

Vanádium(V)-ion hatásának vizsgálata a *Saccharomyces bayanus* mikro-, makro-morfológiájára és alkohol kihozatalára

Szolyka Levente

Szent Miklós Görögkatolikus
Gimnázium és Kollégium 12. évfolyam

Témavezető:

Kovásznai-Oláh Richárd
biológus



DEBRECENI EGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS TECHNOLÓGIAI KAR

BIOTECHNOLÓGIAI INTÉZET

MULTIDISZCIPLINÁRIS BIOTECHNOLÓGIAI ÉS

SEJTBiológiai Intézeti Részleg



Hlavay József Országos Környezettudományi és Műszaki Diákkonferencia

2023

Bevezetés Fitoremediáció

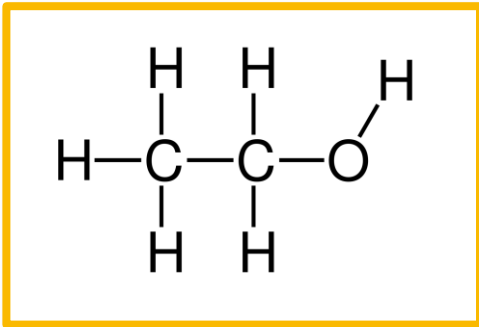
- Alumínium-gyártás
- Szénbányászat
- Kőolaj-finomítás



<http://geomania.hu/lelohely.php?lelohely=357>



<https://enfo.hu/node/4583>



<https://hu.wikipedia.org/wiki/Etanol>



<https://www.aboutmechanics.com/what-is-industrial-fermentation.htm>



<http://tmrt.hu/a-szenyezett-kornyezet-megtisztitasara-novenyek-segitsegevel-fitoremediacio/>



<https://pixabay.com/hu/photos/hamu-lap%C3%A1t-kandall%C3%B3-par%C3%A1zs-7030426/>



https://p1.akcdn.net/full/399184014_bradoline-bradolife-kezfertotlenito-gel-500ml.jpg



<https://vezessz.p3k.hu/app/uploads/2019/02/pia-borito.jpg>



<https://clickpetroleogas.com.br/wp-content/uploads/2021/10/Assim-como-a-gasolina-preco-do-etanol-fecha-setembro-com-nova-altimate-quase-R-6-e-consumidor-nao-tem-para-aonde-correr.jpg>



<https://img.casual.hu/shops/2635/images/item/gyogyszertari-alkohol-etanol-1000-ml-tiszta-szesz-g6-os-gyogyszerkonyvi-minosegu-268091.jpg?v=1667044894>



<https://www.vg.hu/kozelet/2022/08/tobb-szaz-hektaron-egett-a-mecseki-tuz-bocsanatot-kert-a-baleset-okozoja>



https://www.energiainfo.hu/az_alstom_is_beszallna_a_paksi_bovitesbe-31591/

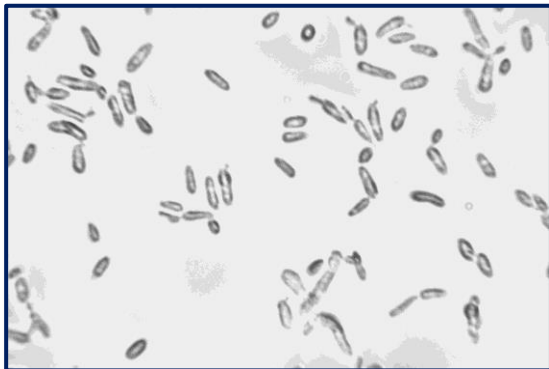
Célkitűzések

- A vanadát-ion hatására bekövetkező mikro-morfológiai változások megfigyelése (*Saccharomyces bayanus*)
- A vanadát-ion koncentráció gradiens függvényében történő alkohol-kihozatal vizsgálata
- Vad élesztőtörzsek izolálása, biokémiai karakterizálása
- Élesztőtörzsek kondicionáltatása vanadát-ionra

Anyagok és módszerek – Modellorganizmus, táptalajok

- Szemi-szelektív táptalajok: *SDA*; *SDB*
- Szelektív táptalajok: *SDA+C*; *SDB+C*
- Fermentációs tápleves: *SDB-150*
- *Twines pepton* lemosó oldat
- 0,85% NaCl-oldat
- Szabadkereskedelmi forgalomban kapható **fajélesztő**:
 - *Saccharomyces bayanus* (Saccardo)
 - Forgalmazó: Bí-bor-ász Kft.
 - Alkohol-tolerancia: 16 v/v%

Saccharomyces bayanus



Táptalaj receptek		
SDA	dextróz	40 g·L ⁻¹
	pepton	10 g·L ⁻¹
	agar	20 g·L ⁻¹
	pH	5,6±0,2
SDA+C	dextróz	40 g·L ⁻¹
	pepton	10 g·L ⁻¹
	agar	20 g·L ⁻¹
	klóramfenikol	0,05 g·L ⁻¹
	pH	5,6±0,2
SDB	dextróz	20 g·L ⁻¹
	pepton	10 g·L ⁻¹
	pH	5,6±0,2
SDB+C	dextróz	20 g·L ⁻¹
	pepton	10 g·L ⁻¹
	klóramfenikol	0,05 g·L ⁻¹
	pH	5,6±0,2
SDB-150	szacharóz	150 g·L ⁻¹
	pepton	5 g·L ⁻¹
	MgCl ₂ ·6 H ₂ O	1,67 g·L ⁻¹
	pH	5,6±0,2
Twines pepton	Triton X-100	10 mL·L ⁻¹
	pepton	5 g·L ⁻¹
	Na ₃ PO ₄ ·12 H ₂ O	5 g·L ⁻¹
	pH	6,8±0,2

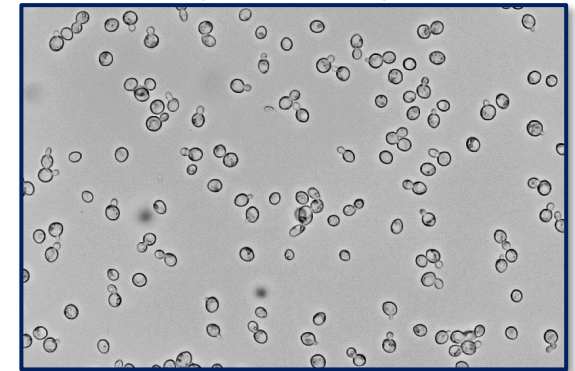
Anyagok és módszerek – Izoláció, identifikáció

Vadélesztők

- **Izolálás:**
 - **Sikeres** izolálás nyíregyházi kiskerti gyümölcsfermentléből
- **Karakterizálás:** szénhidrát hasznosítás és fermentáció alapján

Nemzetség		Saccharomyces spp.	Candida spp.	Rhodotorula spp.
Tulajdonság				
Pigment termelés	SDA	–	–	+
	CMA	–	–	+
Mikro-morfológia (CMA)	Élesztősejtes forma	+	+	+
	Álhifás forma	– (+!)	+	–
	Valódi hifás forma	– (+!)	+	–
Alkoholos erjedés glükózból		+	+/-	–
Telep típus (makro-morfológia)		Körkeresztmetszetű, domború, gombostűfejnyi, krémszínű telepek	Körkeresztmetszetű, domború, gombostűfejnyi, krémszínű telepek	Körkeresztmetszetű, domború, gombostűfejnyi, narancssárga telepek

Saccharomyces sp.
(izolátum)



API 20 C AUX teszt				
	Saccharomyces cerevisiae 1	Saccharomyces cerevisiae 2	Kloeckera apiculata	Rhodotorula rubra
GLU	+	+	+	+
GLY	–	+/–	–	–
2KG	–	–	+	-
ARA	–	–	–	–
XYL	–	–	–	+
ADO	–	–	–	–
XLT	–	–	–	–
GAL	+	+	–	+/–
INO	–	–	–	–
SOR	–	+	–	–
MDG	–	+/–	–	–
NAG	–	–	–	–
CEL	–	–	+	–
LAC	–	–	–	–
MAL	+	+	–	+
SAC	+	+	–	+
TRE	–	–	–	+
MLZ	–	–	–	+
RAF	+	+	–	+
HYPH	–	–	–	–

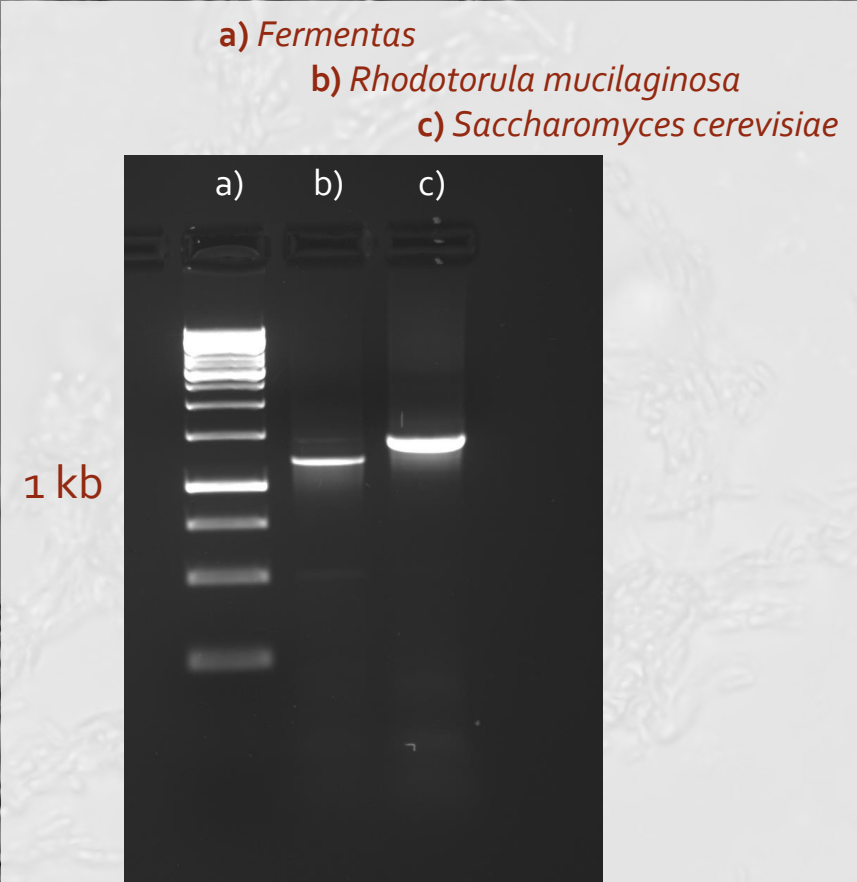
Saccharomyces cerevisiae YPH499 DNA

Sequence ID: AP026843.1 (NCBI-BLASTn)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1232 bits(667)	0.0	667/667(100%)	0/667(0%)	Plus/Plus
Query: kapott szekvencia				
Sbjct: adatbázis szekvencia				
Query 1	GTCGCAGTCCCTCAGTCCCAGCTGGCAGTATTTCCACAGGCTATAATACTTACCGAGGCAA	60		
Sbjct 460352	GTCGCAGTCCCTCAGTCCCAGCTGGCAGTATTTCCACAGGCTATAATACTTACCGAGGCAA	460411		
Query 61	GCTACATTCTATGGATTTATCCTGCCACCAAACTGATGCTGGCCCAGTGAAATGCGAG	120		
Sbjct 460412	GCTACATTCTATGGATTTATCCTGCCACCAAACTGATGCTGGCCCAGTGAAATGCGAG	460471		
Query 121	ATTCCCCTACCCACAAGGAGCAGAGGGGCACAAAACACCATGTCTGATCAAATGCCCTTCC	180		
Sbjct 460472	ATTCCCCTACCCACAAGGAGCAGAGGGGCACAAAACACCATGTCTGATCAAATGCCCTTCC	460531		
Query 181	CTTTCAACAATTTACGTAATTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATC	240		
Sbjct 460532	CTTTCAACAATTTACGTAATTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATC	460591		
Query 241	ACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACC	300		
Sbjct 460592	ACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACC	460651		
Query 301	CACCTTAGAGCTGCATTCCCAAACTCGACTCTTCGAAGGCACCTTTACAAAGAACCGCA	360		
Sbjct 460652	CACCTTAGAGCTGCATTCCCAAACTCGACTCTTCGAAGGCACCTTTACAAAGAACCGCA	460711		
Query 361	CTCCTCGCCACACGGGATTCTCACCTCTATGACGTCTGTTCCAAGGAACATAGACAAG	420		
Sbjct 460712	CTCCTCGCCACACGGGATTCTCACCTCTATGACGTCTGTTCCAAGGAACATAGACAAG	460771		
Query 421	GAACGGCCCCAAAGTTGCCCTCTCCAAATTACAACGCGGCGAAGGTACCAGATTTC	480		
Sbjct 460772	GAACGGCCCCAAAGTTGCCCTCTCCAAATTACAACGCGGCGAAGGTACCAGATTTC	460831		
Query 481	AAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAAGGCAATCCCGGTTGGTTTCTTTT	540		
Sbjct 460832	AAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAAGGCAATCCCGGTTGGTTTCTTTT	460891		
Query 541	CCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTACTCTACCTGATTTGAGGTCAAAC	600		
Sbjct 460892	CCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTACTCTACCTGATTTGAGGTCAAAC	460951		
Query 601	TTAAGAACATTGTTTCGCCTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAACGTTCCAATACGCTCAGT	660		
Sbjct 460952	TTAAGAACATTGTTTCGCCTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAACGTTCCAATACGCTCAGT	461011		
Query 661	ATAAAAA 667			
Sbjct 461012	ATAAAAA 461018			

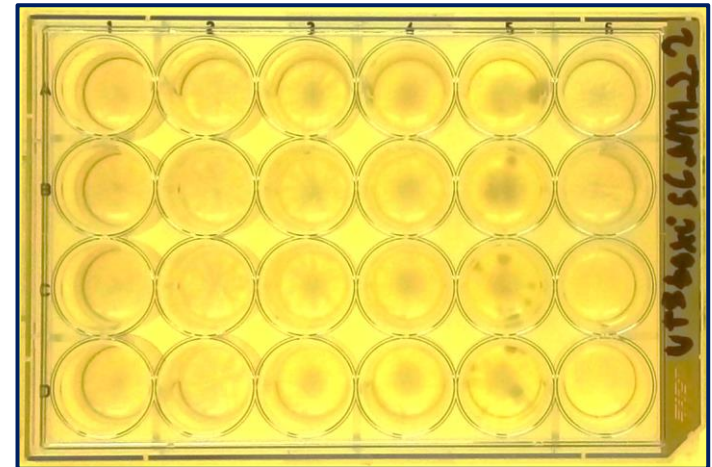
Megerősítő próba

- Az identifikáció megerősítése szekvenálással.
(SC_NYH_1) *Köszönet: Dr. Miklós Ida*



Anyagok és módszerek – Toxicitási teszt, Fermentációs kísérletek – Alkohol kihozatal

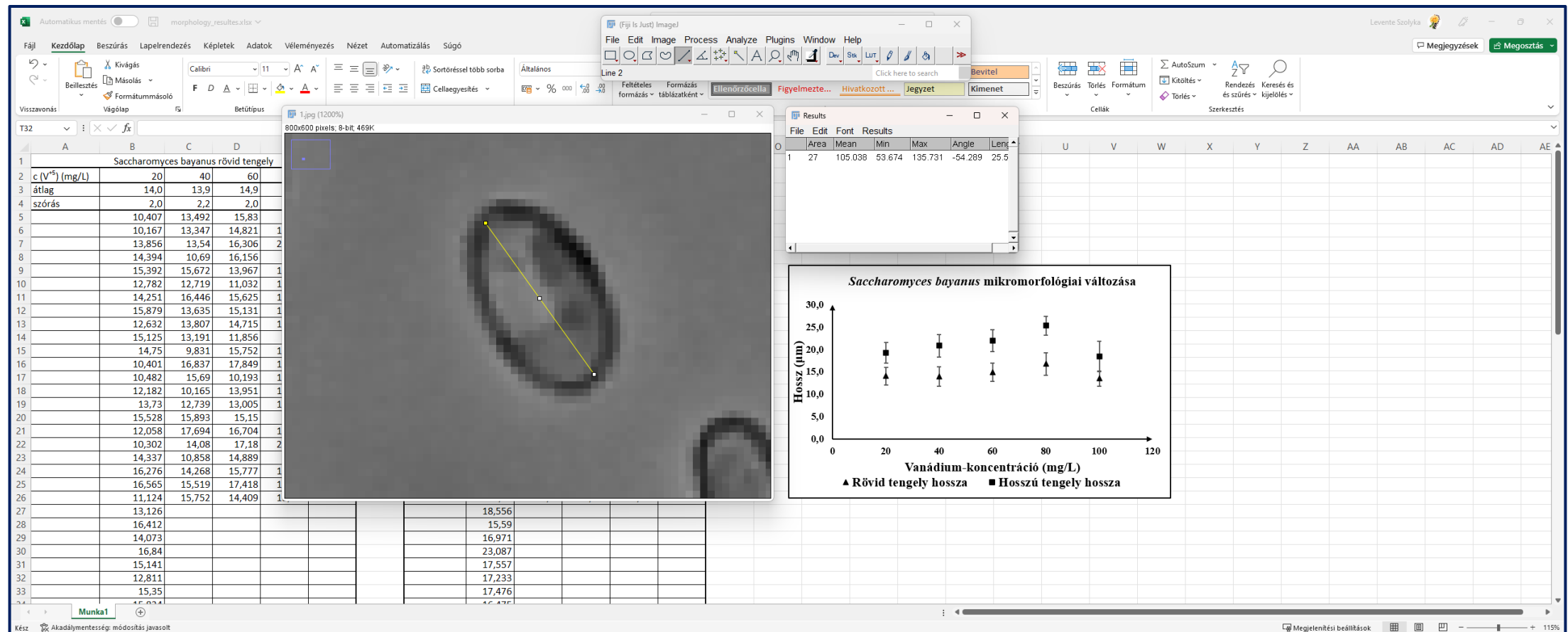
- Toxicitási teszt:
 - 24-es *well-plate*-en 0-100 mg/L-ig felező higitással ötös bontásban
- Fermentációs kísérlet:
 - 100 mL SDB-150 rázatott kultúrában 8 lépéses *koncentráció gradiensen*
 - Gradiens a toxicitási teszt alapján
 - 50 rpm sebességgel, 7 napig inkubáltuk 22,5 °C-on
 - Desztillációt követő alkohol-kihozatal mérés *gázkromatográffal*



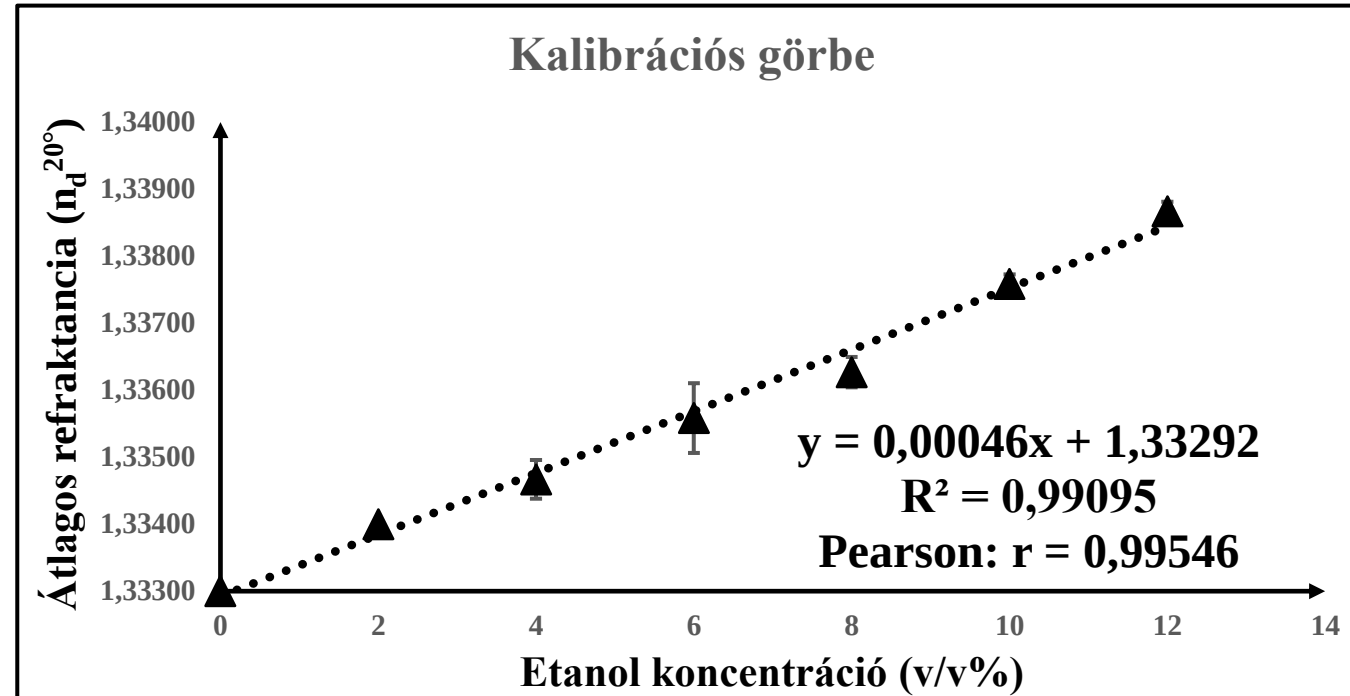


Anyagok és módszerek – Mikroszkópos morfológiai felvételezés, képelemzés

- Felvételezés:
 - Végpontosan ellenőriztük, Bürker-kamra segítségével, natív készítményben
- Képelemzés:
 - Az ImageJ-FiJi nyílt-forráskódú szoftvert használtuk

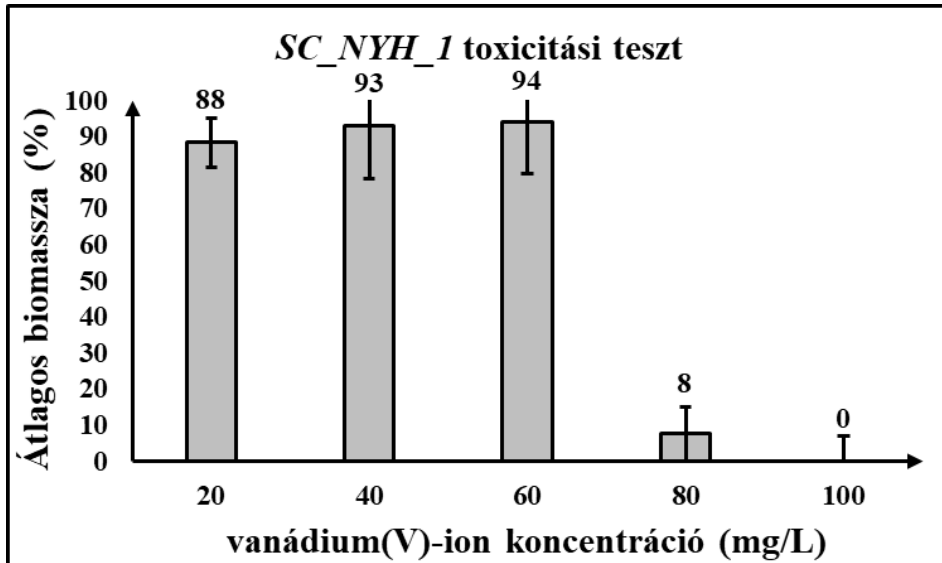
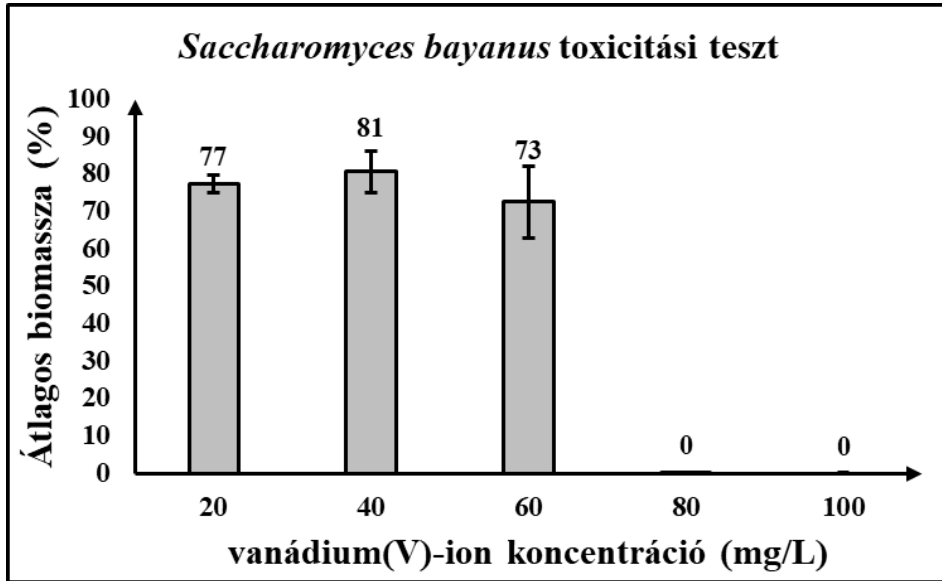


Anyagok és módszerek – Statisztikai elemzés



- Az adatok kiértékeléséhez és ábrázolásához az MS Excel programcsomagot használtuk a beépített függvényeivel.
- 3-as ismételtes számtani közepét adtuk meg a hozzájuk tartozó szórás feltüntetésével.
- Egyenessel közelíthető pontseregeket vizsgáltunk, amelyek közötti összefüggés erősségét Pearson-féle korrelációs együtthatóval mutattuk meg.

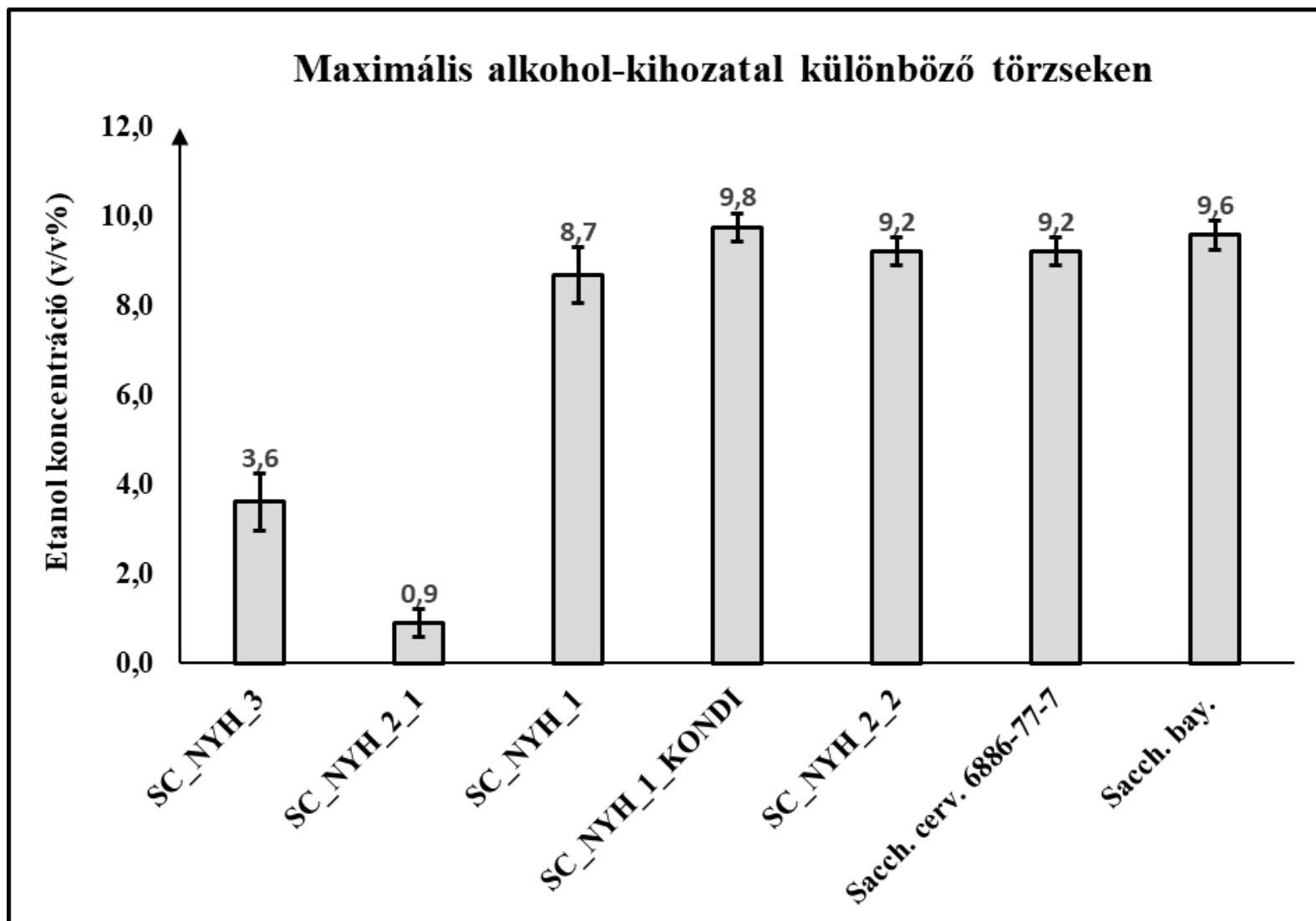
Eredmények – Toxicitási teszt



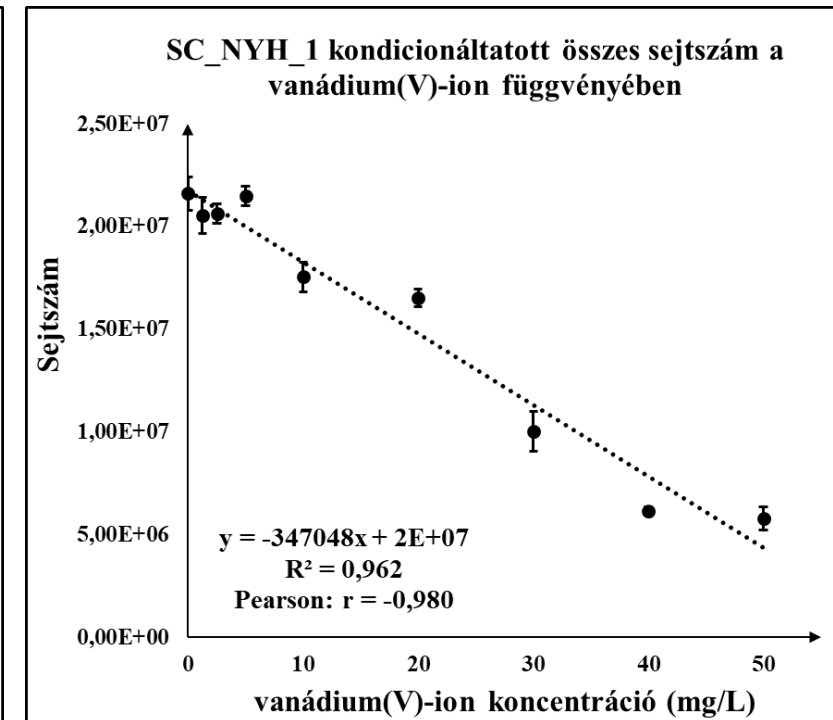
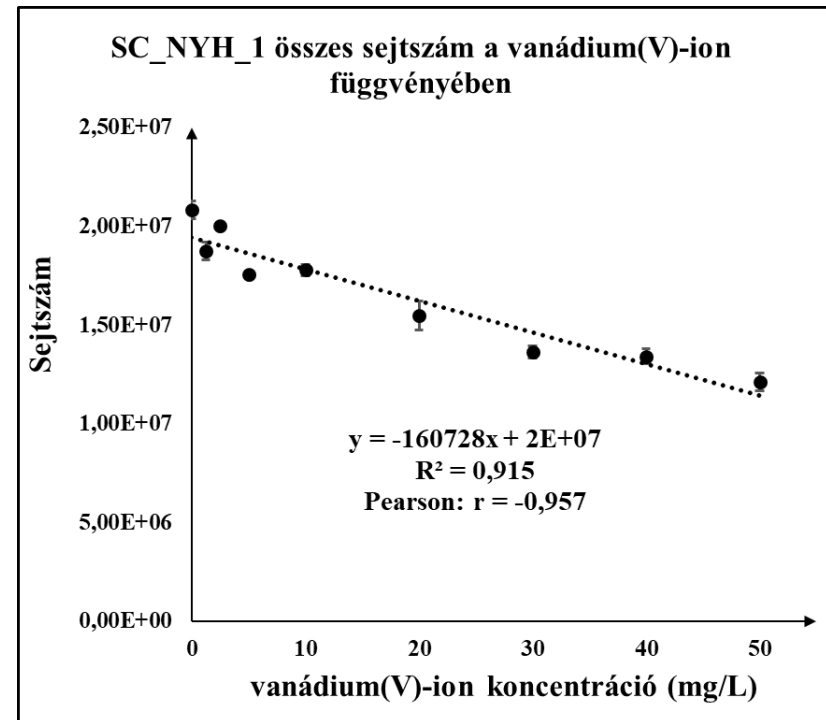
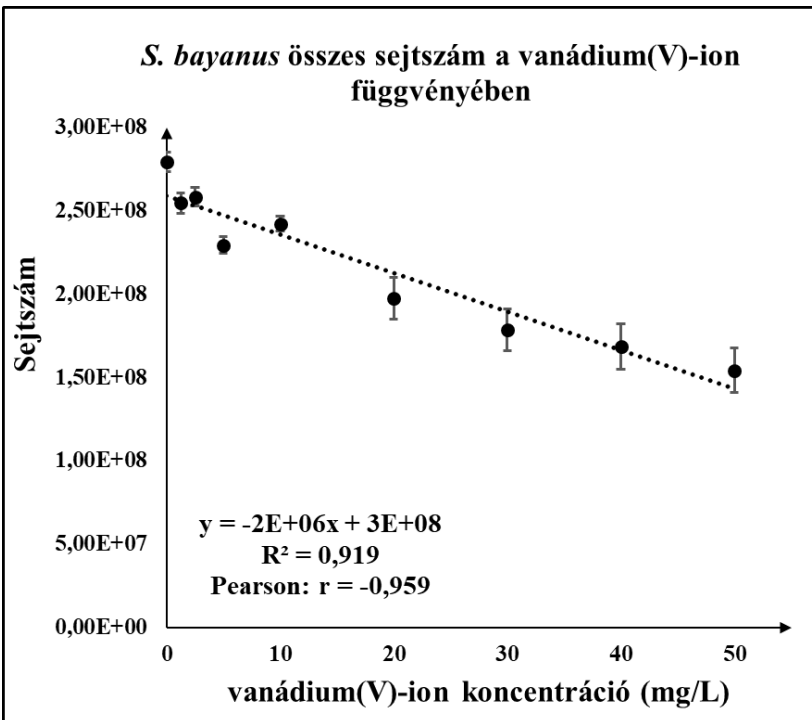
- A vanadát tolerancia megközelítőleg azonos a vizsgált törzseknél (vad- és fajlesztők).



Eredmények – Maximális alkohol-kihozatal



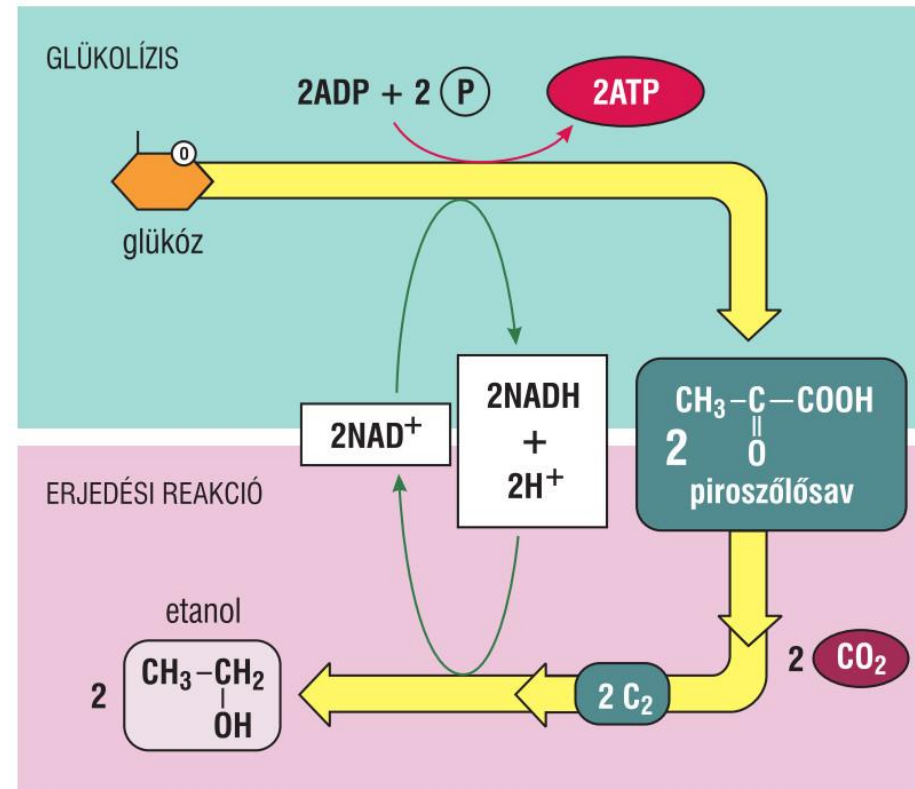
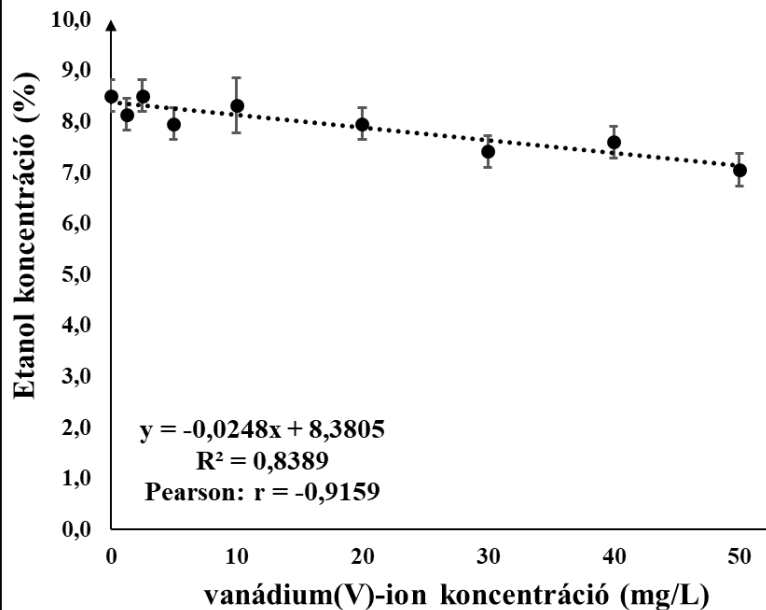
Eredmények – Fermentáció során nyert összes sejtszám



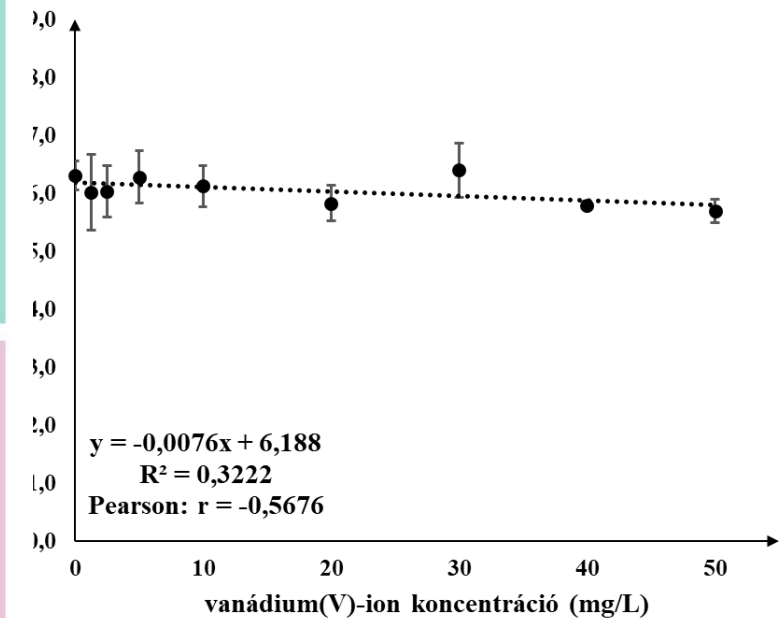
Eredmények – Alkohol-kihozatal

64.2. Az alkoholos erjedés vázlata

Saccharomyces bayanus alkohol-kihozatal a vanádium(V)-ion függvényében

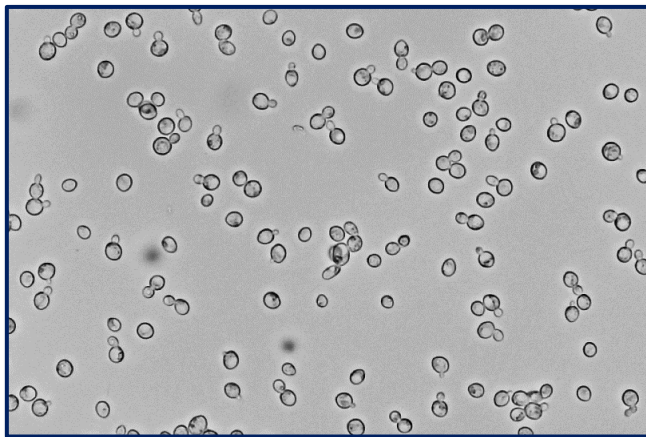
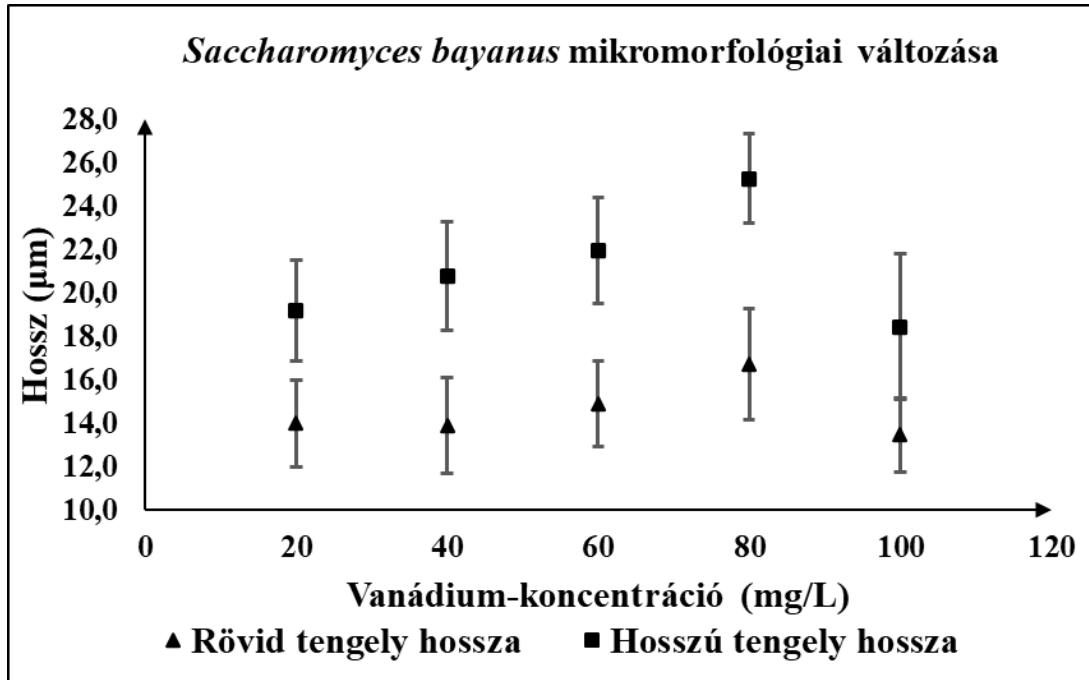


SC_NYH_1 kondicionáltatott alkohol-kihozatal a vanádium(V)-ion függvényében



- Gravimetrikus visszaméréssel a kondicionáltatott törzs esetében a tömegcsökkenés 4 napon konstanssá vált (konverzió). A többi törzs esetében 6-7 napon.

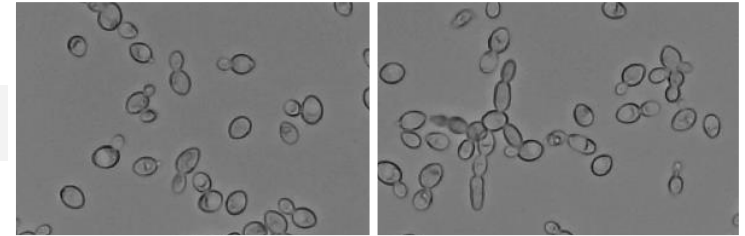
Eredmények – Élesztőtörzsek morfológiája



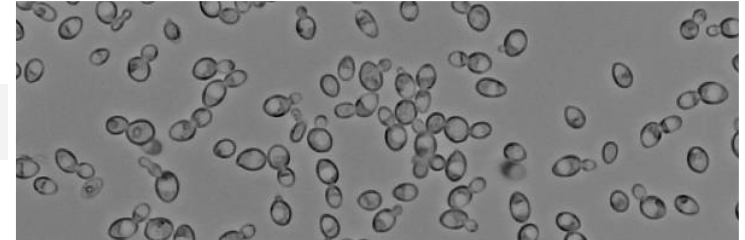
Kontroll

Saccharomyces bayanus

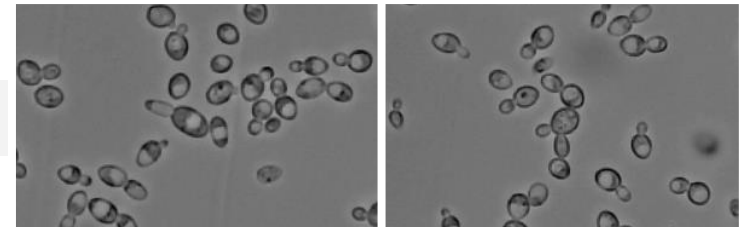
20 mg/L



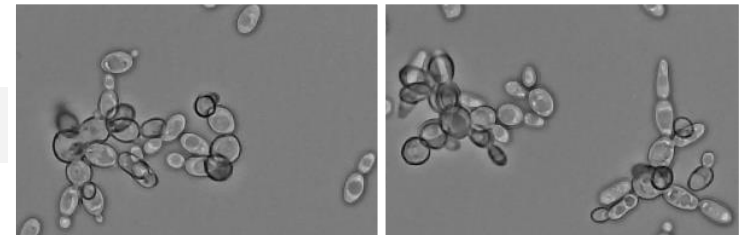
40 mg/L



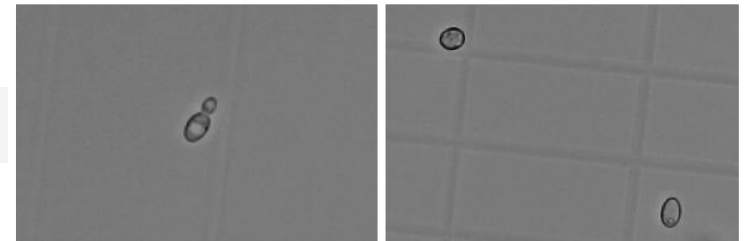
60 mg/L



80 mg/L



100 mg/L



Diszkusszió

- Sikeresen izoláltunk és karakterizáltunk 4 vad élesztőtörzset.
- A vanadát tolerancia megközelítőleg azonos a vizsgált törzseknél (vad és faj élesztők).
- A legjobb alkohol-kihozatalú vad törzs az SC_NYH_1 kondicionáltatott és az SC_NYH_1 törzs.
- A fő fermentációs kísérletekben a legnagyobb alkohol-kihozatalt és biomassza-produkciót a *Saccharomyces bayanus* adta, míg a legkisebb biomassza-produkciót az SC_NYH_1 kondicionáltatott törzs. Ellenben ez közel 1%-os alkohol-kihozatalt mutat az SC_NYH_1 törzshöz képest.
- A konverzió időigénye az SC_NYH_1 kondicionáltatott törzs esetében a legkisebb.
- A mikro-morfológiai sajátosságok változása összefüggésbe hozható a vanadát-ion koncentráció növekedésével.
- **Az általunk tanulmányozott sejtvonalak 0-50 mg/L tartományú, vanadát-iont tartalmazó fermentációs táptalajon, alkalmasak lehetnek bioremediációs- és hidrometallurgiai felhasználásra.**

Kitekintés

- Bioabszorpcióval megkötött vanadát-ion mennyiségi meghatározása ICP-OES vagy AAS segítségével.
- Izolátumok identifikálása (**szekvenálással**)
- **Enzimaktivitás** mérése (kataláz, peroxidáz, amiláz)
- Sejtfalon bekövetkező változások elektron mikroszkópiás vizsgálata
- Újabb fém-ion toleráns törzsek előállítása
- Ko-kultúrás fermentációs kísérletek
- **Transzkriptomikai módszerekkel** vanádium(V)-ion hatása az enzimekre.

Felhasznált irodalom

- J.-H. Huang, F. Huang, L. Evans and S. Glasauer, "Vanadium: Global (bio)geochemistry," *Chemical Geology*, vol. 417, no. 1, pp. 68-89, 28 September 2015.
- J. P. Gustafsson, "Vanadium geochemistry in the biogeosphere – speciation, solid-solution interactions, and ecotoxicity," *Applied Geochemistry*, vol. 102, no. 1, pp. 1-25, 14 January 2019.
- M. Mišík, I. T. Burke, M. Reismüller, C. Pichler, B. Rainer, K. Mišíková, W. M. Mayes and S. Knasmueller, "Red mud a byproduct of aluminum production contains soluble vanadium that causes genotoxic and cytotoxic effects in higher plants," *Science of the Total Environment*, vol. 493, no. 1, p. 883–890, 15 September 2014.
- D. Rehder, "Vanadium: Biological, Environmental, and Engineering Aspects," *Advances in Chemical Research*, vol. 2, no. 1, 8 January 2020.
- K. Török, É. Bertalan, Z. Horváth és G. Falus, „Szénhamuminták geokémiai vizsgálata,” in *A hazai szénvagyon és hasznosítási lehetőségei*, Z. Püspüki, Szerk., Budapest, Magyar Bányászati és Földtani Szolgálat, 2018, pp. 238-246.
- G. Gulyás, „Település szennyvíz nehézfém-tartalma és annak hatása a szennyvíziszap mezőgazdasági hasznosításának lehetőségeire,” PhD thesis, Pannon Egyetem, 2020.
- „3.9.1 Az eljárás célja és elve, 3.10.1 Energiaforrások, 4.1.2.1 Részecske kibocsátás,” in *Integrált Szennyezés-megelőzés és Csökkentés (IPPC) Referencia dokumentum az elérhető legjobb technikákról – tömörítvény a hazai sajátosságok figyelembe vételével Kőolaj - és gázfinomítók*, 2001, pp. 23, 24, 37.
- D. Tripathi, V. Mani and R. P. Pal, "Vanadium in Biosphere and Its Role in Biological Processes," *Biological Trace Element Research*, vol. 186, no. 1, pp. 52-67, 9 March 2018.
- N. D. Chasteen, "The biochemistry of vanadium," in *Copper, Molybdenum, and Vanadium in Biological Systems*, Vols. Structure and Bonding, vol. 53, Germany, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1983, pp. 105-138.
- J. C. Pessoa, E. Garribba, M. F. Santos and T. Santos-Silvia, "Vanadium and proteins: Uptake, transport, structure, activity and function," *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 301–302, no. 1, pp. 49-86.
- Z.-B. Sun, S.-F. Yu, C.-L. Wang and L. Wang, "cAMP Signalling Pathway in Biocontrol Fungi," *Current Issues in Molecular Biology*, vol. 44, no. 6, p. 2622–2634, 4 June 2022.
- D. R. Creamer, S. J. Hubbard, M. P. Ashe and C. M. Grant, "Yeast Protein Kinase A Isoforms: A Means of Encoding Specificity in the Response to Diverse Stress Conditions?," *Biomolecules*, vol. 12, no. 7, p. 958, 8 July 2022.
- Ö. Kayikci and P. M. Magwene, "Divergent Roles for cAMP–PKA Signaling in the Regulation of Filamentous Growth in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*," *G3 Genes|Genomes|Genetics*, vol. 8, no. 11, p. 3529–3538, 1 November 2018.
- P. J. Cullen and G. F. Sprague, Jr., "The Regulation of Filamentous Growth in Yeast," *Genetics*, vol. 190, no. 1, p. 23–49, 1 January 2012.



Köszönetnyilvánítás

- **Dr. Miklós Ida**-nak a törzs szekvenálásáért,
- **Dr. Máthéné Dr. Szigeti Zsuzsa**-nak a szakmai hozzájárulását, értékes javaslatait és meglátásait.
- **Galambos Dóra**-nak a *Saccharomyces cerevisiae* (6886-77-7)-vel kapcsolatos adatait.
- **Kovásznai-Oláh Richárd**-nak lehetővé tette a kutatásaimat.
- A pályamunka a **Nemzeti Tehetség Központ „Nemzet Fiatal Tehetségeiért Ösztöndíj”** támogatásával készült el.



KULTURÁLIS ÉS INNOVÁCIÓS
MINISZTERIUM



Köszönöm a megtisztelő figyelmet!

