 96%-át.

Miah és mtsai. kutatásuk folyamán a konvencionális szeparált hidrolízis és fermentáció hátrányainak kiküszöbölésére dolgoztak ki egy eljárást [27]. Munkájuk során általuk izolált *Bacillus amyloliquefaciens* és *Saccharomyces cerevisiae* fajokkal dolgoztak, melyek közül az utóbbit 37 °C-ról indulva 42 °C-os hőmérsékletre adaptáltak. Ennek oka, hogy a keményítő elfolyósításának és a glükóz fermentálásának hőmérsékleti optimuma nem egyezik meg, így a probléma kiküszöbölésének céljából a fermentációhoz használni kívánt sejtvonalat kondicionáltak a keményítő elfolyósításának magasabb hőmérsékleti optimumához. A fermentáció során nyert alkoholkhozatal növelésének érdekében a szubsztrát koncentrációt 2%-ról fokozatosan 10%-ra növelték az inkubáció során, mely kokultúrás fermentáció során 3,86 (V/V)% alkoholkhozataalt eredményezett.

2.5., *Bacillus subtilis* és rokonfajok habitusa, főbb jellemzői

A *Bacillus subtilis* a *Bacteria* doménbe, az *Firmicutes* phylumba, ezen belül a *Bacillaceae* család *Bacillus* nemzetségébe tartozó prokarióta egysejtű mikroorganizmus. A sejtek Gram-

pozitív festődésű pálcák, melyek sejtfaa egy vastag peptidoglikán réteget tartalmaz. A peritrich ostoroknak köszönhetően aktív mozgásra képesek.

A *Bacillus* genus képviselői fellelhetők a talajban és természetes vizekben. Tagjai élőhelyük változatos tápanyagtartalmának köszönhetően számos metabolikus útvonalat fejlesztettek ki, emellett könnyen tenyészthető baktériumok, melyek nagy mennyiségű proteint képesek a tápvesbe szekretálni. Ezen tulajdonságainak köszönhetően a *Bacillus subtilis* az iparban széles körben használatos, többek között hidrolitikus enzimek (első sorban amiláz és proteáz), antibiotikumok, rovarirtószerek, detergensok, ételek és üdítőitalok előállítására. Utóbbi területeken történő bevett alkalmazásának köszönhetően elnyerte az Amerikai Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (US FDA) által kibocsátott GRAS (generally regarded as safe) státuszt [28]. Ezek mellett előszeretettel használt modellszervezet a biokémia, genetika és fiziológia területén.

A *Bacillus subtilis* obligát anaerob, így respiráció során a terminális elektron akceptor csak O_2 lehet, melynek jelenlétében a glükóz a légzési elektron transzport lánc segítségével CO_2 -dá és vízzé alakul.

A *Bacillus subtilis* szaporodása bipoláros osztódással történik. Kedvezőtlen környezeti paraméterek (például pH, hőmérséklet, kevés tápanyag stb.) hatására endospórát képez.

Telepmorfológiája a környezettel változik [29]. Szilárd táptalajon vertikális és laterális irányban is terjeszkedve hoznak létre telepeket. A *Bacillus subtilis* könnyen beszáradó, krém színű telepeket hoz létre, melyek széle az aktív mozgásnak köszönhetően szakadozó. Félszilárd táptalajon baktériumsejtek irányított mozgása (taxis) figyelhető meg a tápanyagforrás irányába, így egy növekvő gyűrű alakul ki a telepek körül. Folyékony tápoldatban a sejtek önállóan úsznak, így például az aerob *Bacillus subtilis* a sejtek növekedését az oxigénben gazdag helyeken folytatják, így egy vékony filmréteget létrehozva a folyadék-gáz határfelületen.

2.6., *Bacillus subtilis* nikkelfelvétel, transzportja és nikkelfelvétele befolyásoló tényezők

A baktériumok nehézfém felvételét a környezet paraméterei, az élesztők esetéhez hasonlóan jelentős mértékben befolyásolják. Egy-egy sejt vonal fémion felvételének vizsgálatához érdemes jól megválasztani a pH tartományt. Túl alacsony pH-n a magas H_3O^+ koncentráció következtében nagy a verseny a kation-kötő helyekért a sejt felszínen, így magának a vizsgált nehézfémnek kevésbé jut lehetősége megkötődni a sejt felszínen vagy bejutni az intracelluláris térbe, hogy kifejtsen esetleges toxikus vagy serkentő hatását [15].

A túl magas pH eredménye, hogy a legtöbb kation – így a nikkel is – fém-hidroxid formájában kicsapódik, ezzel a sejtek számára elérhető tápoldatban csökken a koncentrációja.

Az optimális vizsgálendő tartomány tehát a pH skála középső részén helyezkedik el, melyet Wierzba szintén megállapított az általa végzett kutatás során, amikor ólom, cink és nikkel bioszorpcióját vizsgálta ipari szennyvízből *Stenotrophomonas maltophilia*, valamint *Bacillus subtilis* fajok felhasználásával [30]. Azt tapasztalta, hogy mindhárom fémion esetén pH 5,00-6,00 közé esett a bioszorpció maximuma, mely *Bacillus subtilis* és nikkel esetén 40,1 mg/ 1 g sejt volt. Ezek mellett figyelembe vette a reakcióközegek érintkezésének idejét, melynek során arra lett figyelmes, hogy a *Bacillus subtilis* 20 perc elteltével elérte a nikkelre vonatkoztatott bioszorpciós maximumának 63,9-78,9 %-át, melynek oka nagy valószínűséggel a sejt felszínén található fémionkötő helyek telítődése.

Számottevő paraméter mindemellett a tápközegben jelen lévő ionok mennyisége és minősége - mint arra már oxóniumion koncentráció jelentőségénél is kitértünk -.

Rezisztenciát eredményező mechanizmusok között tudható, emellett a kénhidrogén képzés (mivel ez a legtöbb fémmel csapadékot eredményez), kelátképző anyagok szekretálása (például citromsav), akkumulációt eredményező mechanizmusok, valamint a fémionok biológiai transzformációja [15].

Egyes mikroorganizmusok nehézfém rezisztenciája mögött állhat, hogy a fém biológiai transzformáció során vegyértéket vált és/vagy fémorganikus vegyületté alakul. Ezen jelenség vizsgálatát rendszerint higany segítségével vizsgálják. A kation elemi higannyá történő redukciója esetén ugyanis a termék illékony, így az eredmény jól vizsgálható. A reakció visszafelé is működik, egyes mikrobák az elemi higanyt képesek kationná alakítani, ezt a tulajdonságot a *Bacillus subtilis* esetén is megfigyelték.

3., Anyagok és módszerek

Jelen fejezetben kifejtésre kerül, hogy milyen keretrendszerben értelmezendők a mérések során nyert eredmények. A reprodukálhatóság érdekében részletesen rögzítettük a használt anyagokat és módszereket. Az oldatok és szuszpenziók elkészítéséhez mindvégig analitikai tisztaságú anyagokat használtunk.

A keresztkontamináció elkerülése végett a steril körülményekre mindvégig gondosan ügyeltünk, meglétét kontrollok alkalmazásával, Gram festéssel (esetenként KOH-tesztel) rendszeresen ellenőriztük.

3.1., Hígító folyadékok és táptalajok előállítása

A hígító folyadékok és a táptalajok készítése során a **3. táblázat**ban megadott szilárd és folyékony összetevőket kimértük [31], majd tisztított vízzel 950 mL-re állítottuk a térfogatot.

3. táblázat Hígító folyadékok és táptalajok elkészítéséhez szükséges bemérési rend és sterilizációs eljárás.

Hígító folyadék/tápleves neve	Rövidítés	Összetevők	pH	Sterilizációs eljárás	Megjegyzés
0,85%(w/w)-os nátrium klorid oldat	0,85% NaCl	8,50 g nátrium-klorid	7,0±0,2	Az így készült oldatot minden esetben 250 ml-ként GL45-ös fejelésű üvegekbe töltjük és validált ciklus szerint, 2 atm nyomáson, 121°C-on 15 percig autoklávozzuk.	Sejtszuszenziók készítésénél, <i>well plate</i> -es eljárások során alkalmaztuk.
Tween-es nátrium-klorid-pepton-tompítóoldat	Tween+pepton	3,60 g kálium-dihidrogén-foszfát; 7,20 g dinátrium-hidrogén-foszfát-dihidrát; 4,30 g nátrium-klorid, 1,00 g pepton, 10,00 g tween	7,0±0,2		A <i>Bacillus spp.</i> sejtvonala izolálása során alkalmaztuk.
Sabouraud-féle 2%-os dextrózos leves	SDB	10,00 g pepton; 20,00 g dextróz	5,6±0,2		Törzsfenntartás, illetve a <i>well plate</i> -es eljárások során alkalmaztuk a <i>Saccharomyces</i> sejtvonalaik esetén.
Sabouraud-féle kétszerszabályos dextrózos leves	SDB2x	20,00 g pepton; 40,00 g dextróz	5,6±0,2		A <i>Saccharomyces</i> sejtvonalaik izolálása során alkalmaztuk.
Sabouraud-féle 2%-os dextrózos leves <i>chloramphenicol</i> -al	SDB+C	10,00 g pepton; 20,00 g dextróz; 500 mg <i>chloramphenicol</i>	5,6±0,2		A <i>Saccharomyces</i> sejtvonallal végzett fermentációs kísérletek során alkalmaztuk.
Sabouraud-féle módosított tápleves	SDB150	5,00 g pepton; 150,00 g szacharóz; 1,67 g MgCl ₂ ·6 H ₂ O	5,6±0,2		
Tripton-szója tápleves	TSB	17,00 g kazein pepton; 3,00 g szója pepton; 2,50 g glükóz monohidrát; 5,00 g nátrium-klorid; 2,50 g dikálium-hidrogénfoszfát	7,3±0,2		Törzsfenntartás, illetve a <i>well plate</i> -es eljárások során alkalmaztuk a <i>Bacillus</i> sejtvonalaik esetén.
Kétszerszabályos tripton-szója tápleves	TSB2x	34,00 g kazein pepton; 6,00 g szója pepton; 5,00 g glükóz monohidrát; 10,00 g nátrium-klorid; 5,00 g dikálium-hidrogénfoszfát	7,3±0,2		
Keményítő leves	-	1,50 g vízzeloldható keményítő; 5,00 g pepton; 2,50 g húskivonat, 2,50 g dextróz	7,2±0,2		A keményítő hasznosítási teszt során alkalmaztuk.
Tápleves	-	10,00 g húskivonat, 40,00 g szója-pepton	7,0±0,2		A keményítő szénforrást tartalmazó fermentációs kísérlet során alkalmaztuk.

Ezt követően kalibrált pH mérő alkalmazása mellett 6 N sósav vagy 10 N nátrium-hidroxid segítségével a pH-t táblázatban megadott értékre állítottuk, majd a végtérfogatot 1000

mL-re egészítettük ki. Az így készült oldatot palackoztuk, majd a táblázatban megtalálható eljárást követve sterilizáltuk. Hasonló eljárással készültek szilárd táptalajaink, azzal az eltéréssel, hogy 20,00 g agar bemérését követően 30 perc duzzadási időt hagytunk, a továbbiakat a táblázatnak megfelelően végeztük.

3.2., Felhasznált organizmusok és izolálásuk

Az „*Anyagok és módszerek*” c. fejezetben leírt kísérleteket ezen fejezetben ismertetett mikroorganizmusok felhasználásával végeztük el. Mind a *Saccharomyces*, mind a *Bacillus* nemzetségből az ipari vagy a törzskönyvtári sejtvonalak mellett általunk izolált, vad típusú sejtvonalakkal is elvégeztük a méréseket, így lehetővé téve ezek összehasonlítását.

3.2.1., *Saccharomyces cerevisiae*

Az Unikén Kft. által forgalmazott, szabad kereskedelemben beszerezhető ipari borélesztő. A sejtvonatra jellemző 12-34 °C-os optimális hőmérséklet, alacsony nitrogén- és oxigénigény, gyors erjesztési képesség, valamint alkohol tűrés 14% (V/V)-ig.

A tiszta sejtvonalat a fent leírt ipari élesztő granulátumból izoláltuk, mivel annak mikrobiológiai tisztasága nem biztosított. 100 mg granulátumot 100 ml 2%-os SDB+C-ben szuszpendáltuk fel, majd 22,5 °C-on 24 órán át inkubáltuk 250 rpm-en rázatott kultúrában (Sartorius Certomat IS). Decimális léptékhígítást követően egysejtkolóniák létrehozásának céljából Petri-csészékben lévő 4%-os SDA+C-re pázsitos szélesztéssel 50 µL 10⁴, 10⁵, 10⁶ hígítású szuszpenziót oltottunk, majd ezeket 22,5 °C-on, 3 napon át inkubáltuk.

3.2.2., *Saccharomyces sp.* (SC_NYH_1)

Kutatócsoportunk által izolált *Saccharomyces sp.* Az izolálás folyamata megegyezik a *Saccharomyces cerevisiae* esetén leírtakkal, azzal a különbséggel, hogy 100 g granulátum helyett SDB+C-ben elődúsított természetes mintákból alkalmaztunk 100 µL-t. Izolálást követően biokémiai identifikációval erősítettük meg az organizmus rendszertani besorolását.

3.2.3., *Bacillus subtilis*

A Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye (1118, Budapest, Somlói út 14-16.) által kibocsátott, az *American Type Culture Collection*-ben ATCC 6633 gyűjteményi számmal rendelkező ipari mikroorganizmus.

3.2.4., *Bacillus* sp.

Kutatócsoportunk által izolált *Bacillus* sp. tiszta sejtvonalát szabad kereskedelembe beszerezhető árpa, zab és hántolt árpa felhasználásával izoláltuk, melyeknek 10,00-10,00 g-ját literenként 4,00 g nátrium-lauril-szulfátot 100 ml hypo-t tartalmazó sterilizáló oldatban ($7,0 \pm 0,2$) kétszer 10 percig 250 rpm-en ráztuk.

Ezt követően a mintákról a sterilizáló oldatot 20-30 ml Tween 80-as pepton tompító-oldattal mostuk le, melynek elkészítését lásd a „*Hígító folyadékok és táptalajok előállítása*” c. fejezetben, majd 100 ml **TSB** dúsító oldatba helyeztük, majd 36 °C-on 24 órán át dúsítottuk. Ahol a dúsító oldat opálos lett, decimális léptékhígítást követően 100 µl-t **TSA** agarra szélesztettünk, továbbiakban az izolálás folyamata megegyezik a *Saccharomyces cerevisiae* esetén leírtakkal, azzal a különbséggel, hogy 100 g granulátum helyett a TSB-ben elődúsított természetes mintákból alkalmaztunk 100 µL-t. Izolálást követően biokémiai identifikációval erősítettük meg az organizmus rendszertani besorolását.

3.3., Inokulációs sejtuszpenzió előállítása

Az inokulációs szuszpenzió (továbbiakban inokulátum) úgy készült, hogy steril kémcsőbe 13 ml 0,85%-os NaCl oldatot mértünk be, majd a tiszta 24 órás sejtvonalból steril fapálcás mintavételező tampon segítségével levettünk egy telepet, melyet a bemért sóoldatban feloldottunk, majd az oldatot homogenizáltuk. Az oldat abszorbanciáját spektrofotométerrel 600 nm-en megmértük (SHIMADZU 1601), majd hígítás segítségével beállítottuk a sejtkoncentrációt McFarland szerint (lásd a „*McFarland-féle relatív típusú sejtszámmeghatározás*” c. fejezetben). A bemérendő szuszpenzió térfogatának kiszámítása a következőképpen történt:

$$V_{\text{törzsoldat}} = \frac{0,06}{A_{\text{törzsoldat}}} \times 13 \text{ ml},$$

ahol az **0,06** az elméleti abszorbancia értéke, a **A_{törzsoldat}** az általunk mért abszorbancia értéke, a **13 ml** esetükben 1 ml.

3.4., McFarland-féle relatív típusú sejtszámmeghatározás

A laboratóriumban relatív típusú sejtszámmeghatározást alkalmaztunk, melyet spektrofotometriás eljárás formájában adaptáltunk [32, 33], ahol $A_{600}=0,649$ 2 McF-del

egyenértékű. Mivel a módszer nem tesz különbséget élő és holt sejt között, az összehasonlítást 18-24 órás készítményekkel végezve kiküszöbölhetjük ezt a hibát.

A McFarland *standard*-ek referenciaként használatosak folyadékok vagy bakteriális szuszpenziók turbiditásának beállításában. A McFarland *standard*-eket a **4. táblázatban** megadott koncentrációkban elkészíthetjük 1%-os bárium-klorid és 1%-os kénsav reakciójával, a sejtszám sűrűsége pedig a koncentrációval arányos.

4. táblázat McFarland *standard*-ek, az előállításukhoz szükséges 1%-os BaCl₂ és 1%-os kénsav mennyisége, és az optikai denzitásuknak megfelelő sejtsuszpenzió baktériumra vonatkoztatott sejtkoncentrációja. Élesztősejtekkel való munka során a táblázatban szereplő értéket 30-cal osztva kapjuk a megfelelő, élesztőre vonatkoztatott sejtkoncentrációt.

McFarland Standard	1% BaCl ₂ (mL)	1% H ₂ SO ₄ (mL)	Hozzávetőleges sejtszámsűrűség (CFU/mL)
0,50	0,05	9,95	1,5E+08
1,00	0,10	9,90	3,0E+08
2,00	0,20	9,80	6,0E+08
3,00	0,30	9,70	9,0E+08
4,00	0,40	9,60	1,2E+09

3.5., Toxicitási teszt

Jelen eljárás *well plate*-es rendszerben összeállított rutin szűrővizsgálati rendszer, amely 0,0-0,10 mg/mL tartományban vizsgálja a fémionkoncentráció hatását a sejtek viabilitására felező hígításban.

A teszt során alkalmazott 4 mg/mL gátlószer oldat készítésekor az alábbi egyenlet szerint számított fémsó mennyiséget analitikai titer alapanyagból (jelen esetben nikkel-szulfát-heptahidrátból) 40 ml ionmentes vízben feloldottuk, majd 0,22 mikronos szűrővel az aszepszis szabályai szerint sterilre szűrtük.

$$m(\text{fémsó}) = \frac{4 \text{ mg/mL}}{Ar(\text{fématom})} \cdot \frac{M(\text{fémsó})}{n} \cdot V_{\text{vég}},$$

ahol **m(fémsó)** a bemérendő fémsó tömege, **4 mg/mL** a gátló fématom tömege, **Ar(fématom)** atomtömeg, **M(fémsó)** a gátlószer moláris tömege, **n** a sztöchiometrikus viszonyszám, **V_{vég}** az oldat végtérfogata.

Egy 24-*well plate*-be az **5. táblázat** adatai és az aszepszis szabályai szerint elvégeztük a beméréseket. A szükséges anyagok elkészítését lásd a „Hígító folyadékok és táptalajok előállítása” c. fejezetben. Homogenizálást követően a megfelelő sejtvonallal inokuláltunk. Az *Inokulátum*, elkészítését lásd a „Tiszta sejtvonal fenntartása és inokulációs sejtsuszpenzió

előállítása” c. fejezetben. A *well plate*-et 36 °C-on, az izotermikus desztilláció körülményeit biztosítva 2 napon át inkubáltuk. A kísérletből négy biológiai ismétlést készítettünk mind a négy általunk vizsgált mikroorganizmussal.

5. táblázat Ni^{2+} teljes gátlásának meghatározása 24-es *well plate*-ben végzett toxicitási teszttel. Élesztők esetén SDB2x, baktériumok esetén TSB2x táptalaj használatos.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	Anyag V (μL)
A	500	500	500	500	500	1*	Táptalaj
	5	10	15	20	25		0,4 mg/mL gátlószer
	495	490	485	480	475		0,85% NaCl
	10	10	10	10	10		A600=0,06 inokulációs szuszpenzió
B	500	500	500	500	500	1*	Táptalaj
	5	10	15	20	25		0,4 mg/mL gátlószer
	495	490	485	480	475		0,85% NaCl
	10	10	10	10	10		A600=0,06 inokulációs szuszpenzió
C	500	500	500	500	500	2*	Táptalaj
	5	10	15	20	25		0,4 mg/mL gátlószer
	495	490	485	480	475		0,85% NaCl
	10	10	10	10	10		A600=0,06 inokulációs szuszpenzió
D	500	500	500	500	500	2*	Táptalaj
	5	10	15	20	25		0,4 mg/mL gátlószer
	495	490	485	480	475		0,85% NaCl
	10	10	10	10	10		A600=0,06 inokulációs szuszpenzió

3.6., Keményítő hasznosítás teszt

Jelen eljárás *well plate*-es rendszerben összeállított rutin szűrővizsgálati rendszer, amely a keményítő hasznosítást 0-1500 mg/L keményítő koncentrációtartományban vizsgálja.

Egy 24-*well plate*-be a **6. táblázat** adatai és az aszepszis szabályai szerint elvégeztük a beméréseket. A szükséges anyagok elkészítését lásd a „*Hígító folyadékok és táptalajok előállítása*” c. fejezetben. Homogenizálást követően a megfelelő sejtsuszpenzióval inokuláltunk, melynek elkészítését lásd a „*Tiszta sejtvonal fenntartása és inokulációs sejtsuszpenzió előállítása*” c. fejezetben. A *well plate*-et 36 °C-on, az izotermikus desztilláció körülményeit biztosítva, 2 napon át inkubáltuk. A kísérletből négy biológiai ismétlést készítettünk mind a négy általunk vizsgált mikroorganizmussal.

6. táblázat Keményítő hasznosítás vizsgálata 1500 mg/L keményítő leves felhasználásával. Élesztők esetén SDB2x, baktériumok esetén TSB2x táptalaj használatos.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	Anyag V (μL)
A	200	400	600	800	1000	1*	Keményítő leves
	800	600	400	200	0		0,85% NaCl
	10	10	10	10	10		A600=0,06 inokulációs szuszpenzió
B	200	400	600	800	1000	1*	Keményítő leves
	800	600	400	200	0		0,85% NaCl
	10	10	10	10	10		A600=0,06 inokulációs szuszpenzió
C	200	400	600	800	1000	2*	Keményítő leves
	800	600	400	200	0		0,85% NaCl
	10	10	10	10	10		A600=0,06 inokulációs szuszpenzió
D	200	400	600	800	1000	2*	Keményítő leves
	800	600	400	200	0		0,85% NaCl
	10	10	10	10	10		A600=0,06 inokulációs szuszpenzió
1* - Pozitív kontroll: 500 μL táptalaj, 500 μL 0,85% NaCl, 10 μL A600=0,06 inokulációs szuszpenzió							
2* - Negatív kontroll: 600 μL keményítő leves, 400 μL 0,85% NaCl, inokulációs szuszpenzió nélkül							

A keményítő hasznosítást a visszamaradt keményítőkoncentráció meghatározásával valósítjuk meg. A teszt során alkalmazott *Lugol-oldatot* úgy készítettük, hogy 600,00 mg jódd és 1200,00 mg kálium-jodid keverékét dörzsöléssel homogenizáltuk, majd cseppenként vizet adagoltunk hozzá. Miután a jód feloldódott ionmentes vízzel 100 ml-re hígítottuk.

A fenti *well plate* teszt bemérési táblázat 1-5. oszlopainak megfelelően 5 kalibráló oldatot készítettünk Eppendorf csövekbe keményítő leves és 0,85% NaCl felhasználásával. Ezt követően újabb Eppendorf csövekbe a *well plate* minden oszlopából 500 μL mintát mértünk be, melyeket 15000 rpg-vel, 5 percig centrifugáltuk. Minden esetben a felülúszóból 200 μL-t egy kémcsőbe mértünk, majd hozzáadtunk 900 μL kétszer desztillált vizet és 1 mL *Lugol-oldatot*. Az így készült oldatot bidesztillált vízzel 5 ml-re hígítottuk. Homogenizálást követően spektrofotométer segítségével 600 nm-en megmértük az oldatok optikai denzitását. A kapott abszorbancia értékek és a kalibráló görbe segítségével a keményítő koncentráció számítható. Mivel a kalibráló oldatok és a minták azonos hibákkal terheltek, így a hibák kiesnek.

3.7., Fermentációs kísérlet

A kísérletben vizsgált 0,00-100,00 mg/L nikkel(II) koncentráció tartományt nyolc részre osztottuk, valamint egy kontrollt alkalmaztunk, mely nem tartalmazott gátlószert. Mindezt két biológiai és két technikai ismétléssel végeztük el.

3.7.1., Fermentációs kísérlet a *Saccharomyces cerevisiae* és az SC_NYH_1 sejtvonalakkal a nikkel koncentráció gradiens mentén

A gátlószert az aszepszis szabályai szerint bemértük egy 100 mL-es mérőhengerbe, majd a térfogatot SDB150-nel 100 mL-re állítottuk és mintatartó üvegbe töltöttük. A táptalaj elkészítését lásd a „*Hígító folyadékok és táptalajok előállítása*”, míg a gátlószer elkészítését a „*Toxicitási teszt*” c. fejezetben. Homogenizálást követően 1 mL $A_{600}=0,06$ abszorbanciájú sejtuszuspenzióval inokuláltunk, melynek elkészítését lásd a „*Tiszta sejtvonal fenntartása és inokulációs sejtuszuspenzió előállítása*” c. fejezetben. A bemérést a **7. táblázat**, illetve a **8. táblázat** adatai szerint, a koncentráció gradiens általunk meghatározott pontjain megismételtük. Az üvegeket 7 napon át, 22,5 °C-on, 50 rpm-en rázótermosztáton inkubáltuk.

A kísérletből két biológiai ismétlést készítettünk, egyszer a *Saccharomyces cerevisiae* ipari, másodszor az **SC_NYH_1** törzzsel inokulálva, mindkét esetben két technikai ismétléssel.

7. táblázat Alkoholos fermentáció bemérési rendje *Saccharomyces cerevisiae* esetén növekvő mennyiségű 4 mg/ml gátlószer hozzáadásával.

Anyag V	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
SDB150 (mL)	100	99,9688	99,9375	99,875	99,75	99,5	99,25	99	98,75
4 mg/mL gátlószer (μL)	0	31,25	62,5	125	250	500	750	1000	1250
$A_{600}=0,06$ inokulációs szuszpenzió (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1

8. táblázat Alkoholos fermentáció bemérési rendje **SC_NYH_1** esetén növekvő mennyiségű 4 mg/ml gátlószer hozzáadásával.

Anyag V	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
SDB150 (mL)	100	99,9688	99,9375	99,0625	98,75	98,438	98,125	97,8125	97,5
4 mg/mL gátlószer (μL)	0	31,25	62,5	937,5	1250	1562	1875	2187,5	2500
$A_{600}=0,06$ inokulációs szuszpenzió (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Minden minta 1 mL-éből tízszeres hígítású oldatot készítettünk 0,85% NaCl-dal. Az így elkészített oldatokat McFarland-féle relatív típusú sejtszámmeghatározásra vittük tovább a „*McFarland-féle relatív típusú sejtszámmeghatározás*” c. fejezet szerint.

A minták többi részét 5 percen át 2500 G-n centrifugáltuk (Sorvall GLC 2). A felülúszóból 50 mL-t 20 mL ionmentes vízzel feltöltve desztilláltunk, 40-45 mL desztillátumot gyűjtöttünk.

A desztillátumot ionmentes vízzel 50 mL-re kiegészítettük, majd későbbi alkohol koncentráció meghatározás céljából (lásd „*Gázkromatográfiás alkohol koncentráció meghatározás*” c. fejezet) 4-8 °C-on hűtőben tároljuk. A pellet mikrobiológiai kontaminációs állapotát Gram-festéssel ellenőriztük. ott, ahol kontamináció volt, a kísérletet megismételtük.

3.7.2., Fermentációs kísérlet az SC_NYH_1 és a *Bacillus sp.* sejtvonalakkal 37,5 mg/L nikkel koncentráció mellett

A fermentáció során használt *hidrolizált keményítő oldat*, úgy készült, hogy egy Erlenmeyer-lombikba felvettünk 6,00 g *Amylum maydis*-t 75 mL ionmentes vízbe, hozzámérünk 0,50 mL tömény 96-98 (w/w) % kénsavat (Scharlau), majd 1,5 órán át 1,75 atm nyomáson, 115 °C-on hidrolizáltattuk. Az így készült oldatot az aszepszis szabályai szerint, kalibrált pH mérő alkalmazásával, 10 N nátrium-hidroxid és 6 N sósav segítségével pH 7,0 ± 0,2 értékre állítottuk.

A hidrolizált keményítőt tartalmazó Erlenmeyer-lombikba, az aszepszis szabályait figyelembe véve, a **9. táblázat**nak megfelelően folytattuk a bemérést. A használt tápleves elkészítését lásd a „*Hígító folyadékok és táptalajok előállítása*”, míg a gátlószer elkészítését a „*Toxicitási teszt*” c. fejezetben. Homogenizálást követően 1 mL $A_{600}=0,06$ abszorbanciájú sejtuszuspenzióval inokuláltunk, melynek elkészítését lásd a „*Tiszta sejtvonal fenntartása és inokulációs sejtuszuspenzió előállítása*” c. fejezetben. A bemérést a koncentráció gradiens általunk meghatározott pontjain megismételtük, a **9. táblázat** adatai szerint. Az üvegeket 7 napon át, 35 °C-on, 150 rpm-en rázótermosztáton inkubáltuk

A minták többi részét 5 percen át 2500 G-n centrifugáljuk. A felülúszóból 50 mL-t 20 mL ionmentes vízzel feltöltve desztilláltunk, míg 40-45 mL gyűjtöttünk. A desztillátumot ionmentes vízzel 50 mL-re kiegészítettük, majd későbbi alkohol koncentráció meghatározás céljából (lásd „*Gázkromatográfiás alkohol koncentráció meghatározás*” c. fejezet) 4-8 °C-on hűtőben tároljuk. A pellet mikrobiológiai kontaminációs állapotát Lugol-oldatos differenciálással ellenőriztük, ott, ahol kontamináció volt, a kísérletet megismételtük.

9. táblázat Alkoholos fermentáció kihozatalának vizsgálata 37,5 mg/L Ni^{2+} koncentráció mellett.

Anyag V	<i>Bacillus spp.</i>			SC_NYH_1			<i>Bacillus spp.</i> +SC_NYH_1		
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
Hidrolizált keményítő oldat (mL)	75	75	75	75	75	75	75	75	75
kalcium-karbonát (g)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tápleves (mL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25
4 mg/mL gátlószer (μL)	0,938	0,938	0	0,938	0,938	0	0,938	0,938	0
$A_{600}=0,06$ inokulációs szuszpenzió (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1

3.8., Gázkromatográfiás alkohol koncentráció meghatározás

Chromatron Gaschromatograph 18.3 rutin gázkromatográfot alkalmaztunk lángdetektoros üzemmódban (H_2 -FID). Hőmérsékleti program és paraméterek:

Injektor és detektor hőmérséklet: 135 °C,

Légtermosztát hőmérséklet: (izotermikus) 110 °C

Kolonna: 4 mm x 2 m, saválló acélcső, SUPELCOPORT 80/100 mesh, 15 % Carbowax 20M

Eluens gáz: nitrogén, 40 mL/perc

Detektor: FID- H_2 ($p(H_2)=20$ kPa, $p(O_2)$)

Erősítés: 10^9

Minta térfogat: 5 μ L rendre

A kiértékelést standard kalibráció módszerével végeztük 0-12,5 (V/V) % etanol tartomány segítségével, 5 lépéses koncentráció gradienst alkalmazva. Minden mérést háromszor végeztünk el, ezek számtani közepét adjuk meg.

3.9., Kiértékelés, statisztika

Kísérleteinket és méréseinket 4 ismétléssel végeztük, ezek átlagát adjuk meg, az összetartozó értékek szórását számítottuk. Elsősorban lineáris összefüggéseket tapasztaltuk, ezért használtuk a Pearson-féle korrelációs tesztet. A számításokhoz és grafikus szemléltetéshez a Microsoft Excel segítségével dolgoztuk fel az adatokat, a kiértékelés során annak beépített függvényeit alkalmaztuk.

4., Eredmények

Jelen fejezetben találhatóak a kutatásunk során nyert eredmények, azok jelentőségének statisztikai módszerekkel történő alátámasztása és szemléltetése, valamint értelmezésükhöz szükséges egyéb tudnivalók. Az eredmények közlésének sorrendje megegyezik az „*Anyagok és módszerek*” c. fejezetben találhatóval.

4.1., A toxicitási teszt eredményei

A *Plate reader* felhasználásával nyert eredményeket Microsoft Excel fájlba importáltuk. Az 1-5 oszlopokat, valamint a pozitív és a negatív kontroll értékeit külön-külön átlagoltuk, majd az átlagos negatív kontroll értékkel korrigáltuk mind az oszlopok, mind az átlagos pozitív kontroll értékét. Ezt követően korrigált pozitív kontrollra indexáltuk a következő képlet felhasználásával, ezzel megadva a toxicitási teszt dózishatás függvényét:

$$\left(\frac{\text{oszlop átlag}}{\text{korrig. pozitív kontroll átlag}} \right) \times 100 - 100$$

Ezt követően a mért abszorbanciát, illetve az **SDB**-re és a **TSB**-re indexált növekedést a nikkel koncentráció függvényében derékszögű koordinátarendszerben ábrázoltuk (lásd **1.**, **3.**, illetve **4. és 5. diagram**), majd a dózis hatásfüggvényt 2 lineáris, illetve egy másodfokú függvényekkel közelítettük. A dózishatás nagyságát a nikkel koncentráció függvényében oszlopdiagramon is szemléltetjük (lásd **2.**, illetve **5. diagram**).

A tápközeg nikkel tartalma és az **SDB**-re/**TSA**-ra indexált növekedés közötti összefüggés lineáris voltát, meredekségét, valamint erősségét a Pearson-féle korrelációs teszt segítségével határoztuk meg. Ennek értéke megadja a lineáris összefüggés erősségét, előjele pedig az egyenes meredekségét.

A *Saccharomyces cerevisiae* esetében az $y = -1,0907x - 14,319$ egyenletű lineáris összefüggés, mely esetben Pearson teszt erőssége $R^2(\text{Pearson})=0,994$. Ekkor az egységnyi Ni(II)-ion koncentráció változásra kapott dózishatás -1,0907 %. A két illesztett egyenes metszéspontja 77,91 mg/L koncentrációnak adódott, mely megadja a nikkel MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) értékét, azaz a teljes gátláshoz szükséges legkisebb gátlószerkoncentrációt. A MIC₅₀ az 50 %-os dózishatáshoz szükséges gátlószerkoncentráció. Meghatározásához a vizsgált tartomány függvényértékeit balról és jobbról korlátozó függvényeket egyenessel és konstanssal közelítettük, melyek egyenlete általánosan $\delta\% = m \times c + b$ és $y=k$ -rendre. Ahol kezdetben serkentő hatás volt megfigyelhető, az $y=0$ és a k közé eső

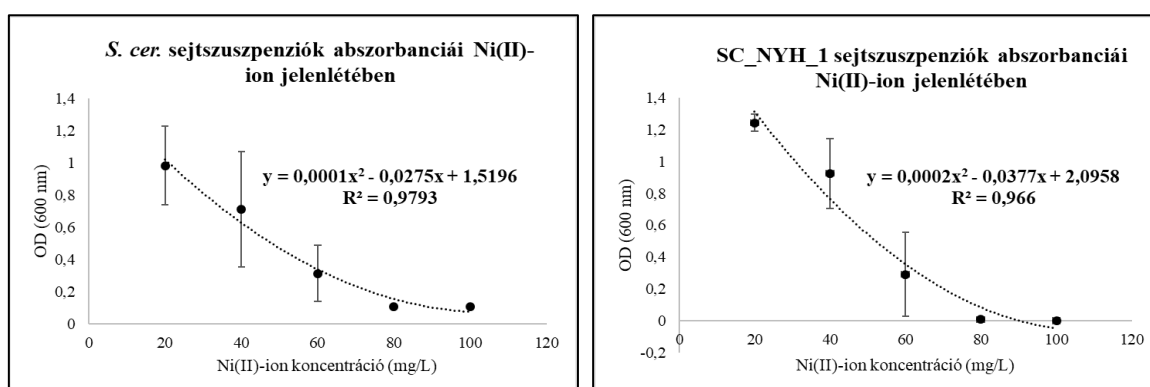
értékekkel számoltunk, a következő képlet felhasználásával:

$$MIC_{50} = \frac{\frac{k}{2} - b}{m}$$

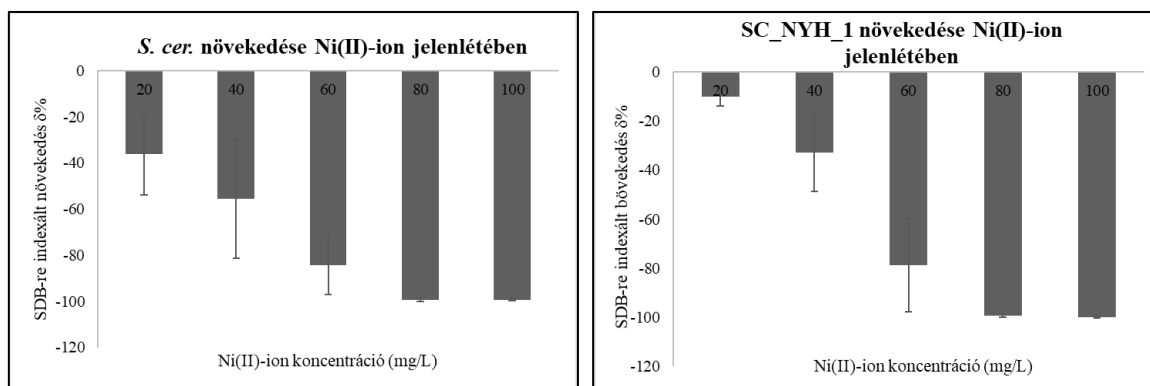
A MIC_{50} *Saccharomyces cerevisiae*-nél 38,969 mg/L.

Az **SC_NYH_1** esetében az $y = -1,5691x + 23,173$ egyenletű lineáris összefüggés erőssége **$R^2(\text{Pearson})=0,988$** . Ekkor az egységnyi Ni(II) koncentráció változásra kapott dózishatás -1,5691 %. A MIC érték ebben az esetben 78,04 mg/L, míg a MIC_{50} 45,678 mg/L.

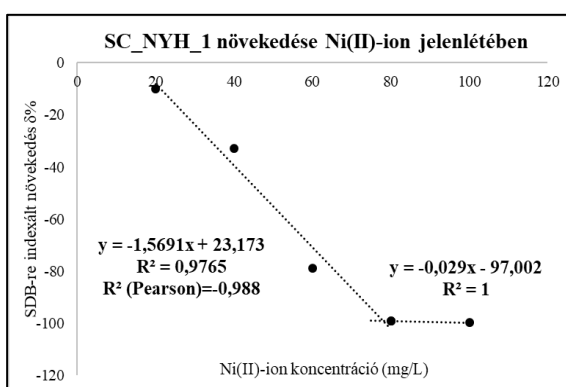
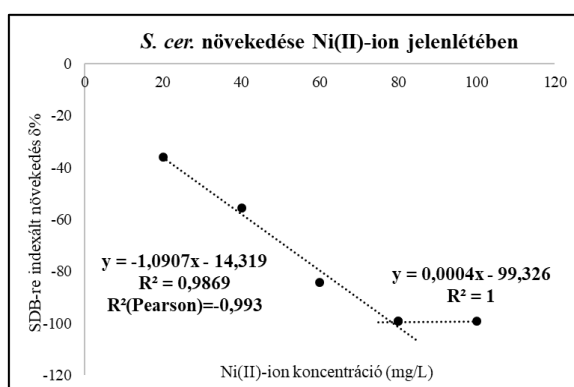
A *Bacillus subtilis*-nél az $y = -2,7008x + 129,09$ egyenletű lineáris összefüggés erőssége **$R^2(\text{Pearson})=0,974$** . Így az egységnyi Ni(II)-ion koncentráció változásra kapott dózishatás -2,7008 %. A MIC érték ebben az esetben 76,18 mg/L, míg a MIC_{50} 61,736 mg/L. A *Bacillus sp.* esetében az $y = -3,2039x + 108,26$ egyenletű lineáris összefüggés erőssége **$R^2(\text{Pearson})=0,994$** . Így az egységnyi Ni(II)-ion koncentráció változásra kapott dózishatás -3,2039 %. A MIC érték ebben az esetben 61,44 mg/L, míg a MIC_{50} 48,785 mg/L.



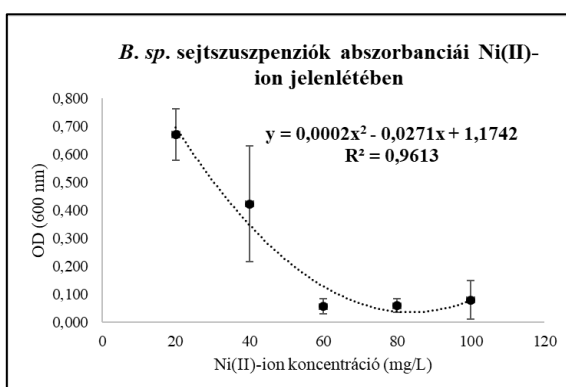
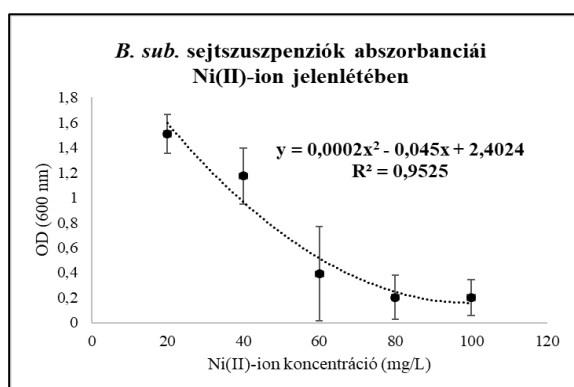
1. diagram Nikkel koncentráció gradiens hatása a *Saccharomyces cerevisiae* és az **SC_NYH_1** sejtvonalak növekedésre.



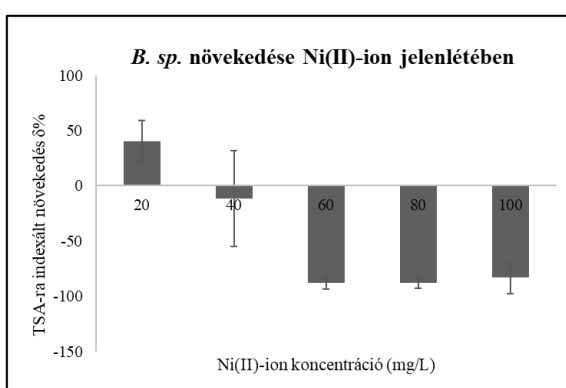
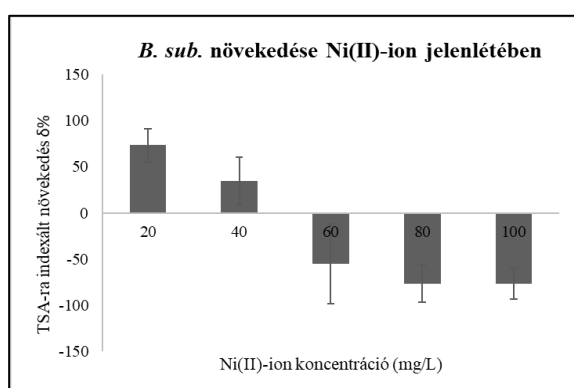
2. diagram Nikkel dózishatása százalékosan *Saccharomyces cerevisiae* és **SC_NYH_1** esetén.



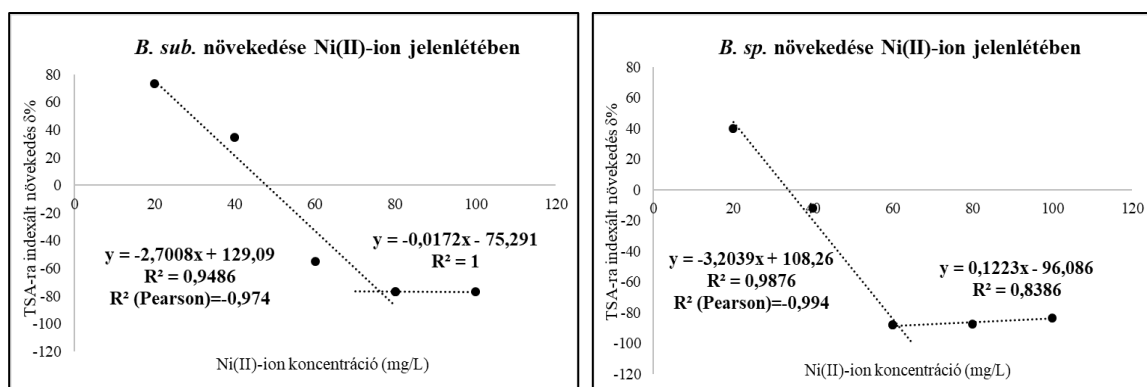
3. **diagram** Dózishatás statisztikai értelmezése *Saccharomyces cerevisiae* és SC_NYH_1 esetén, melyet a Pearson féle korrelációs teszt segítségével igazoltuk.



4. **diagram** Nikkel koncentráció gradiens hatása a *Bacillus subtilis* és *Bacillus sp.* sejtvonalak növekedésre.



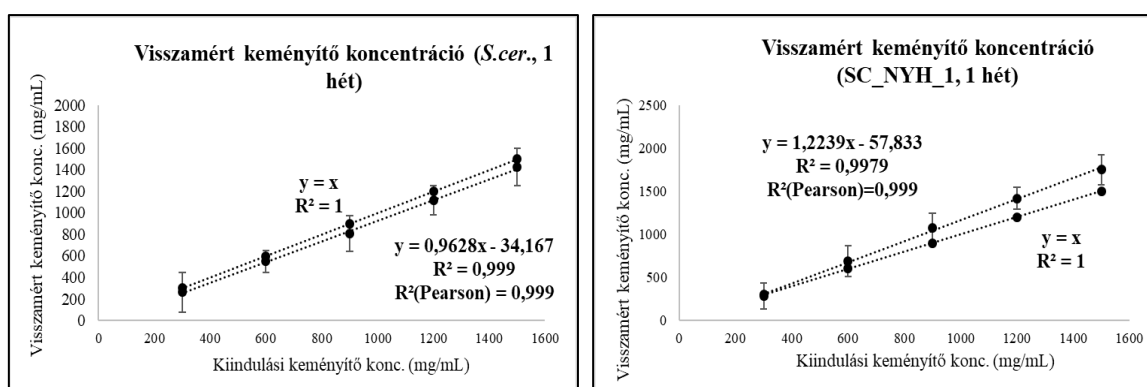
5. **diagram** Nikkel dózishatása százalékosan a *Bacillus subtilis* és *Bacillus sp.* sejtvonalak esetén.



6. diagram Dózishatás statisztikai értelmezése *Bacillus subtilis* és *Bacillus sp.* esetén, melyet a Pearson féle korrelációs teszt segítségével igazoltuk.

4.2., A keményítő hasznosítási teszt eredményei

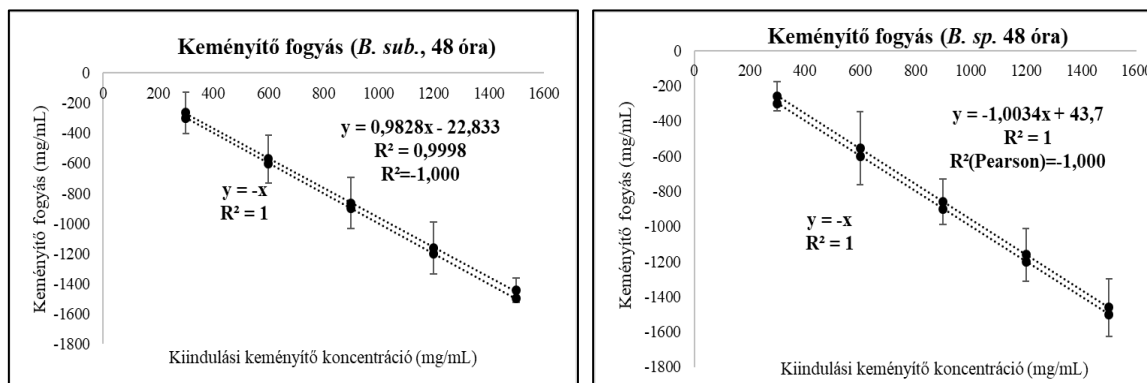
Az élesztő sejtvonalak esetén az 1 hét után visszamért keményítő koncentrációt és a kiindulási keményítő koncentrációt ábrázoltuk a kiindulási keményítő koncentráció függvényében (lásd **7. diagram**). A pontthalmazokat egyenessel közelítettük, melyre elvégeztük a Pearson-tesztet. A *Saccharomyces cerevisiae* esetén az $y = 0,9628x - 34,167$ egyenletű összefüggésre a Pearson-teszt erőssége 0,999, míg az **SC_NYH_1** esetén az $y = 1,2239x - 57,833$ egyenletű összefüggésre a Pearson-teszt erőssége 0,9979. Az utóbbi esetben a mért koncentrációt ábrázoló egyenes a kiindulási keményítő koncentrációt ábrázoló egyenes felé szuperponálódik. Az utolsó mérési pontban a mért érték 252,00 mg/mL-rel, százalékosan 16,80 %-kal haladja meg a teoretikus maximum értéket.



7. diagram 1 hét inkubációt követően visszamért keményítő koncentráció (mg/mL), valamint a kiindulási keményítő koncentráció (mg/mL) *Saccharomyces cerevisiae* és **SC_NYH_1** esetén.

A *Bacillus* sejtvonalak esetén a 48 óra után mért keményítő fogyást és a maximális keményítő fogyást ábrázoltuk a kiindulási keményítő koncentráció függvényében (lásd **8. diagram**). A pontthalmazokat egyenessel közelítettük, melyre elvégeztük a Pearson-tesztet. A *Bacillus subtilis* esetén az $y = 0,9828x - 22,833$ egyenletű összefüggésre a Pearson-teszt

erőssége -1,000, míg a *Bacillus sp.* esetén az $y = -1,0034x + 43,7$ egyenletű összefüggésre a Pearson-teszt erőssége -1,000.



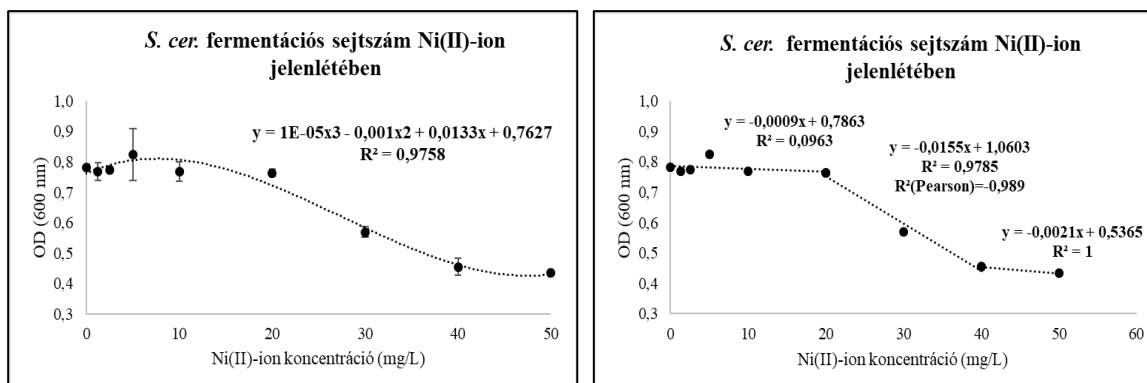
8. diagram 48 óra inkubációt követően meghatározott keményítő fogyás (mg/mL), valamint a kiindulási keményítő koncentráció (mg/mL) *Bacillus subtilis* és *Bacillus sp.* esetén.

4.3., Fermentációs teszt eredményei

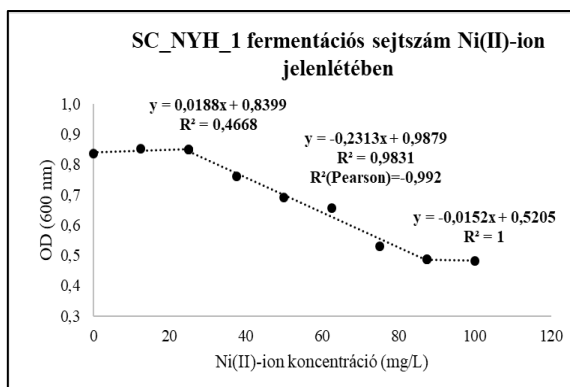
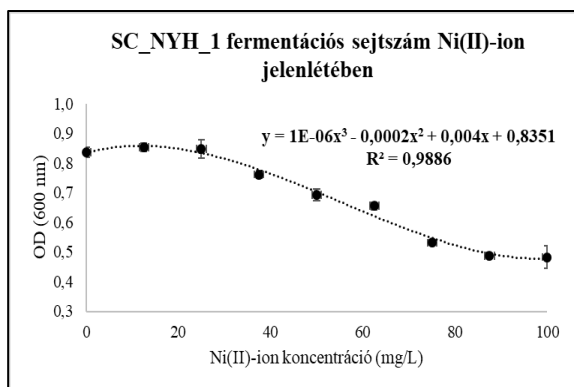
A fermentlevek abszorbancia értékeit a nikkel koncentráció függvényében ábrázolva mind a *Saccharomyces cerevisiae*, mind az **SC_NYH_1** esetén a pontthalmazt egy harmadfokú függvénnyel és három lineáris függvénnyel közelítettük (lásd **9. és 10. diagram**), mely utóbbiak közül a középsőre elvégeztük a Pearson-tesztet is.

Saccharomyces cerevisiae-nél a harmadfokú függvény egyenlete $y = 1E-05x^3 - 0,001x^2 + 0,0133x + 0,7627$, míg a lineáris függvények közül a negatív meredekségű egyenlete $y = -0,0155x + 1,0603$, utóbbira a Pearson-teszt erőssége 0,989.

SC_NYH_1-nél a harmadfokú függvény egyenlete $y = 1E-06x^3 - 0,0002x^2 + 0,004x + 0,8351$, míg a lineáris függvények közül a negatív meredekségű egyenlete $y = -0,2313x + 0,9879$, utóbbira Pearson-teszt erőssége 0,992.

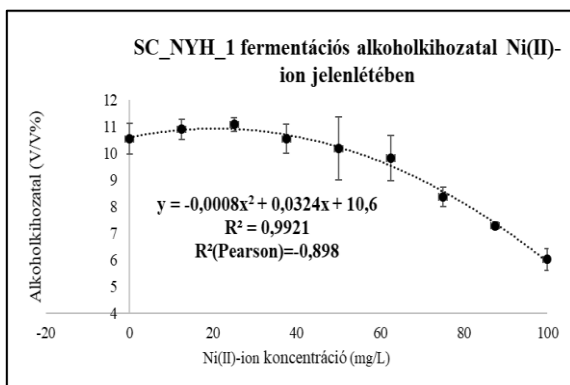
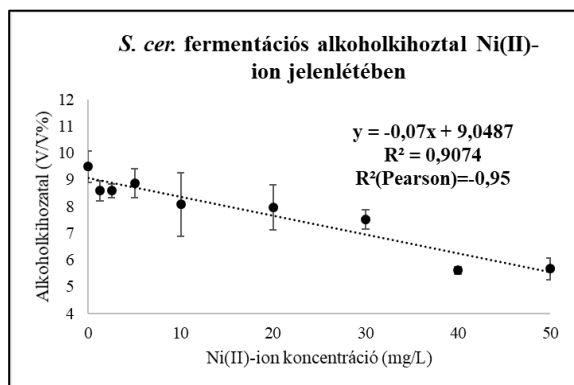


9. diagram Fermentációs sejtszám Ni(II)-ion jelenlétében *Saccharomyces cerevisiae* esetén.

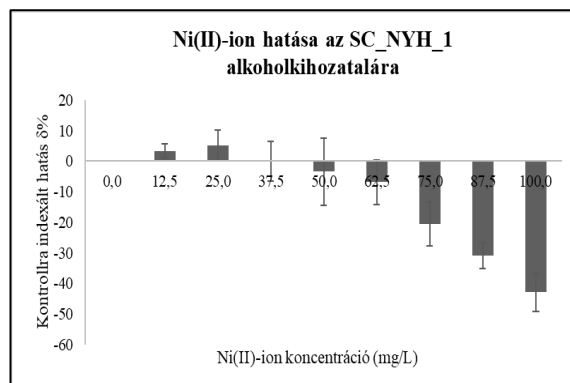
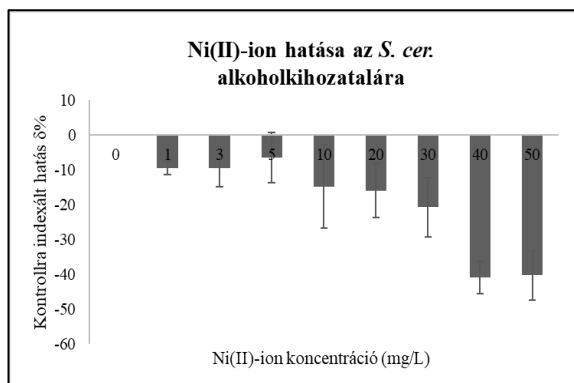


10. diagram Fermentációs sejtszám Ni(II)-ion jelenlétében SC_NYH_1 esetén.

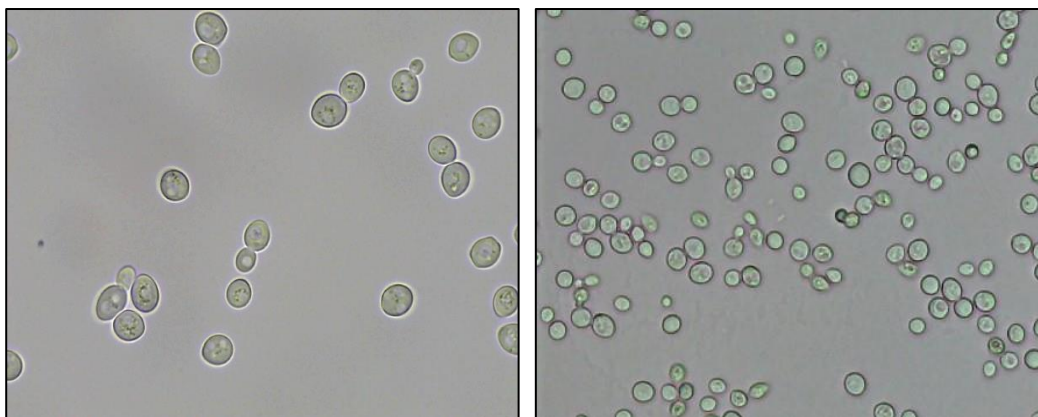
A fermentálé desztillálását követően mért alkoholkhozatazt a nikkelt koncentráció függvényében ábrázoltuk derékszögű koordináta-rendszerben, illetve oszlopdiagramon (lásd **11.** és **12. diagram**). Az előbbi esetben a pontthalmazokra *Saccharomyces cerevisiae*-nél lineáris, SC_NYH_1 esetén másodfokú görbét tudtuk illeszteni, melyek egyenlete rendre $y = -0,07x + 9,0487$ ($R^2(\text{Pearson}) = 0,9074$), illetve $y = -0,0008x^2 + 0,0324x + 10,6$. A minták mikrobiológiai tisztaságát natív készítmény készítésével ellenőriztük (lásd **1. kép** és **2. kép**).



11. diagram Fermentációs alkoholkhozatal Ni(II)-ion jelenlétében *Saccharomyces cerevisiae* és SC_NYH_1 esetén.

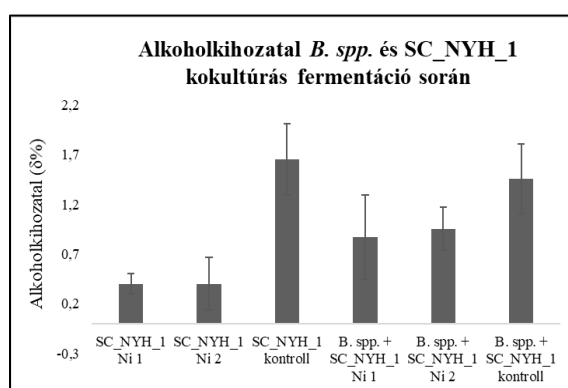


12. diagram Ni(II)-ion dózishatása az alkoholos fermentációra jelenlétében *Saccharomyces cerevisiae* és SC_NYH_1 esetén.

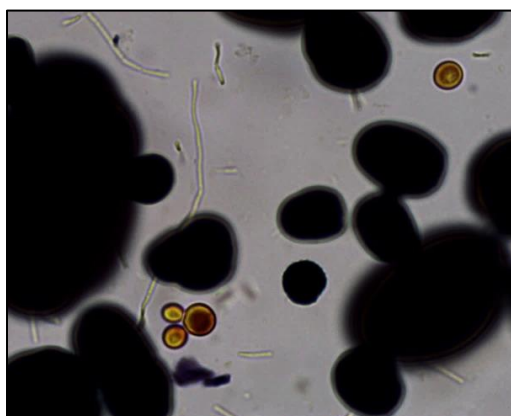


1. kép *Saccharomyces cerevisiae* (balra) és **SC_NYH_1** (jobbra) mikroszkópos felvétele (natív készítmény, 1000x). Saját forrás.

A *Bacillus* sp. és **SC_NYH_1** sejtvonallakkal végzett fermentációs kísérlet során mért alkoholkhozatazt oszlopdiagramon ábrázoltuk, ahol a mért értékek balról jobbra rendre 0,4; 0,4; 1,65; 0,87; 0,95; és 1,456 (V/V) % voltak. A kiindulási szabad glükóz koncentráció átlagosan 1,85g/L volt, 0,57 g/L szórással. A minták mikrobiológiai tisztaságát Lugol-oldatos differenciálással ellenőriztük (lásd **3. kép**).



13. diagram Fermentációs alkoholkhozatal *B. sp.* és **SC_NYH_1** kokultúrás fermentációja esetén.



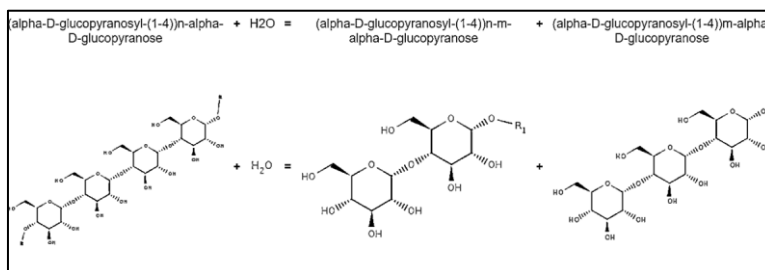
3. kép *Bacillus* sp. és **SC_NYH_1** mikroszkópos felvétele Lugol-oldatos differenciálást követően. Saját forrás.

5., Diszkusszió

A toxicitási tesztek során megfigyelhető volt, hogy a nikkel gátló hatást gyakorol a kutatócsoportunk által izolált mikroorganizmusokra, mivel a nikkelkoncentráció növekedésével csökken a mért abszorbancia (lásd **1.** és **4. diagram**), mely az általunk spektrofotométerre adaptált relatív sejtmeghatározási eljárás alapján (lásd „McFarland-féle relatív típusú sejtszámmeghatározás” c. fejezet) arányos a sejtszámmal.

Nikkel a sejtek biomasszaprodukciójára gyakorolt hatása az élesztők esetén az **SC_NYH_1**-re, míg a *Bacillus*ok esetén a *Bacillus sp.*-re volt nagyobb. Ez a **3.**, illetve **6. diagramon** található csökkentő tendenciájú egyenesek meredekségéből állapítható meg, melyek megadják az egységnyi nikkelkoncentráció változáshoz tartozó dózishatást. Az illesztéseken végzett Pearson teszt erőssége átlagosan 0,9875 volt, mely alátámasztja az összefüggések erősségét. Míg az élesztők esetén a nikkel a legkisebb vizsgált koncentrációban is gátló hatást mutatott, addig a *Bacillus subtilis* esetén 40 mg/L, míg *Bacillus sp.* esetén 20 mg/L koncentrációig serkentő hatást tapasztaltunk (lásd **2.**, illetve **5. diagram**).

A keményítő hasznosítás megfelel a mikroorganizmus amiláz szekréciójának mértékével, mely az amilóz lineáris láncában található $\alpha(1-4)$ glikozidos kötéseket hasítja az **3. ábra** szerint.



3. ábra Az α -amiláz (EC 3.2.1.1) enzim reakciósémája (forrás: BRENDA Enzyme Database nyílt forráskódú adatbázis, <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.1>, utolsó hozzáférés: 2022. 11. 17.)

A keményítő Lugol-oldat jelenlétében kék színreakciót ad, mivel a jódmolekulákat az amilózhélix belsejében van der Waals erők rögzítik. Ez hatással van az elektronszerkezetre, így az elnyelt fény hullámhosszára, tehát a kialakult intenzitásra.

A keményítő hasznosítási teszt során megállapítottuk, hogy a *Saccharomyces* sejtvonalak 1 hét elteltével sem hasznosították a keményítőt. A **7. diagramon** látható, hogy a mérések során *Saccharomyces cerevisiae*-nél a kiindulási keményítő koncentrációval majdnem megegyező koncentrációt mértünk vissza, míg az **SC_NYH_1** az utolsó bemérési pontnál vizsgálva 16,80 %-kal meghaladja a teoretikus maximum értékét. Ez az eltérés a mérési hibahatáron belül esik,

így arra enged következtetni, hogy az **SC_NYH_1** sejtvonal sem hasznosítja a keményítőt. A mérési hibát feltehetően a gyarapodó sejttömeg abszorbanciája okozta. Ezekkel ellentétben a *Bacillus* sejtvonalak már 48 óra elteltével lebontották a rendelkezésükre álló keményítőmennyiséget (lásd **8. diagram**).

A *Saccharomyces cerevisiae* és **SC_NYH_1** sejtvonalakkal végrehajtott fermentáció során a koncentráció gradiens mentén változó sejtszámot az abszorbancia értékek segítségével vizsgáltuk, a „McFarland-féle relatív típusú sejtszámmeghatározás” c. fejezet alapján. A **9.** és a **10. diagram** alapján a gátlószer alacsony koncentrációban nem volt hatással a biomasszatömegre. *Saccharomyces cerevisiae* esetén 20 mg/L, míg **SC_NYH_1** esetén 25 mg/L koncentrációnál csökkenésnek indult a sejtszám, rendre 40 mg/L, illetve 87,5 mg/L koncentrációig, ahol állandósulni látszik az abszorbancia, a nikkel koncentrációtól függetlenül. A két sejtvonal megközelítőleg azonos koncentrációnál kezd érzékenységet mutatni a nikkel jelenlétére, azonban az **SC_NYH_1** még 50 mg/L esetén is jelentős mértékben nő, ellenben a *Saccharomyces cerevisiae* ekkora koncentrációnál már jelentősen csökkent sejtszámot mutat.

A *Saccharomyces cerevisiae* alkoholkihozatalára a nikkel jelenléte a teljes vizsgált tartományon gátló hatással volt, míg az **SC_NYH_1** esetén egészen 37,5 mg/L koncentrációig nem gyakorolt rá gátló hatást (lásd **11.** és **12. diagram**).

Keményítő szénforrás mellett történő fermentáció során az **SC_NYH_1** nikkel jelenlétében jelentősen csökkent alkoholkihozataalt produkált (mindkét technikai ismételts esetén 0,4 (V/V)%-ot) a kontrollhoz képest (1,65 (V/V)%). A *Bacillus subtilis* és az **SC_NYH_1** kokultúrák fermentáció esetén azonban a nikkel jelenléte jelentősen gyengébb gátló hatást gyakorolt az alkoholkihozatalra. 37,5 mg/L nikkel koncentráció mellett a technikai ismétlések alkoholkihozatala átlagosan 0,9122 (V/V)% volt, míg a kontrollé 1,46 (V/V)%. A fermentáció során Ni(II)-ion jelenlétében, kokultúrák összeállításban 128,05%-kal magasabb alkoholkihozataalt értünk el, mint monokultúrásan.

A kutatócsoportunk által izolált *Bacillus sp.* és *Saccharomyces sp.* (**SC_NYH_1**) sejtvonalak szemianaerob kokultúrák fermentáció során, keményítő táptalajon megnövelték az alkoholkihozataalt az **SC_NYH_1** monokultúrák fermentációjához viszonyítva. Az általunk izolált vad típusok további vizsgálata javasolt a toxicitási tesztek és a fermentációs kísérletek alapján.

Hivatkozások

- [1] Ojuederie, O. B. et al., International Journal of Environmental Research and Public Health Volume 14, Page 1504 (2017).
- [2] Mani, D., Kumar, C., Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: an overview with special reference to phytoremediation., Int. J. Environ. Sci. Technol. Volume 11, Pages 843–872 (2014).
- [3] Dixit R. et al., *Sustainability*, Bioremediation of Heavy Metals from Soil and Aquatic Environment: An Overview of Principles and Criteria of Fundamental Processes Volume 7, Pages 2189-2212 (2015).
- [4] Peer, W. A. et al.,. Phytoremediation and hyperaccumulator plants, Biology of Metal Homeostasis and Detoxification. Topics in Current Genetics, Volume 14 (2005).
- [5] Sytar, O. et al., Physiological and molecular mechanisms of metal accumulation in hyperaccumulator plants, Physiologia Plantarum Volume 173, Issue 1, p. 148-166 (2020).
- [6] Rufus L. et al., Using Hyperaccumulator Plants to Phytoextract Soil Ni and Cd, Zeitschrift für Naturforschung Volume 60, Pages 190-198 (2005).
- [7] van der Ent, A. et al., Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. Plant Soil Volume 362, Pages 319–334 (2013).
- [8] Robinson, B. H. et al., The nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii* as a potential agent for phytoremediation and phytomining of nickel, Journal of Geochemical Exploration Volume 59, Issue 2, Pages 75-86 (1997).
- [9] Kovačević, M., Morphological and physiological characteristics of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells differing in the life span, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry (2015).
- [10] Gadd, G. M. et al., Interactions of Fungi with Toxic Metals, The Genus *Aspergillus*. Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Symposium Series, Volume 69 (1994).
- [11] Joho, M. et al., Nickel resistance mechanisms in yeasts and other fungi, Journal of Industrial Microbiology Volume 14, Pages 164-168 (1995).
- [12] Mellor, D. et al., Order of Stability of Metal Complexes, Nature Volume 161, Pages 436–437 (1948).
- [13] Wang, J. et al., Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review, Biotechnology Advances Volume 24, Issue 5, Pages 427-451 (2006).

- [14] Chen, P. et al., Effect of Heavy Metal Uptake on the Electrokinetic Properties of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology Letters* Volume 17, Pages 107-112 (1995).
- [15] Gadd, G. M. et al., Microorganisms and Heavy Metal Toxicity, *Microbial Ecology* Volume 4, Pages 303-317 (1978).
- [16] Fuhrmann, G. F. et al., The transport of Zn^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+} into yeast cells, *Biomembranes* Volume 163, Issue 3, Pages 325-330 (1968).
- [17] Rothstein, A. et al., The active transport of Mg^{2+} and Mn^{2+} into the yeast cell, *Journal of General Physiology* Volume 41, Issue 3, Pages 585-594 (1958).
- [18] Padmavathy, V. et al., Biosorption of Nickel(II) ions on Baker's yeast, *Process Biochemistry* Volume 38, Issue 10, Pages 1389-1395 (2003).
- [19] Joho, M. et al., Changes in the amino acid pool in a nickel-resistant strain of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 55, Issue 2, Pages 137–140 (1988).
- [20] Messenguy F. et al., Regulation of compartmentation of amino acid pools in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on metabolic control, *European Journal of Biochemistry* Volume 180, Issue 2, Pages 439-447 (1980).
- [21] Joho, M. et al., A possible role of histidine in a nickel resistant mechanism of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 66, Issue 1-3, Pages 333–338 (1990).
- [22] Küçükgoze, G. et al., Evolutionary engineering and transcriptomic analysis of nickel-resistant *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Research*, Volume 13, Issue 8, Pages 731–746 (2013).
- [23] Fuhrmann, G. M. et al., The mechanism of the partial inhibition of fermentation in yeast by nickel ions, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, Volume 163, Issue 3, Pages 331-338 (1968).
- [24] Li, H. et al., Insights into maize starch degradation by sulfuric acid from molecular structure changes, *Carbohydrate Polymers*, Volume 229 (2020).
- [25] Hoover, R. et al., Acid-treated starches, *Food Reviews International*, Volume 16, Issue 3, Pages 369-392 (2000).
- [26] Abouzied, M. M. et al., Direct fermentation of potato starch to ethanol by cocultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied And Environmental Microbiology*, Volume 52, Issue 5, Pages 1055-1059 (1986).

- [27] Miah, R. et al., Development of high temperature simultaneous saccharification and fermentation by thermosensitive *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus amyloliquefaciens*, Scientific Reports Volume 12 (2022).
- [28] Harwood, C. R. et al., *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses, Trends in Biotechnology, Volume 10, Pages 247-256 (1992).
- [29] Tasaki, S. et al., Morphologies of *Bacillus subtilis* communities responding to environmental variation, Development, Growth & Differentiation, Volume 59, Issue 5 Pages 369-378 (2017).
- [30] Wierzba, S., Biosorption of Lead(II), Zinc(II) and Nickel(II) from industrial wastewater by *Stenotrophomonas maltophilia* and *Bacillus subtilis*, Polish Journal of Chemical Technology, Volume 17, Issue 1, Pages 79 —87 (2015).
- [31] Ph.Hg.VIII. – Ph.Eur.6.0. 2.6.13. Nem steril termékek mikrobiológiai vizsgálata c. fejezete
- [32] Mcfarland J. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines (1907).
- [33] Zapata, A. et al., A Comparative Study of McFarland Turbidity Standards and the Densimat Photometer to Determine Bacterial Cell Density. Curr Microbiol Volume 70, 907–909 (2015).