

1949

ASPERGILLUS FAJOK NEHÉZFÉM-SZENNYEZÉSEK BIOREMEDIÁCÓJÁBAN VALÓ ALKALMAZÁSÁNAK POTENCIÁLIS LEHETŐSÉGEI

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

BOCZONÁDI IMRE

Témavezető:

Prof. Dr. Pócsi István

egyetemi tanár

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2020

A doktori értekezés betétlapja

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács a Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Biológia doktori programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnverése céljából.

Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Debrecen, 2020.

Boczonádi Imre

Tanúsítom, hogy Boczonádi Imre doktorjelölt 2014-2017 között a fent megnevezett Doktori Iskola Biológia doktori programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét. Az értekezés elfogadását javaslom. Debrecen, 2020.

Prof. Dr. Pócsi István

ASPERGILLUS FAJOK NEHÉZFÉM-SZENNYEZÉSEK BIOREMEDIÁCÓJÁBAN VALÓ ALKALMAZÁSÁNAK POTENCIÁLIS LEHETŐSÉGEI

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében a Biológia tudományágban

Írta: Boczonádi Imre okleveles Biotechnológus

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál Doktori Iskolája (Biológia Doktori programja) keretében

Témavezető:

Prof. Dr. Pócsi István

A dokte	ori szigorlati bizottság:	
elnök:	Prof. Dr. Vasas Gábor	
tagok:	Dr. Kredics László	
	Dr. Kundrát-Simon Edina	

A doktori szigorlat időpontja: 2019. szeptember 11.

Az értekezés bírálói:

		•••	••	•••	•••	•••	•••	•••	••	•••	•••	••	••	•	• •	••	•
		•••	••	•••	••	•••	•••	•••	•••	•••	••	••	••	•	•••	••	•
A bírál	óbizottság:																
elnök:		•••	• •	•••	•••	•••	•••	•••	••	•••	•••	•••	••	•	• •	••	•
tagok:				•••	•••	•••		•••		•••	••	• •	••	•	•••	••	•
			•••	•••	•••	•••		•••	•••	••	••	••		•		•••	•
				•••	• •					••				•			
				•••	• • •	•••		•••	•••	•••				•			•

Az értekezés védésének időpontja: 2020.

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés	1
	1.1. Célkitűzés	3
2.	Irodalmi áttekintés	5
	 2.1. Aspergillus fajok általános jellemzése 2.1.1. Az Aspergillus oryzae jellemzése 2.1.2. Az Aspergillus nidulans jellemzése 	5 6 6
	2.2. A ritkaföldfémek jellemzése	7
	2.3. A réz jellemzése	8
	2.4. A kadmium jellemzése	10
	 2.5. Bioremediációs technológiák 2.5.1. Fémek bioszorpciója és bioakkumulációja 2.5.2. A bioszorpciót és bioakkumulációt befolyásoló paraméterek 	11 14 15
	2.6. Mikroorganizmusok bioremediációban betöltött szerepe	18
3.	Anyagok és módszerek	22
	3.1. A vizsgált Aspergillus törzsek és tenyésztésük	22
	3.2. Az Aspergillus törzsek stressz érzékenységének vizsgálata	23
	 3.3. Az Aspergillus oryzae Rib40 törzzsel végzett bioszorpciós kísérletek 3.3.1. A pellet átmérő és a tenyészetek életképességének meghatározása 3.3.2. A tápközeg pH értékének és NH4⁺ tartalmának mérése	25 28 29 29 30
	3.4. Az <i>Aspergillus nidulans</i> törzsek elemösszetételének meghatározása részecsl indukált röntgenemissziós spektroszkópia-pásztázó transzmissziós ionmikroszkópia (PIXE-STIM) módszer alkalmazásával	ke 30
	 3.5. Aspergillus törzsek elemösszetételének meghatározása induktív csatolású plazma-optikai emissziós spektrometriás (ICP-OES) módszerrel	33 33
	3.5.2. Az Aspergillus nidulans TNJ36 kontroll és MKL14 <i>AcrpA</i> mutáns törzsek kadmium- és réztartalmának mérése ICP-OES módszerrel	35

3.6. Statisztikai kiértékelés35
4. Eredmények
4.1. <i>Aspergillus oryzae</i> stresszérzékenységének vizsgálata a bányavízben meghatározott fémek esetében
4.2. Az Aspergillus oryzae Rib40 törzs tenyészetének morfológiai és fiziológiai jellemzői
4.3. Ritkaföldfémek bioszorpciója Aspergillus oryzae Rib40 ipari törzzsel40
4.4. A fémek sejtfelszíni vagy intracelluláris megkötése45
4.5. A <i>dcrpA</i> deléciójának élettani hatása az <i>Aspergillus nidulans</i> gombafajban.47
 4.6. Az Aspergillus nidulans törzsek kadmium és réz tartalma
lokalizációja55 4.6.3. <i>Aspergillus nidulans</i> törzsek fémtartalmának meghatározása58
5. Eredmények kiértékelése
5.1. Ritkaföldfémek bioszorpciója Aspergillus oryzae Rib40 élő biomasszával59
5.2. Nehézfémek bioszorpciója <i>Aspergillus nidulans ∆crpA</i> hiánymutáns törzs alkalmazásával64
5.3. Új tudományos eredmények68
6. Összefoglalás70
7. Summary73
8. Köszönetnyilvánítás76
9. Hivatkozások
10. Tudományos közlemények jegyzéke103
11. Függelék106

Fontosabb rövidítések jegyzéke

ATP	adenozin-trifoszfát
ССН	celofánnal borított táptalai (cellophane-colony
	harvest")
DCM	száraztömeg ("dry cell mass")
DJ-PCR	"double joint" polimeráz láncreakció
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
GRAS	általánosan biztonságosnak ítélt ("generally
	recognised as safe")
HREE	nehéz ritkaföldfémek ("heavy rare earth elements")
ICP-OES	induktív csatolású plazma-optikai emissziós
	spektrometria
IUPAC	Nemzetközi Elméleti és Alkalmazott Kémiai
	Szövetség
LREE	könnyű ritkaföldfémek ("light rare earth elements")
MIC	minimális gátló koncentráció
MREE	közepes ritkaföldfémek ("middle rare earth
	elements")
NSS	nitrátos sóoldat
PIXE-STIM	részecske indukált röntgen emissziós spektroszkópia
	pásztázó transzmissziós ionmikroszkópia
REE	ritkaföldfémek
ROS	reaktív oxigén formák ("reactive oxygen species")
SEM-EDX	energiaszóró röntgenspektroszkópia
TEM	transzmissziós elektronmikroszkópia
TES	nyomelemoldat
USFDA	Egyesült Államok Élelmezési és Gyógyszerészeti
	Igazgatósága
UTM	univerzális keresztirányú merkátor (vetület)
WHO	Egészségügyi Világszervezet

1. Bevezetés

A ritkaföldfémek (REE) a modern ipar "vitaminjainak" számítanak köszönhetően a folyamatosan növekvő igénynek és keresletnek (Cardoso és mtsi, 2019). A REE, illetve ritkaföldfém-oxidok termelése 2016-ban meghaladta a 126 000 tonnát, így a REE felhasználásával gyártott termékek összértéke elérte az 1,5-2,0 trillió amerikai dollárt, ami a globális bruttó nemzeti termék kb. 5 %-a (Zhou és mtsi, 2017). 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). Az Európai Unió (EU) technológiai szempontból kritikus elemeknek nyilvánította a REE-ket, ugyanis az EU határain belül nem léteznek olyan bányászati területek, ahol belátható időn belül nyereséges lenne a kitermelésük. Ennek oka abban keresendő, hogy a REE visszanyerése savas bányászati vagy ipari szennyvizekből nehezen megoldható, hiszen kis koncentrációban, rendkívül híg oldat formájában vannak jelen (Grawunder és mtsi, 2014; Cobelo-García és mtsi, 2015; Cardoso és mtsi, 2019). 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 nyerhetőek 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 környezetszennyezés korunk egyik legnagyobb problémája, mely elsősorban olyan természetes, illetve antropogén tevékenységekből származik, mint az urbanizáció, technológiai fejlődés, a nem biztonságos mezőgazdasági munkák, valamit a rendkívül gyors ütemben fejlődő iparosodás (Wu és mtsi, 2016; Ojuederie és Babalola, 2017; Yuan és mtsi, 2019). Noha a technológiai fejlődésnek köszönhetően az életszínvonal folyamatos emelkedést mutat, a nemkívánatos anyagok, azaz a veszélyes hulladékok, szerves szennyezők és a nehézfémek környezetben történő feldúsulása súlyos környezeti és egészségügyi problémákhoz

1

vezethet (Wu és mtsi, 2016; Anyanwu és mtsi, 2018; Kapahi és Sachdeva, 2019). A talaj nehézfém-szennyezése miatt a környezetünk folyamatos és változatos terhelésnek van kitéve, ami származhat bányászatból, fémhulladékok, ólmozott üzemanyagok, festékek ártalmatlanításából, műtrágyákból, állati eredetű trágyából, szennyvíziszapokból, peszticidekből, szennyvizek öntözéséből, szénégetési maradványokból, petrolkémiai anyagok kiömléséből, valamint légköri lerakodásokból (Khan és mtsi, 2008; Zhang és mtsi, 2010).

A réz (Cu) és kadmium (Cd) szennyezés egyre szélesebb körben megjelenő környezeti probléma, amely elsősorban mezőgazdasági és ipari tevékenységekből származik (Archana és Jaitly, 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). Mindkét fém mobilitása és elérhetősége a talaj tulajdonságainak, mint szerves széntartalom, textúra és pH függvénye, így az egyes országokban iránymutatásokat és küszöbértékeket határoztak meg ezen talaj értékek figyelembevételével (Carlon és mtsi, 2007). Számos technológiai megoldás ismert ezen nehézfémek környezetből történő eltávolítására, illetve kinyerésére úgy, mint kémiai kicsapás, ioncserélő gyanták alkalmazása, elektrokémiai kezelés, valamint membránokon történő vagy aktív szenes megkötés, ám ezek a módszerek amellett, hogy nem alkalmazhatók megfelelő hatékonysággal, még rendkívül költségesek is (Volesky, 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 Soares, 2013; Johnson, 2014). Ezen eredetű sejtek sejtfalának megvan az a rendkívüli tulajdonsága, hogy számos, a fémionok megkötéséért felelős funkciós csoportot tartalmaz. Ezért mint bioszorbensek olcsón és nagy mennyiségben hozzáférhető alapanyagot jelentenek, ezáltal jelentősen csökkentve a bioremediációs projekt költségeit (Kapoor és Viraraghaven, 1995; Wang és Chen, 2006; Srivastava és mtsi, 2015).

2

1.1. Célkitűzés

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, másrészről lehetővé válik egyes nehézfémek, úgy, mint réz (Cu) és kadmium (Cd), környezetből történő megkötése is.

Ennek érdekében az alábbi kutatásokat végeztük el:

1. Ritkaföldfémek 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 biomassza fémtartalma. 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) agarlemezeken is. A telepeken belüli fémionok (Cu²⁺ és Cd²⁺) térbeli eloszlását részecske indukált röntgen emissziós spektroszkópiával kombinált-pásztázó transzmissziós ionmikroszkópiai (PIXE-STIM) módszerrel vizsgáltuk, majd a TNJ36 kontroll és a $\Delta crpA$ gén deléciós mutáns törzs Cu és Cd bioszorpciós képességét ICP-OES méréssel határoztuk meg.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Aspergillus fajok általános jellemzése

Az Aspergillus fonalas gombák nemzetsége több mint 340 hivatalosan elismert fajból áll (Bennett, 2010). Mivel az emberiség szempontjából kritikus fontosságúak, számos Aspergillus faj teljes genomját már feltérképezték. A különböző Aspergillus fajok összehasonlító és funkcionális genomikai vizsgálata a nemzetség egészére kiterjedő képet adott biológiai sokféleségükről, valamint a genotípus és a fenotípus közötti kapcsolatokról (de Vries és mtsi, 2017; Orosz és mtsi, 2018). Szaporodásuk elsősorban aszexuális spórákkal (konídiumok) történik, amelyek többsejtű konídiumtartókon (konídiofórokon) specializálódott találhatók. morfológiája (mérete, színe és az aszexuális spórák elrendezése) kulcsfontosságú paraméterek az Aspergillusok nemzetségbeli azonosításához és osztályozásához. Az Aspergillusok igen fontos szerepet játszanak mindennapi életünkben, többek között, mint opportunista és növénypatogének (Gugnani, 2003; Bennett, 2010). Egyes fajok, mint például az A. fumigatus és az A. flavus nagy kihívást jelentenek az egészségügy számára a tüdő aszpergillózis vagy allergiás bronhopulmonáris aszpergillózis okozásával (Hedayati és mtsi, 2007; Dagenais és Keller, 2009). Számos faj, köztük az A. flavus és az A. parasiticus, képes a növényi alapú élelmiszereket és takarmányokat szennyezni mikotoxinokkal (például aflatoxin), amelyek a természetben előforduló legerősebb rákkeltő (karcinogén) anyagok. Az aflatoxinnal szennyezett ételek vagy takarmányok fogyasztása olyan betegségek kialakulását idézhetik elő, mint az aflatoxikózis, májnekrózis és/vagy májrák (Hedayati és mtsi, 2007; Amaike és Keller, 2011; Peles és mtsi, 2019; Ráduly és mtsi, 2020). Másrészt viszont biotechnológiai felhasználásuk igen sokrétű, ugyanis számos Aspergillus fajt használnak az élelmiszeriparban, fermentációs folyamatokban, de enzimek, szerves savak és bioaktív vegyületek, valamint gyógyszerkészítmények nagyvolumenű előállításában is részt vesznek.

Az Aspergillusok jelenleg 20 szekcióra oszthatók fel, melyek közül a legnagyobb ipari jelentőséggel 2 szekció, a *Flavi* és a *Nigri* bír (Houbraken és mtsi, 2014; Samson és mtsi, 2014; Hubka és mtsi, 2015).

5

2.1.1. Az Aspergillus oryzae jellemzése

Az Aspergillusok Flavi szekciója mintegy 27 fajból áll, amelyet két fő csoportra oszthatunk fel aszerint, hogy termel-e aflatoxint (Houbraken és mtsi, 2014). Az *A. oryzae*, az *A. flavus* legközelebbi rokona, azonban nem képes aflatoxint termelni, de egyéb fenotípusbeli különbségeket is leírtak a két faj között. Az *A. oryzae* konídiumai simábbak és nagyobb méretűek, több amilázt termelnek, a konídifórok hosszabbak, a micélium flokkózusabb, a telep színe pedig halvány barnászöld, szemben *A. flavus* sárgászöld színével (Frisvad és mtsi, 2018).

Az A. oryzae koji penészgomba Japán nemzeti mikroorganizmusának tekinthető. Élelmiszeripari felhasználása hosszú időkre nyúlik vissza, ugyanis több mint tíz évszázada alkalmazzák hagyományos fermentációs eljárásokban, például szójaszósz, miso és fekete szójabab (douchi) vagy éppen a szaké (rizsbor) előállítására (Kitamoto, 2015; Ichishima, 2016). Biztonságos alkalmazhatósága miatt az *A. oryzae*t primer és szekunder metabolitok, különféle hidrolitikus enzimek (laktázok, proteázok, lipázok) előállítására is használják. Mindezen tulajdonsága ideális modellorganizmusává teszi a gombát génexpresszió és a fehérje szekréció kutatásoknak (Archer, 2000; Pariza és Johnson, 2001; Machida és mtsi, 2008).

Az A. oryzaet az Egyesült Államok Élelmezési és Gyógyszerészeti Igazgatósága (USFDA) valamint az Egészségügyi Világszervezet (WHO) egyaránt biztonságos besorolásúnak (GRAS) minősítette (Taylor és Richardson, 1979).

2.1.2. Az Aspergillus nidulans jellemzése

Az A. nidulans az Aspergillusok Nidulantes szekciójába tartozó aszexuális és szexuális ciklussal is rendelkező fonalas gomba (Taylor és mtsi, 1993; Casselton és Zolan, 2002; Chen és mtsi, 2016). Ezen csoportba tartozó fajok széles körben elterjedtek és jelentős szerepet játszanak a természetben lezajló bomlási folyamatokban (Raper és Fennell, 1965). A legismertebb képviselőjük az A. nidulans, amelynek teljes genomját 2005-ben szekvenálták meg (Galaghan és mtsi, 2005).

Az *A. nidulans*t alkalmazó kutatásokat nagyban segíti, hogy a molekuláris és genetikai eszközök, illetve genomi információk széles körben állnak

rendelkezésünkre, továbbá, hogy a fajról széles körű alapismeretekkel rendelkezünk. Gyakran, mint modellorganizmust alkalmazzák a szignál-transzdukció, az aszexuális fejlődés és a szekunder anyagcsere mechanizmusainak tanulmányozásában (Emri és mtsi, 2004; Yu, 2006; Balázs és mtsi, 2010; Yu, 2010; Park és Yu, 2012; Alkhayyat és Yu, 2014; Leiter és mtsi, 2016). Ennek megfelelően gyakran alkalmazzák az iparban heterológ fehérjék (laktoferrin, kimozin), növényi édesítőszerek (taumatin, neokulin), valamint enzimek (endoglükanáz, β-glükozidáz) előállítására, de mindezek mellett szterigmatocisztint is termel, ami a penicillin és az aflatoxin prekurzora (Yu és Leonard, 1995; MacCabe és mtsi, 2002; Nevalainen és mtsi, 2005; Kumar és mtsi, 2016).

Az *A. nidulans* metabolizmusához kapcsolódó szabályozási útvonalak megértése hozzájárulhat a közeli rokonfajokban (*A. niger*, *A. oryzae*) hasonlóképpen működő mechanizmusok megértéséhez (MacCabe és mtsi, 2002).

2.2. A ritkaföldfémek jellemzése

A Nemzetközi Elméleti és Alkalmazott Kémiai Szövetség (IUPAC) a REE-et egy 17 elemből álló csoportként definiálja, amely 15 lantanoidából (La-Lu), valamint a szkandiumból és az ittriumból tevődik össze (Tsamis és Coyne, 2015). A REE három nagy csoportra oszthatók fel, így megkülönböztetünk a lantántól a prométiumig tartó könnyű ritkaföldfémeket (LREE), a terbium és lutécium közötti nehéz ritkaföldfémeket (HREE) és az úgynevezett közepes ritkaföldfémeket (szamárium, európium és gadolínium; MREE), bár ezt a besorolást a szakirodalomban ritkán alkalmazzák (Zepf, 2013).

Az ittrium (Y) egy szürkés árnyalatú átmenetifém, kémiai jellemzői alapján a lantanoidák közé sorolható. A természetben jellemzően más REE-el együtt fordul elő különböző ásványokban. Ipari alkalmazását tekintve, például szupravezetők, mikrohullámú szűrők, energiatakarékos izzók, valamint gyújtógyertyák előállítására használják. Az Y-nak nincs ismert biológiai szerepe, azonban oldható sói enyhén mérgezőek. A La–Lu-ig terjedő REE, beleértve az Y-ot, 3 vegyértékűek, ezért nagyon hasonló geokémiai tulajdonságokkal bírnak (OSHA, 2007). A cérium (Ce) amely egy ezüstfehér színű nehézfém, a leggyakrabban előforduló és igen nagy reakcióképességű ritkaföldfém. Felhasználásával katalitikus átalakítókat, színezett üvegeket, kémiai oxidálószereket állítanak elő, de az acélgyártásakor is alkalmazzák. Mint általában a REE, a Ce is enyhén toxikus, ugyanis füstje a tüdő szövetére nézve mérgező hatású lehet (Palmer és mtsi, 1987). A Ce kivételt képez a REE körében, mivel nemcsak Ce³⁺ formájában, hanem jóval könnyebben immobilizálható Ce⁴⁺ formában is előfordul, ami az úgynevezett negatív Ce anomáliával magyarázható, amikor a Ce³⁺ \rightarrow Ce⁴⁺-é történő oxidációja történik meg (Leybourne és Johannesson, 2008; Grawunder és mtsi, 2015, 2018).

A neodímium (Nd) egy szürkés színű, viszonylag nehezen alakítható ritkaföldfém, melyet leggyakrabban a high-tech iparban, permanens mágnesek, akkumulátorok, mikrofonok előállításában, valamint az optikai kábelek, lézerek és hadiipari hardverek és autók gyártásában alkalmaznak (Liu és mtsi, 2005; Binnemans és mtsi 2013; Tsamis és Coyne, 2015; Yoon és mtsi, 2016; Yang és mtsi, 2017; München és Veit; 2017;). A Ce-hoz hasonlóan a Nd is könnyen oxidálódik, melynek során rózsaszín, lila/kék és sárga színű vegyületek képződnek (Grawunder és mtsi, 2015, 2018). Hasonlóan a többi REE-hez a Nd is kis vagy közepes mértékben toxikus: bőr, szem, illetve nyálkahártya irritációt, valamit belégzése tüdőembóliát okozhat, míg felhalmozódása esetén májkárosodás is felléphet (Emsley, 2003).

2.3. A réz jellemzése

A Cu esszenciális nyomelem (akárcsak a Fe, Zn, Co és Mn), melynek jelenléte alapvetően szükséges az olyan biológiai folyamatokhoz, mint például sejt anyagcsere vagy az elektron áramlás, illetve a redox potenciál fenntartásához. Fontos azonban megjegyezni, hogy egy adott küszöbérték felett jelenléte toxikussá válhat, ugyanis redoxaktív tulajdonsága miatt reaktív oxigén formák (ROS) keletkezését idézi elő a Fenton-reakció út révén (Soares és Soares, 2013; Antsotegi-Uskola és mtsi, 2017). Képes továbbá olyan enzimek működését megzavarni, melyek katalitikus központjában a Cu-hez hasonló tulajdonságú fémion található, míg anaerob redukáló környezetben a Fe-S klaszter működésére hat (Macomber és mtsi, 2007). Az élesztők, mint például *Saccharomyces cerevisiae* vagy *Candia albicans* esetében az alacsony Cu szint, a Mac1 (MacA ortológ) transzkripciós faktor aktiválódásához vezet (Jungmann mtsi, 1993; Marvin és mtsi, 2004). A Cu²⁺ éhezés alatt a Mac1 kötődése, arra specializálódott Cu transzporter és metalloreduktáz gének expressziójához vezet, azok "upstream" szabályozó elemein keresztül, míg Cu²⁺ felesleg esetén a Mac1 gyorsan lebomlik elkerülve ezáltal a Cu²⁺ okozta toxicitást (Yamaguchi-Iwai és mtsi, 1997; Zhu mtsi 1998). A Cu²⁺ ionok emellett indukálják a ROS elleni transzkripciós faktorokat (AtfA és Yap1) AceA-függő útvonalakon (Hagiwara és mtsi, 2016; Wiemann és mtsi, 2017).

A fonalas gombák, ahogy más mikroorganizmusok is, képesek a fémek aktív felvételére, leadására, valamint sejten belüli felhalmozására (Veglio és Beolchini, 1997). Számos fémion-kötő fehérje evolúciósan konzervált, így valószínűleg ezek a fehérjék már a földtörténet korai szakaszában kialakultak. Ilyen konzervált domén felelős *A. nidulans*ban a Cu felvételéért, különösen Cu hiányos környezetben. Az A. *fumigatus*ban eddig négy tagját azonosították a Cu Ctr transzporter családnak, melyek a CtrA1, CtrA2, Ctr2, valamint a CtrC, az utóbbi bír a legnagyobb szereppel a Cu importban (Cai és mtsi, 2017). A Cu homeosztázis szabályozásáért Cu kötő doménnel rendelkező, nagy cisztein tartalmú transzkripciós faktorok felelősek. Az *Aspergillus* fajokban már azonosították ortológjaikat, melyek a MacA, AceA és a CufA (Wiemann és mtsi, 2017; Cai és mtsi, 2019). A fonalas gombáknál amíg a MacA a Ctr transzporterek aktiválásáért felelős Cu hiány esetén, addig az *aceA* a Cu és ROS detoxifikálásáért felelős géneket szabályozza, mint például a Cu függő *sod1, cat1, cat2* géneket, valamint a Cu transzporter *crpA*-t is.

A gombák a szabad fémionokat peptidekhez, mint például fitokelatinokhoz vagy metallotioneinekhez kötik, így semlegesítve azok káros hatását. A *C. albicans* élesztő a Cup1p (Mackie és mtsi, 2016), míg a *Cryptococcus neoformans* a Cmt1 és Cmt2 metallotioneinekkel védekezik a Cu²⁺ ionok okozta stresszel szemben. Ezek deléciójával létrehozott mutánsok virulenciája jóval gyengébb a vad törzshöz képest, mivel nem tudnak védekezni a makrofágok által kibocsátott Cu²⁺ ionokkal szemben (Ding és mtsi, 2013). A fémionokat további specifikus transzporterek juttathatják ki az extracelluláris térbe, vagy kristályok formájában raktározhatják a vakuólumokban (Wysocki és Tamás, 2010).

2.4. A kadmium jellemzése

A Cd-ot és annak vegyületeit általában galvanizáláshoz, ötvözetek gyártáshoz és Ni-Cd elemek gyártásához használják fel. A Cu-el szemben a Cd egy rendkívül karcinogén nehézfém, ugyanis könnyen akkumulálódik az emberi szervezetben (Nordberg, 2009; Satarug és mtsi, 2010). A gasztrointesztinális traktuson és a légzőrendszer útján bejutó Cd súlyos károkat okozhat minden szervben, beleértve a veséket, vázizomzatot és a májat, csökkentheti a légzőrendszer működését és idegi rendellenességeket válthat ki (Jaishankar és mtsi, 2014; Zhou és mtsi, 2016).

Az élesztőkben Cd²⁺ tolerancia kialakításáért felelős Cd²⁺ pumpát kódoló *pca1p* gén (fém által indukálható PIB-típusú ATP-áz) ortológját (PcaA), mely a plazmamembránon lokalizálódik, már leírták egyes *Aspergillus* fajokban, köztük az *A. fumigatus, A. versicolor, A. sydowii* fonalas gombákban (Adle és mtsi, 2007, de Vries és mtsi, 2017; Bakti és mtsi, 2018). Az *S. cerevisiae* esetében a *pca1p* gén kivételesen nagy Cd, illetve Cu rezisztenciát biztosít a gomba számára (Adle és mtsi, 2007). Az opportunista patogén dimorf élesztő *C. albicans*ban ugyanezt a gént *crp1* néven írták le, ami a Cu, Cd és ezüst detoxifikációért felelős (Riggle és Kumamoto, 2000; Weissman és mtsi, 2000). A *crp1* ortológját fonalas gombák, például az *A. nidulans, A. fumigatus* esetében is azonosították CrpA (P-típusú ATP-áz) néven (Wiemann és mtsi, 2017).

A Cd²⁺ ionok gombákra gyakorolt élettani hatásai közé tartozik, hogy felborítja a redox egyensúlyt, denaturálja a fehérjéket, gátolja a sejtosztódást és a transzkripciót, károsítja a nukleinsavakat, valamint gátolja a DNS javító mechanizmusokat és roncsolja a mitokondriális fehérjéket (Ayangbenro és Babalola, 2017; Bakti és mtsi, 2018). Ez utóbbiak degradációját a PimA LON-típusú ("soluble serine") proteáz szabályozza, ami a mitokondriális fehérjék védelmével megnöveli a mitokondriumok élettartamát. A *pimA* gén szabályozza továbbá a mitokondriumok morfológiáját (alakját és méretét), ROS és szterigmatocisztin termelést, illetve a stressz elleni védekezésben szerepet játszó enzimek aktivitását (Leiter és mtsi, 2016). Mindezek mellett a Cd²⁺ képes felborítani a gomba vas anyagcseréjét, mivel kiszorítja a vas ionokat a vastartalmú fehérjékből, valamint chaperonok inhibitoraként gátolja a megfelelő fehérje szerkezet kialakulását, továbbá a glutation-reduktáz enzim gátlásával hozzájárul az oxidatív stressz növeléséhez (Wysocki és Tamás, 2010).

Ezen megfigyelések fontosak lehetnek az *Aspergillus* alapú bioremediációs technológiák kifejlesztésekor, hiszen nem csak fémtranszporterek, hanem egyéb proteineknek is nagy szerepe van egyes fajok fémtoleranciájában.

2.5. Bioremediációs technológiák

A bioremediáció a mikroorganizmusok/növények felhasználását jelenti a környezetet terhelő szerves és szervetlen xenobiotikumok eltávolításában vagy kevésbé toxikus anyagokká (szén-dioxiddá, vízzé, nitrogénné) történő átalakításában (Perelo, 2010; Kapahi és Sachdeva, 2019). A bioremediáció egyaránt végrehajtható *in situ* vagy *ex situ* módszerek alkalmazásával, melyeket számos tényező befolyásol, mint a terület jellemzői, a talaj szerkezete, hidrogeológiai állapota, a szennyezett talaj mennyisége, a szennyező anyagok típusai, hozzáférhetősége, oldhatósága és azok koncentrációi, a jövőbeni felhasználás célja, valamint a rendelkezésre álló idő és költségkeret (**1. ábra**) (Frutos és mtsi, 2012; Smith és mtsi, 2015).

Általánosságban elmondható, hogy az ex situ remediációs technikák egyértelműen drágábbak, mint az in situ technikák, mivel ezek a feltárás és kitermelés során nem várt költségeket eredményezhetnek. Ugyanakkor az in situ bioremediáció végrehajtásakor a helyszíni felszerelés költsége, valamint a szennyezett területek megfelelő feltárása és a kezelés ellenőrzése csökkentheti az alkalmazott technológia hatékonyságát. Érthető tehát, hogy egy sikeres bioremediációs projekt végrehajtásához elengedhetetlenül szükséges a megfelelő módszer kiválasztása, amelynek segítségével egy elfogadható szint alá csökkenthető a szennyező anyagok mennyisége (Archana és Jaitly, 2014; Azubuike és mtsi, 2016). A fémionok vizes oldatból történő eltávolítására szolgáló remediációs technológiák fizikai, kémiai és biológiai módszerekből állnak. Ide tartozik például a kémiai kicsapás, szűrés, ioncserélők alkalmazása, elektrokémiai kezelés, membrán technológiák, aktív szénnel történő adszorpció, illetve a párologtatás (Wang és Chen, 2009).

Fontos azonban megjegyezni, hogy ezen módszerek rendelkeznek bizonyos limitációkkal, például a kémiai kicsapás és az elektro-kémiai kezelés során nagy mennyiségű szennyvíziszap is keletkezik, melynek tárolásáról és megsemmisítéséről külön gondoskodni kell, illetve kevésbé hatékonyak, ha a fémionok koncentrációja 1–100 mg L⁻¹ között mozog (Ahalya és mtsi, 2003). Az ioncserélő és membrán technológiák, valamint az aktív szénnel történő adszorpció hátránya, hogy rendkívül költségesek, főként akkor, ha ezen technológiákat nagy mennyiségű, de kis nehézfém-koncentrációjú szennyezett vizek kezelésére használjuk (Volsesky és mtsi, 2001).

Az utóbbi években egyre növekvő figyelem övezi a biotechnológiai módszerek fémekkel szennyezett területek remediálásában történő alkalmazását. Ez annak köszönhető, hogy az algák, baktériumok és gombák (mint bioszorbensek) széles körben állnak rendelkezése, olcsón hozzáférhetők és nem utolsó sorban jó hatékonysággal, környezetbarát módon képesek a szennyező anyagokat kivonni, illetve megkötni a környezetből (Wang és Chen, 2009; Soares és Soares, 2013).



1. ábra Bioremediációs technikák (Azubuike és mtsi, 2016).

2.5.1. Fémek bioszorpciója és bioakkumulációja

A bioszorpciót általában metabolikusan passzív folyamatnak tekintik, amellyel lehetőség van nehézfém-ionok szelektív szétválasztására halott vagy inaktív biológiai anyagoktól (Hansda és mtsi, 2016). A megkötés mechanizmusa olyan fizikokémiai folyamat, amely magában foglalja az adszorpció, felületi komplex képződés, ioncsere, illetve kicsapódás jelenségét és/vagy ezek kombinációját (**2. ábra**) (Srinath és mtsi, 2002; Volesky és mtsai, 2003; Fomina és Gadd, 2014). Számos funkciós csoport játszik kulcsfontosságú szerepet a megkötésben, ilyenek a karboxil-, imidazol-, szulfhidril-, amino-, foszfát-, szulfát-, tioéter-, fenol-, karbonil-, amid- és hidroxilcsoportok (**2. ábra**) (Volesky, 2007; Wang és Chen, 2009; Lo és mtsi; 2014). A bioszorpció első lépéseként a fizikai adszorpció jelensége zajlik le, amely a Van der Waals-erőkhöz köthető. A mikrobiális eredetű sejtfal kémiai összetétele rendkívül fontos tényező a fémionok adszorpciójában, hiszen amellett, hogy ez az első komponens, amely érintkezésbe kerül a fémionokkal, egyben védelmet is nyújt a fémek okozta toxicitással szemben (Crowell, 1966).

A bioakkumuláció a fémmegkötés komplex folyamataként értelmezhető, amely élő sejtek révén megy végbe (**2. ábra**). A folyamat két lépésben zajlik le. Az első lépés megegyezik a bioszorpciós mechanizmusokkal, amikor is metabolizmustól független, extracelluláris kötődési folyamatok játszódnak le, míg a második lépés egy anyagcserétől függő, ATP-vezérelt, viszonylag lassú intracelluláris mechanizmus, ami a fémionok sejten belüli transzportjáért felelős és olyan folyamatokhoz köthető, mint például oxidáció, redukció, metilezés és demetilezés (Chojnacka, 2010; Dhankhar és Hooda, 2011). A folyamat részeként az egyes fémionok a sejtek vakuólumaiban lokalizálódhatnak, amelyek az intracelluláris fém szekréció és tárolás elsődleges helyeit képviselik (Srinath és mtsi, 2002; Tamás és mtsi 2005). A nehézfémek átjutását a mikrobiális eredetű sejtmembránon keresztül vélhetően ugyanazok a mechanizmusok szabályozzák, mint amelyek a metabolikusan fontos ionok, például kálium, magnézium és nátrium transzportjáért felelősek (**2. ábra**) (Hansda és mtsi, 2016).

14



2. ábra A bioszorpció és a bioakkumuláció mechanizmusai. A biológiai folyamatok osztályozása a sejtek anyagcseréjének függvényében (Lo és mtsi, 2014).

*A kicsapódás folyamata végbemehet metabolizmustól függő útvonalakon keresztül is.

2.5.2. A bioszorpciót és bioakkumulációt befolyásoló paraméterek

A szennyező anyagok biológiai úton történő eltávolítása egy rendkívül összetett folyamat, amely számos tényezőtől függ. Ide sorolható a biomassza típusa, a pH-érték, a hőmérséklet, ozmotikus nyomás, redoxpotenciál, ionerősség, elektronakceptorok, kontakt idő, szennyező anyagok koncentrációja, biológiai hozzáférhetőség, más kompetitív ionok vagy szennyező anyagok jelenléte, tápanyagok jelenléte, talajszerkezet, valamint vízaktivitás. Ezért a bioszorpciót és a bioakkumulációs folyamatokat befolyásoló tényezők meghatározása döntően fontos az optimális működési feltételének biztosítása szempontjából (**1. táblázat**). Megfigyelték ugyanis, hogy az oldat ionerősségének növekedése csökkenti a szennyező anyagok eltávolításának hatásfokát azáltal, hogy versengés alakul ki a bioszorbens szabad kötőhelyeiért, de például az akkumulálandó szennyező anyag koncentrációjának növekedése változásokat okoz a sejtek morfológiájában és élettanában (Donmez és Aksu, 2002; de Siloniz és mtsi, 2002; Alluri és mtsi, 2007).

Minden tényezőt figyelembe véve elmondható, hogy a bioszorpciónak vannak bizonyos előnyei a bioakkumulációval szemben, például a jó fémmegkötő képesség vagy a sejtfelszíni adszorpció képessége, továbbá, hogy egy gyorsan végbemenő, passzív folyamatról van szó, valamint, hogy a sejt számára kisebb mértékű toxicitást jelent. Egy hatékonyan működő eltávolítási folyamatnak tehát nem csupán a detoxifikáció a célja, hanem a fémionok olyan formában történő visszanyerése is, hogy azok alkalmasak legyenek a későbbi újrahasznosításra. A bioszorpció legfőbb előnyei a deszorpció révén megvalósuló biomassza regenerálódása, továbbá, hogy lehetőségünk van a fémek folyadékfázisból történő visszanyerésére, ami kiemelt fontosságú a folyamat gyakorlati alkalmazásakor. Ezen tényezők pedig döntően befolyásolják a tervezett remediációs projekt költségeit (Hansda és mtsi, 2016).

Tényezők	Bioszorpció Bioakkumuláció			
Keverési sebesség	Egyenesen arányos a bioszorbensek bioszorpciós képességével	sen arányos a bioszorbensek Egyenesen arányos a bioszorbensek pociós képességével bioakkumulációs képességével		
Biomassza	Holt (inaktív) biomassza alkalmazása	Élő biomassza alkalmazása	Kapoor és	
Diomassza	fion (maktiv) biomassza arkannazasa		Viraraghavan, 1995	
Sejtméret	Fordítottan arányos a bioszorpciós folyamattal	Fordítottan arányos a bioakkumulációs folyamattal	Park és mtsi, 2010	
Biomassza mennyisége	Fordítottan arányos a bioszorpciós folyamattal	Egyenesen arányos a bioakkumulációs képességgel	Li és mtsi, 2014	
Kiinduló fémion koncentráció	Egyenesen arányos a bioszorbensek bioszorpciós képességével	Fordítottan arányos a bioszorbensek bioakkumulációs folyamattal	Li és mtsi, 2014	
Tápanyagok jelenléte	Nem szükséges a jelenlétük	Egyenesen arányos a bioakkumulációs folyamattal	Aksu és Donmez, 2005	
Más szennyezők jelenléte	Fordítottan arányos a bioszorbensek bioszorpciós képességével	Fordítottan arányos a bioszorbensek bioakkumulációs képességével	Li és mtsi, 2010	
рН	A folyamat széles pH-tartományban működtethető	A folyamatot nagymértékben befolyásolja a pH érték változása	Park és mtsi, 2010	
Hőmérséklet	Nincs hatással a bioszorpciós képességre, ha inaktív a biomassza	Nagy hatással van a bioakkumulációs képességre	Veglio és Beolchini, 1997	
Kontakt idő	Egyenesen arányos a bioszorpciós aktivitással	Egyenesen arányos a bioakkumulációs aktivitással	Li és mtsi, 2014	

1. táblázat A mikrobiális eredetű sejtek bioszorpcióját és bioakkumulációját befolyásoló paraméterek.

2.6. Mikroorganizmusok bioremediációban betöltött szerepe

Az utóbbi években széles körben tanulmányozták a mikroorganizmusok (algák, baktériumok, gombák) bioremediációban való alkalmazásának lehetőségeit, hiszen ezen organizmusok képesek számos nehézfém megkötésére, kicsapására vagy oxidációs állapotának megváltoztatására, így kivédve a nehézfémek okozta toxicitást. A bioremediációs technológiák többsége kihasználja a mikroorganizmusok azon tulajdonságát, hogy különböző kevert vagy autochton (őslakos) populációk segítségével még hatékonyabban képesek a nehézfémeket adszorbeálni vagy kevésbé toxikus formává alakítani, feltéve, ha a környezeti feltételek kedveznek a szaporodásuknak és anyagcseréjüknek (Gupta és mtsi, 2016; Kang és mtsi, 2016; Verma és Jaiswal, 2016; Işıldar és mtsi, 2018; Riva és mtsi, 2020).

A mikrobiális eredetű biomassza bioremediációban történő felhasználása költséghatékony lehet, ugyanis a nagyléptékű fermentációs folyamatokat követően visszamaradó biomassza, mint melléktermék jelenik meg, mely így olcsón nagy mennyiségben beszerezhető és alkalmazható (Kapoor és Viraraghaven, 1995; Wang és Chen, 2006; Srivastava és mtsi, 2015).

Az algák könnyen és nagy mennyiségben elérhetők minden édesvízi és tengeri környezetből. Vörös (*Asparagopsis armata*), zöld (*Codium vermilara*, *Spirogyra sp*) és barna algákat (*Cystoseira barbata*) egyaránt vizsgáltak adszorpciós kísérletekben, azonban a figyelem a barna algákra irányult azok jobb szorpciós kapacitása miatt (Romera és mtsi, 2007; Gupta és Rastogi, 2008; Yalçın és mtsi, 2012; Srivastava és mtsi, 2015). Összehasonlítva más mikrobiális eredetű bioszorbensekkel, az algák autotróf szervezetek, ezért kis tápanyag igény mellett is képesek nagy biomassza hozamot elérni (Abbas és mtsi, 2014). A fémionok kötődését ez esetben is számos kondíció befolyásolja, ilyenek például a fémion töltése, az oldat kémiai összetétele, vagy maga a faj. A fémek kötődése a sejtekhez legtöbb esetben ioncserélő mechanizmusok révén megy végbe, ahol is a kétértékű fémionok cserélődnek ki a sejtfalat alkotó poliszaharidok ellenionjaival, így például Na⁺, K⁺, Ca²⁺ és/vagy Mg²⁺ ionok, Co²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺ és a Zn²⁺ ionokkal. Az algák sejtfalának fő összetevője a cellulóz, amely olyan potenciális fémkötő csoportokkal bír, mint karboxilát, amin, imidazol, foszfát, szulfhidril, szulfát és hidroxil csoportok (Crist és mtsi, 1981).

Nehézfémek, mint például Cd²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺ és Zn²⁺ vizes oldatból való hatékony kinyerésének lehetőségét számos algafaj esetében vizsgálták (Romera és mtsi, 2007; Gupta és Rastogi, 2008; Yalçın és mtsi, 2012).

A baktériumok a leggyakoribb és legsokoldalúbb mikroorganizmusok a Földön, hozzávetőlegesen a teljes biomassza mennyiség ~10¹⁸ g-os hányadát teszik ki (Volesky, 1990). Kis méretüknek, elterjedésüknek és gyors szaporodásuknak köszönhetően széles körben alkalmazzák őket, mint bioszorbenseket (Urrutia, 1997). Az olyan iparágak, mint az élelmiszeripar vagy a fermentációs ipar nagy mennyiségben produkálnak bakteriális eredetű biomasszát, mint mellékterméket, mely további előnyöket jelent a felhasználásukat tekintve (Srivastava és mtsi, 2015).

Számos baktérium (Micrococcus, Desulfovibrio, Pseudomonas, Bacillus és Enterobacter spp.) bioszorpciós kapacitását vizsgálták már a nehézfémekre (Co, Ni, Cd, Cr, Pb, Cu) nézve. A Micrococcus luteus-t például nagy mennyiségű Pb szintetikus közegből történő eltávolítására használták. Optimális körülmények között a kötési kapacitás 1900 mg/g-ot is meghaladta. Kim és mtsi (2015) leírták Cu, Cr, és Ni tengervízből való eltávolítását immobilizált Desulfovibrio desulfuricans alkalmazásával. Hét nap elteltével az eltávolítási hatékonyság 98,2, 99,8 és 90,1 mg g⁻¹ volt. Egyes Bacillus fajok, mint például a B. licheniformis és a B. laterosporus hatékonyan képesek Cd (159,5 és 142,7 mg g⁻¹) és Cr (72,6 és 62,0 mg g⁻¹) eltávolítására, míg a Pseudomonas aeruginosa a Co-ot képes igen hatékonyan (8,92 mg g⁻¹) kötni (Zouboulis és mtsi, 2004; Rajkumar és Freitas, 2008; Puyen és mtsi, 2012; Kang és mtsi, 2015; Kim és mtsi, 2015). Az, hogy a baktériumok ilyen hatékonysággal képesek megkötni egyes nehézfémeket, annak tudható be, hogy sejtfaluk számos alkotóeleme aktív kötőhelyként szolgál a fémionok megkötésében. Ide soroljuk a Gram-pozitív baktériumok peptidoglikán rétegében megtalálható aminosavakat (alanin és glutaminsav), valamint a diamino-pimelinsavat és a glikoproteinek, teichosavat, míg a Gram-negatív baktériumok sejtjeiben lipopoliszacharidok, lipoproteinek és foszfolipidek töltik be ezt a szerepet (Ayangbenro és Babalola, 2017).

Az élesztők és penészgombák, gyorsan tenyészthetők, genetikailag és morfológiailag könnyen manipulálhatók és nagy biomassza-hozamot eredményezhetnek. Széles körben alkalmazzák őket különféle nagyléptékű ipari

19

erjesztési/fermentációs folyamatokban, amelyek során például antibiotikumokat (penicillin, ciklosporin, gentamicin, ergotpeptidek, cefalosporin), enzimeket (pektináz, amiláz, proteáz, cellulóz, lipáz, laktáz, glükóz izomeráz, észteráz), vegyi anyagokat (kojisav gallinsav, citromsav, glukonsav, fumársav, gibberllinek, karotinoidok), illatanyagokat (metil-ketonok, gomba aromák, laktonok), aromákat és mikrobiális rovarirtókat állítanak velük elő (Park és mtsi, 2017; Baghban és mtsi, 2019).

Az élesztőket (Saccharomyces spp.) és fonalasgombákat (Aspergillus spp., Mucor spp., Rhizopus spp., Penicillium spp.) gyakran alkalmazzák adszorbensekként a toxikus mennyiségben jelen lévő nehézfémek eltávolítására szennyvízből és talajból, hiszen a gomba eredetű bioszorbensek nagy része GRAS organizmus, így gyakorlati alkalmazása a nyilvánosság által elfogadott (Kapoor és Viraraghavan, 1995).

A gomba sejtfal összetételét tekintve elsősorban poliszacharidokból épül fel, amelyek jellemzően a száraztömeg körülbelül 80 %-t teszik ki. A sejtfal glükán (β-1-3 és β-1-6 kötésekkel kapcsolt D-glükóz molekulák), kitin (β-1-4 kötésekkel kapcsolt N-acetil-D-glükozamin), kitozán (β-1-4 kötésekkel kapcsolt D-glükozamin), mannán (β-1-4 kötésekkel kapcsolt mannóz) és foszformanán (foszforilált mannánok) tartalma következtében a gombák számos jó fémkötő képességű funkciós csoporttal bírnak nevezetesen, amin, imidazol, foszfát, szulfát, szulfhidril és hidroxil csoportokkal (Crist és mtsi, 1981). Emellett a gombák (hasonlóan a baktériumokhoz) vaskelát képző anyagokat, úgynevezett sziderofórokat termelnek, amelyek fokozzák a szennyező anyag mobilitását, csökkenti a fémek biohasznosulását, így a szennyezett területek végső kármentesítést eredményezik (Fomina és Gadd, 2014). Elmondható tehát, hogy a gombák komplex védelmi rendszerrel rendelkeznek a nehézfém okozta toxicitás semlegesítésében.

Az élesztő biomasszát (*S. cerevisiae*) sikeresen alkalmazták bioszorbensként az Ag, Au, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, U, Th és Zn vizes oldatból való eltávolításakor (Podgorskii és mtsi, 2004; Wang és Chen, 2006). Fonalas gombák esetében (*Botrytis, Phanerochaete, Rhizopus, Aspergillus* fajok) pedig hatékony eltávolítását figyelték meg az olyan nehézfémeknek mint az Pb, Cr, Ag, Cu és Zn (**2. táblázat**) (Dursun és mtsi, 2003; Iqbal és Edyvean, 2004; Fu és mtsi, 2012).

Ea:	E ś	11	Hőmérséklet	Idő	dő Fém koncentráció Szorpciós		Defense
гај	гет	рн	(°C) (óra) (mg L^{-1}) (mg g^{-1})		Kelerencia		
	Ag	-			100	25	
	Cu	4,5			100	7,1	
	Ni	-			200	1,5	Wang és Chen, 2006;
Saccharomyces	Zn	5	15 40	0517	200	3,5	Soares és Soares,
cerevisiae	Cr	5,5	13-40	0,3-1,7	200	44	2012; Li és mtsi,
	Cd	5,8			100	5	2014
	Pb	5,8			350	144	
	U	5			1000	150	
Botrytis cinerea	Pb	6	25	1,5	350	107,1	Akar és mtsi, 2005
	Pb				100	88,2	Lebel (a Dilancea
Phanerochaete	Cu	6	20	1	100	68,7	iqbai es Edyvean,
cnrysosporium	Zn				100	39,6	2004
Pleurotus platypus	Ag	6	20	2	200	46,7	Das és Das, 2010
Rhizopus oryzae	Cu	4	35	2	100	34	Fu és mtsi, 2012
	Cu	5			100	15,6	
Aspergillus niger	Pb	4,5	30	1	100	34,4	Dursun és mtsi, 2003
	Cr(VI)	3,5			50	6,6	

2. táblázat Gomba biomassza bioszorpciós kapacitása.

3. Anyagok és módszerek

3.1. A vizsgált Aspergillus törzsek és tenyésztésük

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 $\Delta crpA$ (pyrG89; $\Delta crpA$: AfupyrG⁺; pyroA4; veA⁺) gén deléciós mutáns törzseket tanulmányoztuk. A $\Delta crpA$ deléciós mutánst double-joint PCR (DJ-PCR) módszerrel Jae-Hyuk Yu és mtsi. (University of Wisconsin, Madison, USA) hozták létre és bocsátották rendelkezésünkre (Yu és mtsi, 2004). A kapott *crpA* gén deléciós transzformánsok közül hármat (MKL5, MKL10 és MKL14) választottunk ki a stressz-fiziológiai kísérletekhez. Az A. nidulans törzseket szilárd Barratt-féle minimál táptalajon (AMM) növesztettük 37 °C-on, 6 napon keresztül (Barratt és mtsi, 1965).

Az AMM táptalaj: 10,0 g/l glükóz 5,0 v/v % 20× NSS oldat 0,1 v/v % TES oldat pH 6,5 Szilárd halmazállapotú táptalaj esetén 20 g/l agart adtunk a tápleveshez.

A 20×NSS: 6,0 g/l NaNO₃ 1,5 g/l KH₂PO₄ 0,5 g/l MgSO₄×4H₂O 0,5 g/l KCl A nyomelem oldat: 22,0 g/l ZnSO₄×7H₂O 11,0 g/l H₃BO₃ 5,0 g/l MnCl₂×4H₂O 5,0 g/l FeSO₄×7H₂O 1,6 g/l CoSO₄×5H₂O 1,6 g/l CuSO₄×5H₂O 1,1 g/l (NH4)₆Mo₇O₂₄×4H₂O 50,0 g/l EDTA

3.2. Az Aspergillus törzsek stressz érzékenységének vizsgálata

A törzseket a 3.1 pontban leírtak szerint spóráztattuk. A stressz generáló ágensekkel kiegészített minimál tápközegre 5 μ l (1×10⁵ spóra) spóraszuszpenziót cseppentettünk majd 5 napon keresztül 37 °C-on inkubáltuk azokat (de Vries és mtsi, 2017; Orosz és mtsi, 2018).

Az A. oryzae Rib40 stressztűrését a könnyűfémek közé tartozó Mg^{2+} , Al^{3+} és Li⁺, a nehézfémek közé sorolt Fe³⁺, Ni²⁺, és Zn²⁺, valamint a Y³⁺, Ce⁴⁺ és Nd³⁺alkalmazásával vizsgáltuk, az alábbi koncentrációk mellett: 350-450 mM LiCl, 50-70 mM MgSO₄×7H₂O, 0,5-10,0 mM AlCl₃×6H₂O, 1,0-2,5 mM FeCl₃×6H₂O, 1-8 mM NiSO₄×7H₂O, 5-20 mM ZnSO₄×7H₂O, 5-10 mM YCl₃×6H₂O, 1-10 mM Ce(SO₄)₂) és 0,5-5,0 mM NdCl₃×6H₂O.

Az *A. oryzae* stresszérzékenységét MIC₅₀ értékekkel is jellemeztük, amit a vizsgált fém minimális gátló koncentrációjaként (MIC) határoztuk meg, amely a kolónia átmérőjének 50 % -os csökkenését eredményezte a kezeletlen tenyészetekhez viszonyítva. A MIC₅₀ értékek kiszámításához a fémekkel kiegészített agarlemezeken rögzített kolóniaátmérőket másodrendű polinomokkal illesztettük az ágens koncentráció függvényében (Emri és mtsi, 2018).

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

A 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 3.1 pontban 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 telepeket 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.

A kísérleteket minden stresszt generáló ágens esetében háromszor ismételtük, majd meghatároztuk a telepátmérőket (átlag±SD) és a stressz érzékenységeket a kontroll törzshöz viszonyítva jellemeztük (de Vries és mtsi, 2017; Orosz és mtsi, 2018).

3.3. Az Aspergillus oryzae Rib40 törzzsel végzett bioszorpciós kísérletek

A németországi Türingia 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 kőlerakó 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 (100 ml steril desztillált víz, kiegészítve Li⁺, Mg²⁺, Al³⁺, Fe³⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Y³⁺, Ce⁴⁺ és Nd³⁺-al) ezen két területen 2014. szeptember 9-12 között vett több mint 20 mintavételi pontból származó adatok alapján határoztuk meg **(3. ábra).**



3. ábra A ronneburgi volt uránbánya területe.

(A) Áttekintő térkép, amely a Natural Earth, QGIS 2.18.18 Las Palma és a CorelDraw X5 (Corel Corporation) programok segítségével készült. Koordinátarendszer: ETRS89 / UTM 32N zóna (EPSG: 25832) (Grawunder és mtsi, 2018; Boczonadi és mtsi, 2020a). Készítette: Anja Grawunder (Friedrich Schiller University, Jena, Germany). (B) A bányászati területen található mintavételi pontok.

Az átlagértékek meghatározásakor a detektálási határ alatti értékeket nem vettük számításba. A vizsgált koncentrációkat az **3. táblázat** tartalmazza. Lehetőség szerint a fémeket szulfátok (MgSO₄×7H₂O, NiSO₄×7H₂O, ZnSO₄×7H₂O, Ce(SO₄)₂) vagy kloridok (LiCl, AlCl₃×6H₂O, FeCl₃×6H₂O, YCl₃×6H₂O, NdCl₃×6H₂O; Sigma-Aldrich, Budapest) formájában adtuk a rendszerhez összhangban a természetet tükröző állapotokkal. A komplex "többfázisú" tesztoldat teljes Cl⁻ és SO₄²⁻ tartalma 6,08 mM és 30,24 mM volt.

A kísérleteket megelőzően *A. oryzae* Rib40 törzset 6 napon át 25 °C-on növesztettük malátakivonatot tartalmazó táptalajon, majd a kísérletekhez a felületi tenyészetekről lemosott konídiospórákat használtuk fel. A rázatott lombikos tenyészetek esetében (100 ml AMM) a leoltását 10⁸-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 (**3. táblázat**) tartalmazó lombikokba kerültek.

3. táblázat A Gessenhalde és a Nordhalde bányászati területről vett vízminták összetétele alapján alkalmazott átlag fémkoncentrációk.

- $Li^{+} \qquad 0,06\pm0,03 \text{ mM} (0,42\pm0,21 \text{ mg } l^{-1})$
- Mg^{2+} 30±14,4 mM (736,0±349,9 mg l⁻¹)
- $\label{eq:Al3+} {\bf Al^{3+}} \quad 1{,}4{\pm}1{,}6 \ mM \ (38{,}1{\pm}43{,}1 \ mg \ l^{-1})$
- **Fe**³⁺ 0,6 \pm 2,1 mM (31,8 \pm 117,2 mg l⁻¹)
- Ni^{2+} 0,2±0,09 mM (11,5±5,8 mg l⁻¹)
- **Zn²⁺** 0,04±0,044 mM (2,75±2,90 mg l^{-1})
- Y^{3+} 0,007±0,008 mM (0,662±0,711 mg l⁻¹)
- $Ce^{4+} \quad 0,0023 \pm 0,0018 \text{ mM} (0,32 \pm 0,25 \text{ mg } l^{-1})$
- Nd^{3+} 0,00094±0,00091 mM (0,136±0,131 mg l⁻¹)
- Cl^{-} 2,75±1,77 mM (97,4±63,1 mg l^{-1})
- SO_4^{2-} 44±13,8 mM (4230±1333 mg l⁻¹)

A biomassza dózisfüggő fémfelhalmozódásának tanulmányozására két biomassza koncentrációt használtunk a kísérleteinknél. A "egyszeres dózisú" tenyészetnél a kiindulási száraztömeg értéke (DCM) $3,7\pm0,5$ g l⁻¹ DCM volt, míg "kétszeres dózisú" tenyészetnél két párhuzamos tenyészetből nyert biomassza mennyiséget alkalmaztunk, melynek DCM értéke $6,0\pm0,4$ g l⁻¹ volt.

A "többfázisú" tesztoldat kiindulási pH-értéke 3,85±0,07 volt, ami a bányászati területről vett és elemzett vízminták átlagos pH-tartományába esett (pH= 4,2±0,6). A tesztoldat enyhén átlátszatlan és sárgás színű volt, jelezve a másodlagos fázis kicsapódásának kezdetét, valamint a Ce⁴⁺ ionok hidrolízisét (**4. ábra**). Amikor a kiindulási pH-t, 0,1 M KOH-al (VWR International, Budapest) 4,2-re növeltük, az oldat zavarossága (λ = 600 nm, Pharmacia LKB ultrospec plus spektrofotométer, Stockholm, Svédország) jelentősen megnőtt, ezért a tesztoldat kiindulási pH-ját nem módosítottuk (**4. ábra**).

Tekintettel arra, hogy a bányászati területről származó vízminták átlagos hőmérséklete 16,5±1,1 °C volt így a szorpciós kísérleteket 16,5 °C-on, 3,7 Hz-en történő inkubálással zajlottak le 24 órán át.





A turbiditást λ =600 nm-en mértük (**A**: 0,19±0,02 0,25 órás inkubálás után; **B**: 0,22±0,02 24 óra után; **C**: 0,278±0,004 0,25 óra inkubálás után, amikor a pH-t 4,2-re állítottuk 0,1 M KOH-al; **D**: 0,007±0,003 24 órás gombakezelés után).

3.3.1. A pellet átmérő és a tenyészetek életképességének meghatározása

Az "egyszeres dózisú" tenyészeteknél a DCM alakulását, míg a "kétszeres dózisú" tenyészeteknél a DCM-en túl nyomon követtük a pelletek átmérőjének változását és azok életképességét, amivel a szénéhező körülmények között kialakuló esetleges autolizáló folyamatokat vizsgáltuk (Molnár és mtsi, 2004; Kovács és mtsi, 2013).

A pellet átmérőket (átlag±SD értékek) 50 pelletből számítva az NIH ("National Institutes of Health") ImageJ szoftvercsomagjának segítségével határoztuk meg (http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/install/windows.html).

A DCM meghatározásakor 10 ml tenyészetet zsugorított üvegszűrőn (VWR International, Debrecen, Magyarország) szűrtünk, majd a micéliumot desztillált vízzel mostuk és 60 °C-on 8 órán át szárítottuk (Emri és mtsi, 1997).

A tenyészet életképességét Emri és mtsi (1997) által leírt módszerrel határoztuk meg. A 24 órán keresztül rázatással inkubált kontroll és kezelt tenyészeteket meghatározott időközönként (0,25, 1, 6, 12 és 24 óra) mostuk és 100 ml AMM tápközegbe helyeztük át (Barratt és mtsi, 1965). Az így kapott mintákat 25 °C-on, 3,7 Hz-en történő rázatással további 12 órán át inkubáltuk. A glükóz fogyást és a DCM mennyiségét 0, 6 és 12 óra elteltével határoztuk meg. A tápközeg glükóz koncentrációját Leary és mtsi (1992) által leírt módszer segítségével határoztuk meg. A reakcióelegy 4 kU/l glükóz oxidázt, 1 kU/l peroxidázt, 0,76 mmol/l 4aminoantipirint, 11 mmol/l fenolt tartalmazott 0,1 mol/l K-Na-foszfát pufferben (pH=6,6) oldva. Az elegy végtérfogata 1 ml volt és 3 % (v/v) minta mellett tartalmazta az egyes komponenseket. A mérés λ =500 nm-en (Pharmacia LKB ultrospec plus spektrofotométer, Stockholm, Svédország) 1 percen keresztül történt (Pusztahelyi és mtsi, 1997; Emri és mtsi, 1997; Farah és mtsi, 2007).

3.3.2. A tápközeg pH értékének és NH4⁺ tartalmának mérése

A vizsgálatot Dr. Pusztahelyi Tünde (DE-MÉK, Agrárműszerközpont) segítségével végeztük el.

A tápközeg pH-értékét HI 1131 típusú elektróddal felszerelt HI 2211 típusú pH mérővel határoztuk meg (HANNA Instrument, Szeged, Magyarország).

A tápközeg ammónium koncentrációját FIAstar[™] 5000 (Foss Tecator AB, Hillerød, Dánia) típusú készülékkel mértük. Az alkalmazott oldatok és reagensek a következők voltak; indikátor oldat, 1000 mg/l, 100mg/l, 10mg/l NH₄⁺ oldat, valamint 0,5 M NaOH-oldat. A kapott eredményeket az 5000-100 FIAstar[™] 5000 szoftver, SoFIA (Foss Tecator AB, Hillerød, Dánia) segítségével értékeltük ki (Pusztahelyi és mtsi, 1997; Emri és mtsi, 2004).

3.3.3. Transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálat

A vizsgálatot Dr. Antal Miklós és Kis Gréta (DE-ÁOK, Anatómiai, Szövetés Fejlődéstani Intézet) segítségével végeztük el, a fémtartalmú csapadékok lokalizációjának érdekében.

A micéliumokat 24 órás inkubálást (16,5 °C, 3,7 Hz) követően szűrtük, majd centrifugáltuk (13 000×g, 10 perc; 5415R, Eppendorf, Hamburg, Németország). A mintákat 3 %-os glutáraldehid (Electron Microscopy Sciences, München, Németország), majd 1 %-os ozmium-tetroxid oldatok segítségével fixáltuk, majd háromszor átmostuk kakodilát pufferben (15 perc). Ezt követően a mintákat felszálló alkoholsorban (50 %, 70 %, 96 %) dehidratáltuk és a fixált preparátumokat propilén-oxidos mosást követően araldit műgyantába ágyaztuk (Sigma-Aldrich Merck, Darmstadt, Németország). A metszeteket 56 °C-on 48 órán át termosztátban inkubáltuk a teljes polimerizációs keménység eléréséig. Az így elkészített blokkokból Leica Ultracut UCT ultramikrotómmal (Leica, Bécs, Ausztria) metszeteket készítettük. Az elektronmikroszkópos (JEOL JEM 1010, Peabody, Egyesült Államok) vizsgálat előtt a mintákat uranil-acetáttal és ólom-citráttal festettük meg, majd a képeket egy Olympus Veleta CCD-kamerával készítettük el (Olympus, Münster, Németország; Leiter és mtsi, 2005; Kovács és mtsi, 2014).

3.3.4. Pásztázó elektronmikroszkópia-energia-szóró röntgenspektroszkópiai (SEM-EDX) vizsgálat

Ezen vizsgálatot Dr. Daróczi Lajos (DE-TTK, Szilárdtest Fizikai Tanszék) segítségével végeztük el. A SEM-EDX módszerrel a biomassza felületén megjelenő csapadék elemösszetételét vizsgáltuk.

A micéliumot 24 órás inkubálást (16,5 °C, 3,7 Hz) követően szűrtük, majd egy éjszakán keresztül fagyasztva szárítottuk (CHRIST Alpha 1–2 LDplus liofilizátor, Osterode, Németország). A liofilizált minták felületét szénréteggel vontuk be, majd a SEM vizsgálatot Hitachi S 4300 pásztázó elektronmikroszkóppal (Hitachi, Schaumburg, Egyesült Államok) végeztük, amely RÖNTEC energiaszóró röntgenspektrométerrel volt felszerelve (Röntec, Berlin, Németország). A képeket 15 kV-os gyorsítófeszültség mellett rögzítettük másodlagos elektron üzemmódban (Huang és Huang, 1996; Mohanty és mtsi, 2017).

3.4. Az *Aspergillus nidulans* törzsek elemösszetételének meghatározása részecske indukált röntgenemissziós spektroszkópia-pásztázó transzmissziós ionmikroszkópia (PIXE-STIM) módszer alkalmazásával

A mérést Dr. Török Zsófia, Dr. Szoboszlai Zoltán, Dr. Döncző Boglárka és Dr. Kertész Zsófia (Atommagkutató Intézet, Debrecen) végezték el.

A TNJ36 kontroll és az MKL14 *ΔcrpA* törzseket a 3.2. pontban leírtak alapján CCH módszerrel készítettük elő a PIXE-STIM elemzéshez (Balázs és mtsi, 2010; Kurucz és mtsi, 2018). A PIXE-STIM méréseket az Atomki pásztázó nukleáris mikroszondáján, az 5 MV-os Van de Graaff gyorsító 0°-os nyalábcsatornáján végeztük (Rajta és mtsi, 1996; Kertész és mtsi, 2015). A minták elemösszetételét (Z>5) PIXE technika segítéségével határoztuk meg, amely a mintából a besugárzás hatására kilépő karakterisztikus röntgensugárzás detektálásán alapul, míg a STIM módszer információkat szolgáltatott a minta morfológiájáról, vastagságáról és a felületi sűrűségeloszlásáról.

A telepek közepétől kiindulva 0,5 cm szélességű vékony téglalapokat vágtunk ki szike segítségével, melyeket egy 2,0 cm hosszúságú mintatartóra rögzítettük.
A gomba micélium elemösszetételének meghatározásához egy orvosbiológiai alkalmazásra kifeilesztett mérőrendszert alkalmaztunk, amely több jonnyalábanalitikai technika egyidejű alkalmazásán alapul (Kertész és mtsi, 2005). A mérőrendszer összetevői két röntgendetektor, egy PIPS ("Passivated Implanted Planar Silicon") részecske detektorból és egy nyalábszaggató ("beam chopper") voltak. Az alacsony és közepes energiájú röntgensugárzás (0,2-12,0 keV, Z> 5) mérésére egy ultravékony polimer ablakú SDD röntgen detektort alkalmaztunk (SGX Sesortech), míg a közepes és nagy energiájú röntgen vonalakat (3-30 keV, Z>19) egy kapton filterrel (125 µm vastag) ellátott Gresham típusú, Be ablakú detektor mérte (Kertész és mtsi, 2015). Mindkét detektor 30 mm² aktív felülettel rendelkezett és 135 °-os szöget zártak be a nyalábbal. A vizsgálatkor a minta felületét egy 2 µm x 2 µm méretűre fókuszált, 2,5 MeV energiájú, 200-300 pA erősségű protonnyalábbal pásztáztuk. A STIM mérésekhez 50 mm Canberra típusú PIPS részecskedetektort (11 keV névleges energia feloldás) használtunk, ami 50 mm² aktív felülettel rendelkezett. A STIM méréseket mind csak kis ionáramokkal (max.~1000 ion/s) használható "on axis", illetve a nagyobb ionáramokkal is használható "off-axis" geometriában is elvégeztük. Az előbbi esetben a detektor a minta mögött van elhelyezve, ekkor a nyaláb és a detektor normálisa által bezárt szög 0 °-os, míg az utóbbi esetben ez a szög~20°. A nyalábáramot egyrészt egy kis méretű kompakt nyalábszaggató segítségével mértük, másrészt a minta mögé helyezett Faraday-kalitkával is meghatároztuk a mintán áthaladó protonok töltésmennyiségét (Bartha és Uzonyi, 2000). A detektorokból érkező összes jelet egy Oxford típusú, OMDAQ mérésvezérlő rendszerrel vettük fel ún. lista módban (Grime és Pearce, 1995).

A mérések első lépéseként a fagyasztva szárított minták 1,5 mm \times 1,5 mm területeiről készült elemtérképeket (6–9 pontban) rögzítettük, melyek a telep széle (beleértve azt a pontot is, ahol a micélium konfluenciája még nem volt 100 %-os) és közepe között helyezkedtek el. Annak érdekében, hogy a sugárzás káros hatásaitól védjük a részecskedetektort, a tengelyen lévő STIM méréseket 500–1000 proton/s sugárárammal végeztük.

A kapott PIXE spektrumokat a GUPIXWIN programkóddal értékeltük (Campbell és mtsi, 2010). A mintákat "közepesen vastag" -ként kezeltük. A liofilizált minták könnyűelem tartalmát (H, C, N, O és S) Elementar Vario Micro analizátorral (Hanau, Németország) határoztuk meg, az így kapott adatokat aztán a PIXE spektrumok megfelelő illesztéséhez használtuk fel (**függelék 1. táblázat**). A két PIXE detektor által felvett spektrumban a 3,0 - 8,5 keV röntgenenergia-tartományba közös, ezért az ezen tartományon belüli intenzív röntgenvonalakat (például kalcium K α , kálium K α ,) használtuk a koncentrációk normalizálására. A legtöbb esetben a két detektor által meghatározott koncentrációk közötti különbségek 0–5 % között mozogtak. A következő elemekre történt illesztés: O, Na, Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn és Cd. A főkomponensek PIXE mérésének bizonytalansága ~5 %, míg a nyomelemek esetében ez az érték ~10–15 % közé esett. A liofilizált biomasszából mért koncentráció értékeket az egyes fémek esetében µg g⁻¹-ban adtuk meg.

A dózismérés és a koncentráció meghatározás minőségének, valamint pontosságának ellenőrzése érdekében, standard referenciaanyagokat (SRM) használtunk. A validáláshoz használt SRM-ek a következők voltak: egy sor tiszta fém (Zn, Sn, Ti, Ta) és rétegelt minták (6 µm vastag Ti fólia 50 µm Ni-en és 6 µm vastag Ti fólia 8 µm Ta-n). A rétegelt standardokat a STIM mérések kalibrálására is felhasználtuk, továbbá a nyalábmegszakító kalibrálását minden mérés előtt elvégeztük, hogy biztosítani tudjuk az azonos mérési körülményeket. 3.5. *Aspergillus* törzsek elemösszetételének meghatározása induktív csatolású plazma-optikai emissziós spektrometriás (ICP-OES) módszerrel

3.5.1. *Aspergillus oryzae* biomassza elemösszetételének és fém felvételi hatékonyságának meghatározása ICP-OES méréssel

Ezt a mérést Dr. Baranyai Edina (DE-TTK, Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék, Agilent Atomspektroszkópiai Partner Laboratórium) és Tóth Noémi Csilla (DE-TTK, Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék) végezték el.

A kontroll és kezelt *A. oryzae* tenyészetek 10-10 ml térfogatát 25 μ m pórusméretű analitikai szűrőpapírral (VWR International, Debrecen, Magyarország) fedett zsugorított üvegszűrőn szűrtük. A micéliumokat desztillált vízzel mostuk és 60 °C-on 8 órán át szárítottuk, majd meghatároztuk a DCM (g l⁻¹) mennyiségét (Cetinkaya és mtsi, 1999; Farah és mtsi, 2007). A szárított biomasszát nedves roncsolással készítettük elő az elemanalízishez. A minta feltárása teflonlapon 3,0 ml 65 % (m/m) HNO₃ (Merck, Budapest) és 0,5 ml 30 % (m/m) H₂O₂ (Merck, Budapest) elegyével történt. Az így előkészített mintákat 25 ml-es mérőlombikokban 0,1 M HNO₃-al egészítettük ki (Sajtos és mtsi, 2019).

A szűrletek pH-értékét 0,1 M HNO₃ alkalmazásával pH 1,0 -re állítottuk be, majd szárítószekrényben 80 °C-on szárítottuk savval előkezelt üvegpoharakban. A fennmaradó szerves anyag eltávolítása céljából 3,0 ml 65 %-os (m/m) HNO₃-hoz 1,1 ml ultratiszta vizet (MilliQ, Merck, Darmstadt, Németország) és 0,5 ml 30 %-os (m/m) H₂O₂-t adtunk. A minták melegítését a teljes vízmentesség eléréséig folytattuk. Az így elkészített mintákat 10 ml-es kalibrált műanyag kémcsövekbe (VWR International, Debrecen, Magyarország) 0,1 M HNO₃-al jelig töltöttük. A minőségellenőrzés szempontjából minden mintát azonos módon kezeltünk (Sajtos és mtsi, 2019).

Egy különálló kísérletsorban a frissen elkészített "többfázisú" tesztoldat (biomassza nélkül) 10 ml térfogatát 25 µm pórusméretű szűrőpapíron keresztül szűrtük vákuumos üvegszűrő segítségével. A szűrőpapíron narancssárga csapadék maradt vissza, amelyet 60 °C-on 8 órán át szárítottuk. A szűrőpapírokat daraboltuk, majd 7,0 ml 65 % (m/m) HNO₃, 1 ml 30 % (m/m) H₂O₂ és 1,1 ml ultratiszta víz

elegyével mikrohullámmal elősegített nagy nyomású roncsolást végeztünk (Milestone Ethos Up, Budapest, Magyarország; Sajtos és mtsi, 2019). A mintaelőkészítéskor nem használt, tiszta szűrőpapírokat (N = 6) alkalmaztunk vak mintaként. Minden mintát a további elemzés előtt 6 °C-on tároltuk.

A biomassza és fermentlé minták, továbbá a "többfázisú" tesztoldat elemkoncentrációit ICP-OES méréssel határoztuk meg (ICP-OES 5100, Agilent Technologies, Santa Clara, Egyesült Államok). A mért elemek, kereskedelmi forgalomban beszerezhető törzsoldatait (Merck, Darmstadt, Németország) használtuk a kalibráláshoz, illetve szinkron vertikális kettős nézet (SVDV) módot használtunk az adatgyűjtéshez (Sajtos és mtsi, 2019).

Az ICP-OES elemanalízis során meghatározásra kerültek az egyes minták fémkoncentrációi (mg l⁻¹), a biomassza fajlagos fémtartalma (mg g DCM⁻¹), valamint a bioszorpció hatékonysága (%).

A biomassza fajlagos fémtartalmát m_{mi} -vel jelöltük (mg g DCM⁻¹), kiszámítása a C_{abs}/m_{DCM} képlet alapján történt, ahol a C_{abs} a biomassza által abszorbeált fémek koncentrációját jelöli (mg l⁻¹), az m_{DCM} a biomassza mennyisége mutatja a "többfázisú" tesztoldatban (g_{DCM} l⁻¹). A kapott m_{mi} értékeket minden esetben korrigáltuk a kontroll *A. oryzae* micélium fémtartalmával (**függelék 2. táblázat**).

Az általunk alkalmazott "többfázisú" tesztoldatban nem zárható ki csapadék képződése (Fe és Ce) az *A. oryzae* biomassza általi bioszorpció mellett, ezért két bioszorpciós hatékonysági értéket határoztunk meg, a bioszorpciós hatékonyságot (%) {[$(m_{DCM} \times m_{mi})/C_m$] × 100} és a látszólagos bioszorpciós hatékonyságot (%) {[$(m_{DCM} \times m_{mi})/C_m$] × 100}. A C_m és C_{mf} jelöltük a "többfázisú" tesztoldatban meghatározott koncentrációkat (mg l⁻¹), azaz a frissen elkészített szűrés nélküli oldatból (C_m), illetve szűrletből (C_{mf}) mért értékeket.

3.5.2. Az *Aspergillus nidulans* TNJ36 kontroll és MKL14 *AcrpA* mutáns törzsek kadmium- és réztartalmának mérése ICP-OES módszerrel

A méréshez a 3.2. pontban ismertetett CCH agarlemezeken történő tenyésztést alkalmaztunk a kvantitatív elemanalízishez, úgy választottuk ki a megfelelő gátló koncentrációkat, hogy azok elegendő biomassza mennyiség mellett, már szignifikáns gátlást idézzenek elő, mind a kontroll, mind a *∆crpA* deléciós mutáns törzs esetében. Az agar felületéről eltávolított, micéliummal borított celofán korongokat -70 °C-on fagyasztottuk, majd mérést megelőzően egy éjszakán át liofileztük és 4 °C-on tároltuk (Kurucz és mtsi, 2018). A biomassza minták fémtartalmát a 3.5.1. pontban leírtakhoz hasonlóan ICP-OES módszerrel határoztuk meg (Sajtos és mtsi, 2019).

3.6. Statisztikai kiértékelés

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.

Az *A. oryzae* fonalas gombával végzett bioszorpciós kísérletekben a" többfázisú" tesztoldat, valamint az *A. oryzae* "kétszeres dózisú" biomassza mintáinak elemzését hat párhuzamos kísérletből származó adat alapján végeztük el.

4. Eredmények

4.1. *Aspergillus oryzae* stresszérzékenységének vizsgálata a bányavízben meghatározott fémek esetében

Az A. oryzae jól tolerálta a nagy Mg^{2+} (MIC₅₀=60,4 mM), Li⁺ (MIC₅₀=463 mM) és Zn²⁺ (MIC₅₀=22,4 mM) koncentrációkat. Ugyanakkor az Y³⁺, Ce⁴⁺ és Nd³⁺ tolerancia kisebbnek mutatkozott (MIC₅₀=2,1–9,7 mM), hasonlóan az Al³⁺, Fe³⁺ és Ni²⁺ kezelés esetén tapasztaltakhoz, ahol a MIC₅₀ érték 4,9 mM és 6,9 mM-nak adódott (**5. ábra**).

	Li+	Mg^{2+}	Al ³⁺	Fe ³⁺	Ni ²⁺	Zn ²⁺	Y ³⁺	Ce ⁴⁺	Nd ³⁺
mM (Bányavíz)	0,06	30	1,4	0,6	0,2	0,04	0,007	0,002	0,0009
mМ (MIC ₅₀)	463	60,4	6,9	6,0	4,9	22,4	9,7	2,1	7,7
<i>Aspergillus oryzae</i> Rib40 kontroll		٢	•	\bigcirc	۲		\bigcirc		0
<i>Aspergillus oryzae</i> Rib40 kezelt		\bigcirc	$\overline{\ }$	$ \cdot $	\bigcirc	$ \mathbf{\bullet} $	ullet	0	ullet

5. ábra Az A. oryzae Rib40 törzs minimális gátló koncentrációinak összehasonlítása a

vizsgált fémek esetében.

 1 MIC $_{50}$ értékek az egyes fémionok esetében mért 50 %-os növekedés gátlást jelölik a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva.

4.2. Az Aspergillus oryzae Rib40 törzs tenyészetének morfológiai és fiziológiai jellemzői

Az életképesség vizsgálatok alapján elmondhatjuk, hogy a száraztömeg mennyisége az inkubáció teljes ideje alatt konstans maradt, azaz 5,9±0,3 és 6,0±0,3 g l⁻¹ között változott (**6/A. ábra**). A tenyészetek végig pelletes morfológiát mutattak, átmérőjük 0,25±0,03 cm – 0,3±0,09 cm között alakult a "többfázisú" tesztoldatban. A fonalak fragmentálódását, így rövidebb hifa darabok megjelenését sem tapasztaltunk (**6/B. ábra**).



6. ábra. Száraztömeg értékek (A) és a pellet átmérők (B) alakulása az *A. oryzae* Rib40 tenyészeteknél.

(A) A "egyszeres dózisú" (fehér) és két paralel előtenyészetből származó "kétszeres dózisú" tenyészet (fekete) száraztömeg értékeinek alakulása 24 órás inkubációs idő alatt.

(**B**) A pellet átmérőkben bekövetkezett változások a kezeletlen kontroll (fekete) és a kezelt (piros) *A. oryzae* "kétszeres dózisú" kultúrákban (50 pelletből számított átlagértékeket±SD mutattuk be) (Boczonádi és mtsi, 2020a).

Eredményinkből kiderült, hogy az egy napos (24 óra) fémkezelést követően, a további 12 órás AMM tápközegben történő inkubáció után, az *A. oryzae* tenyészet növelte biomasszájának tömegét (4,55±0,23-ról 7,43±0.35 g l⁻¹ DCM-re) és elfogyasztotta a rendelkezésre álló glükózt (8,59±0,09 g l⁻¹-ről 0,18±0,09 g l⁻¹-re). Fontos megjegyezni, hogy a fémekkel kezelt micéliumok növekedése és glükózfogyasztása mindig összehangban volt a kontroll tenyészeteknél mértekkel, amelyeket nem tettünk ki fémkezelésnek a 24 órás inkubáció alatt (**7. ábra**).

Az *A. oryzae* Rib40 törzzsel végezett bioszorpciós kísérletkor nyomon követtük a "többfázisú" tesztoldat pH értékének és NH₄⁺ tartalmának alakulását 24 órán keresztül. A "kétszeres dózisú" tenyészettel végzett kísérlet alkalmával a "többfázisú" tesztoldat pH értéke folyamatosan emelkedett $3,85\pm0,07$ -ről $4,78\pm0,06$ -ra az inkubációs idő 24. órájára (**8. ábra**). A NH₄⁺ tartalom az inkubációs idő 6. órájától (2,9±0,1 mg l⁻¹) kezdett emelkedésbe és az inkubációs idő végére 43,5±4,6 mg l⁻¹ koncentrációt ért el (**8. ábra**).



7. ábra A kontroll (fekete) és kezelt (piros) micélium növekedése (DCM; Δ) és glükózfelhasználása (\circ).

A 24 órán keresztül rázatással inkubált kontroll és kezelt "kétszeres dózisú" tenyészetek további 12 órán át 25 °C-on, minimál tápközegben történő rázatását követően mértük a glükóz fogyását és a DCM mennyiségét (Boczonádi és mtsi, 2020a).



8. ábra A "kétszeres dózisú" A. oryzae Rib40 szénéhező biomassza által indukált pH (Δ) értékek, valamint NH₄⁺ tartalom (▲) változása a "többfázisú" tesztoldatban.
Az ábrán 3 független mérés átlagát és azok szórását tüntettük fel (Boczonádi és mtsi, 2020a).

4.3. Ritkaföldfémek bioszorpciója Aspergillus oryzae Rib40 ipari törzzsel

Kísérleteinkben a természetes körülményeket (Németországi Gessenhalde és Nordhalde környéki bányavizek, 16,5 °C; pH 3,82) tükröző átlag fémkoncentráció értékeket alkalmaztunk (3. táblázat). Első lépésben a biomasszát nem tartalmazó átlátszatlan, sárga színű "többfázisú" tesztoldatból határoztuk meg а fémkoncentrációkat szűrés előtt, azt követően, illetve a szűrőpapíron (4. táblázat). Ezen mérés célja, hogy megmérjük a gomba biomassza számára ténylegesen hozzáférhető fém koncentrációkat. Az ICP-OES módszerrel történő elemanalízis eredményei szerint a szűretlen tesztoldatból visszamért fémkoncentrációk kisebbek voltak, mint a kalkulált koncentrációk, különösen a REE esetében. A legtöbb fém esetén további veszteség volt megfigyelhető a szűrést követően, különösen a Fe és Ce esetén (4. táblázat).

A **4. táblázat**ban feltüntetett értékek alapján kiszámítottuk az *A. oryzae* Rib40 bioszorpciós hatékonyságát, illetve a látszólagos bioszorpciós hatékonyságát. Az értékek megadásánál figyelembe vettük a gomba biomassza által megkötött fémek koncentrációját (**függelék 2. táblázat**), valamint a "többfázisú" tesztoldatban mért

fémkoncentrációkat az *A. oryzae* micélium hozzáadása előtt (**4. táblázat**). A várakozásoknak megfelelően bioszorpciós hatékonyságot mutató értékek kisebbek voltak a látszólagos bioszorpciós hatékonyságoknál (**5. táblázat**). Mivel mi a gomba biomassza által ténylegesen megkötött fémekre, illetve a megkötés hatékonyságára voltunk kíváncsiak, ezért a továbbiakban a bioszorpciós hatékonyság értékeket használtuk fel az elemzésekhez (**5. táblázat**).

A "kétszeres dózisú" tenyészetekkel (6,0±0,4 g DCM l⁻¹) végzett kísérletek esetén a Li és Mg viszonylag kis hatékonysággal kötődött (2,6±0,1 % 6. óra és 5,1±1,0 % 24 óránál), míg az Al 76,9±2,7 %-a megkötődött az inkubációtól számított 12 órán belül (**5. táblázat, 9. és 10. ábra**). Érdekes, hogy a Fe és Ce megkötődésének a hatékonysága igen nagy volt, 6 órás inkubálás után közel 68,8±16,4 % és 58,0±22,3 %-nak adódtak, míg a Ni és a Zn kötési maximumai 12-24 órás inkubáció közé estek 36,3±14,4 és 61,6±6,2 %-al (**5. táblázat, 9. és 10. ábra**). Fontos megjegyezni, hogy az Y és Nd bioszorpciós mechanizmusa egymással nagyon hasonló volt, 24 órás inkubáció után 81,5±11,3 % és 87,4±9,1 %-os kötési hatékonysággal (**5. táblázat, 9. és 10. ábra**).

A "egyszeres dózisú" tenyészettel $(3,7\pm0,5 \text{ g DCM } 1^{-1})$ végzett kísérletek általánosan lassabb folyamatokat és gyengébb kötési hatékonyságokat eredményeztek $(52,5\pm25,8 \% \text{ Al a } 24. \text{ óránál}, 50,4\pm23,0 \% \text{ Fe a kísérlet 6. órájánál})$. Fontos megjegyezni, hogy a kísérletek reprodukálhatósága szintén szignifikánsan gyengébb volt, melyet a kapott SD értékek is alátámasztottak (23-34,5 % Fe, Y, Ce és Nd esetében; **5. táblázat, függelék 1. és 2. ábra**). 4. táblázat A biomassza nélküli "többfázisú" tesztoldatban mért fémkoncentrációk.

Bányayízben 0,42 736 38,1 31,8 11,5 2,75 0,66 0,32 0,1	0,136
$(0,06 \text{ mM})$ (30 mM) (1,4 mM) (0,6 mM) (0,2 mM) (0,04 mM) (7 μ M) (2 μ M) (0,9 μ	0,9 µM)
Szűretlen tesztoldatban 0,38±0,01 697,2±6,8 37,2±1,9 31,1±0,2 9,9±0,2 2,6±0,3 0,52±0,07 0,21±0,03 0,10±	,10±0,02
Szűrt tesztoldatban 0,38±0,01 697,2±18,3 36,2±2,7 27,3±1,2 9,8±0,1 2,2±0,2 0,50±0,03 0,12±0,02 0,10±	,10±0,02
Szűrőpapíron n.d 43±9 2,6±0,6 18,0±2,9 1,0±0,2 0,2±0,1 0,05±0,11 0,5±0,3 0,01±	,01±0,01

Az "n.d." megjelőlés arra utal, hogy a koncentráció érték detektálási határ alá esett (Boczonádi és mtsi, 2020a).

5. táblázat A "egyszeres dózisú" és "kétszeres dózisú" A. oryzae Rib40 biomassza bioszorpciós hatékonysága.

Fémek	Li	Mg	Al	Fe	Ni	Zn	Y	Ce	Nd
Fémmegkötés maximuma									
"kétszeres dózisú"	6	24	12	6	24	24	24	6	24
biomasszánál (óra)									
Bioszorpciós hatékonyság (%)	2,6±0,1	5,1±1,0	76,9±2,7	68,8±16,4	36,3±14,4	61,6±6,2	81,5±11,3	58,0±22,3	87,4±9,1
Látszólagos bioszorpciós	2 6⊥0 1	5 1+1 0	78 7+2 7	78 2+18 6	36 7+14 5	70 6+7 1	85 3+11 8	08 1+21 6	00 3+0 5
hatékonyság (%)	2,0±0,1	J,1±1,0	/8,/±2,/	/8,2±18,0	30,/±14,3	/0,0±/,1	83,3±11,8	98,1±21,0	90,3±9,3
Fémmegkötés maximuma									
"egyszeres dózisú"	1	24	24	6	24	24	24	1	24
biomasszánál (óra)									
Bioszorpciós hatékonyság (%)	1,8±1,6	2,1±1,1	52,5±25,8	50,4±23,0	5,3±4,0	7,9±14,7	39,7±25,4	77,6±34,5	40,9±28,2
Látszólagos bioszorpciós hatékonyság (%)	1,8±1,5	2,1±1,1	53,9±32,4	57,9±26,1	5,4±4,0	9,1±16,8	41,5±35,3	80,6±28,8	42,2±26,3



9. ábra A "kétszeres dózisú" A. oryzae Rib40 biomassza bioszorpciós hatékonysága.

Az értékeket a biológiailag hozzáférhető fémkoncentrációkból számoltuk. Az átlag ±SD értékek 6 párhuzamos mérésből lettek meghatározva (Boczonádi és mtsi, 2020a).



10. ábra A kontakt idő bioszorpcióra gyakorolt hatása "kétszeres dózisú" A. oryzae Rib40 biomasszánál.

A biomassza fémtartalmát (fekete négyzetek, korrigálva a kezeletlen biomassza fémtartalmával), és a "többfázisú" tesztoldat fémtartalmát (fehér négyzetek) 6 biológiai ismétlésből származó adatok alapján határoztuk meg (átlagértékek ±SD) (Boczonádi és mtsi, 2020a).

4.4. A fémek sejtfelszíni vagy intracelluláris megkötése

A kezelt *A. oryzae* Rib40 micélium TEM elemzése egyértelműen kimutatta, hogy nagy elektronsűrűségű, fémtartalmú aggregátumok jelentek meg a sejtfal külső felszínén (CSAgg; **11/B, C, D. ábra**). Néhány esetben az aggregátumok sejten belüli, vakuólumokban, történő megjelenését is detektálni tudtuk (VAgg; **11/E. ábra**).



11. ábra Az A. oryzae Rib40 ultrastruktúrája.

A kontroll (**A**) és a "többfázisú" tesztoldatban a kezelt "kétszeres dózisú" biomasszáról (**B-E**) készült TEM felvételek. Fémtartalmú aggregátumok a hifák felületén (CSAgg), fémtartalmú aggregátumok a vakuólumban (VAgg), sejtfal (CW), endoplazmatikus retikulum (ER), mitokondrium (MT), sejtmag (N) és sejtmagvacska, (Nu), plazma membrán (PM) és vakuólum (V) (Boczonádi és mtsi, 2020a).

A micéliumok felületén megjelenő csapadék elemösszetételét SEM-EDX méréssel határoztuk meg. (12/B, C. ábra).

A kapott spektrumok alapján elmondhatjuk, hogy az aggregátumok főként Fe(III)-és Al(III)- oxo-hidroxidok és/vagy foszfát kolloidok/csapadékok formájában jelentek meg (**12/D. ábra**). Fontos megjegyezni, hogy egyes sejtfelszíni aggregátumok Ni-t is tartalmaztak (ezeket az adatokat nem tüntettük fel).



12. ábra Az A. oryzae Rib40 micélium pásztázó elektronmikroszkópia- energia-szóró röntgenspektroszkópiai (SEM-EDX) elemzése.

A kontroll (**A**) és a "többfázisú" tesztoldaltnak kitett, "kétszeres dózisú" (**B**, **C**) liofilizált mintákról készült SEM felvételek, továbbá a kezelt tenyészet felszínén megjelent aggregátumok EDX spektruma (**D**) (Boczonádi és mtsi, 2020a).

4.5. A ΔcrpA deléciójának élettani hatása az Aspergillus nidulans gombafajban

Az *A. nidulans* kontroll és *∆crpA* gén deléciós mutáns törzsek nehézfém stresszérzékenységét (0,05–0,5 mM CuCl₂; 0,1–6,0 mM CdCl₂) külön megvizsgáltuk.

Az eredményeink alapján mindhárom *A. nidulans* $\Delta crpA$ gén deléciós testvértörzs (MKL5, MKL10 és MKL14) megnövekedett érzékenységet mutatott 0,175 mM Cu²⁺ és 0,1 mM Cd²⁺ jelenlétekor (**13. ábra**). A 0,125 mM vagy annál kisebb Cu²⁺ kezelés esetében minden testvértörzsnél nagyon vékony, laza micélium szövedék, az úgynevezett "réz fenotípus", megjelenését tapasztaltuk, mely az MKL14 törzsnél 14,7±4,2 %-os növekedés stimulációt okozott (Antsotegi-Uskola és mtsi, 2017) (**14. ábra**). Figyelemre méltó, hogy mindhárom $\Delta crpA$ törzs jelentős toleranciát mutatott a 0,05-0,125 mM Cu²⁺ stresszel szemben, míg a 0,1-0,25 mM Cd²⁺ kezelés a testvértörzsek megnövekedett érzékenységét okozta, a kezelt kontroll törzzsel összehasonlítva (**15. és 16. ábra**).

Mindezen eredmények alapján az ICP-OES és PIXE-STIM módszerekkel történő hifán belüli Cu²⁺ és Cd²⁺ tartalom feltérképezéséhez az MKL14 $\Delta crpA$ gén deléciós törzset választottuk ki. Erre a törzsre minden kísérletkor a három vizsgált testvértörzsre jellemző átlagos fenotípusos mintázat volt jellemző.



13. ábra Az A. nidulans kontroll (TNJ36) és a *AcrpA* (MKL5, MKL10 és MKL14) mutáns gombatörzsek Cu²⁺ érzékenységének összehasonlítása.



14. ábra A kontroll és a *AcrpA* gén deléciós törzsek felületi tenyészeteinek Cu²⁺ érzékenysége.

A kontroll (fehér oszlop) és a $\Delta crpA$ mutáns (szürke oszlop) tenyészetek növekedését az 5. napon átmérőjük lemérésével jellemeztük. A táblázatban három független mérés átlaga és szórása szerepel. A *, # és † szimbólumok a szignifikáns különbségeket (p<0,05) mutatják a kezelt

és a kezeletlen kontroll (TNJ36), a kezeletlen és a kezelt $\Delta crpA$ gén deléciós törzs között, illetve a kezelt kontroll és mutáns törzs között (Boczonádi és mtsi, 2020b).



15. ábra Az A. nidulans kontroll (TNJ36) és a *AcrpA* (MKL5, MKL10 és MKL14) mutáns gombatörzsek Cd²⁺ érzékenységének összehasonlítása.



16. ábra A kontroll és a Δ*crpA* gén deléciós törzsek felületi tenyészeteinek Cd²⁺ érzékenysége.

A kontroll (fehér oszlop) és a $\Delta crpA$ mutáns (szürke oszlop) tenyészetek növekedését az 5. napon átmérőjük lemérésével jellemeztük. A táblázatban három független mérés átlaga és szórása szerepel. A *, # és † szimbólumok a szignifikáns különbségeket (p<0,05) mutatják a kezelt és a kezeletlen kontroll (TNJ36) törzs között, a kezeletlen és a kezelt $\Delta crpA$ gén deléciós törzs között, illetve a kezelt kontroll és mutáns törzs között (Boczonádi és mtsi, 2020b).

4.6. Az Aspergillus nidulans törzsek kadmium és réz tartalma

4.6.1. *Aspergillus nidulans* törzsek vizsgálata celofán fóliával borított (CCH) szilárd fázisú AMM táptalajon

A **17. és 18. ábrán** látható, hogy mind a TNJ36 kontroll, mind pedig az MKL14 $\Delta crpA$ deléciós törzs megnövekedett toleranciát mutatott Cu²⁺ és Cd²⁺ kezeléssel szemben, a 4.5. pontban ismertetett stressz agar kísérletekhez képest (**13.-16. ábra**).

A 0,2–0,4 mM Cu²⁺ kezelés a *ΔcrpA* deléciós törzsnél megnövekedett stressz toleranciát eredményezett, a kezelt TNJ36 kontroll törzzsel összehasonlítva. Fontos megjegyezni, hogy az úgynevezett "réz fenotípus" (Antsotegi-Uskola és mtsi, 2017) megjelenését nem tapasztaltuk a CCH kísérleti körülmények között (**17. ábra**).

Nem várt módon, a 0,1-0,5 mM CdCl₂ kezelés megnövelte az *A. nidulans* MKL14 $\Delta crpA$ törzs stressztoleranciáját a kezelt kontroll törzshöz viszonyítva, mely jelenséget standard tenyésztési körülmények között nem tapasztaltunk (**16. és 18. ábra**).

A CCH módszerrel kapott eredmények alapján a 0,3 mM Cu²⁺, valamint a 0,3 mM Cd²⁺ koncentráció értéket választottuk ki a PIXE-STIM és az ICP-OES elemzésekhez.





Cu²⁺ érzékenységének összehasonlítása a celofánnal borított (CCH) minimál táptalajon.

A kontroll (fehér oszlopok) és a mutáns (szürke oszlopok) törzsek átlagos telepátmérő adatait három független kísérletből kiszámított átlag±SD-értékek alapján jelöltük, kiegészítve a tenyészetekről készült fotókkal.

A *, # és † szimbólumok a szignifikáns különbségeket (p<0,05) mutatják a kezelt és a kezeletlen kontroll (TNJ36) törzs között, a kezeletlen és a kezelt $\triangle crpA$ gén deléciós törzs között, illetve a kezelt kontroll és mutáns törzs között (Boczonádi és mtsi, 2020b).



18. ábra Az A. nidulans kontroll (TNJ36) és a *AcrpA* (MKL14) mutáns gombatörzsek

Cd²⁺ érzékenységének összehasonlítása a celofánnal borított (CCH) minimál táptalajon.

A kontroll (fehér oszlopok) és a mutáns (szürke oszlopok) törzsek átlagos telepátmérő adatait három független kísérletből kiszámított átlag±SD-értékek alapján jelöltük, kiegészítve a tenyészetekről készült fotókkal.

A *, # és † szimbólumok a szignifikáns különbségeket (p<0,05) mutatják a kezelt és a kezeletlen kontroll (TNJ36) törzs között, a kezeletlen és a kezelt $\Delta crpA$ gén deléciós törzs között, illetve a kezelt kontroll és mutáns törzs között (Boczonádi és mtsi, 2020b).

4.6.2. Aspergillus nidulans törzsek elemösszetételének vizsgálata és lokalizációja

Az A. *nidulans* kontroll és deléciós mutáns telepekben a $0,3 \text{ mM Cu}^{2+}$ és $0,3 \text{ mM Cd}^{2+}$ térbeli eloszlását PIXE módszer segítségével térképeztük fel (**19. és 20. ábra**).

A 0,3 mM CuCl₂ esetén a TNJ36 kontroll törzs egyenletes Cu felhalmozódást mutatott 4,5–6 mm-re a telep szélétől (1100 μ g (g DCM)⁻¹ koncentrációban, a Cukoncentráció bizonytalansága körülbelül 10 % volt). Azonban a kolónia közepétől az öregedő régiók felé haladva (13,5–15 mm között) egyenletesen csökkent a Cu koncentrációja 590 μ g (g DCM)⁻¹ értékre (**19/A ábra**). Az MKL14 *ΔcrpA* gén deléciós mutáns törzs lassabb, de növekvő Cu akkumulációs dinamikát mutatott 1200 μ g (g DCM)⁻¹ maximummal a metabolikusan inaktív régiókban (10–13,5 mm között). A kolónia belseje felé haladva, hasonlóan a kontroll törzsnél mérthez, azonban a Cu koncentráció folyamatosan csökkent, melynek minimuma 870 μ g (g DCM)⁻¹-nak adódott (**19/B. ábra**).

A Cd²⁺ stressz kezelésnél a TNJ36 kontroll törzs maximális kötési kapacitása a kolónia széle és középpontja közötti területen (7,5–9,0 mm) koncentrálódott, 850 μ g (g DCM)⁻¹-os értékkel (a Cd koncentráció bizonytalansága körülbelül 15 % volt) (**20/A. ábra)**. A kontroll törzsnél tapasztaltakkal ellentétben a MKL14 $\Delta crpA$ mutáns törzs folyamatosan növekvő Cd akkumulációs képességet mutatott a telep szélétől az öregedő régiók felé haladva 1300 μ g (g DCM)⁻¹ maximális koncentráció értékkel (a telep szélétől 16,5–19,5 mm távolságra) (**20/B. ábra)**.



19. ábra Az A. nidulans TNJ36 kontroll (A) és MKL14 *AcrpA* (B) mutáns törzs réz eloszlásának PIXE-STIM elemzése.

A fagyasztva szárított minták 1,5 mm×1,5 mm-es területeinek elemtartalmát (μ g (g DCM)⁻¹) 9 pontban mértük le. Az x-tengely kiinduló pontja (0. pont) a kolónia legszélét jelzi. A Cu és C elemtérképek, valamint a STIM képek az 1. pontban (100 %-os micélium konfluencia), 7 egymást követő pontban (a telep széle és közepe között), továbbá a legutolsó 9. pontban (a telep közepe) kerülnek bemutatásra. A színskálák az elemtartalom változását jelzik legnagyobbtól (vörös és fehér) a legkisebb (kék és fekete) koncentrációig (Boczonádi és mtsi, 2020b).



20. ábra Az A. nidulans TNJ36 kontroll (A) és MKL14 AcrpA (B) mutáns törzs Cd eloszlásának PIXE-STIM elemzése.

A fagyasztva szárított minták 1,5 mm×1,5 mm-es területeinek elemtartalmát (μ g (g DCM)⁻¹) a TNJ36 esetében 8, míg az MKL14 törzsnél 6 pontban mértük. Az x-tengely kiinduló pontja (0. pont) a kolónia legszéle. A Cd és C elemtérképek, valamint a STIM képek az 1. pontban (100 %-os micélium konfluencia), 5 (TNJ36) és 3 (MKL14) egymást követő pontban (a telep széle és közepe között), továbbá a legutolsó 8. (TNJ36) és 6. (MKL14) pontban kerülnek bemutatásra. A színskálák az elemtartalom változását jelzik legnagyobbtól (vörös és fehér) a legkisebb (kék és fekete) koncentrációig (Boczonádi és mtsi, 2020b).

4.6.3. Aspergillus nidulans törzsek fémtartalmának meghatározása

Az *A. nidulans* TNJ36 kontroll és az MKL14 $\Delta crpA$ gén deléciós törzsek fém kötő képességének vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy a mutáns törzs DCM-re vonatkoztatott teljes Cd²⁺ akkumulációja körülbelül 2,7-szer nagyobb volt a kontroll törzshöz viszonyítva {1672,7±104,7 és 612,5±189,3 mg (kg DCM)⁻¹} (**6. táblázat**).

Fontos megjegyezni, hogy az *A. nidulans* MKL14 deléciós törzs megnövekedett Cd²⁺ bioszorpciós képessége nehézfémspecifikusnak bizonyult, mivel a vizsgált TNJ36 és MKL14 törzsek Cu²⁺ felhalmozásában nem volt szignifikáns különbség 0,3 mM CuCl₂-al történt kezeléskor (**6. táblázat**).

6. táblázat Az *A. nidulans* TNJ36 kontroll és a *∆crpA* gén deléciós mutáns törzs réz- és kadmium adszorpciója.

VV.	Fémtartalom ^a						
Kezeles	TNJ36	MKL14 (<i>AcrpA</i>)					
+ 0,3 mM CuCl ₂	$\begin{array}{c} 665,6{\pm}182,9\ (mg\ kg^{-1})\\ 10,5{\pm}2,9\ (mmol\ kg^{-1}) \end{array}$	$697,1\pm106,9 \text{ (mg kg}^{-1}\text{)}$ 10,9±1,7 (mmol kg $^{-1}$)					
+ 0,3 mM CdCl ₂	$612,5\pm189,3 \text{ (mg kg}^{-1}\text{)}$ $5,4\pm1,7 \text{ (mmol kg}^{-1}\text{)}$	$1672,7\pm104,7 (\text{mg kg}^{-1})^*$ 14,9±0,9 (mmol kg $^{-1})^*$					

^a– Három egymástól független kísérletből származó adatok alapján kiszámított átlagos fémtartalmat \pm SD értékeket tüntettük fel.

A * szimbólum szignifikáns különbséget jelöl (p<0,05, Student-féle *t*-teszt alapján) a kadmiummal kezelt kontroll (TNJ36) és a $\Delta crpA$ gén deléciós mutáns (MKL14) törzsek között (Boczonádi és mtsi, 2020b).

5. Eredmények kiértékelése

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; Isıldar és mtsi, 2018; Riva és mtsi, 2020). Ezért doktori disszertációban azokra a kérdésekre kerestük a választ, hogy: (i) az A. orvzae 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 Cu²⁺ és Cd²⁺ transzportot biztosító CrpA pumpa hiánya, hogyan befolyásolja ezen nehézfémek gombatelepen belüli eloszlását, illetve akkumulációját?

5.1. 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).

Ahhoz, hogy információkat gyűjtsünk a REE hatékony bioszorpciójához alkalmazható technológia kifejlesztéséhez, egy komplex "többfázisú" tesztoldatot állítottunk össze, amely tartalmazott három könnyűfémet (Li⁺, Mg²⁺, Al³⁺), három nehézfémet (Fe³⁺, Ni²⁺, Zn²⁺) és három ritkaföldfémet (Y³⁺, Ce⁴⁺, Nd³⁺), a természetes

körülményeket tükröző mennyiségben. Minden kísérleti paramétert úgy állítottunk be, hogy azok megfeleljenek a Németországi Gessenhalde és Nordhalde környéki bányaviezkből származó adatoknak, különös tekintettel a pH értékre és hőmérsékletre (3. ábra, 3. táblázat). A bioszorpciós folvamatok fejlesztésekor elengedhetetlen bizonyos paraméterek optimalizálása, ezek közül is az egyik legfontosabb a pH érték (Karavaiko és mtsi, 1996; Das és Das, 2013). A savas pH tartományban ugyan növekszik a REE ionok oldhatósága, viszont oldatban maradnak más olyan fémek ionjai is, mint például Fe és Al, amelyekről köztudott, hogy negatívan befolyásolják a REE kémiailag indukált bioszorpcióját (Karavaiko és mtsi, 1996). Nagyobb pH értékek esetén Fe(III)és Al(III)oxo-hidroxidok és/vagy foszfátkolloidok/csapadékok jelennek meg a rendszerben, így a szervetlen kémiai és a bioszorpciós folyamatok együttesen mennek végbe (Merten és mtsi, 2004).

A sejtfal felületén lezajlódó bioszorpciós folyamatokról már leírták, hogy nagymértékben függenek a gombák sejtfalában található funkciós csoportok jelenlététől (Günther és mtsi, 2014). Megkíséreltük így leírni a hifa felületén, biológiai aktivitás nélkül lezajlódó fémkötési mechanizmusokat, tekintettel arra, hogy az adszorpció vizsgálatakor nem minden esetben tudunk detektálni transzport rendszerekhez kötött biológiai fémfelvételt (Andrès és mtsi, 2003; Merten és mtsi, 2004; Moriwaki és Yamamoto, 2013; Wang és Chen, 2009; Soares és Soares, 2012).

A szorpciós kísérletekhez az *A. oryzae* Rib40 élő biomasszáját használtuk, mint bioszorbenst, amely egy jól ismert GRAS organizmus (Machida és mtsi, 2005). Egyes irodalmi adatok alapján az *A. oryzae* hatékonyan képes nehézfém ionokat, például Cd²⁺, Pb²⁺ vagy Zn²⁺, kivonni akár fémoldat elegyekből is (Das és Das, 2013). Mivel az *A. oryzae* jelentős mértékben képes tolerálni az erős oxidatív, ozmotikus és sejtfal-integritási stresszt generáló ágenseket, azt feltételeztük, hogy a REE-el szemben is ellenálló lesz nagy koncentrációk esetén is (Grawunder és Merten, 2012; de Vries és mtsi, 2017; Orosz és mtsi, 2018).

A kolloidok/csapadékok pH-függő képződése tipikus fiziko-kémiai folyamat, amely a szivárgó vizekből már ismert, és általában a REE Fe-sal együtt történő kicsapódásával jár együtt (Bau, 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-

60

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 (**4. ábra**). Ez magyarázatot ad a Fe és Ce egyidejű kicsapódására, amit már korábbi tanulmányokban is leírtak savas körülmények között (Bau, 1999). 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 kapcsoltan megy végbe. Bár az áltatunk beállított kísérleti körülményekben igen nagynak számító Al (1,4±1,6 mM) és Fe (0,6±2,1 mM) koncentrációk mérhetők, melyek egyértelműen negatív hatással vannak a REE bioszorpciójára, mégis majdnem 60 %-os kötési hatékonyságot mértünk Ce(IV) esetében 6 órás inkubációt követően (**5. táblázat, 9. és 10. ábra**).

A Ce-mal ellentétben az Y és Nd kötési maximumai egyértelműen a kísérlet 24. órájára tolódtak, ahol is 80 %-ot meghaladó szorpciós hatékonyságokat tudtunk mérni, amely jelenségért valószínűleg a biomasszában lezajlódó, lassú, de aktív mechanizmusok tehetők felelőssé (**5. táblázat, 9. és 10. ábra**). Ugyanakkor megfigyelhető volt Ni és Zn kötődése is, de relatíve gyengébb kötési hatékonyságokkal (**5. táblázat, 9. és 10. ábra**). A Ni esetében már korábban leírták, hogy Zn, Pb és Cd jelenlétében gyengébb hatékonysággal képes megkötődni (Das és Das, 2013). Az Y és Nd késői bioszorpciója egybeesett a pH érték növekedésével és a megnövekedett NH₄⁺ koncentrációkkal (**8. ábra**), ami az élő hifákban végbemenő élettani folyamatokra vezethetők vissza. Az éhező tenyészetekben a fiziológiai folyamatok előrehaladása összefüggésben áll az intracelluláris fehérjetartalékok jelentős mértékű lebontásával és a progresszív makroautofágiával (Pusztahelyi és mtsi, 1997; Emri és mtsi, 2004; Szilágyi és mtsi, 2013). Azon folyamatokat, ahol az NH₄⁺ felszabadulása a pH értékek növekedéséhez vezet, főként fonalas gombákban figyelték meg, például a *Schizophyllum commune* esetében (Merten és mtsi, 2004).

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 lezajlódó méregtelenítési folyamatokat is (**11. ábra**) (Pócsi és mtsi, 2004; Schlunk és mtsi, 2015). Ezek alapján megkülönböztethetünk egy túlnyomórészt a sejtfalon lezajlódó, gyors, Fe(III)- és Al(III)-oxo-hidroxid és/vagy foszfát kolloidok/csapadékok megjelenésével járó megkötést és egy lassabb, de aktívabb intracelluláris fémfelvételt, ami összhangban van az eddig leírt bioszorpciós mechanizmusokkal (Wang és Chen, 2009). Az EDX vizsgálatoknál Ni-tartalmú aggregátumok megjelenését is megfigyeltük a hifa egyes részeinek felszínén (ezen adatokat nem tüntettük fel), amely alátámasztja azt a nézetet, miszerint a Ni a "többfázisú" tesztoldatból történő megkötése időben és térben eltolódik a Fe(III)- és Al(III)-oxo-hidroxid és/vagy foszfát kolloidok/csapadékok megjelenésétől (**12. ábra**).

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, **21. ábra**).

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. Habár ezen körülmények között a Ce⁴⁺ kicsapódása egybeesne a Fe(III)- és Al(III)-oxohidroxid és/vagy foszfát kolloidok/csapadékok megjelenésével, de a Ce³⁺ vélhetően az Y vagy a Nd szorpciós mintázatát mutatná (Boczonádi és mtsi, 2020a).



21. ábra Az A. oryzae Rib40 Y és Nd kötési profilja.

Az ábrán a REE (Y és Nd) 24 óránál bekövetkező speciális bioszorpciója figyelhető meg, amely szoros összefüggésben áll a tesztoldatban mérhető, dinamikusan növekvő pH és NH_4^+ koncentrációkkal. A fémek Fe(III)- és Al(III)-oxo-hidroxid és/vagy foszfát kolloidok/csapadékok formályában a hifák felszínén jelentek meg.

5.2. Nehézfémek bioszorpciója *Aspergillus nidulans <i>AcrpA* hiánymutáns törzs alkalmazásával

A gombák számos fehérjecsaláddal rendelkeznek, amelyek részt vesznek a Cu homeosztázis fenntartásában, ide tartoznak például a Cu²⁺ és Cd²⁺ megkötésében szerepet játszó transzkripciós faktorok, vagy maguk a transzporterek. Utóbbiak a gomba túléléséhez járulnak hozzá nagy fémion koncentrációjú környezetben. Azonban e transzporterek fémek detoxifikációjában betöltött szerepéről csak nagyon kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre a modellorganizmusként használt *A. nidulans* fonalas gomba esetében. Kísérleteinkben az AN3117 (*crpA*) gén deléciójának hatását vizsgáltuk, mely feltehetőleg Cu²⁺ és Cd²⁺ iontranszportert kódol *A. nidulans*ban.

A fenotípus vizsgálat alapján elmondhatjuk, hogy az általunk tesztelt $\Delta crpA$ gén deléciós mutáns törzsek (MKL5, MKL10, MKL14) megnövekedett stressz érzékenységet mutattak mind a Cu²⁺, mind pedig a Cd²⁺ nehézfémstressz kezelésekre (**13.-16. ábra**), 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 a $\Delta crpA$ törzsekkel végzett felületi stresszérzékenység vizsgálatok esetén figyeltük meg (**13. ábra**). Az MKL14 törzzsel, CCH körülmények között elvégzett kísérleteknél nem tapasztaltuk ezen fenotípus megjelenését, mely azzal magyarázható, hogy ezen tenyésztési körülmények között a micélium ellenállóbb a nehézfém okozta stresszel szemben (**17. ábra**). A kapott eredmények felhívják a figyelmet arra, hogy ezen speciális "réz fenotípus" megjelenése szervesen kapcsolódik a mutáns konidiospórák csírázásához nagy koncentrációjú Cu²⁺ 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 (**17. és 18. ábra**). A szilárd fázisú kísérletekhez képest eltolódott koncentráció értékeket a törzsek egy napos előnövesztésének tulajdonítható. Ilyen jelenséget figyeltek meg a lipid-peroxidációt iniciáló vegyületnek (*terc*-butil-hidroperoxid) kitett *A. nidulans*

AatfA (bZIP típusú transzkripciós faktor) mutáns törzs esetében Hagiwara és mtsi (2008), Balázs és mtsi (2010), Emri és mtsi (2015), valamint Orosz és mtsi (2017).

Mindkét nehézfémstressz esetén tapasztaltunk paradox stressz-érzékenységi fenotípust, amikor az MKL14 *AcrpA* törzs megnövekedett nehézfém toleranciát mutatott a kezelt kontroll törzshöz viszonyítva. Ezen jelenség kialakulását normál tenyésztési körülmények között 0,125 mM vagy ennél kisebb koncentrációjú Cu²⁺ kezelésnél, míg CCH agarlemezeken végzett kísérletkor a legkisebb 0,1 mM Cd²⁺ koncentrációnál figyelhettük meg (13. és 18. ábra). Hasonló túlkompenzációs mechanizmusokat írtak le Emri és mtsi (1997, 1999), illetve Pócsi és mtsi (2011), mikor nem várt módon megnövekedett stressz tolerancia alakult ki. A Penicillium chrysogenum figyelemre méltó ellenállóképességet mutatott az olyan oxidatív stressz generáló ágensek, mint a hidrogén-peroxid, terc-butil-hidroperoxid, vagy menadion alkalmazása esetén, ami a megnövekedett glutation peroxidáz és kataláz aktivitásokkal volt magyarázható. Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a CrpA elsősorban Cu²⁺ transzporter, de emellett szállíthat Cd²⁺ ionokat is, ha más fő Cd²⁺ detoxifikáló rendszerek, mint a Cd²⁺ pumpák és a glutation/fitokelatin rendszer telítettek (Antsotegi-Uskola és mtsi, 2017). Ezen megállapítással összhangban a túlkompenzációs mechanizmusok hatékonyabban működtek a Cd²⁺ stressznek kitett CCH tenyészetekben, ami jelentősen megnövekedett Cd2+ toleranciát és bioszorpciót eredményezett a deléciós törzsben (17. ábra és 6. táblázat).

A PIXE-STIM mérések alapján elmondhatjuk, hogy a TNJ36 kontroll törzsben a Cu²⁺ és a Cd²⁺ is hasonló térbeli eloszlási mintázatot mutat, azaz mindkét fém jellemzően a telep közepe és széle között halmozódik fel. Ez azzal magyarázható, hogy a CrpA más nehézfém ion transzporterekkel együttműködve, a hifák apikális és szubapikális régióiban található sejtekből aktívan pumpálta ki a Cu²⁺ és a Cd²⁺ ionokat, így a telep szélén kisebb koncentráció értékeket határoztunk meg (**19/A. és 20/A. ábra**) (Wiemann és mtsi, 2017; Antsotegi-Uskola és mtsi, 2017; Bakti és mtsi, 2017; Cai és mtsi, 2018; Yang és mtsi, 2018; Raffa és mtsi, 2019).

Az MKL14 *∆crpA* törzs esetében a telep szélen jelentősen kisebb nehézfém ion koncentrációt mértünk, szemben az öregedő régiókkal. Ezen eredmények jelzés értékűek, ugyanis alternatív detoxifikáló mechanizmusok, mint például Cu²⁺ metallotioneinek vagy a Cd²⁺ 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; Antsotegi-Uskola és mtsi, 2017; Cai és mtsi, 2018; Guo és mtsi 2019; Sácký és mtsi, 2014 és 2019) (**19/B. és 20/B. ábra**).

Az ICP-OES elemanalízis rámutatott, hogy az MKL14 $\Delta crpA$ törzs jelentősen megnövekedett Cd akkumulációs képessége {1672,7±104,7 mg (kg DCM)⁻¹ 0,3 mM Cd^{2+;} **6. táblázat**} 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). Fontos megjegyezni, hogy Kurucz és mtsi (2018) által végzett kísérletek esetében a leoltás közvetlenül a Cd²⁺ kiegészített táptalajra történt, szemben az általunk alkalmazott egy napos telep stresszorral kiegészített táptalajra történő átvitelével (Kurucz és mtsi, 2018).

Korábbi tanulmányokban már leírták magnetotaktikus baktériumok Co bioszorpcióját geológiai mintákból (Maenhaut, 1987), valamint nehézfémet akkumuláló *Citrobacter ssp.* fajok (Jeong és mtsi, 1997; Tajer-Mohammad-Ghazvini és mtsi, 2016), továbbá arbuszkuláris mikorrhiza gombák, *Cynodon dactylon* és *Fusarium culmorum* obligált növény patogén, *Fomes fomentarius* farontó gombák (Koay és mtsi, 1996; Weiersbye és mtsi, 1999; Wallander és mtsi, 2002; Král és mtsi, 2005; Olsson és mtsi, 2008 és 2011; Hammer és mtsi, 2011a; és 2011b), továbbá emberi minták köztük vér, szérum, vizelet és daganatos szövetek elemösszetételének nagy felbontású módszerekkel történő vizsgálatát (Maenhaut és mtsi, 1980; Sabbioni és mtsi, 1996; Kumar és mtsi, 2002).

Az általunk elvégzett PIXE-STIM elemzéssel fény derült az *A. nidulans* kontroll és mutáns törzsek nehézfém eloszlási mintázatai közötti különbségekre. A jövőben ez a módszer 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 bioszorpciós kapacitását, köszönhetően a paradox módon megjelenő túlkompenzációs mechanizmusoknak (**22. ábra**) (Boczonádi és mtsi, 2020b).

66
18 21
1

Kezelés	Femtartaiom	
	TNJ36	MKL14 (<i>AcrpA</i>)
+ 0,3 mM CdCl ₂	612,5±189,3 (mg kg ⁻¹) 5,4±1,7 (mmol kg ⁻¹)	1672,7±104,7 (mg kg ⁻¹) 14,9±0,9 (mmol kg ⁻¹)

22. ábra A. nidulans MKL14 AcrpA törzs Cd²⁺ kötési profilja.

Az ábrán a Cd²⁺-al kiegészített celofánnal borított táptalajon (CCH) felnövesztett $\Delta crpA$ törzzsel elvégzett PIXE-STIM elemzés figyelhető meg. Az eredményekből kiderült, hogy *crpA* hiánya jelentősen megváltoztatta a Cd térbeli eloszlását a CCH tenyészetekben. Az ICP-OES elemösszetétel meghatározás rámutatott, hogy $\Delta crpA$ törzs 2,7-szer nagyobb Cd bioszorpciós kapacitással bír a kontroll törzshöz viszonyítva.

5.3. Új tudományos eredmények

Munkám során két *Aspergillus* faj (*A. oryzae* és *A. nidulans*) alkalmazásának lehetőségeit vizsgáltam REE visszanyerésére, valamint olyan toxikus mennyiségben jelen lévő nehézfémek eltávolítására, mint a Cu és Cd.

Az elvégzett kísérletek és a kapott eredmények fényében megfogalmazható új tudományos eredmények a következők:

Az A. oryzae Rib40 ipari törzs élő biomasszája alkalmas REE bioszorpciójára.

A Ce komplex fémoldatból történő megkötése Fe(III)- és Al(III)- oxohidroxidok vagy foszfátok képződéséhez és kicsapódásához kapcsoltan, egy időben zajlik, addig az Y és Nd bioszorpciós hatékonyságának maximuma időben eltolódott ezekhez képest.

A törzs több fémion, különös tekintettel a Fe és Al, egyidejű és nagy koncentrációjú jelenléte mellett is alkalmas ritkaföldfémek szelektív és hatékony bioszorpciójára.

A fémek Fe, illetve Al tartalmú csapadékok formájában a sejtfalhoz kapcsolódva, illetve néhány esetben intracellulárisan (a vakuólumokban) jelentek meg.

Lehetőség nyílik egy új gomba biomasszán alapuló hatékony bioremediációs technológia fejlesztésére, ugyanis egy kétfázisú bioszorpciós rendszerrel tovább növelhető a REE bioszorpciójának hatékonysága.

Az A. nidulans MKL14 *AcrpA* törzs esetében, mind a Cu, mind pedig a Cd kezelés hatására megfigyeltünk paradox módon megjelenő túlkompenzációs mechanizmusokat.

68

A PIXE-STIM elemzés rámutatott az *A. nidulans* kontroll és mutáns törzsek nehézfém eloszlási mintázatai közötti különbségekre.

Az MKL14 *△crpA* törzs megdöbbentően nagy, 1672,7±104,7 mg (kg DCM⁻¹) Cd kötő képességgel bír, mely így alkalmas lehet Cd-al szennyezett területek bioremediálására.

A bizonyítottan Cu²⁺ és a Cd²⁺ transzportért felelős CrpA pumpa hiánya pozitívan befolyásolja a gomba bioszorpciós kapacitását.

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. 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 vonzónak (Anastopoulos és mtsi, 2016). Nem szabad viszont elfelejtenünk, hogy ezen értékes fémek jelenléte mellett körnvezetünket 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 Babalola, 2017). A nehézfém-ionok, például a Cu²⁺ és Cd²⁺, 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

70

és Fe zavaróan nagy koncentrációban voltak jelen. Az egyes fémekre jellemző kétfázisú kötődési mintázat szoros összefüggésben áll a tesztoldatban mérhető, dinamikusan növekvő pH és NH₄⁺ 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 Cu²⁺ és Cd²⁺ pumpaként működik, jelentősen hozzájárulva a gomba nehézfém-stressz elleni védekezéséhez. Várakozásainkkal ellentétben paradox módon megnövekedett toleranciát tapasztaltunk normál agarlemezeken Cu²⁺, míg a celofánnal borított táptalajon (CCH) történt tenyésztési körülmények között Cd²⁺ stressznek kitett $\Delta crpA$ törzs esetében. Ezen megfigyeléseink más hatékony Cu²⁺ és Cd²⁺ detoxifikációs rendszerek aktiválódását valószínűsítik *crpA* hiányában, amelyek egyúttal túlkompenzálják a pumpa 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 $\Delta crpA$

törzs 2,7-szer nagyobb Cd bioszorpciós kapacitást mutatott a CCH tenyészetekben $\{1672,7\pm104,7 \text{ és } 612,5\pm189,3 \text{ mg } (\text{kg DCM})^{-1}\}$. Mindez azért nagyon érdekes és fontos megfigyelés, mert az eddig irodalmi adatok alapján Cd akkumulációban rekordernek számító *A. fumigatus* Af293 csupán 850±110 mg (kg DCM)^{-1} Cd-t képes felhalmozni (Kurucz és mtsi, 2018). Az *A. nidulans* $\Delta crpA$ 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 Cd²⁺ 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 bioszorpciós technológiák kifejlesztésének (Boczonádi és mtsi, 2020a és 2020b).

7. 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 and Babalola, 2017). Removal of heavy metal ions such as Cu²⁺ and Cd²⁺ 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 NH₄⁺ 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 Cu²⁺ and Cd²⁺ pump, contributing significantly to protect the fungi against the heavy metal stress. As expected, Cu²⁺ and Cd²⁺ 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 Cu²⁺ stress agar plate experiments and cellophane colony harvest (CCH) cultures, when the *AcrpA* strain was exposed to Cd²⁺. These observations suggested the activation of other efficient Cu²⁺ and Cd²⁺ 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 $\Delta crpA$ strain showed a 2.7 higher Cd biosorption capacity in CCH cultures {1672.7±104.7 vs. 612.5±189.3 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±110 mg (kg

DCM)⁻¹ Cd (Kurucz et al, 2018). *A. nidulans* $\Delta crpA$ 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 Cd²⁺ 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).

8. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban nagy tisztelettel szeretném őszinte köszönetemet kifejezni témavezetőmnek Prof. Dr. Pócsi István egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette és szakmai irányításával, értékes tanácsaival támogatta 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 (Friedrich Schiller University, Jena), 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 (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, aki nélkülözhetetlen szakmai segítséget nyújtott a laboratóriumi munkámban, 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, 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.

9. Hivatkozások

Abbas SH, Ismail IM, Mostafa TM, Sulaymon AH. (2014). Biosorption of heavy metals: A review. J. Chem. Sci. Technol. 3:74–102.

Adle DJ, Sinani D, Kim H, Lee J. (2007). A cadmium-transporting P1Btype ATPase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 282:947–955.

Ahalya N, Ramachandra TV, Kanamadi RD. (2003). Biosorption of heavy metals. Res. J. Chem. Environ. 7:71-78.

Akar T, Tunali S, Kiran I. (2005). *Botrytis cinerea* as a new fungal biosorbent for removal of Pb(II) from aqueous solutions. Biochem. Eng. J., 25:227–235.

Aksu Z, Donmez G. (2005). Combined effects of molasses sucrose and reactive dye on the growth and dye bioaccumulation properties of *Candida tropicalis*. Process Biochem. 40:2443–2454.

Alkhayyat F, Yu JH. (2014). Upstream regulation of mycotoxin biosynthesis. Adv. Appl. Microbiol. 86:251-278.

Alluri HK, Ronda SR, Settalluri VS, Bondili JS, Suryanarayana V, *et al.* (2007). Biosorption: An eco–friendly alternative for heavy metal removal. African J. Biotechnol. 6:2924–2931.

Amaike S, Keller NP. (2011). *Aspergillus flavus*. Annu. Rev. Phytopathol. 49:107e133.

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

78

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. 8:912.

Anyanwu BO, Ezejiofor AN, Igweze ZN, Orisakwe OE. (2018) Heavy Metal Mixture Exposure and Effects in Developing Nations: An Update. Toxics. 6(4):65.

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

Archer DB. (2000). Filamentous fungi as microbial cell factories for food use. Curr. Opin. Biotechnol. 11(5):478-483.

Ayangbenro AS, Babalola OO. (2017). A new strategy for heavy metal polluted environments: A review of microbial biosorbents. Int. J. Environ. Res. Public Health. 14:94.

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.

Baghban R, Farajnia S, Rajabibazl M, Ghasemi Y, Mafi A, *et al.* (2019). Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. Mol. Biotechnol. 61(5):365-384.

Bakti F, Király A, Orosz E, Miskei M, Emri T, *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, Leiter E, Emri T, *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, Lago A, Rocha V, *et al.* (2019). Recovery of Rare Earth Elements from Wastewater Towards a Circular Economy. Molecules. 24(6):1005.

Bartha L, Uzonyi I. (2000). Ion beam dose measurement in nuclear microprobe using a compact beam chopper. Nucl. Instr. Meth. B. 161:339–343.

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.

Bennett JW. (2010). An overview of the genus *Aspergillus*. Aspergillus: Molecular Biol. and Genomics. 5(4):1e17.

Binnemans K, Jones PT, Blanpain B, Van Gerven, T, Yang Y, *et al.* (2013). Recycling of rare earths: a critical review. J. Cleaner Prod. 51:1–22.

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

Boczonádi I, Török Zs, Jakab A, Kónya G, Gyurcsó K, *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, Zeng Q, Long N, Dai C, *et al.* (2017). Cu-sensing transcription factor Mac1 coordinates with the Ctr transporter family to regulate Cu acquisition and virulence in *Aspergillus fumigatus*. Fungal Genet. Biol. 107:31–43.

Cai Z, Du W, Zhang Z, Guan L, Zeng Q, *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.

Cai Z, Du W, Liu L, Pan D, Lu L. (2019). Molecular characteristics of the conserved Aspergillus nidulans transcription factor Mac1 and its functions in response to copper starvation. mSphere 4(1):e00670-18.

Campbell JL, Boyd NI, Grassi N, Bonnick P, Maxwell JA. (2010). The Guelph PIXE software package IV. NIMB; 268:3356–3363.

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

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

Carlon C, D'Alessandro M, Swartjes F. (2007). Derivation methods of soil screening values in Europe. A Review and Evaluation of National Procedures Towards Harmonization. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, p. 320 (EUR 22805 EN).

Casselton L, Zolan M. (2002). The art and design of genetic screens: Filamentous fungi. Nature Reviews Genetics. 3:683e697.

Cetinkaya DG, Aksu Z, Ozturk A, Öztürk A, Kutsal T. (1999). A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae. Process Biochem. 34:885–892.

Chen AJ, Frisvad JC, Sun BD, Varga J, Kocsube S, *et al.* (2016). *Aspergillus* section *Nidulantes* (formerly Emericella): Polyphasic taxonomy, chemistry and biology. Studies in Mycol. 84:1e118.

Chojnacka K (2010). Biosorption and bioaccumulation—the prospects for practical applications. Environ. Int. 36:299–307.

Cobelo-García A, Filella M, Croot P, Frazzoli C, Du Laing G, *et al.* (2015). COST action TD1407: Network on technology-critical elements (NOTICE)—from environmental processes to human health threats. Environ. Sci. Pollut. Res. 22:15188–15194.

Crist RH, Oberholser K, Shank N, Ming Nguyen. (1981). Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls. Environ. Sci. Technol. 15(10):1212–1217.

Crowell AD (1966). Surface forces and solid-gas interface. In: Flood EA (ed) The solid-gas interface. Marcel Dekker, New York.

Dagenais TR, Keller NP. (2009). Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. Clinical Microbiol. Reviews. 22:447e465.

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.

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

de Siloniz MI, Balsalobre L, Alba C, Valderrama MJ, Peinado JM (2002). Feasibility of copper uptake by the yeast *Pichia guilliermondii* isolated from sewage sludge. Res Microbiol. 153:173–180.

de Vries RP, Riley R, Wiebenga A, Aguilar-Osorio G, Amillis S, *et al.* (2017). Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. Genome Biol. 18:28.

Ding C, Festa RA, Chen YL, Espart A, Palacios Ò, *et al.* (2013). *Cryptococcus neoformans* copper detoxification machinery is critical for fungal virulence. Cell Host Microbe. 13(3):265-276.

Dhankhar R, Hooda A. (2011). Fungal biosorption—an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. Environ. Technol. 32:467–491.

Donmez G, Aksu Z. (2002). Removal of chromium (VI) from saline wastewaters by *Dunaliella* species. Process Biochem. 38:751–762.

Dursun A, Uslu G, Cuci Y, Aksu Z. (2003). Bioaccumulation of copper(II), lead(II) and chromium(VI) by growing *Aspergillus niger*. Process Biochem. 38:1647–1651.

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.

Emri T, Pócsi I, Szentirmai A. (1999). Analysis of the oxidative stress response of *Penicillium chrysogenum* to menadione. Free Radic. Res. 30:125–132.

Emri T, Molnár Z, Pusztahelyi T, Pócsi I. (2004). Physiological and morphological changes in autolyzing *Aspergillus nidulans* cultures. Folia Microbiol. 49:277–284.

Emri T, Szarvas V, Orosz E, Antal K, Park H, *et al.* (2015). Core oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. BMC Genomics. 16:478.

Emri T, Antal K, Riley R, Karányi Z, Miskei M *et al.* (2018). Duplications and losses of genes encoding known elements of the stress defense system of the *Aspergilli* contribute to the evolution of these filamentous fungi but do not directly influence their environmental stress tolerance. Stud. Mycol. 91:23–36.

Emsley J. (2003). Nature's building blocks: An A–Z guide to the elements. Oxford University Press. pp. 268–270.

Farah JY, El–Gendy NS, Farahat LA. (2007). Biosorption of Astrazone Blue basic dye from an aqueous solution using dried biomass of Baker's yeast. J. Haz. Mat. 48:402–408.

Fomina M, Gadd G. (2014). Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. Biores. Technol. 160:3-14.

Frisvad JC, Møller LLH, Larsen TO, Kumar R, Arnau J. (2018). Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 102(22):9481-9515.

Frutos FJG, Pe'rez R, Escolano O, Rubio A, Gimeno A, *et al.* (2012). Remediation trials for hydrocarbon-contaminated sludge from a soil washing process: evaluation of bioremediation technologies. J. Hazard Mater. 199:262–271.

Fu YQ, Li S, Zhu HY, Jiang R, Yin LF. (2012). Biosorption of copper(II) from aqueous solution by mycelial pellets of *Rhizopus oryzae*. Afr. J. Biotechnol. 11:1403–1411.

Galaghan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma LJ, Wortman JR, *et al.* (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. Nature. 438:1105–1115.

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, Merten D, Büchel G. (2014). Origin of middle rare earth element enrichment in acid mine drainage–impacted areas. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 21:6812–6823.

Grawunder A, Lonschinski M, Merten D, Büchel G. (2015). Rare earth elements as a tool for studying the formation of cemented layers in an area affected by acid mine drainage. Appl. Geochem. 54:100-110.

Grawunder A, Lonschinski M, Händel M, Wagner S, Dirk 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.

Grime GW, Pearce RB. (1995). External beam analysis of living sycamore xylem infected by pathogenic fungi. Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. 104(1-4):299–305.

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

Gugnani HC. (2003). Ecology and taxonomy of pathogenic *Aspergilli*. Frontiers in Bioscience. 8:s346e357.

Günther A, Raff J, Merroun ML, Rossberg A, Kothe E, *et al.* (2014). Interaction of U(VI) with *Schizophyllum commune* studied by microscopic and spectroscopic methods. Biometals; 27(4):775-785.

Guo SX, Yao GF, Ye HR, Tang J, Huang ZQ, *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 V, Rastogi A. (2008). Biosorption of lead from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species: Kinetics and equilibrium studies. J. Hazard. Mater. 152:407–414.

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

Hagiwara D, Asano Y, Yamashino T, Mizuno T. (2008). Characterization of bZiptype transcription factor *AtfA* with reference to stress responses of conidia of *Aspergillus nidulans*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 72:2756–2760.

Hagiwara D, Takahashi H, Kusuya Y, Kawamoto S, Kamei K, *et al.* (2016). Comparative transcriptome analysis revealing dormant conidia and germination associated genes in *Aspergillus* species: an essential role for AtfA in conidial dormancy. BMC Genomics. 17:358.

Hammer EC, Nasr H, Pallon J, Olsson PA, Wallander H. (2011a). Elemental composition of arbuscular mycorrhizal fungi at high salinity. Mycor. 21:117–219.

Hammer EC, Pallon J, Wallander H, Olsson PA. (2011b). Tit for tat? A mycorrhizal fungus accumulates phosphorus under low plant carbon availability. FEMS Microbiol. Ecol. 76:236–244.

Hansda A, Kumar V, Anshumali. (2016). A comparative review towards potential of microbial cells for heavy metal removal with emphasis on biosorption and bioaccumulation. World J. of Microbiol. Biotechnol. 32(10):170.

Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW. (2007). *Aspergillus flavus*: Human pathogen, allergen and mycotoxin producer. Microbiol. 153:1677e1692.

Houbraken J, de Vries RP, Samson RA. (2014). Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. Adv. Appl. Microbiol. 86:199e249.

Huang C, Huang CP. (1996). Application of *Aspergillus oryze* and *Rhizopus oryzae* for Cu(II) removal. Water Res. 30:1985–1990.

Hubka V, Nováková A, Kolarík A, Jurjević Ž, Peterson SW. (2015). Revision of *Aspergillus* section Flavipedes: seven new species and proposal of section Jani sect. nov. Mycol. 107(1):169-208.

Ichishima E. (2016). Development of enzyme technology for *Aspergillus oryzae*, *A. sojae*, and *A. luchuensis*, the national microorganisms of Japan. Biosci. Biotechnol. Biochem. 80:1681e1692.

Iqbal M, Edyvean R. (2004). Biosorption of lead, copper and zinc ions on loofa sponge immobilized biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. Miner. Eng.17:217–223.

Işıldar A, van Hullebusch ED, Lenz M, Du Laing G, Marra A, Cesaro A, Kuchta K. (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, Baveye P, Andreux F. (2005). Diuron mobility through vineyard soils contaminated with copper. Environ. Pollut. 138(2):250–259.

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

Jeong BC, Hawes C, Bonthrone KM, Macaskie LE. (1997). Localization of enzymically enhanced heavy metal accumulation by *Citrobacter* sp. and metal accumulation in vitro by liposomes containing entrapped enzyme. Microbiol. 143:2497–2507.

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

Jungmann J, Reins HA, Lee J, Romeo A, Hassett R, *et al.* (1993). MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. EMBO J. 12:5051–5056.

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

Kang CH, Oh SJ, Shin Y, Han SH, Nam IH, *et al.* (2015). Bioremediation of lead by ureolytic bacteria isolated from soil at abandoned metal mines in South Korea. Ecol. Eng. 74:402–407.

Kapahi M, Sachdeva S. (2019) Bioremediation Options for Heavy Metal Pollution. J Health Pollut. 9(24):191203. Kapoor A, Viraraghavan T. (1995). Fungal Biosorption—An Alternative Treatment Option for Heavy Metal Bearing Wastewaters: A Review. Biores. Technol. 53:195-206.

Karavaiko GI, Kareva AS, Avakian ZA, Zakharova VI, Korenevsky AA, *et al.* (1996). Biosorption of scandium and yttrium from solutions. Biotechnol. Lett. 18:1291–1296.

Kertész Z, Szikszai Z, Uzonyi I, Simon A, Kiss ÁZ. (2005). Development of a bio-PIXE setup at the Debrecen scanning proton microprobe. Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. 231:106–111.

Kertész Zs, Furu E, Angyal A, Freiler Á, Török K, *et al.* (2015). Characterization of uranium and thorium containing minerals by nuclear microscopy, J. Radioanal. Nucl. Chem. 306:283–288.

Khan S, Cao Q, Zheng YM, Huang YZ, Zhu YG. (2008). Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. Environ. Poll. 152(3):686–692.

Kim IH, Choi JH, Joo JO, Kim YK, Choi JW, *et al.* (2015). Development of a microbe-zeolite carrier for the effective elimination of heavy metals from seawater. J. Microbiol. Biotechnol. 25:1542–1546.

Kitamoto, K. (2015). Cell biology of the Koji mold *Aspergillus oryzae*. Bioscience, Biotechnol. Biochem. 79:863e869.

Koay J, Osborn RW, Grime GW, Rees S. (1996). PIXE analysis of *Fusarium culmorum* fungus treated with chemical agents. Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. 10910:332–335.

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

Kovács B, Hegedűs N, Bálint M, Szabó Zs, Emri T, *et al.* (2014). *Penicillium* antifungal protein (PAF) is involved in the apoptotic and autophagic processes of the producer *Penicillium chrysogenum*. Acta Microbiol. Immunol. Hun. 61:379–388.

Kovács Z, Szarka M, Kovács S, Boczonádi I, Emri T, *et al.* (2013). Effect of cell wall integrity stress and RlmA transcription factor on asexual development and autolysis in *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet. Biol. 54:1–14.

Král J, Voltr J, Proška J, Gabriel J, Baldrian P, *et al.* (2005). PIXE determination of element distribution in *Fomes fomentarius*. X-Ray Spectro. 34(4):341–344.

Kumar Ashok R, Kennedy JV, Sasikala K, Jude ALC, Ashok M, *et al.* (2002). Trace element analysis of blood samples from mentally challenged children by PIXE. Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. 190:449–452.

Kumar A, Dutt D, Gautam A. (2016). Production of crude enzyme from *Aspergillus nidulans* AKB-25 using black gram residue as the substrate and its industrial applications. J. of Genetic Eng. Biotechnol. 14:107e118.

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

Leiter E, Szappanos H, Oberparleiter C, Kaiserer L, Csernoch L, *et al.* (2005). Antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma membrane of *Aspergillus nidulans* and induces an apoptosis–like phenotype. Antimicrob. Agents Chemother. 49:2445–2453.

Leiter É, Park HS, Kwon NJ, Han KH, Emri T, *et al.* (2016). Stress tolerances of nullmutants of function-unknown genes encoding menadione stress-responsive proteins in *Aspergillus nidulans*. J. Basic Microbiol. 56:827–833.

Leybourne MI, Johannesson KH. (2008). Rare earth elements (REE) and yttrium in stream waters, stream sediments, and Fe–Mn oxyhydroxides: fractionation, speciation, and controls over REE + Y patterns in the surface environment. Geochim. Cosmochim. Acta. 72:5962–5983.

Li C, Jiang W, Ma N, Zhu Y, Dong X, *et al.* (2014). Bioaccumulation of cadmium by growing *Zygosaccharomyces rouxii* and *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresour. Technol. 155:116–121.

Li H, Lin Y, Guan W, Chang J, Xu L, *et al.* (2010). Biosorption of Zn(II) by live and dead cells of *Streptomyces ciscaucasicus* strain CCNWHX 72-14. J. Hazard Mater. 179:151–159.

Liu G. (2005). Spectroscopic Properties of Rare Earths in Optical Materials; Jacquier, B., Eds.; Springer Science Business Media: Berlin, Germany. pp 1-94.

Lo YC, Cheng CL, Han YL, Chen BY, Chang JS. (2014). Recovery of high-value metals from geothermal sites by biosorption and bioaccumulation. Biores. Technol. 160:182–190.

MacCabe AP, Orejas M, Tamayo EN, Villanueva A, Ramon D. (2002). Improving extracellular production of food-use enzymes from *Aspergillus nidulans*. J. Biotechnol. 96:43e54.

Machida M, Asai K, Sano M, Tanaka T, Kumagai T, *et al.* (2005). Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. Nature. 38:1157–1161.

Machida M, Yamada O, Gomi K. (2008). Genomics of *Aspergillus oryzae*: Learning from the history of Koji mold and exploration of its future. DNA Res. 15:173–183.

Mackie J, Szabo EK, Urgast DS, Ballou ER, Childers DS, *et al.* (2016). Host-Imposed Copper Poisoning Impacts Fungal Micronutrient Acquisition during Systemic *Candida albicans* Infections. PLoS One. 11(6):e0158683.

Macomber L, Rensing C, Imlay JA. (2007). Intracellular copper does not catalyze the formation of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 189:1616-1626.

Maenhaut W, De Reu L, Van Rinsvelt HA, Cafmeyer J Van Espen P. (1980). Particleinduced x-ray emission (PIXE) analysis of biological materials: Precision, accuracy and application to cancer tissues. Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. 168:557–562.

Maenhaut W. (1987). Particle-induced x-ray emission spectrometry: an accurate technique in the analysis of biological environmental and geological samples. Anal. Chim. Acta. 195:125–140.

Marvin ME, Mason RP, Cashmore AM. (2004). The *CaCTR1* gene is required for high-affinity iron uptake and is transcriptionally controlled by a copper-sensing transactivator encoded by *CaMAC1*. Microbiol. 150:2197–2208.

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.

Mohanty S, Ghosh S, Nayak S, Das PA. (2017). Bioleaching of manganese by *Aspergillus* sp. isolated from mining deposits. Chemosph. 172:302–309.

Molnár Z, Mészáros E, Szilágyi Z, Rosén S, Emri T, *et al.* (2004). Influence of $fadA^{G203R}$ and $\Delta flbA$ mutations on morphology and physiology of submerged *Aspergillus nidulans* cultures. Appl. Biochem. Biotechnol. 118:349–360.

92

Moriwaki H, Yamamoto H. (2013). Interactions of microorganisms with rare earth ions and their utilization for separation and environmental technology. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97:1-8.

München DD, Veit HM. (2017). Neodymium as the main feature of permanent magnets from hard disk drives HDDs). Waste Manag. 61:372–376.

Nevalainen KM, Te'o VS, Bergquist PL. (2005). Heterologous protein expression in filamentous fungi. Trends in Biotechnol. 23:468e474.

Nordberg GF. (2009). Historical perspectives on cadmium toxicology. Toxico. Appl. Pharmacol. 238:192-200.

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

Olsson PA, Hammer EC, Pallon J, van Aarle IM, Wallander H. (2011). Elemental composition in vesicles of an arbuscular mycorrhizal fungus, as revealed by PIXE analysis. Fungal Biol. 115:643–648.

Olsson PA, Hammer EC, Wallander H, Pallon J. (2008). Phosphorus availability influences elemental uptake in the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*, as revealed by particle-induced X-ray emission analysis. Appl. Environ. Microbiol. 74:4144–4148.

Orosz E, Antal K, Gazdag Z, Szabó Z, Han KH, Yu JH, *et al.* (2017). Transcriptome-Based Modeling Reveals that Oxidative Stress Induces Modulation of the AtfA-Dependent Signaling Networks in *Aspergillus nidulans*. Int. J. Genom. 2017:6923849.

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

93

OSHA contributors (2007). "Occupational Safety and Health Guideline for Yttrium and Compounds". United States Occupational Safety and Health Administration.

Owens CL, Nash GR, Hadler K, Fitzpatrick RS, Anderson CG, Wall F. (2019). Apatite enrichment by rare earth elements: A review of the effects of surface properties. Ad. in Colloid Interface Sci. 265:14-28.

Palmer RJ, Butenhoff JL, Stevens JB. (1987). Cytotoxicity of the rare earth metals cerium, lanthanum, and neodymium *in vitro*: Comparisons with cadmium in a pulmonary macrophage primary culture system. Environ. Res. 43(1):142–156.

Pariza MW, Johnson EA. (2001). Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: Update for a new century. Regulatory Toxicol. Pharm. 33:173e186.

Park D, Yun YS, Park JM. (2010). The past, present, and future trends of biosorption. Biotechnol. Bioprocess Eng. 15(1):86–102.

Park HS, Yu JH. (2012). Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. Curr. Opin. Microbiol. 15:669e677.

Park HS, Jun SC, Han KH, Hong SB, Yu JH. (2017). Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi. Adv. Appl. Microbiol. 100:161-202.

Peles F, Sipos P, Győri Z, Pfliegler WP, Giacometti F, *et al.* (2019). Adverse effects, transformation and channeling of aflatoxins into food raw materials in livestock. Front Microbiol. 10:2861.

Perelo LW (2010). Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. J. Hazard. Mat. 177:81–89.

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

Pócsi I. (2011). Toxic Metal/Metalloid Tolerance in Fungi—A Biotechnology-Oriented Approach. In: Bánfalvi, G., Editor. Cellular Effects of Heavy Metals. Springer Inc. p. 31–58.

Podgorskii VS, Kasatkina TP, Lozovaia OG. (2004). Yeasts—biosorbents of heavy metals. Mikrobiol. Z. 66:91-103.

Pusztahelyi T, Pócsi I, Kozma J, Szentirmai A. (1997). Aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: I: Morphological changes and secondary metabolite production. Biotechnol. Appl. Biochem. 25:81–86.

Puyen ZM, Villagrasa E, Maldonado J, Diestra E, Esteve I, *et al.* (2012) Biosorption of lead and copper by heavy-metal tolerant *Micrococcus luteus*. Bioresour. Technol. 126:233–237.

Raffa N, Osherov N, Keller NP. (2019). Copper utilization, regulation, and acquisition by *Aspergillus fumigatus*. Int. J. Mol. Sci. 20: pii:E1980.

Rajkumar M, Freitas H. (2008). Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. Chemosph. 71:834–842.

Rajta I, Borbély-Kiss I, Mórik Gy, Bartha L, Koltay E, *et al.* (1996). The new ATOMKI scanning proton microprobe. Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. 109–110:148–153.

Raper KB, Fennell DI. (1965). The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

95

Ráduly Z, Szabó L, Madar A, Pócsi I, Csernoch L. (2020). Toxicological and medical aspects of *Aspergillus*-derived mycotoxins entering the feed and food chain. Front Microbiol. 10:2908.

Riggle PJ, Kumamoto CA. (2000). Role of a *Candida albicans* P1-type ATPase in resistance to copper and silver ion toxicity. J. Bacteriol. 182:4899–4905.

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

Romera E, González F, Ballester A, Blázquez M, Munoz J. (2007). Comparative study of biosorption of heavy metals using different types of algae. Bioresour. Technol. 98:3344–3353.

Sabbioni E, Kuèera J, Pietra R, Vesterberg O. (1996). A critical review on normal concentrations of vanadium in human blood, serum, and urine. Sci. Total Environ. 188:49–58.

Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, *et al.* (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Studies Mycol. 78:141–173.

Sácký J, Leonhardt T, Borovička J, Gryndler M, Briksí A, *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, Leonhardt T, Kotrba P. (2019). Different cadmium tolerance of two isolates of *Hebeloma mesophaeum* showing different basal expression levels of metallothionein (HmMT3) gene. Fungal Biol. 123:247–254.

Sajtos Z, Herman P, Harangi S, Baranyai E. (2019). Elemental analysis of Hungarian honey samples and bee products by MP-AES method. Microchem. J. 149:103968.

Satarug S, Garrett SH, Sens MA, Sens DA. (2010). Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. Environ. Health Perspect. 118:182-190.

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

Smith E, Thavamani P, Ramadass K, Naidu R, Srivastava P, *et al.* (2015). Remediation trials for hydrocarbon-contaminated soils in arid environments: evaluation of bioslurry and biopiling techniques. Int. Biodeterior. Biodegrad. 101:56– 65.

Soares EV, Soares HM. (2012). Bioremediation of industrial effluents containing heavy metals using brewing cells of *Saccharomyces cerevisiae* as a green technology: a review. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 19:1066–1083.

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

Srinath T, Verma T, Ramteke PW, Garg SK. (2002). Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. Chemos. 48:427–435.

Srivastava S, Agrawal SB, Mondal MK. (2015). A review on progress of heavy metal removal using adsorbents of microbial and plant origin. Environ. Sci. Poll. Res. 22(20):15386–15415.

Szilágyi M, Miskei M, Karányi Z, Lenkey B, Pócsi I, *et al.* (2013). Transcriptome changes initiated by carbon starvation in *A. nidulans*. Microbiol. 59:176–190.

Tajer-Mohammad-Ghazvini P, Kasra-Kermanshahi R, Nozad-Golikand A, Sadeghizadeh M, Ghorbanzadeh-Mashkani S, *et al.* (2016). Cobalt separation by *Alphaproteobacterium* MTB-KTN90: magnetotactic bacteria in bioremediation. Bioprocess Biosyst. Eng. 39(12):1899-1911.

Tamás MJ, Labarre J, Toledano MB, Wysocki R. (2005). Mechanisms of toxic metal tolerance in yeast. In: Tamás MJ, Martinoia E (eds) Molecular biology of metal homeostasis and detoxification: from microbes to man. Springer, Heidelberg, pp 395–454.

Taylor JW, Bowman BH, Berbee ML, White TJ. (1993). Fungal model organismsphylogenetics of *Saccharomyces*, *Aspergillus*, and *Neurospora*. Systematic Biol. 42:440e457.

Taylor MJ, Richardson T. (1979). Applications of microbial enzymes in food systems and in biotechnology. Adv. Appl. Microbiol. 25:7e35.

Tsamis A, Coyne M. (2015). Recovery of Rare Earths from Electronic Wastes: An Opportunity for High-Tech SMEs. Centre for Strategy and Evaluation Services LLP: Brussels, Belgium. pp. 1-44.

Urrutia MM. (1997). General Bacterial Sorption Processes. In: Wase J, Forster C, editors. Biosorbents for metal ions. London, UK: CRC Press. p. 39–66.

Veglio F, Beolchini F. (1997). Removal of metals by biosorption: a review. Hydrometall. 44:301–316.

Verma JP, Jaiswal DK. (2016). Book review: advances in biodegradation and bioremediation of industrial waste. Front Microbiol. 6:1–2.

Verplanck PL, Nordstrom DK, Taylor HE, Kimball BA. (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.

Volesky B, Weber J, Park JM. (2003). Continuous-flow metal biosorption in a regenerable Sargassum column. Water Res. 37(2):297–306.

Volesky B. (2007). Biosorption and me. Water Res. 41(18):4017–4029.

Wallander H, Johansson L, Pallon J. (2002). PIXE analysis to estimate the elemental composition of ectomycorrhizal rhizomorphs grown in contact with different minerals in forest soil. FEMS Microbiol. Ecol. 39:147–156.

Wang J, Huang CP. (2002). Heavy metal interactions with activated sludge particulates. Proceedings of the Water Environment Federation. 15: 48-60.

Wang J, Chen C. (2006). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. Biotechnol. Adv. 24(5):427–451.

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

Weiersbye IM, Straker CJ, Przybylowicz WJ. (1999). Micro-PIXE Mapping of elemental distribution in arbuscular mycorrhizal roots of the grass, *Cynodon dactylon*, from gold and uranium mine tailings. Environ. Sci. Technol. 37:754–760.

Weissman Z, Berdicevsky I, Cavari BZ, Kornitzer D. (2000). The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97:3520–3525.

Wiemann P, Perevitsky A, Lim FY, Shadkchan Y, Knox BP. *et al.* (2017). *Aspergillus fumigatus* copper export machinery and reactive oxygen intermediate defense counter host copper-mediated oxidative antimicrobial offense. Cell Rep. 19:1008-1021.

Wu X, Cobbina SJ, Mao G, Xu H, Zhang Z, *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.

Wysocki R, Tamás MJ. (2010). How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. FEMS Microbiol. Rev. 34(6):925-951.

Yalçın S, Sezer S, Apak R. (2012). Characterization and lead(II), cadmium(II), nickel(II) biosorption of dried marine brown macro algae *Cystoseira barbata*. Environ. Sci. Pollut. Res. 19:3118–3125.

Yamaguchi-Iwai Y, Serpe M, Haile D, Yang W, Kosman DJ, *et al.* (1997). Homeostatic regulation of copper uptake in yeast via direct binding of MAC1 protein to upstream regulatory sequences of *FRE1* and *CTR1*. J. Biol. Chem. 272:17711– 17718.

Yang K, Shadkchan Y, Tannous J, Landero Figueroa JA, Wiemann P, *et al.* (2018). Contribution of ATPase copper transporters in animal but not plant virulence of the crossover pathogen *Aspergillus flavus*. Virulence. 9:1273–1286.

Yang Y, Walton A, Sheridan R, Güth K, Gauß R, *et al.* (2017). REE Recovery from End-of-Life NdFeB Permanent Magnet Scrap: A Critical Review. J. Sustain. Metall. 3:122–149. Yang Q, Wang JL, Xing Z. (2005). Biosorption of cadmium by fungal biomass of *Aspergillus niger*. Biomed. Environ. Sci. 18(3):141–145.

Yoon HSS, Kim CJJ, Chung KWW, Kim SDD, Lee JYY, *et al.* (2016). Solvent extraction, separation and recovery of dysprosium (Dy) and neodymium (Nd) from aqueous solutions: Waste recycling strategies for permanent magnet processing. Hydrometall. 165:27–43.

Yu JH, Leonard TJ. (1995). Sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus nidulans* requires a novel type I polyketide synthase. J. Bacteriol. 177:4792e4800.

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

Yu JH. (2006). Heterotrimeric G protein signaling and RGSs in *Aspergillus nidulans*. J. Microbiol. 44:145e154.

Yu JH. (2010). Regulation of development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. Mycobiol. 38:229e237.

Yuan Z, Luo T, Liu X, Hua H, Zhuang Y, *et al.* (2019). Tracing anthropogenic cadmium emissions: From sources to pollution. Sci. Total Environ. 676:87-96.

Zepf V. (2013). Rare Earth Elements; Springer Science Business Media: Berlin, Germany. pp. 1-162.

Zhang MK, Liu ZY, Wang H. (2010). Use of Single Extraction Methods to Predict Bioavailability of Heavy Metals in Polluted Soils to Rice. Com. Soil Sci. Plant Anal. 41(7):820–831. Zhou B, Li Z, Chen C. (2017). Global potential of rare earth resources and rare earth demand from clean technologies. Minerals. 7:203.

Zhou Z, Lu YH, Pi HF, Gao P, Li M, *et al.* (2016). Cadmium exposure is associated with the prevalence of dyslipidemia. Cell Physiol Biochem. 40:633–643.

Zouboulis A, Loukidou M, Matis K. (2004). Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. Process Biochem. 39:909–916.
10. Tudományos közlemények jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400 Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Tárgy:

Nyilvántartási szám: DEENK/234/2020.PL 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

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2) 1. Boczonádi, I., Török, Z., Jakab, Á., Kónya, G., Gyurcsó, K., Fehérné Baranyai, E., Szoboszlai, Z., Döncző, B., Fábián, 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., Daróczi, L., Csernoch, L., Kis, G., Antal, M., Pusztahelyi, T., Grawunder, A., Merten, D., Emri, T., Fábián, 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., Fehérné Baranyai, E., Tóth, N. C., Daróczi, L., Csernoch, L., Kis, N. G., Antal, M., Pusztahelyi, T., Grawunder, A., Merten, D., Emri, T., Fábián, I., Kothe, E., Pócsi, I.: Aspergillus oryzae potenciális alkalmazásának lehetőségei ritkaföldfémek bioszorpciójában. In: Biotechnológia a Debreceni Egyetemen Tudományos szimpózium : Program és OFBRECEN összefoglalók, Debrecen Egyetem, Debrecen, 14, 2019.

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (3)

4. Boczonádi, I., Jakab, Á., Fehérné Baranyai, E., Tóth, C. N., Daróczi, L., Kis, N. G. Antal, M Emri, T., Pusztahelyi, T., Fábián, 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.



DEBRECENI EGYETEM EGYETENI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf. 400 Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

 Boczonádi, I., Fehérné 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.

 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





DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETTI KÖNYVTÁR H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400 Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@ilb.unideb.hu

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)

 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)

 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

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 tudománymétriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapla elvégezte.

Debrecen, 2020.07.28.

Mintál	Elemek (%) ^a					
winitak	С	Н	Ν	S		
kezeletlen TNJ36	39,23±0,47	6,25±0,04	4,66±0,08	0,334±0,006		
+ 0,3 mM CuCl ₂	41,84±0,23	6,57±0,06	4,52±0,03	0,351±0,011		
+ 0,3 mM CdCl ₂	41,07±0,21	6,53±0,06	5,23±0,05	0,415±0,001		
kezeletlen MKL14 (<i>\(\DeltarpA\)</i>)	42,48±0,12	6,38±0,05	5,76±0,05	0,488±0,011		
+ 0,3 mM CuCl ₂	41,17±0,42	6,18±0,06	5,65±0,13	0,502±0,014		
+ 0,3 mM CdCl ₂	42,31±0,15	6,39±0,02	5,92±0,04	0,537±0,004		

1. táblázat A nehézfém stressznek kitett *A. nidulans* TNJ36 kontroll és *∆crpA* gén deléciós mutáns törzsekből származó micélium szén (C), hidrogén (H), nitrogén (N) és kén (S) tartalma.

^a – Három egymástól független kísérletből származó adatok alapján kiszámított átlagos fémtartalmat ±SD értékeket tüntettük fel (Boczonádi és mtsi, 2020b).

Fémek	Li	Mg	Al	Fe	Ni	Zn	Y	Ce	Nd
"Kétszeres dózisú" biomassza	n.d.	2,75 ±0,22	0,07 ±0,28	0,085 ±0,026	n.d.	$0,086 \pm 0,004$	n.d.	n.d.	n.d.
"Egyszeres dózisú" biomassza	n.d.	1,32 ±0,21	0,044 ±0,004	0,03 ±0,01	n.d.	0,077 ±0,013	n.d.	n.d.	n.d.

2. táblázat A kezeletlen A. oryzae biomasszából mért fémkoncentrációk (mg g⁻¹).

¹ Az *A. oryzae* biomasszájában mért fémkoncentráció értékeket korrigáltuk a kezeletlen gomba biomasszában mért koncentrációkkal. Az "n.d." megjelölés arra utal, hogy a koncentráció érték detektálási határ alá estek (Boczonádi és mtsi, 2020a).



1. ábra A "egyszeres dózisú" *A. oryzae* biomassza bioszorpciós hatékonysága. Az értékeket a biológiailag hozzáférhető fémkoncentrációkból számoltuk. Az átlag ±SD értékek 3 mérésből lettek meghatározva (Boczonádi és mtsi, 2020a).



2. ábra A kontakt idő bioszorpcióra gyakorolt hatása "egyszeres dózisú" *A. oryzae* biomassza esetén. A biomassza fémtartalmát (fekete négyzetek, korrigálva a kezeletlen biomassza fémtartalmával) és a "többfázisú" tesztoldat fémtartalmát (fehér négyzetek) 3 biológiai ismétlésből származó adat alapján határoztuk meg (átlagértékek ±SD) (Boczonádi és mtsi, 2020a).