

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**ASPERGILLUS FAJOK NEHÉZFÉM-
SZENNYEZÉSEK BIOREMEDIÁCIÓJÁBAN VALÓ
ALKALMAZÁSÁNAK POTENCIÁLIS
LEHETŐSÉGEI**

BOCZONÁDI IMRE

Témavezető:
Prof. Dr. Pócsi István



DEBRECENI EGYETEM
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2020

1. Bevezetés és célkitűzések

A ritkaföldfémek (REE) a modern ipar „vitaminjainak” számítanak köszönhetően a folyamatosan növekvő igénynek és keresletnek (Cardoso és mtsi, 2019). Jelenleg olyan országok, mint Kína, az Amerikai Egyesült Államok és Ausztrália szolgáltatja a globális REE termelés döntő hányadát, közülük is kiemelkedik Kína, amely a világ globális termelésének 90 %-át adja (Zhou és mtsi, 2017). Tekintettel arra, hogy a REE iránti kereslet jóval meghaladja a kínálatot, a feltörekvőben lévő „zöld-technológiák” szempontjából elengedhetetlen olyan módszerek kidolgozása, amelyek segítségével megfelelő hatékonysággal nyerhetők ki ezen fémek a talajból, illetve talajvízből (Anastopoulos és mtsi, 2016; Goodenough és mtsi, 2018; Barros és mtsi, 2019; Owens és mtsi, 2019).

Az olyan technológiák kidolgozása/alkalmazása, melyekkel nemcsak a gazdasági szempontból értékes fémek nyerhetők ki, hanem adott esetben a toxikus mennyiségben jelenlévők is, alapvető jelentőséggel bírnak.

A réz (Cu) és kadmium (Cd) szennyezés egyre szélesebb körben megjelenő környezeti probléma, amely elsősorban mezőgazdasági és ipari tevékenységekből származik (Archana és mtsi, 2014). Ezen nehézfém-szennyezők kapcsán felmerülő probléma, hogy nagy mennyiségű és hosszú távú alkalmazásuk miatt a talajban és a talajvízben feldúsulhatnak, ahol nem alakulnak át kevésbé toxikus vegyületekké (Jacobson és mtsi, 2005; Komárek és mtsi, 2010). Számos technológiai megoldás ismert ezen nehézfémek környezetből történő eltávolítására ám ezek a módszerek amellet, hogy nem

alkalmazhatók megfelelő hatékonysággal, még rendkívül költségesek is (Volesky és mtsi, 1990; Wang és Huang, 2002; Yang és mtsi, 2005).

Így napjainkban egyre nagyobb figyelem övezi azon technológiai módszereket, amelyek biológiai rendszereket, elsősorban mikroorganizmusokat, alkalmaznak a nehézfémek megkötésére (Wang és Chen, 2009; Soares és mtsi, 2013; Johnson, 2014).

Doktori munkámban célul tűztem ki *Aspergillus* spp. (*A. oryzae* és *A. nidulans*) biomasszáján alapuló bioremediációs módszerek kidolgozását, melyek a jövőben alapját képezhetik olyan technológiai megoldásoknak, amikkel biztonságosan, kis anyagi ráfordítással, illetve hatékonyan nyerhetők ki REE, másrésről lehetővé válik egyes nehézfémek, úgy, mint Cu és Cd, környezetből történő megkötése is.

Ennek érdekében az alábbi kutatásokat végeztük el:

1. REE bioszorpciója *A. oryzae* fonalas gombával.

A természetes körülményeket leginkább tükröző kísérleti paramétereket alkalmazva vizsgáltuk az *A. oryzae* bioszorpciós folyamatait. A kísérletek alkalmával folyamatosan nyomon követtük a gomba élettani változásait, úgy, mint száraztömeg (DCM) és pellet átmérő változását, túlélési képességét, MIC₅₀, DCM/glükóz fogyás, valamint a tápközegben megjelenő NH₄⁺ tartalom és pH érték változását. Mindeközben azokra a kérdésekre kerestük a választ, hogy a gomba képes-e más fémionok egyidejű jelenléte mellett REE szelektív és hatékony bioszorpciójára. E kérdés megválaszolása

érdekében induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometriai (ICP-OES) vizsgálatot végeztünk, ahol is meghatározásra került mind a tesztoldat, mind pedig a biomassa fém tartalma. Végezetül pedig szerettük volna tudni, hogy a fémmegkötés mechanizmusa sejten belül vagy sejten kívül játszódik-e le, ezért először transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM), majd energiaszóró röntgenspektroszkópiai (SEM-EDX) vizsgálatot végeztünk.

2. Nehézfémek bioszorpciója *A. nidulans* gombával.

Egy feltételezhetően Cu és Cd transzporter (CrpA) fiziológiai szerepét vizsgáltuk nehézfém stressznek kitett *A. nidulans* mutáns törzsekben. Azokra a kérdésekre kerestük a választ, hogy a gombatelep mely régióiban zajlik a fémek akkumulációja, valamint a CrpA transzporter hiánya eredményez-e mennyiségbeli különbséget a fémfelvételben, a kontroll törzshöz viszonyítva. A kísérletek során nyomon követtük mind a kontroll (TNJ36), mind pedig a mutáns törzsek (MKL5, MKL10, MKL14) stresszérzékenységének változásait, először normál tenyésztési körülmények között, majd a kiválasztott MKL14 mutáns törzzsel celofánnal borított (CCH) agarlemezekeken is. A telepeken belüli fémionok (Cu^{2+} és Cd^{2+}) térbeli eloszlását részecske indukált röntgen emissziós spektroszkópiával kombinált-pásztázó transzmissziós ionmikroszkópiai (PIXE-STIM) módszerrel vizsgáltuk, majd a TNJ36 kontroll és a ΔcrpA gén deléciós mutáns törzs Cu és Cd bioszorpciók képességét ICP-OES méréssel határoztuk meg.

2. Anyagok és módszerek

Kísérleteinkben az *Aspergillus oryzae* Rib40 ipari törzzsel dolgoztunk, amelyet malátakivonatot tartalmazó táptalajon (3 % malátakivonat, 0,5 % mikológiai pepton, 1,5 % agar, pH 6,0) spóráztattuk 25 °C-on, 6 napon keresztül (de Vries és mtsi, 2017; Orosz és mtsi, 2018).

A vizsgálatainkban továbbá az *A. nidulans* TNJ36 (*pyrG89 AfpyrG⁺ pyroA4 veA⁺*) kontroll, valamint a *ΔcrpA* (*pyrG89; ΔcrpA: AfupyrG⁺; pyroA4; veA⁺*) gén deléciós mutáns törzseket tanulmányoztuk. A *ΔcrpA* deléciós mutánst double-joint PCR (DJ-PCR) módszerrel Jae-Hyuk Yu és mtsi (University of Wisconsin, Madison, USA) hozták létre és bocsátották rendelkezésünkre (Yu JH és mtsi, 2004). Az *A. nidulans* törzseket szilárd Barratt-féle minimál táptalajon (AMM) növesztettük 37 °C-on, 6 napon keresztül (Barratt és mtsi, 1965).

A törzseket a fent leírtak szerint spóráztattuk. A stressz generáló ágensekkel kiegészített minimál tápközegre 5 μl (1×10^5 spóra) spóraszuszpenziót cseppentettünk majd 5 napon keresztül 37 °C-on inkubáltuk azokat (de Vries és mtsi, 2017; Orosz és mtsi, 2018).

2.1. *Aspergillus oryzae* törzzsel végzett bioszorpciók kísérletek

A németországi Thüringia tartományban lévő elhagyott urán bányászati terület (Ronneburg) két helyszínén is tanulmányozták a REE megjelenését. Egyik helyszínen Gessenhalde (UTM 32N: E721501, N5638350) zagytározós szabadtéri kilúgozási műveleteket

végeztek, míg a másik helyszín Nordhalde (UTM 32N: E722290, N5638222), egy elhagyott kölerakó volt. A bányavíz elemösszetételét Prof. Dr. Erika Kothe (Friedrich Schiller University, Jena, Germany) bocsájtotta a rendelkezésünkre, melyből kiderült, hogy a Ronneburg környéki talajvizek igen magas ritkaföldfém koncentrációval bírnak (Grawunder és Merten, 2012). Az általunk alkalmazott „többfázisú” tesztoldat fémkoncentrációit ezen két területen 2014. szeptember 9-12 között vett összesen több mint 20 mintavételi pontból származó adatok alapján határoztuk meg és alkalmaztuk (Li^+ $0,06 \pm 0,03$ mM, Mg^{2+} $30 \pm 14,4$ mM, Al^{3+} $1,4 \pm 1,6$ mM, Fe^{3+} $0,6 \pm 2,1$ mM, Ni^{2+} $0,2 \pm 0,09$ mM, Zn^{2+} $0,04 \pm 0,044$ mM, Y^{3+} $0,007 \pm 0,008$ mM, Ce^{4+} $0,0023 \pm 0,0018$ mM, Nd^{3+} $0,00094 \pm 0,00091$ mM).

A „többfázisú” tesztoldat kiindulási pH-értéke $3,85 \pm 0,07$ volt, ami a bányászati területről vett és elemzett vízminták átlagos pH-tartományába esett ($\text{pH} = 4,2 \pm 0,6$).

A bányászati területről származó vízminták átlagos hőmérséklete $16,5 \pm 1,1$ °C volt így a szorpciós kísérleteket $16,5$ °C-on, 3,7 Hz-en történő inkubálással zajlottak le 24 órán át.

A kísérleteket megelőzően *A. oryzae* Rib40 törzset 6 napon át 25 °C-on növesztettük, a kísérletekhez a felületi tenyészetekről lemosott konídiospórákat használtuk fel. A rázatott lombikos tenyészetek esetében (100 ml) a leoltását 10^8 -on számú spórával végeztük, Bürker-kamrában történő spóraszámolást követően. A tenyészeteket 25 °C-on 48 órán át 3,7 Hz frekvencián előtenyésztettük. A 48 órás inkubálást követően a micéliumot szűrtük, majd háromszori steril desztillált vízzel történő mosást követően a

kontroll (100 ml steril desztillált víz), illetve komplex „többfázisú” tesztoldatot tartalmazó lombikokba kerültek.

A biomassa dóziszfüggő fémfelhalmozódásának tanulmányozására két biomassa koncentrációt használtunk a kísérleteinknél. A „egyszeres dózisu” tenyészetnél a kiindulási száraztömeg értéke (DCM) $3,7 \pm 0,5 \text{ g l}^{-1}$ DCM volt, míg a „kétszeres dózisu” tenyészetnél két párhuzamos tenyészetből nyert biomassa mennyiséget alkalmaztunk, melynek DCM értéke $6,0 \pm 0,4 \text{ g l}^{-1}$ volt.

A tenyészet életképességét Emri és mtsi (1997) által leírt módszerrel határoztuk meg. A tápközeg pH értékének és NH_4^+ tartalmának mérését Dr. Pusztahelyi Tündével (DE, MÉK, Agrárműszerközpont) végeztük el. A transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálatot Dr. Antal Miklós és Kis Gréta (DE, ÁOK, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet) segítségével végeztük el, a fémtartalmú csapadékok lokalizációjának érdekében. A pásztázó elektronmikroszkópia-energia-szóró röntgenspektroszkópiái (SEM-EDX) vizsgálatot Dr. Daróczi Lajossal (DE, TTK, Szilárdtest Fizikai Tanszék) végeztük el, mely módszerrel a biomassa felületén megjelenő csapadék elemösszetételét vizsgáltuk.

Az *A. oryzae* Rib40 biomassa elemösszetételének és fém felvételi hatékonyságának meghatározása induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometriás (ICP-OES) módszerrel történt. A mérést Dr. Baranyai Edina (DE, TTK, Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék, Agilent Atomspektroszkópiái Partner Laboratórium) és Tóth Noémi Csilla (DE, TTK, Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék) végezték el.

A bioszorpció kísérletekben a „többfázisú” tesztoldat, valamint az *A. oryzae* Rib40 „kétszeres dózisú” biomassza mintáinak elemzését hat párhuzamos kísérletből származó adat alapján végeztük el.

2.2. Az *Aspergillus nidulans* TNJ36 kontroll és MKL14 *ΔcrpA* mutáns törzsekkel végzett bioszorpció kísérletek

Az *A. nidulans* kontroll és mutáns törzsekkel végzett nehézfém stresszérzékenység vizsgálatokkor a következő koncentrációértékeket alkalmaztuk: 0,05–0,5 mM CuCl₂ és 0,1–6,0 mM CdCl₂.

Az gombatelep elemösszetételének térbeli eloszlásához és annak mennyiségi meghatározásához celofánnal borított (CCH) agarlemezeket alkalmaztunk (Balázs és mtsi, 2010; Kurucz és mtsi, 2018). A TNJ36 kontroll, mind pedig a MKL14 *ΔcrpA* törzseket a fentebb leírtak alapján 6 napig spóráztattuk, majd steril, féligáteresztő celofán korongokkal borított minimál táptalajra pontszerűen inokuláltuk (10⁵ számú spórával, 5 µl-es térfogatban). A 24 órás, 37 °C-on történő előinkubálást követően a tenyészeteket 0,1–0,4 mM CuCl₂-al és 0,1–0,5 mM CdCl₂-al kiegészített MNM agarlemezre helyeztük és további 5 napig inkubáltuk 37 °C-on.

Az *A. nidulans* törzsek elemösszetételének meghatározása, illetve eloszlása részecske indukált röntgenemissziós spektroszkópiával kombinált pásztázó transzmissziós ionmikroszkópiai (PIXE-STIM) módszer alkalmazásával zajlott. Ezt a mérést Dr. Török Zsófia, Dr. Szoboszlai Zoltán, Dr. Döncző

Boglárka és Dr. Kertész Zsófia (DE, Atommagkutató Intézet Debrecen) végezték el.

A TNJ36 kontroll és MKL14 *ΔcrpA* mutáns törzsek Cd és Cu tartalmának mérése ICP-OES módszer alkalmazásával történt. A mérést Dr. Baranyai Edina (DE, TTK, Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék, Agilent Atomspektroszkópiai Partner Laboratórium) végezte el.

A statisztikai elemzésekhez az átlagokat és a szórásokat (SD), minden esetben három független kísérlet adataiból határoztuk meg. A szignifikancia vizsgálatokhoz Student-féle t tesztet használtunk. Minden esetben a $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

3. Eredmények és megbeszélésük

A környezeti biotechnológiát egyre növekvő érdeklődés övezi mind a kutatók, mind a nagyközönség és a környezetipar részéről, éppen ezért az elmúlt két évtizedben számos előrelépés történt a bioremediációt alkalmazó technikákban, melyeknek végső célja a szennyezett területek hatékony és környezettudatos helyreállítása környezetbarát megoldások alkalmazásával és kis anyagi ráfordítás mellett. Egyre szélesebb körben kezdték el vizsgálni olyan technológiák alkalmazhatóságát, amelyek képesek csökkenteni az antropogén tevékenységek káros környezeti hatásait. Ennek érdekében különböző bioremediációs technikákat fejlesztettek ki és modelleztek, azonban a természet és/vagy a szennyező anyag típusa miatt nem létezik egyetlen olyan általánosan alkalmazható bioremediációs technika, amely „csodafegyverként” szolgál a szennyezett környezet helyreállításában (Azubuike és mtsi, 2016; Gupta és mtsi, 2016; Kang és mtsi, 2016; Işıldar és mtsi, 2018; Riva és mtsi, 2020). Ezért doktori disszertációban azokra a kérdésekre kerestük a választ, hogy: (i) az *A. oryzae* élő biomassza alkalmas-e REE rendkívül híg oldatból történő szelektív és hatékony bioszorpciójára más nehézfém ionok jelenlétében? (ii) az *A. nidulans* mutáns törzsek esetében a Cu^{2+} és Cd^{2+} transzportot biztosító CrpA pumpa hiánya, hogyan befolyásolja ezen nehézfémek gombatelepen belüli eloszlását, illetve akkumulációját?

3.1. Ritkaföldfémek bioszorpciója *Aspergillus oryzae* Rib40 élő biomasszával

A REE iránti növekvő igény miatt megnőtt az érdeklődés az elhagyott bányászati területeken található szivárgó vizek ipari mértékű kiaknázására (Merten és mtsi, 2004; Grawunder és mtsi, 2018). Nem meglepő tehát, hogy az elmúlt időszakban számos tanulmány született az értékes REE mikrobiális eredetű biomasszával, „másodlagos forrásokból” történő visszanyeréséről (Andrès és mtsi, 2003; Merten és mtsi, 2004).

A kolloidok/csapadékok pH-függő képződése tipikus fizikokémiai folyamat, amely a szivárgó vizekből már ismert, és általában a REE Fe-al együtt történő kicsapódásával jár együtt (Bau és mtsi, 1999; Verplanck és mtsi, 2004). Vélhetően ezen folyamatok csökkentik ezen értékes fémek biológiai hozzáférhetőségét, azonban fontos megjegyezni, hogy a Fe(III)-és Al(III)- oxo-hidroxidok vagy foszfát-kolloidok/csapadékok kémiai képződése is megkezdődött, amit a tesztoldat opálosodása és jelentős mennyiségű, Fe-at és Ce-ot tartalmazó narancssárga színű csapadék megjelenése is jelzett. Ezen megfigyelések alátámasztják azt az elképzelésünket, hogy a Ce komplex fémoldatból történő megkötése Fe(III)- és Al(III)-oxo-hidroxidok vagy foszfátok képződéséhez és kicsapódásához kapcsoltn megy végbe.

A Ce-al ellentétben az Y és Nd kötési maximumai egyértelműen a kísérlet 24. órájára tolódtak, ahol is 80 %-ot meghaladó szorpciós hatékonyságokat tudunk mérni, amely jelenségért valószínűleg a biomasszában lezajló, lassú, de aktív

mechanizmusok tehetők felelőssé. Az Y és Nd késői bioszorpciója egybeesett a teszt oldatban mért pH értékek növekedésével és a megnövekedett NH_4^+ koncentrációkkal. Ezen fiziko-kémiai változások az élő hifákban végbemenő élettani folyamatokra vezethetők vissza.

A TEM vizsgálatkor mind sejtfelszíni, mind intracelluláris aggregátumokat is megfigyeltünk. Ezen eredményünk kapcsán fontosnak tartom megjegyezni, hogy az általunk vizsgált bioszorpciós mechanizmusokra az extracelluláris fém megkötés volt inkább jellemző, ugyanakkor a mérgező fémek intracelluláris kompartmentalizációja a vakuólumokban, nemcsak aktív felvételi mechanizmusok jelenlétét jelzi, hanem az élő hifákban lezajló mérgeztelenítési folyamatokat is (Pócsi és mtsi, 2004; Schlunk és mtsi, 2015).

A micéliumok felületén megjelenő csapadék elemösszetételét SEM-EDX méréssel határoztuk meg. A kapott spektrumok alapján elmondhatjuk, hogy az aggregátumok főként Fe(III)-és Al(III)- oxo-hidroxidok és/vagy foszfát kolloidok/csapadékok formájában jelentek meg.

Mindezen eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy lehetőség nyílik a manapság egyre nagyobb jelentőséggel bíró és értékes REE bányászati területeken felszínre bukkanó vizekből történő szelektív bioremediációjára (bioszorpcióra).

Megfigyeléseink szerint egy kétfázisú bioszorpciós rendszer alkalmazásával tovább lenne növelhető a REE megkötésének hatékonysága, oly módon, hogy az első fázisban a Fe és Al megkötése történne egy viszonylag rövid inkubációs idő alkalmazásával, majd

ezt követné a második fázis, amikor is egy új biomassza töltet alkalmazásával a fennmaradó REE még hatékonyabb megkötése zajlana le (Boczonadi és mtsi, 2020a).

3.2 Nehézfémek bioszorpciója *Aspergillus nidulans* $\Delta crpA$ hiánymutáns törzs alkalmazásával

A gombák számos fehérjecsaláddal rendelkeznek, amelyek részt vesznek a Cu homeosztázis fenntartásában, ide tartoznak például a Cu^{2+} és Cd^{2+} megkötésében szerepet játszó transzkripció faktorok, vagy maguk a transzporterek. Utóbbiak a gomba túléléséhez járulnak hozzá nagy fémion koncentrációjú környezetben. Kísérleteinkben az AN3117 (*crpA*) gén deléciójának hatását vizsgáltuk, mely feltehetőleg Cu^{2+} és Cd^{2+} iontranszportert kódol *A. nidulans*ban.

A fenotípus vizsgálat alapján elmondhatjuk, hogy az általunk tesztelt *ΔcrpA* gén deléciós mutáns törzsek (MKL5, MKL10, MKL14) megnövekedett stressz érzékenységet mutattak mind a Cu^{2+} , mind pedig a Cd^{2+} nehézfémstressz kezelésekre, mely eredmények összhangban állnak az Antsotegi-Uskola és mtsi. (2017) által közzétett korábbi kísérleti adatokkal (Antsotegi-Uskola és mtsi, 2017). Az úgynevezett „réz fenotípus” megjelenését (nagyon vékony, laza micélium szövedék) csak az *ΔcrpA* törzsekkel végzett felületi stresszérzékenység vizsgálatok esetén figyeltük meg. A kapott eredmények felhívják a figyelmet arra, hogy ezen speciális „réz fenotípus” megjelenése szervesen kapcsolódik a mutáns konidiospórák csírázásához nagy koncentrációjú Cu^{2+} stressz esetén (Antsotegi-Uskola és mtsi, 2017). Nem meglepő módon, mind a

TNJ36 kontroll, mind az MKL14 mutáns törzs megnövekedett toleranciát mutatott CCH tenyésztési körülmények között.

Mindkét nehézfémstressz esetén tapasztaltunk paradox stressz-érzékenységi fenotípust, amikor az MKL14 *ΔcrpA* törzs megnövekedett nehézfém toleranciát mutatott a kezelt kontroll törzshöz viszonyítva. Ezen jelenség kialakulását normál tenyésztési körülmények között 0,125 mM vagy ennél kisebb koncentrációjú Cu^{2+} kezelésnél, míg CCH agarlemezekeken végzett kísérletkor a legkisebb 0,1 mM Cd^{2+} koncentrációnál figyelhettük meg.

Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a CrpA elsősorban Cu^{2+} transzporter, de emellett szállíthat Cd^{2+} ionokat is, ha más fő Cd^{2+} detoxifikáló rendszerek, mint a Cd^{2+} pumpák és a glutation/fitokelatin rendszer, telítettek (Antsotegi-Uskola és mtsi, 2017). Ezen megállapítással összhangban a túlkompenzációs mechanizmusok hatékonyabban működtek a Cd^{2+} stressznek kitett CCH tenyészetekben, ami jelentősen megnövekedett Cd^{2+} toleranciát és bioszorpciót eredményezett a deléciós törzsben.

A PIXE-STIM mérések alapján elmondhatjuk, hogy a TNJ36 kontroll törzsben a Cu^{2+} és a Cd^{2+} is hasonló térbeli eloszlási mintázatot mutat, azaz mindkét fém jellemzően a telep közepe és széle között halmozódik fel. Az MKL14 *ΔcrpA* törzs esetében a telep szélén jelentősen kisebb nehézfémion koncentrációt mértünk, szemben az öregedő régiókkal. Ezen eredmények jelzés értékűek, ugyanis alternatív detoxifikáló mechanizmusok, mint például Cu^{2+} metallotioneinek vagy a Cd^{2+} glutationnal alkotott komplexei, a citoplazmában, illetve a vakuólumokban raktározódnak, így valószínűleg hozzájárulnak a nehézfém tartalom szabályozásához és a

fémek okozta toxicitás semlegesítéséhez (Cánovas és mtsi, 2003; Guelfi és mtsi, 2003; Antsolegi-Uskola és mtsi, 2017; Cai és mtsi, 2018; Guo és mtsi 2019; Sácák és mtsi, 2014 és 2019).

Az ICP-OES elemvizelés rámutatott, hogy az MKL14 *ΔcrpA* törzs jelentősen megnövekedett Cd akkumulációs képessége {1672,7±104,7 mg (kg DCM)⁻¹ 0,3 mM Cd²⁺} kiemelkedő a gombák körében. Az eddig rekordernek számító *A. fumigatus* Af293 törzs CCH tenyészetei csupán 850±110 mg (kg DCM)⁻¹ Cd-ot képes felhalmozni 2 mM koncentrációban alkalmazott Cd²⁺ kezelésnél (de Vries és mtsi, 2017; Bakti és mtsi, 2017; Orosz és mtsi, 2018; Kurucz és mtsi, 2018).

Az általunk elvégzett PIXE-STIM és ICP-OES elemzéssel fény derült az *A. nidulans* kontroll és mutáns törzsek nehézfém eloszlási mintázatai és mennyiségbeli közötti különbségekre, mely így mindazon alap és alkalmazott kutatás gerincét képezheti, ahol különösen fontos a szaprofita gombák nehézfémek bioszorpciójának feltérképezése. További eredményeink alapján elmondható, hogy a bizonyítottan Cu²⁺ és Cd²⁺ transzportért felelős CrpA pumpa hiánya pozitívan befolyásolja a gomba bioszorpció kapacitását, köszönhetően a paradox módon megjelenő túlkompenzációs mechanizmusoknak (Boczonadi és mtsi, 2020b).

4. Összefoglalás

Napjainkban a ritkaföldfémekre (REE) egyre nagyobb figyelem irányul, köszönhetően egyedi tulajdonságaiknak és rendkívül széles ipari alkalmazhatóságuknak. Ennek eredményeként a REE szennyezett talajból, talajvízből való kinyerése egy igen jelentős kutatási feladat. Számos módszer létezik ezek visszanyerésére, például kicsapás, szűrés, oldószeres extrahálás stb., ám ezek a módszerek gazdasági szempontból nem bizonyultak eddig elég vonzóknak (Anastopoulos és mtsi, 2016). Nem szabad viszont elfelejtenünk, hogy ezen értékes fémek jelenléte mellett környezetünket egyre nagyobb mértékben terheli nehézfém szennyezés, mely elsősorban az olyan antropogén hatásokból ered, mint a mezőgazdasági vagy ipari tevékenységek (Wu és mtsi, 2016; Ojuederie és mtsi, 2017). A nehézfém-ionok, például a Cu^{2+} és Cd^{2+} , eltávolítása a szennyezett talajból vagy szennyvízből elengedhetetlen az egészségre és környezetre gyakorolt káros hatásaik elkerülése érdekében, különös tekintettel, ha ezen szennyezők nagy koncentrációban vannak jelen (Jaishankar és mtsi, 2014).

Kísérleteinkben az *A. oryzae* Rib40 fonalas gombát alkalmaztuk a REE vizes oldatból történő bioszorpciójára. A gomba biomassza nagy mennyiségben és könnyen előállítható a biofermentációs folyamatok végtermékeként, amely aztán felhasználható olyan komplex, „többfázisú” oldatban, amely leginkább tükrözi a természetben előforduló bányászati területekről származó vízminták elemösszetételét és egyéb paramétereit (pH, hőmérséklet). Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk arról,

hogy a gomba képes túlélni ezen körülményeket, az egyes fémekre vonatkozóan megvizsgáltuk a minimális gátló koncentrációkat (MIC), valamint a kísérlet teljes időtartama alatt nyomon követtük a biomassza életképességét. Eredményinkből kiderült, hogy az *A. oryzae* nemcsak tolerálni képes az általunk alkalmazott fém koncentrációkat, de 16,5 °C-on, 24 órán át tartó fémkezelés után is életképes maradt a micélium.

Az ily módon összeállított „többfázisú” tesztoldatban a Ce, Al és Fe fázisokkal egy időben történő kicsapódását figyeltük meg a REE (Y és Nd) 24 óránál bekövetkező speciális bioszorpcióját megelőzően. Mindez azért figyelemreméltó, mert annak ellenére sikerült az Y-ot és Nd-ot időben elkülönítve kivonni, hogy az Al és Fe zavaróan nagy koncentrációban voltak jelen. Az egyes fémekre jellemző kétfázisú kötődési mintázat szoros összefüggésben áll a tesztoldatban mérhető, dinamikusan növekvő pH és NH_4^+ koncentrációkkal, ami azzal magyarázható, hogy glükózmentes körülmények között szénéhezés alakult ki, melynek következtében a sejtek fehérjetartalma bomlásnak indult, így a tesztoldatban folyamatosan emelkedő ammónia koncentrációt mértünk.

A transzmissziós (TEM) és röntgenspektroszkópiával egybekötött pásztázó elektronmikroszkópos (SEM-EDX) vizsgálatkor képet kaptunk a fémfelvétel mechanizmusáról, melyből kiderült, hogy a fémek Fe, illetve Al tartalmú csapadékok formájában a sejtfalhoz kapcsolódva, valamint néhány esetben intracellulárisan (a vakuólumokban) is megjelentek.

Az olyan nehézfémek, mint például Cu vagy Cd bioremediációjára irányuló kísérleteink első lépésében a CrpA

transzporter élettani szerepét vizsgáltuk az *A. nidulans* hiánymutáns törzsekben. Eredményeinkből kiderült, hogy a CrpA P-típusú ATPáz fontos Cu^{2+} és Cd^{2+} pumpaként működik, jelentősen hozzájárulva a gomba nehézfém-stressz elleni védekezéséhez. Várakozásainkkal ellentétben paradox módon megnövekedett toleranciát tapasztaltunk normál agarlemezekben Cu^{2+} , míg a celofánnal borított táptalajon (CCH) történt tenyésztési körülmények között Cd^{2+} stressznek kitett *ΔcrpA* törzs esetében. Ezen megfigyeléseink más hatékony Cu^{2+} és Cd^{2+} detoxifikációs rendszerek aktiválódását valószínűsítik *crpA* hiányában, amelyek egyúttal túlkompenzálják a pompa hiányát.

Ezen megfigyelések fényében adódott tehát a kérdés, hogy a gombatelepen belül van-e különbség a Cu^{2+} és Cd^{2+} térbeli eloszlásában. E kérdés megválaszolása érdekében részecske indukált röntgen emissziós spektroszkópiával kombinált pásztázó transzmissziós ionmikroszkópiai (PIXE-STIM) elemzést végeztünk, melyből kiderült, hogy *crpA* hiánya jelentősen megváltoztatta a Cu^{2+} és Cd^{2+} térbeli eloszlását a CCH tenyészetekben, mégpedig oly módon, hogy a mutáns törzs esetében mindkét fém felhalmozódásának súlypontja az öregedő (vakuolizált) régiók felé tolódott el.

Az induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometriai (ICP-OES) méréssel megnéztük, hogy az előző eredmények hogyan nyilvánulnak meg az egész gombatelepre vonatkoztatott fémmegkötő képességben. Meglepő módon a *ΔcrpA* törzs 2,7-szer nagyobb Cd bioszorpciós kapacitást mutatott a CCH tenyészetekben $\{1672,7 \pm 104,7$ és $612,5 \pm 189,3 \text{ mg (kg DCM)}^{-1}\}$. Mindez azért nagyon érdekes és fontos megfigyelés, mert az eddig irodalmi adatok

alapján Cd akkumulációban rekordernek számító *A. fumigatus* Af293 csupán $850 \pm 110 \text{ mg (kg DCM)}^{-1}$ Cd-t képes felhalmozni (Kurucz és mtsi, 2018). Az *A. nidulans* *ΔcrpA* gén deléciós törzs így jó alternatívája lehet az opportunista humán patogén *A. fumigatus*nak a Cd-al szennyezett területek bioremediációjában. Reményeink szerint az általunk alkalmazott módszerek hozzájárulhatnak a megnövekedett Cd^{2+} tolerancia mögötti molekuláris mechanizmusok mélyebb megértéséhez, valamint hasznos lehet bioremediációs célokra alkalmazható törzsek fejlesztésére.

Mindezen képességüknek köszönhetően mindkét *Aspergillus* faj potenciális jelöltje lehet a hatékony és egyben biztonságos gomba biomasszán alapuló bioszorpció technológiák kifejlesztésének (Boczonádi és mtsi, 2020a és 2020b).

5. Tézisek

- 1) Az *Aspergillus oryzae* Rib40 ipari törzs élő biomasszája alkalmas REE bioszorpciójára.
- 2) A Ce, komplex fémoldatból történő megkötése Fe(III)- és Al(III)-oxo-hidroxidok vagy foszfátok képződéséhez és kicsapódásához kapcsolatosan, egy időben zajlik, míg az Y és Nd bioszorpció hatékonyságának maximuma időben eltolódott ezekhez képest.
- 3) A törzs több fémion, különös tekintettel a Fe és Al, egyidejű és nagy koncentrációjú jelenléte mellett is alkalmas REE szelektív és hatékony bioszorpciójára.
- 4) A fémek Fe , illetve Al tartalmú csapadékok formájában a sejtfalhoz kapcsolódva illetve, néhány esetben intracellulárisan (a vakuólumokban) jelentek meg.
- 5) Lehetőség nyílik egy új gomba biomasszáján alapuló hatékony bioremediációs technológia fejlesztésére, ugyanis egy kétfázisú bioszorpció rendszerrel tovább növelhető a REE bioszorpciójának hatékonysága.
- 6) Az MKL14 *ΔcrpA* törzs esetében, mind a Cu, mind pedig a Cd kezelés hatására megfigyeltünk paradox módon megjelenő túlkompenzációs mechanizmusokat.

- 7) A PIXE-STIM elemzés rámutatott az *A. nidulans* kontroll és mutáns törzsek nehézfém eloszlási mintázatai közötti különbségekre.
- 8) Az MKL14 *ΔcrpA* törzs megdöbbenően nagy $1672,7 \pm 104,7$ mg (kg DCM⁻¹) Cd kötő képességgel bír, mely így alkalmas lehet Cd-al szennyezett területek bioremediálására.
- 9) A bizonyítottan Cu²⁺ és a Cd²⁺ transzportért felelős CrpA pumpa hiánya pozitívan befolyásolja a gomba bioszorpció kapacitását
- 10) A PIXE-STIM elemzés, kombinálva az ICP-OES elemanalízissel hozzájárulhat a megnövekedett Cd²⁺ tolerancia mögötti molekuláris mechanizmusok mélyebb megértéséhez, és hasznos lehet a jövőben, új bioremediációs célokra alkalmazható törzsek fejlesztésekor.

6. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném őszinte köszönetemet kifejezni témavezetőmnnek Prof. Dr. Pócsi István egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette és szakmai irányításával, értékes tanácsaival támogatva munkámat.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Emri Tamás és Dr. Leiter Éva egyetemi docenseknek, valamint Dr. Jakab Ágnes egyetemi adjunktusnak, akik lelkiismeretesen segítették munkámat.

Köszönet illeti Prof. Dr. Erika Kothet, Dr. Anja Grawundert és Dr. Dirk Mertent (Friedrich Schiller University, Jena) a doktori munkám alapját képező adatokért és hogy hasznos tanácsaikkal támogatták munkámat.

Szeretném megköszönni Jae-Hyuk Yunak (University of Wisconsin, Madison) Mi-Kyung Leenek (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology), hogy rendelkezésemre bocsájtották a deléciós mutáns törzset.

Köszönettel tartozom Dr. Pusztahelyi Tündének (DE, MÉK, Agrárműszerközpont) az ammónia mérésben, Dr. Baranyai Edinának és Tóth Noémi Csillának (DE, TTK, Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék) az ICP-OES mérésben, Dr. Török Zsófiának, Dr. Szoboszlai Zoltánnak, Dr. Döncző Boglárkának és Dr. Kertész Zsófiának (DE, Atommagkutató Intézet Debrecen) a PIXE-STIM mérésben, Dr. Daróczi Lajosnak (DE, TTK, Szilárdtest Fizikai Tanszék) a SEM-EDX mérésben, Prof. Dr. Antal Miklósnak és Kis Grétának (DE, ÁOK, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet) a TEM mérésben nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért.

Külön köszönettel tartozom Prof. Dr. Csernoch László (DE, ÁOK, Élettani Intézet) és Prof. Dr. Fábián István (DE, TTK, Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék) hasznos tanácsaikért és hogy támogatták munkámat, szakmai fejlődésemet.

Szeretném megköszönni Kánya Klaudia, Csernai Beatrix, Szabó Gréta, Gyurcsó Klaudia és Kónya Gábor szakdolgozóknak a lelkes és odaadó munkájukat.

Külön köszönettel tartozom Tóth Gáborné laboratóriumi asszisztensnek, továbbá a Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék minden dolgozójának, hogy munkámat kellemes légkörben barátok közt végezhettem.

Nem utolsó sorban hálás vagyok Szüleimnek, Nővéremnek és családjának, és Barátaimnak a támogatásukért, biztatásukért. Külön köszönettel tartozom Páromnak, aki végig mellettem állt és hatalmas segítséget nyújtott, nemcsak a dolgozat végső formában való elkészítésében, hanem a doktori munkám teljes időszaka alatt is.

A dolgozatot az EFOP-3.6.1-16-2016-00022 számú „Debrecen Venture Catapult Program” és az Innovációs és Technológiai Minisztérium által meghirdetett NKFIH-1150-6/2019 Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program, a Debreceni Egyetem Biotechnológia tématerületi programja támogatta. A dolgozat az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

**Short thesis for the degree of doctor of philosophy
(PhD)**

**POTENTIAL APPLICATION OF *ASPERGILLUS*
SPECIES IN THE BIOREMEDIATION OF HEAVY
METALS**

IMRE BOCZONADI

Supervisor:

Prof. Dr. Istvan Pocsi



UNIVERSITY OF DEBRECEN
Doctoral School of Juhasz-Nagy Pal

Debrecen, 2020

7. Introduction and objectives

Rare earths elements (REEs) are considered as “the vitamins” of the modern industry due to ever-increasing supply and demand (Cardoso et al., 2019). Currently, countries such as China, United States and Australia supply the bulk of global REE production, China stands out among them, which accounts for 90% of global production (Zhou et al., 2017). Given that demand for REE far exceeds supply, it is essential for the emerging “green technologies” to develop methods to extract these metals from soil and groundwater with sufficient efficiency (Anastopoulos et al., 2016; Goodenough et al., 2016), 2018; Barros et al., 2019; Owens et al., 2019).

Developmental application of technologies which not only extract economically valuable metals, but also, where appropriate, those present in toxic quantities, are of fundamental importance.

Copper (Cu) and cadmium (Cd) pollution is an increasingly widespread environmental problem, stemming primarily from agricultural and industrial activities (Archana et al., 2014). One of the problems with these heavy metal contaminants is that due to their large amounts and long-term use, they can be enriched in soil and groundwater where they are not converted to less toxic compounds (Jacobson et al., 2005; Komárek et al., 2010).

Many technological solutions are known for the removal or recovery of these heavy metals from the environment but these methods, in addition to not being applied with an adequate efficiency, are even extremely costly (Volesky et al., 1990; Wang and Wang and Huang, 2002; Yang et al., 2005). Thus, today, there is an increasing

focus on technological methods that use biological systems, primarily microorganisms, to bind heavy metals (Wang and Chen, 2009; Soares et al., 2013; Johnson, 2014).

In my doctoral work, I aimed to develop biomass-based bioremediation technologies based on *Aspergillus spp.* (*A. oryzae*, and *A. nidulans*), which can be used to safely and efficiently recover REE, with little financial effort, moreover it is also possible to retain certain heavy metals, such as copper (Cu) and cadmium (Cd), in the environment.

To this end the following research was performed:

Biosorption of rare earth metals with *A. oryzae* Rib40 filamentous fungi.

The biosorption processes of *A. oryzae* Rib40 were studied using the experimental parameters that best reflected the natural conditions. During the experiments, physiological changes in the fungus, such as changes in dry weight (DCM) and pellet diameter, survival, MIC₅₀, DCM/glucose loss, and changes in NH₄⁺ content and pH in the medium were continuously monitored. Meanwhile, we sought answers to the questions of whether the fungus is capable of selective and efficient biosorption of REE in the simultaneous presence of other metal ions. To answer this question, we performed inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) analysis, where the metal content of both the test solution and the biomass was determined. Finally, we wanted to know whether the mechanism of

metal binding occurs intracellularly or extracellularly, so we performed transmission electron microscopy (TEM) and then energy scattering X-ray spectroscopy (SEM-EDX).

2. Biosorption of heavy metals by *A. nidulans*.

We investigated the physiological role of a putative Cu and Cd ion transporter (CrpA) in *A. nidulans* mutant strains exposed to heavy metal stress. We sought answers which regions of the accumulation of metals takes place in the fungal colony and whether the absence of the CrpA transporter results in a quantitative difference in metal uptake compared to the control strain. Changes in the stress sensitivity of both control (TNJ36) and mutant strains (MKL5, MKL10, MKL14) were monitored during the experiments, first under normal culture conditions and then on cellophane-coated (CCH) agar plates with the selected MKL14 mutant strain. The spatial distribution of metal ions (Cu^{2+} and Cd^{2+}) within the colonies was examined by particle-induced X-ray emission spectroscopy combined-scanning transmission ion microscopy (PIXE-STIM) method, and then the Cu and Cd biosorption capacity of the TNJ36 control and the ΔcrpA gene deletion mutant strain were determined by ICP-OES measurement.

8. Materials and methods

In our experiments we worked with the industrial strain *Aspergillus oryzae* Rib40, which was grown on a medium containing malt extract (3% malt extract, 0.5% mycological peptone, 1.5% agar, pH 6.0) was sporulated at 25 °C for 6 days (de Vries et al., 2017; Orosz et al., 2018).

In addition, *A. nidulans* TNJ36 (*pyrG89 AfpyrG⁺ pyroA4 veA⁺*) control and Δ *crpA* (*pyrG89; Δ crpA: AfupyrG⁺; pyroA4; veA⁺*) gene deletion mutant strains were studied. The Δ *crpA* deletion mutant was generated and provided by Jae-Hyuk Yu et al. (University of Wisconsin, Madison, USA) by double-joint PCR (DJ-PCR). *A. nidulans* strains were grown on solid Barratt minimal medium (AMM) at 37 °C for 6 days (Barratt et al., 1965).

The strains were sporulated as described above. 5 μ l (1×10^5 spores) of spore suspension was added to the minimal medium supplemented with stress-generating agents and incubated for 5 days at 37 °C (de Vries et al., 2017; Orosz et al., 2018).

8.1. Biosorption experiments with *Aspergillus oryzae*

The appearance of REE was also studied at two sites in the abandoned uranium mining area (Ronneburg) in the German state of Thuringia, Gessenhalde (UTM 32N: E721501, N5638350) and Nordhalde (UTM 32N: E722290, N5638222). The metal concentrations of our “multiphase” test solution were determined and applied on the basis of data from more than 20 sampling points taken

in these two areas between 9-12 September 2014 which revealed that groundwater around Ronneburg has very high concentrations of rare earth metals (Grawunder and Merten, 2012). (Li^+ 0.06 ± 0.03 mM, Mg^{2+} 30 ± 14.4 mM, Al^{3+} 1.4 ± 1.6 mM, Fe^{3+} 0.6 ± 2.1 mM, Ni^{2+} 0.2 ± 0.09 mM, Zn^{2+} 0.04 ± 0.044 mM, Y^{3+} 0.007 ± 0.008 mM, Ce^{4+} 0.0023 ± 0.0018 mM, Nd^{3+} 0.00094 ± 0.00091 mM).

The initial pH of the “multiphase” test solution was 3.85 ± 0.07 , which was in the average pH range of the water samples taken and analyzed from the mining area ($\text{pH}=4.2\pm0.6$).

The average temperature of the water samples from the mining area was 16.5 ± 1.1 °C, so the experiments were performed by incubation at 16.5 °C, 3.7 Hz for 24 hours.

Prior to the experiments, *A. oryzae* Rib40 strain was grown for 6 days at 25 °C using conidia spores washed from surface cultures. For shake flask cultures (100 ml), inoculation was performed with 10^8 spores after spore counting in a Bürker chamber. Cultures were precultured at 25 °C for 48 hours at 3.7 Hz. After 48 hours of incubation, the mycelium was filtered and, after washing three times with sterile distilled water, transferred to flasks containing control (100 ml of sterile distilled water) and complex “multiphase” test solution.

To study the dose-dependent metal accumulation of biomass, we used two biomass concentrations in our experiments. For the “single dose” culture, the initial dry weight (DCM) was 3.7 ± 0.5 g l⁻¹ DCM, while in the “double-dose” culture, the amount of biomass obtained from two parallel cultures with a DCM value of 6.0 ± 0.4 g l⁻¹ was used.

The viability of the culture was determined by the method described by Emri et al. (1997). The pH and NH_4^+ content of the medium was measured with the help of Dr. Tünde Pusztahelyi (DE, Central Laboratory of Agricultural and Food Products, Faculty of Agricultural and Food Sciences and Environmental Management). Transmission electron microscopy (TEM) was performed with the help of Dr. Miklós Antal and Kis Gréta (DE, Department of Anatomy, Faculty of Medicine) in order to localize the metal-containing precipitates. Scanning electron microscopy (SEM) and Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) were performed with the help of Dr. Lajos Daróczi (DE, Department of Solid State Physics, Faculty of Science and Technology). The elemental composition and metal uptake efficiency of *Aspergillus oryzae* biomass were determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). The measurement was performed by Dr. Edina Baranyai (DE, Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Agilent Atomic Spectroscopy Partner Laboratory) and Csilla Noémi Tóth (DE, Department of Inorganic and Analytical Chemistry).

The biosorption experiments with *A. oryzae* Rib40 filamentous fungi, the analysis of the “multiphase” test solution and the “double dose” biomass samples were performed on the basis of data from six replicates.

8.2. Biosorption experiments with *Aspergillus nidulans* TNJ36 control and MKL14 *ΔcrpA* mutant strains

The following concentration values were used in heavy metal stress sensitivity assays with *A. nidulans* strains: 0.05–0.5 mM CuCl₂ and 0.1–6.0 mM CdCl₂.

Cellophane-covered (CCH) agar plates were used for the spatial distribution and quantification of the elemental composition of the fungal colony (Balázs et al., 2010; Kurucz et al., 2018). Both TNJ36 control and MKL14 *ΔcrpA* strains were sporulated for 6 days as described above and then point-inoculated on minimal medium covered with sterile semipermeable cellophane sheets (with spores 10⁵ in a volume of 5 µl). After 24 hours of preincubation at 37 °C, the cultures were placed on an MNM agar plate supplemented with 0.1–0.4 mM CuCl₂ and 0.1–0.5 mM CdCl₂ and incubated for an additional 5 days at 37 °C.

The elemental composition and distribution of *Aspergillus nidulans* strains were determined using particle induced X-ray emission spectroscopy - scanning transmission ion microscopy method (PIXE-STIM). This measurement was performed by Dr. Zsófia Török, Dr. Zoltán Szoboszlai, Dr. Boglárka Dönczö and Dr. Zsófia Kertész (Laboratory for Heritage Science, Institute for Nuclear Research, Hungarian Academy of Sciences (ATOMKI), Debrecen).

The cadmium and copper contents of the TNJ36 control and MKL14 *ΔcrpA* mutant strains were measured using the ICP-OES method. The measurement was performed by Dr. Edina Baranyai (DE,

Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Agilent Atomic Spectroscopy Partner Laboratory).

For statistical analyses, means and standard deviations (SD) were determined from data from three independent experiments in each case. Student's t test was used for significance studies. In all cases, $p < 0.05$ was considered statistically significant.

9. Results and discussion

There is a growing interest in environmental biotechnology both by researchers, the general public and the environmental industry, which is why many advances have been made in bioremediation techniques over the last two decades, whose ultimate goal is the efficient and environmentally conscious remediation of contaminated areas using environmentally friendly solutions with little financial outlay. The applicability of technologies that can reduce the adverse environmental impacts of anthropogenic activities has begun to be increasingly explored. To this end, various bioremediation techniques have been developed and modelled, however, due to the nature and/or type of pollutant, there is no single universally applicable bioremediation technique that serves as a “silver bullet” in restoring a polluted environment (Azubuike et al., 2016; Gupta et al., 2016; Kang et al., 2016; Işıldar et al., 2018; Riva et al. 2019). Therefore, in my doctoral dissertation, we sought answers to the questions of whether: (i) is living biomass of *A. oryzae* Rib40 suitable for the selective and efficient biosorption of REE from an extremely dilute solution in the presence of other heavy metal ions? (ii) In the case of *A. nidulans* mutant strains, is the lack of a CrpA pump providing Cu^{2+} and Cd^{2+} transport affecting the distribution and accumulation of these heavy metals within the fungal colony?

9.1. Biosorption of rare earth metals with *Aspergillus oryzae* living biomass

Due to the growing demand for REE, there has been an increased interest in the industrial exploitation of leaking waters in abandoned mining areas (Merten et al., 2004; Grawunder et al., 2018). It is not surprising, therefore, that a number of studies have recently been conducted for the recovery of valuable REE from microbial-derived biomass originating from “secondary sources” (Andrès et al., 2003; Merten et al., 2004).

The pH-dependent formation of colloids/precipitates is a typical physicochemical process already known from leaking waters and usually involves the precipitation of REE with Fe (Bau et al., 1999; Verplanck et al., 2004). These processes are thought to reduce the bioavailability of these valuable metals, but it is important to note that the chemical formation of Fe(III)- and Al(III)- oxohydroxides or phosphate colloids/precipitates has also begun, which was also indicated by the opalescence of the test solution and the appearance of a significant amount of orange Fe and Ce containing precipitate. These observations support our idea that the binding of the Ce complex from a metal solution is associated with the formation and precipitation of Fe(III)- and Al(III)- oxohydroxides or phosphates.

In contrast to Ce, the binding maxima of Y and Nd clearly shifted to the 24th hour of the experiment, where sorption efficiencies reached more than 80% which is likely to be responsible for the slow but active mechanisms taking place in biomass. The late biosorption of Y and Nd coincided with an increased pH values in the test solution

and an increased NH_4^+ concentrations. These physicochemical changes can be traced back to physiological processes in the living hyphae.

Both cell surface and intracellular aggregates were observed during the TEM analysis. In connection with this result, we consider it's important to note that the biosorption mechanisms we studied were more characterized by extracellular metal binding, however, the intracellular compartmentalization of toxic metals in vacuoles indicates not only active uptake mechanisms but also detoxification processes in living hyphae. 2004; Schlunk et al., 2015).

The elemental composition of the precipitate on the surface of the mycelium was determined by SEM-EDX measurement. Based on the obtained spectra, it can be said that the aggregates appeared mainly in the form of Fe(III)- and Al(III)- oxohydroxides and/or phosphate colloids/precipitates.

Based on all these results, we can conclude that there is an opportunity for a selective bioremediation (biosorption) of the increasingly important and valuable REE from surface water in mining areas.

According to our observations, the efficiency of REE binding could be further increased by using a two-phase biosorption system, in such a way that Fe and Al are bound in the first phase using a relatively short incubation time, followed by a second phase in which even more efficient binding of the remaining REE would take place using a new biomass charge (Boczonadi et al., 2020a).

9.2 Biosorption of heavy metals using *Aspergillus nidulans* $\Delta crpA$ deficient mutant strain

Fungi have a number of protein families involved in maintaining copper homeostasis, these include, for example, transcription factors involved in Cu^{2+} and Cd^{2+} binding, or the transporters themselves. The latter contribute to the survival of the fungus in environments with high metal ion concentrations. In our experiments, we investigated the effect of deletion of the AN3117 (*crpA*) gene, which presumably encodes a Cu^{2+} and Cd^{2+} ion transporter in *A. nidulans*.

Based on the phenotypic analysis, we can say that the $\Delta crpA$ gene deletion mutant strains we tested (MKL5, MKL10, MKL14) showed increased stress sensitivity to both Cu^{2+} and Cd^{2+} heavy metal stress treatments, which are in agreement with Antsotegi-Uskola. (2017) (Antsotegi-Uskola et al., 2017). The appearance of the so-called “copper phenotype” (very thin, loose mycelial mats) was observed only in the case of surface stress sensitivity studies with $\Delta crpA$ strains. The obtained results draw attention to the fact that the appearance of this special “copper phenotype” is organically related to the germination of mutant conidiospores under high concentrations of Cu^{2+} stress (Antsotegi-Uskola et al., 2017). Unsurprisingly, both the TNJ36 control and the MKL14 mutant strain showed increased tolerance under CCH culture conditions.

A paradoxical stress-sensitivity phenotype was observed for both heavy metal stress when the MKL14 $\Delta crpA$ strain showed increased heavy metal tolerance compared to the treated control strain.

The development of this phenomenon was observed under normal culture conditions with Cu^{2+} treatment at a concentration of 0.125 mM or less, while at the lowest 0.1 mM Cd^{2+} concentration when tested on CCH agar plates.

Based on these results, CrpA is primarily a Cu^{2+} transporter, but may also transport Cd^{2+} ions when other major Cd^{2+} detoxification systems, such as Cd^{2+} pumps and the glutathione phytochelatin system, are saturated (Antsotegi-Uskola et al., 2017). Consistent with this finding, overcompensation mechanisms were more effective in CCH cultures exposed to Cd^{2+} stress, resulting in significantly increased Cd^{2+} tolerance and biosorption in the deletion strain.

Based on the PIXE-STIM measurements, we can say that in the TNJ36 control strain, Cu^{2+} and Cd^{2+} show a similar spatial distribution pattern, i.e. both metals typically accumulate between the centre and the edge of the colony. In the case of strain MKL14 ΔcrpA , significantly lower heavy metal ion concentrations were measured at the edge of the colony, in contrast to the aging regions. These results are indicative, as alternative detoxifying mechanisms, such as Cu^{2+} with metallothioneins or Cd^{2+} with glutathione complexes, are stored in the cytoplasm and vacuoles, respectively, and are likely to contribute to the regulation of heavy metal content and neutralization of metal toxicity (Cánovas et al., 2003; et al., 2003; Antsotegi-Uskola et al., 2017; Cai et al., 2018; Guo et al. 2019; Sácáy et al., 2014 and 2019).

ICP-OES elemental analysis showed that the remarkably increased Cd accumulation capacity of the MKL14 ΔcrpA strain $\{1672.7 \pm 104.7 \text{ mg (kg DCM)}^{-1} \text{ at } 0.3 \text{ mM CdCl}_2\}$ is outstanding

among fungi because the *A. fumigatus* Af293 strain characterized before with a notable Cd^{2+} tolerance accumulated less, $850 \pm 110 \text{ mg (kg DCM)}^{-1} \text{ Cd}$ when exposed to 2 mM CdCl_2 in CCH cultures (de Vries et al., 2017; Bakti et al., 2017; Orosz et al., 2018; Kurucz et al., 2018).

Our PIXE-STIM and ICP-OES analysis revealed differences between the heavy metal distribution patterns and quantities of *A. nidulans* control and mutant strains, which may form the backbone of all basic and applied research where heavy metal biosorption of saprophytic fungi is particularly important. Based on our further results, it can be said that the lack of a CrpA pump proven to be responsible for Cu^{2+} and Cd^{2+} transport positively affects the biosorption capacity of the fungus, due to paradoxically appearing overcompensation mechanisms (Boczonadi et al., 2020b).

10. Summary

Nowadays, rare earth elements (REE) are receiving more attention due to their unique properties and extremely wide industrial applicability. As a result, the extraction of REE from soil and groundwater is a very urgent issue. There are several methods for recovering REE, such as precipitation, filtration, solvent extraction, etc., but these methods so far did not prove to be economically feasible (Anastopoulos et al, 2016). However, we should not forget that in the presence of these precious metals, our environment is increasingly burdened by heavy metal pollution, which stems primarily from anthropogenic impacts such as agricultural or industrial activities (Wu et al, 2016; Ojuederie et al, 2017). Removal of heavy metal ions such as Cu^{2+} and Cd^{2+} from contaminated soil or wastewater is essential to avoid their adverse effects on health and the environment, especially when these contaminants are present in high concentrations (Jaishankar et al, 2014).

In our experiments, we used the filamentous fungus *A. oryzae* Rib40 to biosorb REE from aqueous solution. Fungal biomass can be produced in large quantities and easily as a final product of biofermentation processes, which can be used in a complex, “multiphase” test solution represents the elemental composition and other parameters (pH, °C) of naturally occurring water samples from mining areas. To ensure that the fungi was able to survive these conditions, the minimal inhibitory concentrations (MIC) for each metal were examined and biomass viability was monitored throughout the whole experiment. Our results showed that *A. oryzae* biomass was

not only able to tolerate the metal concentrations we used, but the mycelium remained viable even after metal treatment at 16.5 °C for 24 hours.

In the “multiphase” test solution, precipitation of the secondary Al and Fe phases simultaneously with Ce was observed before the special biosorption of REE (Y and Nd) at 24 h. This is remarkable because Y and Nd were successfully separated in time despite the presence of disturbingly high concentrations of Al and Fe. The biphasic binding pattern of each metals is closely related to the dynamically increasing pH and NH_4^+ concentrations measured in the test solution, which can be explained by the fact that under glucose-depleted conditions, carbon starvation developed and the protein content of the cells began to degrade. Presumably, these conditions positively affected the efficiency of biosorption as there was no active detoxification mechanisms in the cell.

The transmission (TEM) and scanning electron microscopy combined with X-ray spectroscopy (SEM-EDX) provided an image of the exact location of the metal uptake, which revealed that the metals are located in the form of iron- and aluminium-containing complexes attached to the cell wall and, in some cases, also appeared intracellularly (in vacuoles).

Throughout our project, we studied the bioremediation of heavy metals such as Cu or Cd and we were interested to reveal the physiological role of CrpA transporter in *A. nidulans* mutant strain. Our results showed that CrpA P-type ATPase acted as an important Cu^{2+} and Cd^{2+} pump, contributing significantly to protect the fungi against the heavy metal stress. As expected, Cu^{2+} and Cd^{2+} stress

sensitivity studies carried out on agar plates revealed that the deletion of *crpA* caused a decreased heavy metal tolerance. On the other hand, increased tolerance was observed in both standard Cu^{2+} stress agar plate experiments and cellophane colony harvest (CCH) cultures, when the ΔcrpA strain was exposed to Cd^{2+} . These observations suggested the activation of other efficient Cu^{2+} and Cd^{2+} detoxification process in the absence of *crpA*, which overcompensated for the lack of the pump.

Thus, the question arose whether there was a difference in the spatial distributions of Cu^{2+} and Cd^{2+} within the fungal colony. To answer this question, we performed a particle induced X-ray emission spectroscopy-scanning transmission ion microscopy (PIXE-STIM) analysis, which revealed that the absence of *crpA* significantly altered the spatial distribution of Cu and Cd in CCH cultures in the case of the mutant strain, by shifting the centres of gravity of the accumulation of both metals towards the aging (vacuolated) regions.

By using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) measurement, we were interested to find out how the previous results were appears in metal-binding capacity for the whole fungal colony. Surprisingly, the ΔcrpA strain showed a 2.7 higher Cd biosorption capacity in CCH cultures $\{1672.7 \pm 104.7$ vs. $612.5 \pm 189.3 \text{ mg (kg DCM)}^{-1}\}$. All these observations are very intriguing and important because based on the literature dates, the *A. fumigatus* Af293, which is a recorder in Cd accumulation, can only accumulate $850 \pm 110 \text{ mg (kg DCM)}^{-1}$ Cd (Kurucz et al, 2018). *A. nidulans* ΔcrpA strain may be a good alternative for the opportunistic human pathogen *A. fumigatus* in the field of Cd-contaminated

bioremediation. We believe that the methods we described will contribute to further understanding the molecular mechanisms behind increased Cd^{2+} tolerance, as well as to the development of new strains for bioremediation purposes.

Summing it up, both *Aspergillus* species may will be potential candidates for the development of efficient and at the same time safe fungal biomass-based biosorption technologies in the future (Boczonádi et al, 2020a and 2020b).

11. Thesis

- 1) The living biomass of the industrial strain *Aspergillus oryzae* Rib40 is suitable for the biosorption of REE.
- 2) While the binding of Ce from a complex metal solution is related to the formation and precipitation of Fe(III) and Al(III) oxohydroxides or phosphates, it takes place simultaneously, until, the maximum of the biosorption efficiencies of Y and Nd shifted over time relative to these.
- 3) It is suitable for the selective and efficient biosorption of REE even in the simultaneous and high concentration of several metal ions, especially Fe and Al.
- 4) Metals appeared in the form of Fe- or Al-containing precipitates attached to the cell wall and, in some cases, intracellularly (in vacuoles).
- 5) It is possible to develop an efficient bioremediation technology based on a new fungal biomass, as a two-phase biosorption system can further increase the efficiency of biosorption of rare earths.
- 6) In the case of the MKL14 *ΔcrpA* strain, paradoxically appearing overcompensation mechanisms were observed under both Cu and Cd treatment.

- 7) PIXE-STIM analysis showed differences between the heavy metal distribution patterns of *A. nidulans* control and mutant strains.
- 8) The MKL14 *ΔcrpA* strain has a remarkably high Cd binding capacity of 1672.7 ± 104.7 mg (kg DCM⁻¹), which may be suitable for bioremediation of Cd-contaminated areas.
- 9) The lack of a CrpA pump responsible for Cu²⁺ and Cd²⁺ transport has a positive effect on the biosorption capacity of the fungus.
- 10) PIXE-STIM analysis, combined with ICP-OES elemental analysis, may contribute to a deeper understanding of the molecular mechanisms behind increased Cd²⁺ tolerance and may be useful in the future in the development of new strains for bioremediation purposes.

12. Acknowledgements

First of all, I would like to express my sincere thanks to my supervisor, Prof. Dr. István Pócsi, for allowing me and support my work with his professional guidance and valuable advice.

I am also grateful to Dr. Tamás Emri, Dr. Éva Leiter, associate professor, and Dr. Ágnes Jakab, assistant professor, who conscientiously assisted me in my work.

Thanks to Prof. Dr. Erika Koth, Dr. Anja Grawundert and Dr. Dirk Mertent (Friedrich Schiller University, Jena)) for the data on which my doctoral work is based and that they have supported my work with their useful advice.

I would like to thank Jae-Hyuk Yu (University of Wisconsin, Madison) Mi-Kyung Lee (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology) for making the deletion mutant strains available to me.

I am grateful to Dr. Tünde Pusztahelyi (DE, Agricultural Instrument Center) for the ammonia measurement, Dr. Edina Baranyai and Csilla Noémi Tóth (DE, Department of Inorganic and Analytical Chemistry) for the ICP-OES measurement, Dr. , Dr. Zoltán Szoboszlai, Dr. Boglárka Dönczö and Dr. Zsófia Kertész (Nuclear Research Institute Debrecen) in the PIXE-STIM measurement, Dr. Lajos Daróczi (DE, Department of Solid State Physics) in the SEM-EDX measurement, Prof. Dr. Antal Miklós and Kis Gréta (DE, Institute of Anatomy, Histology and Development) for their indispensable help in the TEM analysis.

Special thanks to Prof. Dr. László Csernoch (DE, Institute of Physiology) and Prof. Dr. István Fábián (DE, Department of Inorganic

and Analytical Chemistry) for their useful advice and for supporting my work and professional development.

I would like to thank , Klaudia Kánya, Beatrix Csernai, Gréta Szabó, Klaudia Gyurcsó and Gábor Kónya for their enthusiastic and dedicated work.

Special thanks to Gáborné Tóth, laboratory assistant, who provided indispensable professional assistance in my laboratory work, as well as to all employees of the Department of Molecular Biotechnology and Microbiology, for allowing me to do my work in a pleasant atmosphere with friends.

Last but not least, I am grateful to my parents, my sister and her family, and my friends for their support and encouragement. Special thanks to my girlfriend, who stood by me throughout and provided tremendous help, not only in the final preparation of the dissertation, but also during the entire period of my doctoral work.

The dissertation was supported by the EFOP-3.6.1-16-2016-00022 "Debrecen Venture Catapult Program" and the NKFIH-1150-6/2019 Higher Education Institutional Excellence Program, the Biotechnology thematic program of the University of Debrecen, announced by the Ministry of Innovation and Technology. The dissertation was supported by the European Union and co-financed by the European Social Fund.

13. Hivatkozások/References

Anastopoulos I, Bhatnagar A, Lima EC. (2016). Adsorption of rare earth metals: A review of recent literature. J. Mol. Liq. 221:954–962.

Andrès Y, Texier AC, Le Cloirec P. (2003). Rare earth elements removal by microbial biosorption: a review. Environ. Technol. 24:1367–1375.

Antsotegi-Uskola M, Markina-Iñarrairaegui A, Ugalde U. (2017). Copper Resistance in *Aspergillus nidulans* relies on the PI-type ATPase CrpA, regulated by the transcription factor AceA. Frontiers in Microbiol. 2017.00912.

Archana HS, AK. Jaitly (2014). Bioremediation: Environmental biotechnology for heavy metal decontamination of soil and water. Biochem. Cell. Arch. 14(2):259-281.

Azubuike CC, Chikere CB, Okpokwasili GC. (2016). Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. World J. Microbiol. Biotechnol. 32(11):180.

Bakti F, Király A, Orosz E, *et al.* (2017). Study on the glutathione metabolism of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 64:255-272.

Balázs A, Pócsi I, Hamari Z, *et al.* (2010). *AtfA* bZIP-type transcription factor regulates oxidative and osmotic stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Genet. Genomics*. 283:289–303.

Barratt RW, Johnson GB, Ogata WN. (1965). Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. *Genet.* 52:233–246.

Barros Ó, Costa L, Costa F, *et al.* (2019). Recovery of Rare Earth Elements from Wastewater Towards a Circular Economy. *Mol.* 24(6):1005.

Bau M. (1999). Scavenging of dissolved yttrium and rare earths by precipitating iron oxyhydroxide: Experimental evidence for Ce oxidation, Y–Ho fractionation, and lanthanide tetrad effect. *Geochim Cosmochim Acta*. 63:67–77.

Boczonádi I, Jakab A, Baranyai E, *et al.* (2020a). Rare earth element sequestration by *Aspergillus oryzae* biomass. *Environ. Technol.* 16:1-11.

Boczonádi I, Török Zs, Jakab A *et al.* (2020b). Increased Cd²⁺ biosorption capability of *Aspergillus nidulans* elicited by *crpA* deletion. *J. Basic Microbiol.* 60(7):574-584.

Cai Z, Du W, Zhang Z, *et al.* (2018). The *Aspergillus fumigatus* transcription factor *AceA* is involved not only in Cu but also in Zn

detoxification through regulating transporters CrpA and ZrcA. *Cell Microbiol.* 20:12864.

Cánovas D, Cases I, De Lorenzo V. (2003). Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* revealed by complete genome analysis. *Environ Microbiol.* 5:1242–1256.

Cardoso CED, Almeida JC, Lopes CB, *et al.* (2019). Recovery of Rare Earth Elements by Carbon-Based Nanomaterials—A Review. *Nanomaterials.* 9(6): 814.

Das N, Das D. (2013). Recovery of rare earth metals through biosorption: An overview. *J. Rare Earths.* 31:933-944.

Das D, Das N, Mathew L. (2010). Kinetics, equilibrium and thermodynamic studies on biosorption of AG(I) from aqueous solution by macrofungus *Pleurotus platypus*. *J. Hazard. Mater.* 1:765–774.

Emri T, Pócsi I, Szentirmai A. (1997). Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum*. *Free Radic. Biol. Med.* 23:809–814.

Goodenough KM, Wall F, Merriman D. (2018). The rare earth elements: demand, global resources, and challenges for resourcing future generations. *Nat Resour Res.* 27:201-216.

Grawunder A, Merten D. (2012). Rare earth elements in acidic systems— biotic and abiotic impacts. In: Kothe E, Varma A (Eds) Bio-geo interactions in metal-contaminated soils. Soil Biology Vol. 31, Springer. Berlin. p. 81–97.

Grawunder A, Lonschinski M, Händel M, *et al.* (2018). Rare earth element patterns as process indicators at the water–solid interface of a post-mining area. Appl. Geochem. 96:138–154.

Guelfi A, Azevedo RA, *et al.* (2003). Growth inhibition of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* by cadmium: an antioxidant enzyme approach. J. Gen. Appl. Microbiol. 49:63–73.

Guo SX, Yao GF, Ye HR, *et al.* (2019). Functional characterization of a cystathionine β -synthase gene in sulfur metabolism and pathogenicity of *Aspergillus niger* in pear fruit. J. Agric. Food. Chem. 67:4435–4443.

Gupta A, Joia J, Sood A, *et al.* (2016). Microbes as potential tool for remediation of heavy metals: A review. J. Microb. Biochem. Technol. 8:364–372.

.

İşildar A, van Hullebusch ED, Lenz M, *et al.* (2018). Biotechnological strategies for the recovery of valuable and critical raw materials from waste electrical and electronic equipment (WEEE) – A review. J. Haz. Mat. 362:467-481.

Jacobson AR, Dousset S, Guichard N, *et al.* (2005). Diuron mobility through vineyard soils contaminated with copper. *Environ. Pollut.* 138(2):250–259.

Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, *et al.* (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip. Toxicol.* 7:60–72.

Johnson DB. (2014). Biomining—biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials. *Curr. Opin. Biotechnol.* 30:24–31.

Kang CH, Kwon YJ, So JS. (2016) Bioremediation of heavy metals by using bacterial mixtures. *Ecol. Eng.* 89:64–69.

Komárek M, Čadková E, Chrastný V, *et al.* (2010). Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. *Environ. Int.* 36(1):138–151.

Kurucz V, Kiss B, Szigeti ZM, *et al.* (2018). Physiological background of the remarkably high Cd²⁺ tolerance of the *Aspergillus fumigatus* Af293 strain. *J. Basic Microbiol.* 58:957–967.

Merten D, Kothe E, Büchel G. (2004). Studies on microbial heavy metal retention from uranium mine drainage water with special emphasis on rare earth elements. *Mine Water Environ.* 23:34–43.

Ojuederie OB, Babalola OO. (2017). Microbial and Plant-Assisted Bioremediation of Heavy Metal Polluted Environments: A Review. Inter. J. Environ. Res. Publ. Health. 14(12):1504.

Orosz E, van de Wiele N, Emri T, *et al.* (2018). Fungal Stress Database (FSD)—a repository of fungal stress physiological data. Database (Oxford).1–6.

Owens CL, Nash GR, Hadler K, *et al.* (2019). Apatite enrichment by rare earth elements: A review of the effects of surface properties. Adv. Colloid Inter. Sci. 265:14-28.

Pócsi I, Prade RA, Penninckx MJ. (2004). Glutathione, altruistic metabolite in fungi. Adv. Microbiol. Physiol. 49:1–76.

Riva V, Riva F, Vergani L, *et al.* (2020). Microbial assisted phytodepuration for water reclamation: environmental benefits and threats. Chemosphere. 241:124843.

Sácký J, Leonhardt T, Borovička J, *et al.* (2014). Intracellular sequestration of zinc, cadmium and silver in *Hebeloma mesophaeum* and characterization of its metallothionein genes. Fungal Genet. Biol. 67:3–14.

Sácký J, Beneš V, Borovička J, *et al.* (2019). Different cadmium tolerance of two isolates of *Hebeloma mesophaeum* showing different basal expression levels of metallothionein (HmMT3) gene. Fungal Biol. 123:247–254.

Schlunk I, Krause K, Wirth S, *et al.* (2015). A transporter for abiotic stress and plant metabolite resistance in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma vaccinum*. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 22:19384–19393.

Soares EV, Soares HM. (2013). Clean up of industrial effluents containing heavy metals: a new opportunity of valorising the biomass produced by brewing industry. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97(15):6667–6675.

Verplanck PL, Nordstrom DK, Taylor HE, *et al.* (2004). Rare earth element partitioning between hydrous ferric oxides and acid mine water during iron oxidation. Appl. Geochem. 19:1339–1354.

Volesky B. (1990). Removal and recovery of heavy metals by biosorption. In: Volesky B, editor. Biosorption of Heavy Metals. Boca. Ration, FL: CRC Press. pp. 7-43.

Wang J, Huang CP. (2002). Heavy metal interactions with activated sludge particulates. Proceed. Water Environ. Federation. (15):48-60.

Wang J, Chen C. (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. Biotechnol. Adv. 27(2):195–226.

Wu X, Cobbina SJ, Mao G, *et al.* (2016). A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. Environ. Sci. Poll. Res. 23(9):8244–8259.

Yang Q, Wang JL, Xing Z. (2005). Biosorption of cadmium by fungal biomass of *Aspergillus niger*. Biomed. Environ. Sci. 18(3):141–145.

Yu JH, Hamari Z, Han KH, *et al.* (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. Fungal Genet. Biol. 41(11):973-981.

Zhou B, Li Z, Chen C. (2017). Global potential of rare earth resources and rare earth demand from clean technologies. Minerals. 7:203.



Nyilvántartási szám: DEENK/234/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Boczonádi Imre
Neptun kód: PMWFJU
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10056723

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idégen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

1. **Boczonádi, I.,** Török, Z., Jakab, Á., Kónya, G., Gyurcsó, K., Fehérmé Baranyai, E., Szoboszlai, Z., Dönczö, B., Fábán, I., Leiter, É., Lee, M. K., Csernoch, L., Yu, J. H., Kertész, Z., Emri, T., Pócsi, I.: Increased Cd²⁺ biosorption capability of *Aspergillus nidulans* elicited by crpA deletion.
J. Basic Microbiol. 60 (7), 574-584, 2020. ISSN: 0233-111X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.202000112>
IF: 1.909 (2019)
2. **Boczonádi, I.,** Jakab, Á., Fehérmé Baranyai, E., Tóth, C. N., Daróczi, L., Csernoch, L., Kis, G., Antal, M., Pusztahelyi, T., Grawunder, A., Merten, D., Emri, T., Fábán, I., Kothe, E., Pócsi, I.: Rare Earth Element Sequestration by *Aspergillus oryzae* Biomass.
Environ. Technol. Epub. 1-11, 2020. ISSN: 0959-3330.
DOI: <https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1739146>
IF: 2.213 (2019)

Magyar nyelvű absztrakt kiadványok (1)

3. **Boczonádi, I.,** Jakab, Á., Fehérmé Baranyai, E., Tóth, C. N., Daróczi, L., Csernoch, L., Kis, N. G., Antal, M., Pusztahelyi, T., Grawunder, A., Merten, D., Emri, T., Fábán, I., Kothe, E., Pócsi, I.: *Aspergillus oryzae* potenciális alkalmazásának lehetőségei ritkaföldfémek bioszorpciójában. In: *Biotechnológia a Debreceni Egyetemen Tudományos szimpózium : Program és összefoglalók*, Debrecen Egyetem, Debrecen, 14, 2019.

Idégen nyelvű absztrakt kiadványok (3)

4. **Boczonádi, I.,** Jakab, Á., Fehérmé Baranyai, E., Tóth, C. N., Daróczi, L., Kis, N. G., Antal, M., Emri, T., Pusztahelyi, T., Fábán, I., Kothe, E., Pócsi, I.: The potential application of *Aspergillus oryzae* in the biosorption of rare earth element ions present in seepage waters from a post-uranium-mining area.
In: *30th Fungal Genetic Conference : Abstract Book*, Genetic Society of America, Rockville, 79, 2019.





5. **Boczonádi, I.,** Fehérmé Baranyai, E., Jakab, Á., Emri, T., Fábián, I., Kothe, E., Pócsi, I.:
Biosorption of rare earth element ions by *Aspergillus oryzae* biomass in the presence of high concentrations of other metal ions.
In: 17th symposium on remediation : The role of heterogeneity in contaminated site assessment, bio-geo interactions and reactive transport, Friedrich Schiller University, Jena, 1, 2018.
6. **Boczonádi, I.,** Cserni, B., Gyurcsó, K., Kónya, G., Leiter, É., Jakab, Á., Lee, M. K., Yu, J. H., Pócsi, I.: Investigation of a putative copper and cadmium ion transporter in *Aspergillus nidulans*.
In: Ifjatal Biotechnológusok Országos Konferenciája. Szerk.: Tamás László, Zelenyánszki Helga, JATEPress, Szeged, 92, 2018. ISBN: 9789633153703





További közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

7. Jakab, Á., Antal, K., Emri, T., **Boczonádi, I.**, Imre, A., Gebri, E. Z., Majoros, L., Pfliegler, V. P., Szarka, M., Balla, G., Balla, J., Pócsi, I.: Effects of hemin, CO₂, and pH on the branching of *Candida albicans* filamentous forms.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 63 (4), 387-403, 2016. ISSN: 1217-8950.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/030.63.2016.023>
IF: 0.921

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (1)

8. Kovács, Z., Szarka, M., Kovács, S., **Boczonádi, I.**, Emri, T., Abe, K., Pócsi, I., Pusztahelyi, T.: Effect of cell wall integrity stress and RlmA transcription factor on asexual development and autolysis in *Aspergillus nidulans*.
Fungal Genet. Biol. 54, 1-14, 2013. ISSN: 1087-1845.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2013.02.004>
IF: 3.262

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (1)

9. Tólas, L., Máthéné Szigeti, Z., **Boczonádi, I.**, Bánfalvi, G., Szemán-Nagy, G.: Comparison of adhesion and infection dynamics of *Candida albicans* isolates with digital image analysis. In: *Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája*. Szerk.: Tamás László, Zelenyánszki Helga, JATEPress, Szeged, 107, 2018. ISBN: 9789633153703

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8,305

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 4,122

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudomány-metriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2020.07.28.





Registry number: DEENK/234/2020.PL
Subject: PhD Publikációs Lista

Candidate: Imre Boczonádi

Neptun ID: PMWFJU

Doctoral School: Pál Juhász-Nagy Doctoral School of Biology and Environmental Sciences

MTMT ID: 10056723

List of publications related to the dissertation

Foreign language scientific articles in international journals (2)

1. **Boczonádi, I.**, Török, Z., Jakab, Á., Kónya, G., Gyurcsó, K., Fehérné Baranyai, E., Szoboszlai, Z., Dönczö, B., Fábán, I., Leiter, É., Lee, M. K., Csernoch, L., Yu, J. H., Kertész, Z., Emri, T., Pócsi, I.: Increased Cd²⁺ biosorption capability of *Aspergillus nidulans* elicited by crpA deletion.
J. Basic Microbiol. 60 (7), 574-584, 2020. ISSN: 0233-111X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.202000112>
IF: 1.909 (2019)
2. **Boczonádi, I.**, Jakab, Á., Fehérné Baranyai, E., Tóth, C. N., Daróczy, L., Csernoch, L., Kis, G., Antal, M., Pusztahelyi, T., Grawunder, A., Merten, D., Emri, T., Fábán, I., Kothe, E., Pócsi, I.: Rare Earth Element Sequestration by *Aspergillus oryzae* Biomass.
Environ. Technol. Epub. 1-11, 2020. ISSN: 0959-3330.
DOI: <https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1739146>
IF: 2.213 (2019)

Hungarian abstracts (1)

3. **Boczonádi, I.**, Jakab, Á., Fehérné Baranyai, E., Tóth, C. N., Daróczy, L., Csernoch, L., Kis, N. G., Antal, M., Pusztahelyi, T., Grawunder, A., Merten, D., Emri, T., Fábán, I., Kothe, E., Pócsi, I.: *Aspergillus oryzae* potenciális alkalmazásának lehetőségei ritkaföldfémek bioszorcpciójában. In: Biotechnológia a Debreceni Egyetemen Tudományos szimpózium : Program és összefoglalók, Debrecen Egyetem, Debrecen, 14, 2019.

Foreign language abstracts (3)

4. **Boczonádi, I.**, Jakab, Á., Fehérné Baranyai, E., Tóth, C. N., Daróczy, L., Kis, N. G., Antal, M., Emri, T., Pusztahelyi, T., Fábán, I., Kothe, E., Pócsi, I.: The potential application of *Aspergillus oryzae* in the biosorption of rare earth element ions present in seepage waters from a post-uranium-mining area.
In: 30th Fungal Genetic Conference : Abstract Book, Genetic Society of America, Rockville, 79, 2019.





5. **Boczonádi, I.**, Fehérmé Baranyai, E., Jakab, Á., Emri, T., Fábián, I., Kothe, E., Pócsi, I.:
Biosorption of rare earth element ions by *Aspergillus oryzae* biomass in the presence of high concentrations of other metal ions.
In: 17th symposium on remediation : The role of heterogeneity in contaminated site assessment, bio-geo interactions and reactive transport, Friedrich Schiller University, Jena, 1, 2018.
6. **Boczonádi, I.**, Cserni, B., Gyurcsó, K., Kónya, G., Leiter, É., Jakab, Á., Lee, M. K., Yu, J. H., Pócsi, I.: Investigation of a putative copper and cadmium ion transporter in *Aspergillus nidulans*.
In: Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája. Szerk.: Tamás László, Zelenyánszki Helga, JATEPress, Szeged, 92, 2018. ISBN: 9789633153703

List of other publications

Foreign language scientific articles in Hungarian journals (1)

7. Jakab, Á., Antal, K., Emri, T., **Boczonádi, I.**, Imre, A., Gebri, E. Z., Majoros, L., Pfliegler, V. P., Szarka, M., Balla, G., Balla, J., Pócsi, I.: Effects of hemin, CO₂, and pH on the branching of *Candida albicans* filamentous forms.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 63 (4), 387-403, 2016. ISSN: 1217-8950.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/030.63.2016.023>
IF: 0.921

Foreign language scientific articles in international journals (1)

8. Kovács, Z., Szarka, M., Kovács, S., **Boczonádi, I.**, Emri, T., Abe, K., Pócsi, I., Pusztahelyi, T.:
Effect of cell wall integrity stress and RimA transcription factor on asexual development and autolysis in *Aspergillus nidulans*.
Fungal Genet. Biol. 54, 1-14, 2013. ISSN: 1087-1845.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2013.02.004>
IF: 3.262





UNIVERSITY of
DEBRECEN

UNIVERSITY AND NATIONAL LIBRARY

UNIVERSITY OF DEBRECEN

H-4002 Egyetem tér 1, Debrecen

Phone: +3652/410-443, email: publikaciok@lib.unideb.hu

Foreign language abstracts (1)

9. Tálas, L., Máthéné Szigeti, Z., **Boczonádi, I.**, Bánfalvi, G., Szemán-Nagy, G.: Comparison of adhesion and infection dynamics of *Candida albicans* isolates with digital image analysis. In: *Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája*. Szerk.: Tamás László, Zelenyánszki Helga, JATEPress, Szeged, 107, 2018. ISBN: 9789633153703

Total IF of journals (all publications): 8,305

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 4,122

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.

28 July, 2020

