

Bacillus thuringiensis szuszpenzió flokkuláltatása polielektrolitokkal és tenzidekkel

SZEPESSZENTGYÖRGYI Ádám^a, BÁRÁNY Sándor^b, SKVARLA Jíri^c és MÉCS Imre^a

^aBay Zoltán Kutatóintézet, P.O.Box 2337,6726 Szeged, Magyarország

^bMiskolci Egyetem, Analitikai Kémiai Tanszék, 3515, Miskolc- Egyetemváros, Magyarország

^cKassai Műszaki Egyetem, Kosice, ul. Letná 3, Szlovákia

1. Bevezetés:

A *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis* (Bti) baktériumokat sikeresen alkalmazzák szúnyog-lárvák gyérítésére, spórája ugyanis tartalmaz egy fehérje kristályt (δ -endotoxin), mely a szúnyoglárvá táplálkozása közben a bélcsatornába jut, a középbélben aktivizálódik és elpusztítja a szúnyoglárvát¹⁻². A szegedi Bay Zoltán Biotechnológiai Kutatóközpontban kifejlesztettük aránylag híg koncentrációban ($1-3 \times 10^7$ n/ml) Bti szuszpenziók inkubálásának feltételeit és módszerét³. Ugyanakkor a szuszpenzió kiszérelése és gyakorlati célokra való alkalmazása csak sokkal töményebb szuszpenziók esetében lehetséges. Felmerült tehát a híg szuszpenzió sűrítésére alkalmas eljárás kidolgozása. A sejt-szuszenziók koncentrálására mind reagens-nélküli (szeparáció, szűrés, ultra-és mikroszűrés), mind reagensek alkalmazásával párosult (koaguláció, flokkuláció, flotálás, kromatográfia) módszereket használnak. Az előbbi módszerek előnye az, hogy biztosítják a natív oldat, ill. sejtanyag tisztaságát. Ugyanakkor e módszerek hatékonysága rohamosan csökken a kolloidrezecskék/sejtek méreteinek csökkenésével, amikor is nehézségek merülnek fel a szűrésnél, centrifugálásnál, stb. A reagenseket alkalmazó eljárások előnye: a nagymértékű sűrítés, ennek aránylag kis költsége és egyszerű technológiai megvalósítása⁴. Ezek az előnyök természetesen csak hatékony reagensekkel valósíthatók meg.

A mikroorganizmus-szuszenzió sűrítésének sok problémája megoldható nagy molekulatömegű anionos és kationos polielektrolitok alkalmazásával, figyelembe véve ezen anyagok jelentős flokkuláló (aggregáló) hatását, felhasználásuk gazdaságosságát és a biokolloidokra kifejett kímélő, nem-toxikus hatását. A flokkuláció alkalmazható sejtszuszenziók sűrítésére önálló módszerként, vagy pedig a hagyományos eljárások - szűrés, flotáció, centrifugálás stb. - hatékonyságának növelésére.

A makromolekulákkal történő flokkuláltatás általános törvényszerűségeit és alkalmazásait a biotechnológiában az egyik szerző monográfiája és összefoglaló cikke tárgyalja^{4,5}. Mint ismeretes⁵⁻⁷ a flokkuláció időbeli lefolyását és hatékonyságát számos tényező befolyásolja, úgymint a polimer szerkezete, oldatban felvett méretei, a makromolekula-szegemesek és a részecskefelület közötti kötési energia, az alkalmazott polimeroldat töménysége és a diszperzióval való elegyítés módja, a polimer molekulatömege, töltéselőjele és töltéssűrűsége (polielektrolitok esetében), az oldat elektrolit-tartalma, a szilárd fázis koncentrációja stb. Ebből is látható, hogy a polimerekkel való flokkuláltatás még szervesen (élettelen)

diszperziók esetében is egy igen bonyolult, sok paramétertől függő folyamat. Mint ezt számos esetben kimutattuk^{4,5}, a mikroorganizmus szuszpenziók flokkuláltatásának általános törvényszerűségei és mechanizmusa nagyjából megfelelnek a szervesen diszperziókra érvényes törvényszerűségeknek. Ugyanakkor az előbbi egy sokkal bonyolultabb folyamat, mint a szervesen részecskékből álló szuszpenziók flokkuláltatása. Az utóbbiakkal ellentétben a sejt - flokkuláns kölcsönhatásokat nagymértékben befolyásolják a sejtek életműködése során keletkező sejtmetabolizmus-termékek, a környező oldat komponensei, valamint a sejtfal állandóan változó felépítése, architektúrája⁸⁻¹⁰.

1.1. Kutatásunk célja

Nagy térfogatú híg Bti készítmény sűrítése (kiszérelése) gyors és egyszerű módszerrel, vízdékony polimerek és tenzidek alkalmazásával. E célból részletesen tanulmányoztuk a különböző felépítésű anionos és kationos polielektrolitoknak (PE) valamint tenzideknek a Bti szuszpenzió sejt-aggregálódásának kinetikájára és mértékére kifejtett hatását a hozzáadott reagens-mennyiség, a sejttömeg, az adagolás módja, a polimer-oldat koncentrációja stb. függvényében.

2. Kísérleti anyagok és módszerek

2.1. Bacillus thuringiensis ssp. israelensis törzs

A *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis* (Bti) mikroba pálcá alakú, spórás, aerob baktérium¹¹. Hossza 3-5 μm , szélessége 0,5-0,8 μm . A spóra 2-3 μm méretű és ovoid alakú. Kísérleteinkben közel 100%-os spórás Bti szuszpenziót használtunk. A Bti baktériumot egy kereskedelmi termékből izoláltuk (VECTOBAC® 12 AS, Valent BioScience Co., Libertyville, IL, USA) és T2¹² tápoldatban kultiváltuk 72 órán át rázótermosztátban ($T=34\text{C}^\circ$; rpm=195). A törzsoldat töménysége $1,5 \times 10^7$ n/ml (n-sejtszám), az egységnyi térfogatban lévő élő sejtek számát hígítással és széleszétessel határoztuk meg.

2.2. Polielektrolitok

Flokkulálószerként SNFH528 (Gyártó:SNF S.A.,41 rue Jean Huss, 42028 SAINT-ETIENNE, CEDEX 01, France), Percol 1697 és DS jelzésű kationos polielektrolitokat, SNFH149, SNFH57 (Gyártó:lásd

fent), Magnafloc 156 és Magnafloc 1011 jelzésű anionos polielektrolitokat (gyártó: Allied Colloids, jelenleg CIBA), valamint hexadecil-piridinium-klorid kationos, illetve nátrium-dodecil-benzol-szulfonát anionos tenzideket és ezek elegyeit alkalmaztuk. Percol 1697 az akril-amid és akrilát kvatener-ammónium só kopolimere, molekulatömege kb. 200.000, töltéssűrűsége 14,9 mmol/g¹³. A Magnafloc 156 és 1011 polimereket nagy molekulatömegű poliakrilamid részleges hidrolízisével állítják elő, a 0,5% töménységű oldat viszkozitása megfelelően 1,0 Pa.s és 1,2 Pa.s (Allied Colloids adat). A gyártótól kapott információk szerint az SNFH 57, 528 és 149 jelzésű polielektrolitok magas, nagyon magas és ultra magas molekulatömegű poliakrilamidok, akrilamid kopolimerek akrilsav származékkal. A 0,5 %-os anionos polielektrolit oldat viszkozitása 0,5-0,7 Pa.s értékek között mozog. Az anionos minták szabad monomer tartalma kevesebb mint 250 ppm, a kationosnál kevesebb mint 1000 ppm. Jelenleg érvényben lévő rendeletek szerint nincs veszélyességi besorolásuk.

Flokkulálószerként alkalmaztunk továbbá anionos (nátrium-dodecil-benzol-szulfonát - NaDS) és kationos (hexadecil-piridinium-klorid - HPyC és cetil-trimetil-ammónium-bromid - CTAB) tenzidek 0,1 % oldatát.

2.3. PDA-2000 Diszperzió Analizátor

A flokkulációs méréseket dinamikus feltételek mellett PDA-2000 részecske-méret analízisére alkalmas berendezéssel (Rank Brothers Inc, Anglia) végeztük a ^{6,13} tanulmányokban leírt módon. A műszer működési elve röviden a következő. Az átlátszó flexibilis csövön áthaladó szuszpenzió egy kis térfogatában (jellemzően 1 mm³) lévő részét egy szűk fény-nyalábbal merőlegesen világítják meg. A szuszpenzió áthaladó fény-fluxus értékét érzékeny foto-detektor regisztrálja, amely a fényjelet elektromos jellé alakítja át. A fényjel egy nagy, az áthaladó fény átlag-intenzitását, azaz a szuszpenzió zavarosságát jellemző állandó fluxusból (dc), és egy, a megvilágított zónában megjelenő részecskék számát jellemző fluktuáló fluxusból (ac) tevődik össze. Kimutatták⁶, hogy a fluktuáló jel négyzetes átlaga négyzetgyökének értéke (RMS) arányos a részecskék darabszám szerint átlagolt koncentrációjával és méretével. Az RMS értékek jelentősen növekednek az aggregálódás kezdetével és csökkennek a folyamat végzetével. A kijövő jel mutatja az RMS és az RMS/dc arány értékét is. Mindkettő alkalmazható az aggregálódás mértékének jellemzésére.

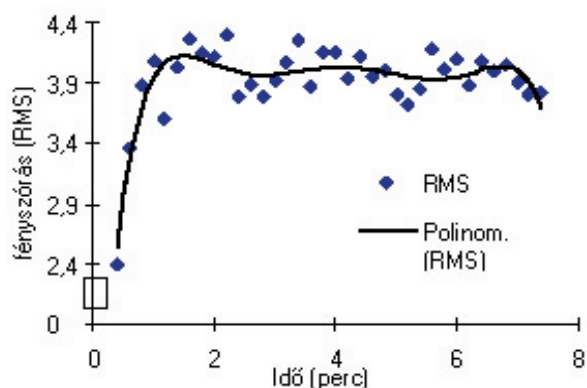
A PDA-2000 műszer korai információval szolgál a rendszerben lejátszódó aggregálódási folyamatokról, akár már másodpercek elteltével a reagens szuszpenzióhoz való hozzáadása után. Az ábrákon bemutatott RMS értékek általában három mérés eredményének az átlaga.

3. Eredmények

3.1. A flokkuláció kinetikája

A flokkuláció mértékét, melyet az RMS értékkel jellemeztünk, általában a polimer-oldat szuszpenzióhoz való (állandó keverés mellett) hozzáadása után 4-6 perc elteltével

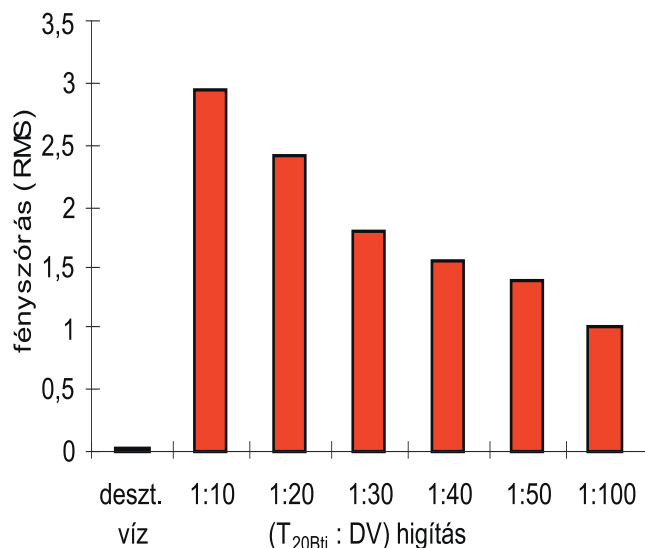
mértük. Fontos volt megállapítani, hogy ez az időtartalom elegendő-e egy kvázi-stabil, időben már lényegesen nem változó állapot elérésére, azaz reprodukálható aggregáció – mértékek meghatározására. A méréseket egy cirkuláló rendszerben valósítottuk meg, a RMS értékeket 12 másodpercenként regisztráltuk. Ezzel a módszerrel részletesen tudtuk követni a flokkuláció időbeli lefolyását. Az 1. ábra adataiból látható, hogy a flokkuláció mértéke a polimer-oldat hozzáadása utáni 1-7 percben nagyjából állandó értéket mutat, csak ezután kezd csökkenni az RMS értéke, ami a nagyméretű flokkulátumok (szabad szemmel is látható) kiüledésével magyarázható.



1. Ábra. Hígított (1: 20) Bti szuszpenzió flokkulációjának kinetikája 10 g/10¹¹sejt SNFH 528 kationos polimer jelenlétében. A flokkuláltatást 0,1 % oldattal valósítottuk meg. Itt és a további ábrákon az RMS érték a flokkuláció fokát jellemzi.

Az állandó RMS értékkel jellemezhető tartományban az aggregátumok (flokkulátumok) elérik maximális nagyságukat, amely nyilvánvalóan a keverés intenzitásának és a flokkulátumok stabilitásának, szilárdságának függvénye. A 0 és 1 perc közötti tartományban a RMS értéke rohamosan nő. Ennek oka valószínűleg az, hogy az ellentétes töltésű kationos polimer gyors adszorpciója következtében a sejtek ütközésének hatékonysága jelentősen növekszik, ami az aggregálódás kezdetéhez vezet. Érdekes módon a flokkuláció kinetikai görbéjében nem figyelhető meg jelentős kezdeti lag-szakasz, melyben az aggregáció mértéke nem vagy csak alig növekszik, mint ez jellemző szervesetlen anyagok (kaolin, szilícium-dioxid stb.) diszperzióinak polielektrolitokkal történő flokkuláltatása esetében¹⁴.

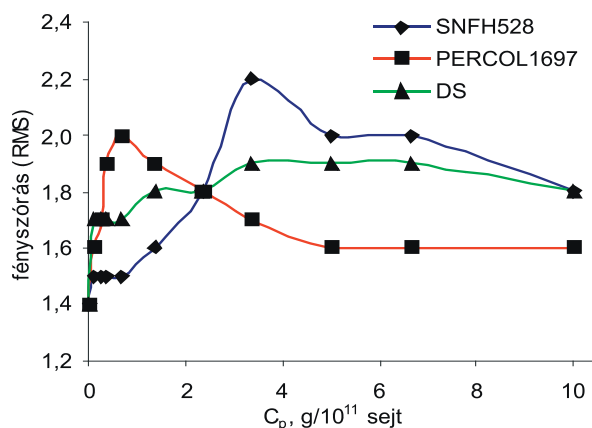
A PDA-2000 műszer érzékeny mérési tartománya az 1,00 és 4,00 RMS értékek között van. A flokkulációs kísérletek előtt meghatároztuk, milyen koncentrációjú tápoldatban végezhető el a makromolekulák sejtek aggregációjára kifejtett hatásának vizsgálata, hogy az effektusok a fenti RMS tartományban jól mérhetőek legyenek. E célból az 1,5·10⁷ csíra/ml kiinduló tápoldatból tízszeres, hússzoros, harmincszoros, negyvenszoros, ötvenszoros és százszoros hígítású szuszpenziókat készítettünk és mértük ezek fényszórását. A 2. ábrán látható, hogy a kisebb hígítású oldat alapzavarossága elég nagy és a flokkuláns - hozzáadás következtében fellépő RMS növekedése nem mérhető elég széles tartományban, így a mérések többségét 50x hígítású (élő csíraszám 3·10⁵ n/ml) szuszpenziókkal végeztük, melyekben jól mérhetőek az alapzavarosság és a reagens által kiváltott effektusok.



2. Ábra. Bti szuszpenziók fényszórásának (RMS) függése a diszperzió hígításának mértékétől

Az is megfigyelhető, hogy a tápoldat-koncentráció és az RMS értékek között nincs egyenes összefüggés, ami a (reagenst nem tartalmazó) töményebb sejt-szuszpenzióban fellépő aggregálódással hozható összefüggésbe. Ezért minden mérés-sorozat előtt meghatároztuk a vizsgálandó sejt-szuszpenzió (viszonyítási alapul szolgáló) RMS értékét.

Tanulmányunkban különböző kationos és anionos polielektrolittal végeztünk vizsgálatokat, majd részletesen tanulmányoztuk a leghatékonyabbnak bizonyult minták által kiváltott flokkuláltatás törvényszerűségeit. Az irodalmi adatok szerint a mikroorganizmusok leghatásosabb flokkuláló- szereit a kationos polielektrolitok^{4,5,8-10}, kutatásunkban is ezeknek szenteltük a legnagyobb figyelmet. A 3. ábrán mutatjuk be 50x hígítású, azaz 3.10^5 sejt/ml tartalmú Bti szuszpenzió SNFH528, Percol 1697 és DS jelzésű kationos polielektrolitok 0,01 % oldata adagolásával megvalósított flokkuláltatás eredményét.

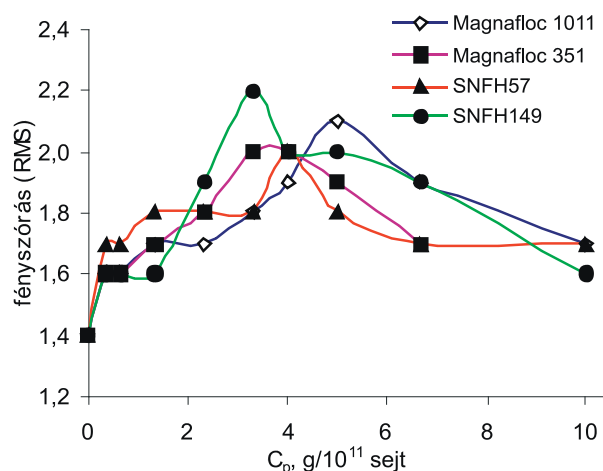


3. Ábra. Hígított (1:50) Bti szuszpenzió RMS értékének függése a hozzáadott kationos polimer mennyiségétől. A flokkulációt 0,01% polimer-oldatokkal valósítottuk meg.

Látható, hogy a hozzáadott reagens mennyiségének

növelésével az aggregáció mértéke először növekszik, majd csökken, azaz a híg diszperziókra jellemző klasszikus viselkedés figyelhető meg: kis koncentrációknál a nagy molekulatömegű flokkuláns érzékenyítő, jelentős mennyiségekben pedig stabilizáló hatást fejt ki. Az SNFH528 és DS minták csak a flokkulációs maximumhoz viszonyítva mutatnak részleges stabilizációt. A flokkuláció mértékével arányos maximális RMS értékek néhány g/100 milliárd sejt reagens - koncentrációknál figyelhetők meg, ami összhangban van E. Coli és más sejt-szuszpenziókban mért optimális flokkulációt előidéző polimer koncentrációkkal^{4,5,8-10}. A nagy töltéssűrűségű Percol 1697 jelzésű kationos polielektrolit, melynek adszorpciós affinitása a negatív töltésű sejtfelülethez valószínűleg a legnagyobb, már 1-2 g/100milliárd mennyiségben is jelentős flokkulációt idéz elő. Ugyanakkor a flokkulációs zóna szélessége ebben az esetben meglehetősen kicsi. Hatékonyabb reagensnek bizonyult az SNFH 528 minta, itt az aggregálódás mértéke nagyobb és flokkulációs tartomány is szélesebb. A kationos DS minta flokkuláltató képessége az előbbi két mintához viszonyítva lényegesen gyengébb. Nyilvánvaló, hogy a kationos polimerek flokkuláció képessége elsősorban a makroionok pozitív és a sejtfa negatív töltései között fellépő elektrosztatikus kölcsönhatások következtében fellépő adszorpcióval van összefüggésben. Ugyanakkor az aggregáció mechanizmusa ellentétes töltéselőjeli polielektrolitokkal nem feltétlenül tisztán elektrosztatikus, azaz nem csak a felületi töltések semlegesítésének eredménye⁷. Merevláncú PE esetében az említett tényező mellett jelentős szerepet játszhat a flokkuláció hidkötéses mechanizmusa is, mint ezt megfigyeltük E.coli szuszpenziók merev- vázú poliszacharidokkal (kitozán és származékai) történő flokkuláltatása során^{8,9}. A makro-lánc hajlékonyságától (rigiditásától) függően tehát az aggregáció különböző mechanizmusai dominálnak.

Megfigyeléseink szerint számos anionos polielektrolit is aránylag jól aggregálja a Bti sejteket, mint ez a 4. ábra adataiból jól követhető. A vizsgált négy anionos polimer (SNFH 149, SNFH 57, Magnafloc 351 és Magnafloc 1011 jelzésű minták) közül az első minta bizonyult a leghatásosabbnak.



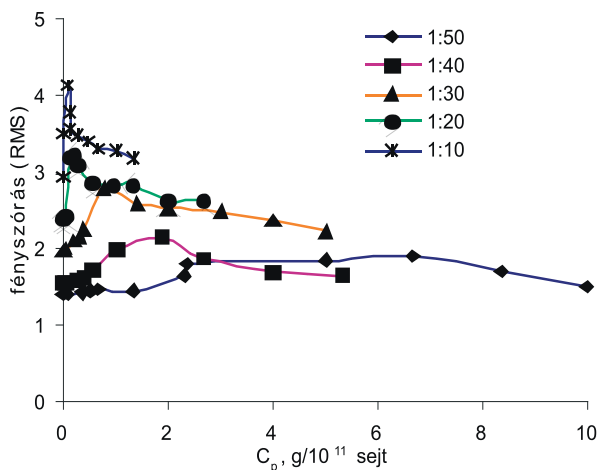
4. Ábra. Hígított (1:50) Bti szuszpenzió RMS értékének függése a hozzáadott anionos polimer mennyiségétől. A flokkulációt 0,01% polimer-oldatokkal valósítottuk meg.

A kísérleteket $3 \cdot 10^5$ sejt/ml töménységű szuszpenzióval és 0,01 % polielektrolit-oldattal végeztük ugyanolyan módon, mint a kationos polielektrolitok esetében. Itt is a klasszikus viselkedés - kis polimer-töménységeknél aggregálódás, majd jelentős reagens-koncentrációknál a diszperzió újbóli stabilizációja - figyelhető meg. Feltételezhető, hogy a sejtfal mozaikszerű szerkezete, ahol pozitív és negatív töltésű funkciócsoportok váltják egymást, lehetőséget teremt az anionos szegmensek kötődésére is a felülethez. Mivel a pozitív funkciócsoportok száma a sejtfelületen aránylag kicsi (lényegesen kisebb, mint a negatív funkciócsoportok koncentrációja), így az anionos PE csak kisszámú kötődéssel kapcsolódik a sejtfelülethez, és ily módon a kevésbé deformált, jelentős kiterjedésű adszorbeált makro-anion képes hidkötéses mechanizmus révén összekötni, aggregálni több bacillus-sejtet. A sejtfelület és polielektrolit-szegmensek közötti hidrofób kölcsönhatások is szerepet játszhatnak az adszorpciós réteg kialakulásában.

A továbbiakban részletesen vizsgáltuk a szuszpenzió polielektrolitok hozzáadásával történő flokkuláltatásának törvényszerűségeit.

3.2. A szuszpenzió töménységének hatása

Ennek tanulmányozására különböző hígítású szuszpenziót flokkuláltattunk az igen hatékonyan bizonyult (2. ábra) SNFH 528 jelzésű kationos polielektrolit 0,01 % oldatával. Mint az 5. ábrán feltüntetett eredményekből látható, a töményebb szuszpenziók maximális flokkulációjához kevesebb polimer szükséges és ez a kevesebb polimer nagyobb mértékű (nagyobb RMS értékkel jellemezhető) aggregációt vált ki.



5. Ábra. Különböző hígítású Bti szuszpenziók RMS értékének függése a hozzáadott kationos polimer mennyiségétől. A flokkulációt 0,01% SNFH 527 oldattal végeztük.

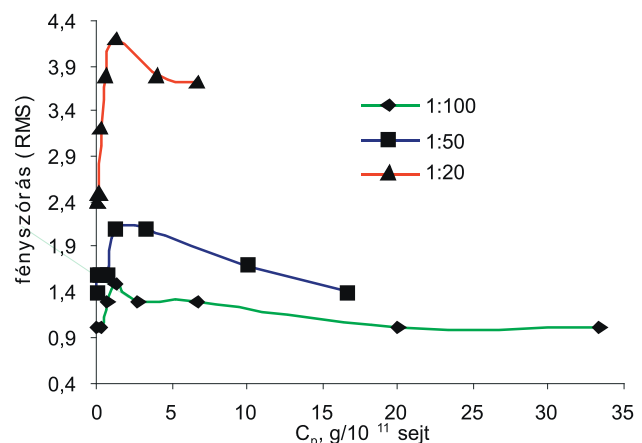
A sejtszám csökkenésével a flokkuláció mértéke csökken, de a destabilizációs zóna kiszélesedik. Tehát, minél nagyobb a sejtek koncentrációja, annál kisebb makromolekulamennyiség (és feltehetően adszorbeált polimer-mennyiség) szükséges a hatékony aggregáció eléréséhez (I. táblázat). Hasonló megfigyeléseink voltak polisztról-latex és más szeretlen szuszpenziók flokkuláltatásának vizsgálata

során kationos és nemionos polimerekkel^{15,16}. Az I. táblázat a különböző töménységű szuszpenziók maximális flokkulálását kiváltó polimer mennyiséget mutatja be ugyanazon sejtszámra (100 millió) vonatkoztatva.

I. Táblázat: Különböző töménységű Bti szuszpenziók maximális flokkulációját kiváltó optimális kationos SNFH528 polimer mennyiségek:

| Hígítás | Sejtszám (n/50ml) | Optimális polimer tartalom (mg/50ml) | Maximális flokkulációt előidéző PE-mennyiség (mg/100 millió sejt) |
|---------|--------------------|--------------------------------------|---|
| 50 x | $1,50 \times 10^7$ | 1 | 6,7 |
| 40 x | $1,87 \times 10^7$ | 0,35 | 1,9 |
| 30 x | $2,50 \times 10^7$ | 0,2 | 0,8 |
| 20 x | $3,75 \times 10^7$ | 0,075 | 0,2 |
| 10 x | $7,50 \times 10^7$ | 0,05 | 0,07 |

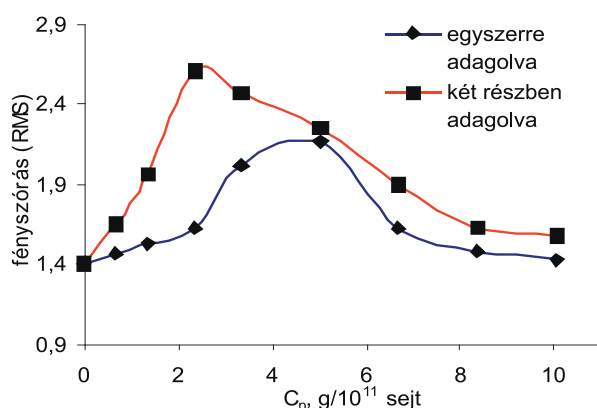
A $3 \cdot 10^5$ sejt/ml töménységű szuszpenziótól való átmenet az $1,5 \cdot 10^6$ sejt/ml szuszpenzióig az optimális flokkulációt kiváltó PE mennyiség $6,7 \text{ mg}/10^8$ sejt-től $0,07 \text{ mg}/10^8$ sejt-ig, azaz igen jelentősen csökken. Ez valószínűleg a flokkuláció kinetikai aspektusával van összefüggésben: a szuszpenzió töménységének növekedésével a sejtek ütközésének gyakorisága és ennek folytán az adszorbeált polimer által előidézett aggregáció mértéke jelentősen növekszik. A gyakoribb ütközések következtében az oldatba bevitt polimer gombolyagoknak (láncoknak) kevesebb idő áll rendelkezésre, hogy a felülettel való kontaktus után ezen szétterüljenek, felvegyék egyensúlyi konformációjukat. Így a töményebb szuszpenzióban a (hatékonyabb) flokkulációt kevésbé deformált, valószínűleg nagyobb méretű makromolekulák idézik elő, mint híg rendszerekben, ahol a ritkább ütközések eredményeként a polimer molekuláknak a deformálódásra, konformáció-változásra több idő áll rendelkezésükre. Az utóbbi esetben a gyengébb flokkuláció a jobban deformált, a felülethez több kötésponttal kötődő, vékonyabb adszorpciós rétegek képződésével magyarázható. Hasonló összefüggéseket figyeltünk meg a szuszpenzió SNFH 149 és SNFH 57 jelzésű anionos polielektrolittal megvalósított flokkulációja során is (6. ábra).



6. Ábra. Különböző hígítású (feltüntetve) Bti szuszpenzió RMS értékének függése a hozzáadott anionos SNFH 57 polimer mennyiségétől. A flokkuláció 0,01% oldattal történt

3.3. A polimer adagolási módjának hatása

Ismeretes^{2,5}, hogy a polimerek flokkulátató hatását növelhetjük úgy is, hogy a polimert nem egy, hanem két egyenlő vagy több részletben adagoljuk a diszperzióhoz. Az ismert irodalmi adatok szervesen szuszpenziók flokkulátására vonatkoznak. Fontosnak tűnt meghatározni, növelhető-e a sejt-suszpenzió aggregálódásának mértéke, ha a reagenst szakaszosan visszük be a rendszerbe. A 7. ábra alsó görbéje a rendszer RMS értékének változását mutatja be a bevitt SNFH 528 jelzésű kationos polimer koncentrációjának függvényében a reagens egyszerre történő hozzáadása feltételénél, míg a felső görbe a polielektrolit két egyenlő (a második részletet az első után 5 perc elteltével vittük be) részben megvalósított adagolása által előidézett változásokat illusztrálja.



7. Ábra. Hígított (1:50) Bti szuszpenzió kationos SNFH 528 0,01% oldatával megvalósított flokkulációja mértékének (RMS) függése a hozzáadott polimer mennyiségétől a polimer-oldat kétféle adagolási módjánál.

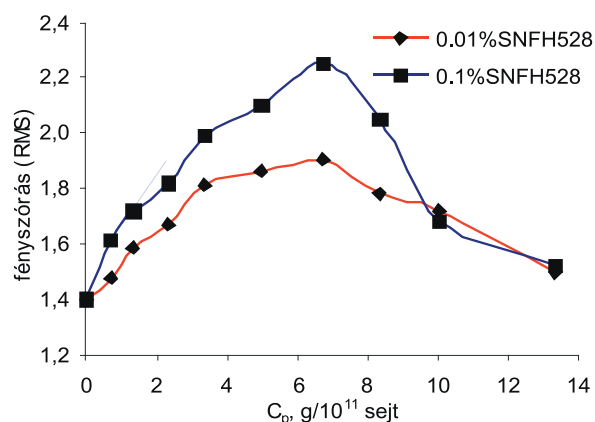
Látható, hogy azonos térfogatú kationos polielektrolit oldat adagolása azonos térfogatú szuszpenzióhoz nagyobb hatást fejt ki, ha a polimer-oldatot két részben adjuk a szuszpenzióhoz. Nemcsak a flokkuláció mértéke lett nagyobb, hanem a maximális flokkuláció eléréséhez is kevesebb polimer mennyiség szükséges. A hatékonyabb flokkulálás oka az lehet, hogy az első polimer-részlet bevitele után képződött flokkulumok a második adaggal bevitt makromolekulák hatására tovább aggregálódnak, azaz a flokkulációs folyamat két lépcsőben játszódik le. Először csak kis flokkulumok képződnek, majd ezek nagyobb aggregátumokká egyesülnek. A másodlagos aggregátumok jóval nagyobbak, mint az elsődlegesek és ez nagyobb RMS értékek megjelenésében tükröződik (7. ábra).

Megjegyzendő azonban, hogy a polimer részletenkénti adagolása nem minden esetben eredményez hatékonyabb flokkulálást¹⁷, a megfigyelést a szerzők nem magyarázták.

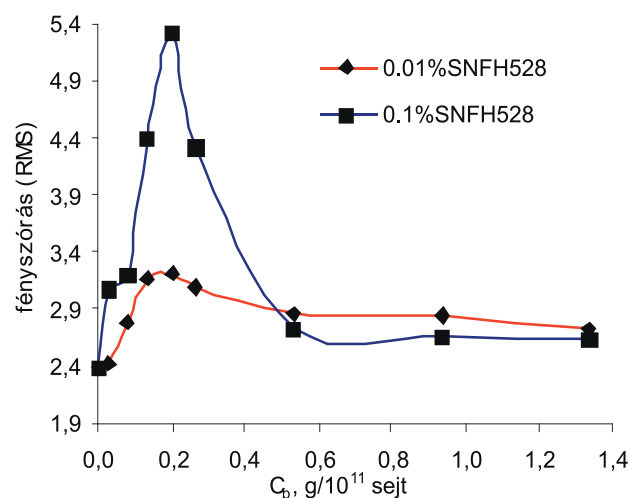
3.4. A polimeroldat koncentrációjának hatása

Gyakran az alkalmazott polimeroldat koncentrációja is befolyásolja a részecskék aggregálásának mértékét¹⁶. Ennek hatását SNFH 528 jelzésű kationos polielektrolit 0,1 %

és 0,01 % oldatával megvalósított flokkulátás során vizsgáltuk. A töményebb 0,1 % polimer-oldat nagyobb flokkulátató hatást váltott ki a Bti szuszpenzióban a kiinduló tápoldat mind ötvenszeresen hígított, mind hússzorosan hígított mintájában (8-9 ábra).



8. Ábra. 1:50 hígítású Bti szuszpenzió RMS értékének függése a hozzáadott SNFH 528 kationos polimer mennyiségétől 0,01 % és 0,1 % oldatokkal megvalósított flokkuláció esetében

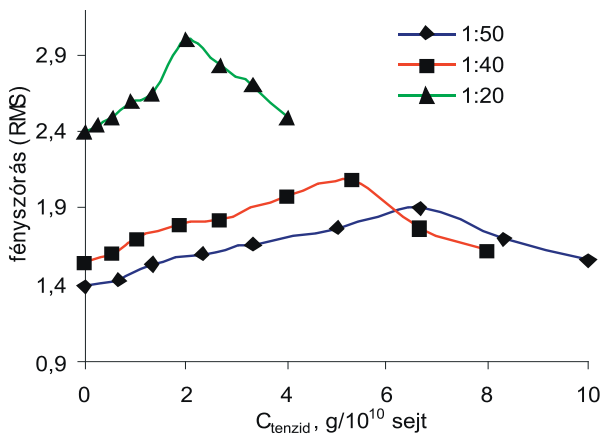


9. Ábra. 1:20 hígítású Bti szuszpenzió RMS értékének függése a hozzáadott SNFH 528 kationos polimer mennyiségétől 0,01 % és 0,1 % oldatokkal megvalósított flokkuláció esetében

Különösen jelentős a polimeroldat koncentrációjának hatása a töményebb 7,5·10⁵ sejt/ml szuszpenzió esetében. Ennek az oka egyértelműen nem tisztázott. Feltételezhető, hogy a tömény polimeroldatban nagyméretű asszociátumok, szupramolekula-struktúrák képződnek és ezek kötődése, adszorpciója a sejtfelületen határozza meg az aggregálódás mértékét. Elképzelhető az is, hogy a koncentrált(abb) oldatban a polielektrolit töltései jobban le vannak árnyékolva, a makromolekula nagyobb mértékben van begombolyodva és ennek kinyúlása, szétterülése a sejtfelületen, illetve töltéseinek hozzáférhetősége, kölcsönhatása a felület töltéseivel megnehezített, s ennek következtében a gyakori ütközésekkel jellemezhető szuszpenzióban a flokkulált állapotot a kevésbé deformált, kisszámú kötésponttal rendelkező (nagyobb kiterjedésű, azaz nagyobb flokkulátató hatással bíró) adszorbeált makromolekulák hozzák létre.

3.5. Bti szuszpenzió flokkuláltatása tenzid oldatokkal és tenzid elegyekkel

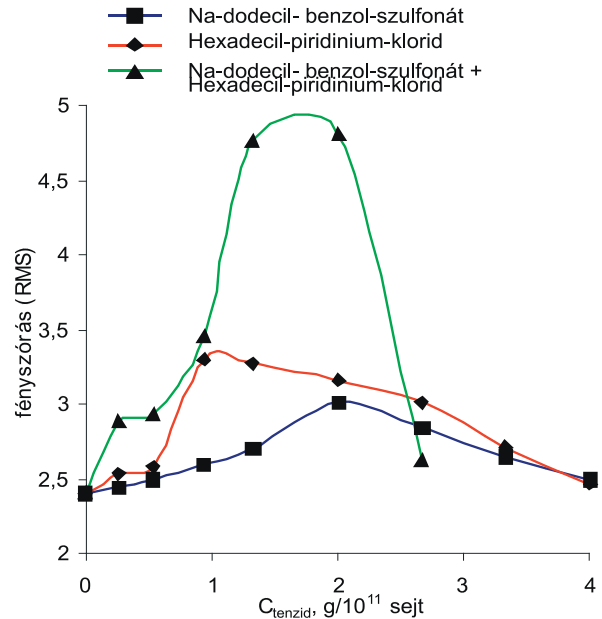
Sejtszuszenziók flokkuláltatása elérhető kationos tenzid-oldatok adagolásával is. Mint a 10. ábra adataiból látható, hexadecil-piridinium-klorid 0,1 % oldatának növekvő mennyiségben való adagolása - a polimeroldatokhoz hasonlóan - a Bti szuszpenzió RMS értékeinek, azaz a flokkuláció mértékének növekedéséhez, majd csökkenéséhez vezet.



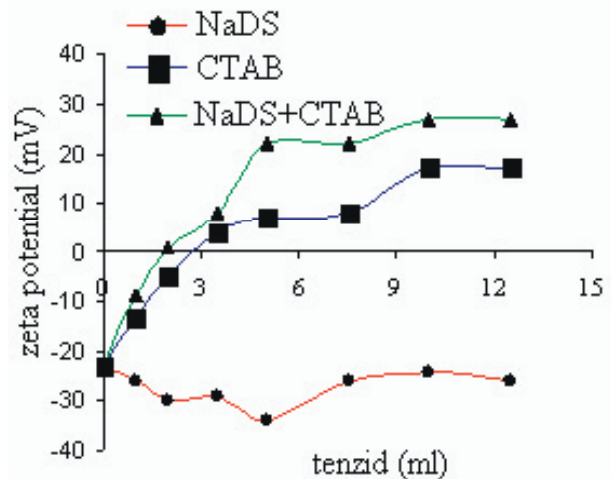
10. Ábra. Különböző hígítású Bti szuszpenziók flokkulációjának mértéke (RMS) a hozzáadott hexadecil-piridinium-klorid mennyiségétől. A tenzid-oldat koncentrációja 0,1 %

A fent leírtakhoz hasonlóan a töményebb szuszpenzió maximális flokkulációjához kevesebb tenzidoldat szükséges, és ez a kevesebb tenzidoldat az adott koncentrációnál egyre nagyobb flokkulációs hatást fejt ki. Az optimális aggregációt kiváltó tenzid-koncentráció nagyságrenddel nagyobb (néhány g/10 milliárd sejt), mint a hasonló effektus eléréséhez szükséges polielektrolit-mennyiség (néhány g/100 milliárd sejt). A kationos tenzid flokkuláltató hatása nyilvánvalóan a pozitív töltésű molekuláknak a sejtfelület negatív töltésű részein megvalósuló adszorpciójával magyarázható. Váratlan módon az anionos nátrium-dodecil-benzol-szulfonát (NaDBS) adagolása is előidézte a sejtszuszenzió gyenge flokkulációját (11. ábra), ami valószínűleg a negatív töltésű ionoknak a mozaikszerű sejtfelületen található pozitív töltésű funkciók csoportokkal való kölcsönhatásával hozható összefüggésbe.

A flokkuláltató hatás jelentősen növelhető kationos és anionos tenzid- oldatok egymás utáni adagolásával. Mint a 11. ábra felső görbéjéből látható, ha a szuszpenzióhoz először 0,1 % nátrium-dodecil-benzolszulfonát oldatot, majd 5 perc elteltével ugyanolyan mennyiségű szintén 0,1% hexadecil-piridinium-klorid oldatot adunk, az individuális komponensek által kiváltott hatáshoz viszonyítva jelentős RMS érték-, azaz aggregáció mérték-növekedés figyelhető meg. A tenzidek flokkuláltató hatása jól értelmezhető a sejtek elektrokinetikai potenciáljának változásával tenzidek jelenlétében. Ezt a Kassai Műszaki Egyetem Eljárástechnikai és Környezetvédelmi Tanszékén lévő (Doppler-effektuson alapuló) ZetaPlus, Brookhaven Inc, USA, műszer alkalmazásával határoztuk meg, amely lehetőséget nyújt a ζ -potenciál sejtenkénti megoszlásának



11. Ábra. Hígított (1:20) Bti szuszpenzió RMS értékének függése a hozzáadott anionos és kationos tenzid, illetve ezek 1:1 elegye mennyiségétől. A flokkulációt 0,1 % oldatokkal végeztük.



12. Ábra. Hígított (1:50) Bti szuszpenzió ζ -potenciájának változása a hozzáadott tenzid- mennyiség függvényében.

nagy pontosságú mérésére is. A kapott adatokat a 12. ábrán tüntettük fel. Látható, hogy a Bti sejtek ζ -potenciál értéke -23 mV, a negatív zéta - potenciál abszolút értéke anionos tenzid hozzáadása során valamelyest, kb. -34 mV-ig növekszik, majd jelentős tenzid-tartalomnál ismét (-25 - 26 mV-ig) csökken. Az elektrokinetikai potenciál növekedése közvetve a NaDBS sejtfalon megvalósuló adszorpciójára utal, melynek következtében növekszik a felület hidrofobitása, és így elképzelhető, hogy a sejtfelületek között fellépő hidrofób kölcsönhatások (vonzóerők) túlkompenzálják a felület negatív töltéseinek tasztítását, ami az aggregáció kismértékű növekedésével párosul (11. ábra). A cetil-trimetil-ammonium-bromid (12. ábra) és hexadecil-piridinium klorid (nem szerepel az ábrán) koncentrációjának növekedésével a sejtek negatív ζ -potenciálja jelentősen csökken, majd áttöltés után a pozitív ζ - értékek növekednek. A ζ -

potenciál abszolút értékének csökkenése a felületi töltés és potenciálcsökkenés következménye, tehát ebben az esetben a sejtek neutralizációs aggregálódásának mechanizmusáról beszélhetünk. Ugyanakkor - hasonlóan a szervesetlen diszperziókban megfigyeltékhez¹⁸ - a sejtek maximális aggregációjának és izoelektromos pontjának megfelelő tenzid-koncentrációk nem esnek egybe, nagymértékű aggregáció már kis negatív ζ -potenciál értékeknél (kb. -5 -6 mV) is megfigyelhető. A kationos és anionos tenzid-oldatok együttes hatása által előidézett jelentős flokkulációt jól magyarázza a két tenzid jelentős negatív ζ -potenciál (abszolút értékeit) csökkentő, illetve pozitív - potenciál növelő hatása, melynek mértéke meghaladja az individuális kationos tenzid hatását (12. ábra).

A 11. és 12. ábrák adatainak összehasonlítása azt mutatja, hogy korreláció figyelhető meg a tenzideknek és tenzidelegyeknek a sejtek elektrokinetikai potenciáljára és aggregálódásának mértékre kifejtett hatása között. Ez a pozitív töltésű tenzidek által előidézett aggregálódás elektrosztatikai mechanizmusának jelentős szerepére utal.

Jelentős különbségek figyelhetők meg a tenzidek vagy polielektrolitok által előidézett üledékek (flokulumok) tulajdonságai között. Az előbbieket hozzáadása során keletkezett csapadék kistérfogatú, tömör, látszólagosan sima határfelületű, jelentős mennyiségű vízben újra diszpergálható. A polimerek jelenlétében képződött flokkulumok nagyméretűek, lazák, egyes esetekben fonalszerűek, nem-rediszpergálhatók.

A kationos PE-anionos tenzid vagy anionos PE-kationos tenzid elegyek bizonyultak a legnagyobb hatásfokú flokkuláló szereknek. Az ilyen, megfelelő összetételű elegyek adagolása a sejtuszpenzió pillanatszerű kicsapódásához, nagyméretű "túrószerű" üledék keletkezéséhez vezet, amelyet rediszpergálni csaknem lehetetlen. Az aggregálódás mértéke olyan nagy és a folyamat olyan gyors, hogy ezt a PDA műszerrel követni lehetetlen.

4. Összefoglalás

Átfolyós rendszerben végzett fényszórásos módszerrel kimutattuk, hogy *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* szuszpenziók jól flokkulálthatók kationos és anionos polielektrolit-oldatok hozzáadásával. Tehát a megfelelő vízdékony polimerek alkalmasak az iparilag kultivált híg szuszpenzió sűrítésére, ami elengedhetetlenül szükséges a szennygyógyító, környezetbarát baktérium gyakorlati alkalmazása szempontjából. A makromolekulák és sejtek közötti 1-2 perc időtartalmú kontaktus elegendő a polimeroldat maximális aggregáló hatásának kifejtéséhez, és a kontaktus időtartalmának növelése kb. 7 percig nem változtatja meg a flokkuláció mértékét.

A maximális flokkulációhoz szükséges polimer-mennyiség - ami néhány tized g/10⁹ sejt és néhány g/10¹¹ sejt értékek között mozog - a szuszpenzió töménységének növelésével jelentősen csökken. Ezt a flokkuláció kinetikai törvényszerűségeivel hoztuk összefüggésbe.

A polimeroldat két egyenlő részben megvalósított adagolása, illetve a polimeroldat koncentrációjának emelése jelentősen

növeli a reagens flokkuláltató hatását.

A sejtuszpenzió jól flokkuláltható kationos tenzidekkel, illetve különösen jó hatásfokkal kationos és anionos tenzidelegyek alkalmazásával. A tenzidek és elegyeik flokkuláltató hatása és a sejt felület ζ -potenciáljára kifejtett hatása között korreláció figyelhető meg. Anionos PE-kationos tenzid és kationos PE-anionos tenzid elegyek a sejtuszpenzió igen hatékony flokkuláló szereit, hozzáadásuk rosszul oldódó üledék formájában azonnal kicsapítja a sejteket. A Bti szuszpenzió polielektrolitokkal történő flokkuláltatása egy igen bonyolult, összetett folyamat, melynek törvényszerűségei a mozaikszerű sejt felülethez kapcsolódó mind pozitív, mind negatív töltésű makroionok kapcsolódásával, a polimeradszorpció és sejt-aggregálódás kinetikai aspektusaival, valamint az aggregálódásban szerepet játszó polimer-hídkötés és felületi töltés-csökkenés figyelembevételével magyarázhatók.

Köszönetnyilvánítás

A kutatás részben *BZAKA* finanszírozású belső kutatás, részben az *OTKA* által támogatott T 029033 sz. téma, valamint a 00493 sz. INTAS, és a Magyar-Izraeli 22/98 sz. Tét projekt keretében valósult meg, a nyújtott támogatásokat Sz.Á. és B.S. hálásan köszönik.

Hivatkozások

- Margalit, J.; Dean, D. *J. Am. Mosq. Control.* **1985**, *1*, 1.
- Ozer, N. *Mikrobiol. Bul.* **1983**, *17*, 63.
- Guan, X.; Chen, J.; Huang, Z.; Tang, Y.; Gao, R. *Chin. J. Biotechnol.* **1998**, *14*, 45.
- Bárány, S., Teszlenko A. *Magyar Kémiai Folyóirat.* **1992**, *12*, 463.
- Baran, A. A. (S. Bárány); Teszlenko, A. Ya. *Flokkulánsok a biotechnológiában*, Khimiya Kiadó: Leningrád, **1990**.
- Gregory, J. *Colloids and Surfaces.* **1988**, *31*, 231.
- Bárány, S. *Polimerek diszperz rendszerekben. A kémia újabb eredményei*, 88. Kötet, Akadémiai Kiadó: Budapest, **2000**.
- Baran, A. A.; *Colloids and Surfaces.* **1988**, *31*, 259.
- Baran, A. A.; Teszlenko, A. Ya.; Medvedev, Ju. V.; *Uspekhi kolloidnoj khimii*, Khimiya Kiadó: Leningrád **1991**, 358.
- Eriksson, L. B.; Hardin, A. M. *Flocculation in Biotechnology and Separation Systems*; Attia, Y. A., Ed.; Elsevier Publ.: New York, **1987**, pp. 441.
- Sneath, H.A.P. *Systematic Bacteriology. Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci*; Holt, J.G., Ed.; Williams & Wilkins Press: Baltimore, **1986**; pp. 1104-1111.
- Horváth, S. *Mikrobiológiai Praktikum*, Tankönyv kiadó: Budapest, **1980**. 465.
- Bárány, S.; Báder, E. *Magyar Kémiai Folyóirat.* **1998**, *104*, 47.
- Gregory, J.; Lee, S. Y. *J. Water SRT-Aqua.* **1990**, *39*, 265.
- Solementseva, I. M.; Tuszupbaev, N. K.; Baran, A. A. *Ukrainszkij Khim. Zsurnal.* **1980**, *46*, 929..
- Baran, A. A. *Polimerszorgyerzsacsstije diszpesznije szisztemi*, Nauková Dumka kiadó: Kijev, **1986**. 1-203 ol.
- Csempesz F., Rohrsetzer S. *Acta Chimica Acad.Scient. Hungaricae.* **1979**, *99*, 381.
- Lyklema, J. *Fundamentals of Interface and Colloid Science*, Academic Press: London- San Diego- New York- Boston- Sydney- Tokyo- Toronto, **1998**; Vol. 3.

Flocculation of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* (Bti) suspensions by polyelectrolytes and surfactant solutions.

By measuring the intensity of the scattered laser beam in a flowing system it has been shown that dilute suspensions of Bti bacteria (that are cultivated by microbiological method) can be effectively flocculated and concentrated using different cationic(SNFH528, Percol 1697 and DS grade) and anionic (SNFH 149, SNFH 57, Magnafloc 351 and Magnafloc 1011) polyelectrolytes that is necessary for its formulation and use as anti-mosquito agent. It has been shown that maximum and constant (within 7-8 minutes) degree of aggregation can be reached within 1-2 minute contact of added macromolecules with cells, and the optimum flocculant dosage necessary to reach maximum degree of flocculation substantially decreases with increasing the suspension concentration and it ranges between several tenth of mg polymer/100 million cell to several mg polymer/100 million. This feature is explained by the influence of kinetics factors and adsorbed polymer layer structure on the efficiency of flocculation. It is also shown that adding the optimal polymer dosage in two equal portions enhances the flocculation activity of the flocculant

compared to one-step addition, and the more concentrated (0.1 %) polyelectrolyte solution possess higher flocculation efficiency compared to the more diluted one (0.01%). We have found that Bti cells can be aggregated by cationic surfactants and, with especially good effect, using cationic-anionic surfactant mixtures. A correlation between the flocculating efficiency of surfactants and their effect on the zeta-potential of the cells is observed. Anionic PE- cationic surfactant and cationic PE-anionic surfactant mixtures have shown to be extremely powerful flocculants for the cellular suspension, their addition results in an immediate formation of compact precipitates of cells. Flocculation of cellular suspensions by polymers is a complicated process that can be explained by adsorption of negatively or positively charged macroions on the cell surface with mosaic structure having both positive and negative functional groups, taking into account the kinetics of polymer adsorption and kinetics of aggregation of cells having adsorbed polymers as well as the possible charge neutralization and polymer bridging mechanisms.