

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Kémia Doktori Iskola

Nehézfém bioszorpció mikroorganizmusokon

PhD értekezés tézisei

Kőnigné Péter Anikó

Témavezető:

Dr. Pernyeszi Tímea,
egyetemi adjunktus

PÉCS, 2014

1. Bevezetés

Az antropogén folyamatok következtében a talajba, felszíni, felszín alatti és ivóvízbe bejutó nehézfém szennyeződés napjainkban jelentős környezeti terhelést okoz. A nehézfémek, mint értékes alapanyagok, nélkülözhetetlenek az iparban és a hétköznapi életben. Egy részük biokatalitikus funkcióval rendelkezik, így az élő szervezetben is fontos szerepet tölthet be. A bioakkumuláció és az esetleges toxikus hatások miatt a fémionokkal szennyezett vizek az élő rendszerekre veszélyesek lehetnek, tisztításuk azonban gyakran technológiai nehézségekbe ütközik.

A könnyen hozzáférhető, olcsón szaporítható és a környezeti hatásokkal szemben ellenálló mikroorganizmusok – baktériumok és algák, mint *bioszorbensek* – igen fontos szerepet játszhatnak a környezet „egészségének” megőrzésében. Jelentős nehézfém megkötő kapacitásukat felhasználva, gyors és költséghatékony biotechnológiai módszerek fejleszthetők, amelyek alkalmasak lehetnek a szennyezett vizek nehézfém koncentrációjának csökkentésére.

A szakirodalomban megjelent, hatékony eljárások alkalmazhatóságát korlátozza, hogy a mikroorganizmus szuszpenziók felhasználása időigényes és nem költséghatékony. Megkötésekre (immobilizálásukra) a megfelelő hordozó megtalálása ezért alapvető fontosságú. Intenzív kutatások folynak a hordozók segítségével rögzített, így technológiai szempontból könnyen kezelhető mikroorganizmusok, ill. a hordozók adszorpciós kapacitásának kihasználására, amit az ipar élénk érdeklődéssel követ.

2. Célkitűzések

Különböző baktérium- (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Pseudomonas fluorescens* BME, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* D31 m3) és algatörzsek (*Chlorella vulgaris*, *Spirulina (Arthrospira) platensis-maxima*) bioszorpcióját vizsgáltam nehézfémionok megkötésére alkalmas, regenerálható és költséghatékony bioszorbens fejlesztéséhez.

Céljaim a következők voltak:

- 1) Optimális kísérleti körülmények meghatározása a bioszorpció folyamataihoz.

- 2) Különböző törzsek (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Pseudomonas fluorescens* BME, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* D31 m3, *Chlorella vulgaris*, *Spirulina (Arthrospira) platensis-maxima*) fémmegkötő képességének vizsgálata liofilizált biomassza alkalmazásával, Pb^{2+} -, Cd^{2+} -, Cu^{2+} - és Zn^{2+} - ionokat tartalmazó oldatokból.
- 3) A bioszorbensek rangsorba állítása szorpciós kapacitásuk, ill. alkalmazásuk feltételei alapján.
- 4) Immobilizálási eljárások laboratóriumi vizsgálata a kiválasztott bioszorbenst alkotó sejteken.
- 5) A kiválasztott bioszorbens felhasználásával olyan immobilizált rendszer létrehozása, amelyben legnagyobb mértékben összegződik a kiválasztott bioszorbens és az immobilizáló ágens nehézfém adszorpciós képessége.

3. Anyagok és módszerek

Liofilizált **baktériumokat**: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Pseudomonas fluorescens* BME, *Escherichia coli* NCB O21, *Escherichia coli* NCB D31 (forrás: Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Mikrobiológiai és Immunológiai Intézet) és **algákat**: *Chlorella vulgaris* és *Spirulina (Arthrospira) platensis-maxima* (forrás: Cseh Tudományos Akadémia, Csehország) vizsgáltam szabad és immobilizált formában hatékony bioszorbens fejlesztéséhez.

A sejtek felületi tulajdonságainak jellemzése. A sejtek elektrokinetikai tulajdonságát ζ -potenciál méréssel, a sejtek fajlagos felületi töltését a *P. aeruginosa*, *C. vulgaris*, *S. platensis*-*S. maxima* sejtek esetében tenzidoldattal történő titrálással, közvetett módon határoztam meg. *P. aeruginosa*, *C. vulgaris*, *S. platensis*-*S. maxima* sejteken a kötésben feltételezhetően résztvevő csoportok jelenlétét FT-IR mérésekkel igazoltam.

Mérések statikus körülmények között. A bioszorpciós folyamatok hatékonyságára a bioszorbens koncentrációja, a rendszer kémhatása, a folyamat kinetikája, a hőmérséklet, az oldatok fémion koncentrációja, a mikroorganizmusok életképessége és a sejt felszínének

előzetes kezelése lehetnek befolyással. „Batch” rendszerben ezen kísérleti tényezők vizsgálatával választottam ki az optimális körülményeket.

Mérések áramlásos körülmények között. A vizsgált mikroorganizmusok közül a *Spirulina platensis-maxima* algakeveréket használtam gélgyöngyök készítéséhez. Hordozóként alginátot és kitozánt választottam. Szakaszos működésű rendszerben a gyöngyök méretét, az immobilizáló ágens és alga koncentrációját optimalizáltam. Oszlopkísérletek során az oszlop hosszának, az áramlás sebességének, a nehézfém koncentráció megváltoztatásának hatását, ill. a töltet regenerálhatóságát teszteltem. Pb^{2+} -, Cd^{2+} -, Cu^{2+} - és Zn^{2+} -ionokat tartalmazó oldatok átáramoltatása után, az effluens fémiontartalmát atomabszorpciós spektrométerrel határoztam meg.

4. Eredmények

Nehézfémionok bioszorpciós folyamatának jellemzése statikus körülmények között:

1. A vizsgált bioszorbensek vizes szuszpenziói esetében az 1 g/dm³-es biomasz koncentráció és pH 5-6 kémhatás alkalmazásával elegendően nagy adszorpciós kapacitás áll rendelkezésre ahhoz, hogy Pb-, Cd-, Cu-, és Zn- ionokat híg vizes oldatból ($c < 100$ g/dm³) hatékonyan eltávolítsunk.
2. Szorpciós izotermák segítségével meghatároztam a különböző bioszorbensek adszorpciós kapacitás értékeit, ill. azok sorrendjét a nehézfémionok és a mikroorganizmusok esetében:

Pseudomonas aeruginosa: $Pb^{2+} = Cd^{2+} < Cu^{2+} < Zn^{2+}$

Pseudomonas fluorescens: $Pb^{2+} = Cd^{2+} < Cu^{2+} < Zn^{2+}$

Escherichia coli: $Pb^{2+} = Zn^{2+} < Cd^{2+} < Cu^{2+}$

Escherichia coli D31: $Pb^{2+} < Cd^{2+} < Cu^{2+} < Zn^{2+}$

Chlorella vulgaris: $Pb^{2+} < Cd^{2+} < Zn^{2+} < Cu^{2+}$

Spirulina platensis-maxima: $Pb^{2+} = Cd^{2+} < Zn^{2+} < Cu^{2+}$

Pb²⁺: *E. coli* törzsek < Aktív szén < *P. fluorescens* < *Candida tropicalis* < *C. vulgaris* < *P. aeruginosa* < *S. platensis-maxima*

Cd²⁺: *E. coli* törzsek < *Pseudomonas* törzsek < Aktív szén < *Candida tropicalis* < *C. vulgaris* < *S. platensis-maxima*

Cu²⁺: Aktív szén < *Pseudomonas* törzsek < *E. coli* törzsek < *C. vulgaris* < *Candida tropicalis* < *S. platensis-maxima*

Zn²⁺: *E. coli* < Aktív szén < *E. coli* D31 < *Pseudomonas* törzsek < *Candida tropicalis* < *C. vulgaris* < *S. platensis-maxima*

3. A vizsgált mikroorganizmusok negatív felületi töltéssel rendelkeznek, pH 4-nél nagyobb kémhatás esetén, vizes szuszpenzióban. Meghatároztam a sejtek felületén elméletileg kicserélhető kationok és a fajlagos felületi töltések mennyiségét, amiből megállapításokat tettem a fémionok megkötésének folyamatára, a felületi csoportok szerepére. *P. aeruginosa* baktériumsejtek esetében a kísérletileg meghatározott adszorbeált mennyiség lényegesen kisebb, a titrálással kicserélhető kation mennyiségnél, ez arra utal, hogy a folyamat döntően nem a funkciós csoportok igénybevételével történik, azaz fizikai adszorpció. Az algasejtek esetében az adszorbeált mennyiség lényegesen nagyobb a titrálással kicserélhető kation mennyiségnél, ami alapján arra lehet következtetni, hogy a felületi funkciós csoportok segítségével lejátszódó ioncserén és komplexképződésen túl, más ion-visszatartási mechanizmusok is hatnak.
4. A lejátszódó bioszorpciós folyamatok egyensúlyát jellemezni lehet Langmuir-, Freundlich-, Temkin-, Frumkin- és Langmuir-Freundlich adszorpciós modellekkel az izotermák nemlineáris illesztésével. Az izotermák illeszkedése a mérési pontokra legtöbb esetben szoros. Igazoltam, hogy a bioszorpció igen gyorsan, spontán lejátszódik minden rendszerben, ezt a Langmuir- és Frumkin-állandóból számolt szabadentalpia-változás (ΔG) negatív értékeivel is alátámasztottam. Az adszorbeált nehézfémek mennyisége a hőmérséklet emelésével csökken, ami exoterm folyamatra utal. Ezt a van't Hoff-egyenletről és a Temkin-modell segítségével számított entalpiaváltozás (ΔH) negatív értékei igazolják.

Nehézfémionok bioszorpciós folyamatának jellemzése dinamikus körülmények között:

5. Az optimalizált kísérleti feltételek között, legnagyobb adszorpciós kapacitásuk alapján, a *S. platensis-maxima* sejteket választottam ki az alginátban és kitozánban történő immobilizálásra. Optimalizáltam az immobilizálást. Az optimális összetételű alginát gélgyöngyök 2 mm átmérőjűek, 20 g/dm³ alginát és 1 g/dm³ algakonzentrációjúak. Az optimális összetételű kitozán gélgyöngyök 2 mm átmérőjűek, 40 mg/dm³ kitozán és 1 g/dm³ algakonzentrációjúak. A nehézfémionokat tartalmazó oldatok átáramoltatásának hatására az ilyen összetételű gélgyöngyök nem deformálódnak, ellenállóak, ill. nem tapasztalható az algasejtek kijutása az oldatba.

6. Az immobilizált bioszorbenst tartalmazó dinamikus rendszerben meghatároztam a fémionok eltávolításának hatékonyságát jellemző áttörési kapacitás, ill. maximálisan adszorbeált mennyiségeket $2 \text{ cm}^3/\text{perc}$ áramlási sebesség, 30 cm hosszúságú oszlop és $100 \text{ mg}/\text{dm}^3$ kiindulási koncentrációjú fémionokat tartalmazó oldatok segítségével. Bioszorbensként az alginát és kitozán gélgyöngyök is felhasználhatók, mivel nagy adszorpciós kapacitással rendelkeznek. A *Spirulina* sejtek immobilizálásának hatására az alginát gélgyöngyök által maximálisan adszorbeált nehézfémionok mennyisége kismértékben csökken.
7. A kitozán gélgyöngyök adszorpciós kapacitása kisebb Pb^{2+} -, Cd^{2+} - és Cu^{2+} -ionokra, míg Zn^{2+} -ionokra megegyezik az alginát gélgyöngyökével. Az immobilizált *S. platensis-maxima* sejtek a kitozán gélgyöngyök Zn^{2+} adszorbeáló képességét 50%-kal megemelik.
8. A *S. platensis-maxima* sejteket tartalmazó gélgyöngyök híg ásványi savak oldataival történő regenerálás után, több cikluson keresztül a nehézfémionok változatlan mennyiségének felvételére képesek, állagromlás nélkül.

5. Összefoglalás

A bioszorpciós folyamatok vizsgálata során különböző baktérium- és algasejtek (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Pseudomonas fluorescens* BME, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* D31 m3, *Chlorella vulgaris*, *Spirulina (Arthrospira) platensis-maxima*) adszorpciós képességét hasonlítottam össze nehézfémionokra. A legnagyobb adszorpciós kapacitással rendelkező *Spirulina (Arthrospira) platensis-maxima* sejtek immobilizálásával oszloptölteteket készítettem, amelyek jó hatékonysággal, kis előállítási költséggel és regenerálhatóan működtethetők.

A vizsgálatok első lépéseként meghatároztam azokat az optimális körülményeket, amelyek között az adszorpció nagy hatékonysággal játszódik le. Az $1 \text{ g}/\text{dm}^3$ bioszorbens koncentráció és a pH 5-6 tartomány több nehézfém (Pb-, Cd-, Cu- és Zn-ionok) eltávolításában minden vizsgált bioszorbens esetében nagy hatékonyságot biztosít. A bioszorpció szobahőmérsékleten is gyorsan lejátszódik, a hőmérséklet emelése nem kedvező, csökkenti az adszorbeált mennyiséget.

A bioszorbensként kiválasztott - környezeti tényezők változásával szembeni – nagy tűrőképességgel rendelkező mikroorganizmusok közül a *Spirulina platensis-maxima* kéalkgák

rendelkezik a legkiemelkedőbb adszorpciós kapacitással. A *Chlorella vulgaris* zöldalgasejtek adszorpciós kapacitása nehézfémekre nézve kisebb. A baktériumtörzsek közül a *Pseudomonas* sejtek képesek nagyobb nehézfémennyiségek megkötésére, az *Escherichia* törzsek adszorpciós kapacitása elmarad a többi vizsgált mikroorganizmus mögött.

Gélgyöngyökből oszloptölteteket készítettem alginátban és kitozánban immobilizált *Spirulina platensis-maxima* sejtek felhasználásával. Kitozánból stabil, ellenálló gélgyöngyöket készítettem. Áramlásos körülmények között összehasonlítottam az optimális összetételű gélgyöngyök és az immobilizáló ágensből készített gyöngyök adszorpciós kapacitását. Az eredmények szárazanyag tartalomra vonatkoztatott elemzése szerint az alginát gélgyöngyök rendelkeznek a legnagyobb Pb^{2+} , Cd^{2+} és Cu^{2+} adszorpciós hatékonysággal. A Zn^{2+} -ionokat a kitozánban immobilizált *S. platensis-maxima* sejteket tartalmazó gélgyöngyök a kitozánnál nagyobb, a szabad algasejteknél kisebb hatékonysággal kötik meg. A gélgyöngyök legalább 5 adszorpciós/deszorpciós cikluson keresztül híg ásványi savakkal regenerálhatók.

6. Megjelent közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk

Anikó Kőnigné Péter, Béla Kocsis, Alizabeta Hegedüsova, Tímea Pernyeszi: Bioadsorption of lead(II) and cadmium(II) ions into the lyophilized cell surface of *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous suspension

Acta Universitatis Sapientiae 3, 5-17, 2011

Anikó Kőnig-Péter, Béla Kocsis, Ferenc Kilár, Tímea Pernyeszi: Bioadsorption characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* PAOI

Journal of the Serbian Chemical Society 79(4), 495-508, 2014

IF: 0,889

Anikó Kőnig-Péter, Ferenc Kilár, Attila Felinger, Tímea Pernyeszi: Biosorption characteristics of *Spirulina* and *Chlorella* cells to accumulate heavy metals

Journal of the Serbian Chemical Society, Paper 5988-EC, 2014

IF: 0,889

Anikó Kőnig-Péter, Csaba Csudai, Attila Felinger, Ferenc Kilár, Tímea Pernyeszi: Potential of various biosorbents for Zn(II) removal

Water, Air, & Soil Pollution 225(9), Paper 2089, 2014

IF: 1,685

Krisztina Honfi, Katalin Tólos, **Anikó Kőnig-Péter**, Ferenc Kilár, Tímea Pernyeszi: Copper(II) and phenol biosorption by surface treated *Candida tropicalis* cells in aqueous suspension

Water, Air, & Soil Pollution 10: Paper WATE-D-14-00877R1, 2014

IF: 1,685

Az értekezés témájában készült nem referált konferencia absztraktok

Anikó Kőnig-Péter, Béla Kocsis, Tímea Pernyeszi: Bioadsorption of lead(II) and cadmium(II) by *Pseudomonas aeruginosa* biomass in aqueous suspension
VII. Kárpát-medencei Környezettudományi Konferencia, Kolozsvár, Románia, 2011.03.24-27. Konferencia Kiadvány, p. 854.

Kőnig-Péter Anikó, Kocsis Béla, Pernyeszi Tímea: Ólom- és kadmium ionok bioadszorpciója *Pseudomonas aeruginosa* sejtek vizes szuszpenziójában
X. Környezetvédelmi Analitikai és Technológiai Konferencia: A környezetvédelem és az élelmiszerminőség aktuális kérdései, Sümeg, Magyarország, 2011.10.05-07. Book of Abstracts, p. 32.

Anikó Kőnig-Péter, Tímea Pernyeszi: Biosorption of heavy metal ions by lyophilized cells of *Pseudomonas* species
MSB 2012 27th International Symposium On Microscale Bioseparations and Analysis, Genf, 2012. 02. 12-15. Book of Abstracts, p. 132.

Anikó Péter, Béla Kocsis, Tímea Pernyeszi: Bioadsorption of lead(II) and cadmium(II) ions onto the lyophilized cell surface of *Pseudomonas fluorescens* in aqueous suspension
VIII. Kárpát-Medencei Környezettudományi Konferencia, Veszprém, 2012. 04. 18-21. Konferencia kiadvány, p. 532.

Farkas Viktor, Tálós Katalin, **Kőnig-Péter Anikó**, Honfi Krisztina, Pernyeszi Tímea: Bioszorpció folyamatok
Első Környezetkémiai Szimpózium, Mátraháza, 2012. Konferencia kiadvány, p. 22.

Anikó Kőnig-Péter, Tímea Pernyeszi: Comparison of biosorption processes by bacterial and algal cells
CECE 2013 10th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, Pécs, 2013. 04. 25-27. Program and Abstract Book, p. 4.

Kőnig-Péter Anikó, Kilár Ferenc, Pernyeszi Tímea: Bioszorpció folyamatok összehasonlítása baktérium- és algasejtekben, 320-328.
IX. Kárpát-Medencei Környezettudományi Konferencia, Miskolc, 2013.06. 13-15. Konferencia kiadvány, p. 573.

Anikó Kőnig-Péter, Krisztina Honfi, Viktória Poór, Attila Felinger, Ferenc Kilár, Tímea Pernyeszi: Dynamic sorption studies: Development of a column packing biomaterial
9th Balaton Symposium On High Performance Separation Methods, Siófok, 2013. 09. 4-6. Book of Abstracts, p. 104.

Tímea Pernyeszi, Viktor Farkas, Krisztina Honfi, **Anikó Kőnig-Péter**, Ibolya Kiss, Attila Felinger, Ferenc Kilár: Development of a column packing biomaterial using microbial cells for dynamic sorption study

20th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques (ITP2013), Puerto de la Cruz, Spanyolország, 2013.10.06-09. Book of Abstracts, p. 225.

Anikó Kőnig-Péter, Csaba Csudai, Attila Felinger, Ferenc Kilár, Tímea Pernyeszi: Dynamic sorption studies: Immobilization of *Spirulina platensis* cells

30th International Symposium on Microscale Bioseparations, Pécs, Magyarország, 2014.04.27-05.01. Book of Abstracts, p. 36.

Kőnig-Péter Anikó, Csudai Csaba, Pernyeszi Tímea: Nehézfém bioszorpció mikroorganizmusokon

Harmadik Környezetkémiai Szimpózium, Lajosmizse, Magyarország, 2014.10.09-10. Konferencia kiadvány, p. 12.

Az értekezés témáján kívül készült tudományos közlemények

Anikó Péter, Tímea Dergez, Ibolya Kiss, Ferenc Kilár: Fast GC-MS method for quantification of gammabutyrolactone in biological matrices

Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia LVIII, 2, 87 – 92, 2011

IF: 0,136

Anikó Péter, Gabriella Dósa: Detection of phenoloids in some Hungarian *Inula* and *Centaurea* species

Acta Botanica Hungarica 44, 129-135, 2002

Az értekezés témáján kívül készült nem referált konferencia absztraktok

Anikó Kőnig-Péter, Melinda Rezeli, Ferenc Kilár: Detection of Quorum sensing molecules by CE and CZE-MS

7th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Pécs, Magyarország, 2007.06.10-15. Program and Abstract Book, p. 40.

Tímea Dergez, **Anikó Kőnig-Péter**, Melinda Rezeli, Viktória Poór, Ferenc Kilár: Detection of Quorum sensing molecules by GC-MS and CE-MS

7th Balaton Symposium On High-Performance Separation Methods, Siófok, 2007.09.05-07. Book of Abstracts, p. 92.

Anikó Kőnig-Péter, Tímea Dergez, Ferenc Kilár: Rapid and simple method for extraction and detection of gamma-butyrolactone

9th International Symposium on Instrumental Analysis, Pécs, 2008.06.29-07.02. Program and Abstract Book, p. 45.

Anikó Kőnig-Péter, Tímea Dergez, Nelli Farkas, Ferenc Kilár, Béla Kocsis: Tyrosol is autoinducer molecule by *Saccharomyces cerevisiae*
8th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods and 15th International Symposium on Separation Sciences, Siófok, 2009.09.02-04. Book of Abstracts, p. 123.

Ferenc Kilár, Dávid Szabó, Péter Buzási, Nelli Farkas, **Anikó Kőnig-Péter**, Béla Kocsis: Cell electrophoresis
8th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods and 15th International Symposium on Separation Sciences, Siófok, 2009.09.02-04. Book of Abstracts, p. 106.