



LUNDS UNIVERSITET
Lunds Tekniska Högskola

Metallreducerande förmåga hos *Weissella* sp.

Kandidatarbete Livsmedelsteknik
Jesper Bengtsson & Michael Jones
Handledare: Olena Prykhodko & Ia Rosenlind
Examinator: Åsa Håkansson
2026-05-25

Innehållsförteckning

1. Inledning.....	5
1.1 Syfte.....	5
1.2 Frågeställning.....	6
2. Teori och bakgrund.....	6
2.1 Weissella sp.....	6
2.2 Biosorption.....	7
2.3 Exopolysaccharides (EPS).....	7
2.3 Koppar och Aluminium.....	8
2.3.1 CuSO ₄	8
2.3.2 Al ₂ (SO ₄) ₃	8
2.4 MRS-buljong.....	9
2.5 Spektrofotometer.....	9
2.5.1 Analys av koppar med hjälp av DDTC.....	9
2.5.2 Analys av aluminium med hjälp av aluminon.....	10
3. Material och metod.....	10
3.1 Kemikalier.....	10
3.2 Biologiskt material.....	10
3.3 Utrustning.....	10
3.4 Metod.....	11
3.4.1 Bakteriedodling.....	11
3.4.2 Beredning av lösningar.....	11
3.4.3 Inkubering.....	12
3.4.4 Centrifugering.....	12
3.4.5 Kopparanalys.....	13
3.4.6 Aluminiumanalys.....	13
3.4.7 Databehandling.....	13
4. Resultat.....	14
4.1 kalibreringskurvor.....	14
4.2 Bakterietillväxt.....	15
4.3 Metallanalys.....	15
4.4 statistisk analys.....	18
5. Diskussion.....	18
5.1 Tolkning av resultat.....	18
5.2 Bakterietillväxt.....	18
5.3 Kopparresultat.....	19
5.4 Aluminiumresultat.....	20
5.5 Felkällor och metodbegränsningar.....	20
5.6 Resultatens tillförlitlighet och jämförelse med tidigare studier.....	21
6. Slutsats.....	22
7. Referenser.....	23

Summary

Heavy metal contamination in the environment and food systems is an important issue from both environmental and food safety perspectives. Traditional methods for metal removal are often chemical based and may be resource intensive, creating a need for more sustainable biological alternatives. Lactic acid bacteria, including *Weissella* sp. have in previous studies demonstrated the potential to bind metal ions through biosorption.

The aim of this study was to investigate whether *Weissella* sp. could reduce the concentration of copper and aluminum ions at different concentrations and incubation times. The study was conducted as an experimental in vitro investigation, where bacterial growth was monitored using OD600 measurements and metal concentrations were determined spectrophotometrically after centrifugation and separation of the supernatant.

The results showed that *Weissella* sp. Was able to grow in the presence of both copper and aluminum. For copper, statistically significant reductions in concentration were observed after 6 hours of incubation, suggesting an initial interaction between the bacteria and copper ions. The aluminium results were less reliable, as the analytical method was strongly affected by pH changes, which complicated interpretation of the results.

Overall, the findings indicate that *Weissella* sp. may have the potential to interact with metal ions, particularly copper, but further studies with more robust and standardized methodology are required to confirm these findings and evaluate possible future applications in biological metal remediation.

Sammanfattning

Förekomsten av metalljoner i miljö och livsmedel är en viktig fråga ur både miljö och livsmedelssäkerhetsperspektiv. Traditionella metoder för metallreduktion är ofta kemiska och kan vara resurskrävande, vilket skapar behov av mer hållbara biologiska alternativ. Mjölksyrabakterier, inklusive *Weissella* sp. har i tidigare studier visat potential att binda metalljoner genom biosorption.

Syftet med denna studie var att undersöka om *Weissella* sp. kunde reducera koncentrationen av koppar och aluminiumjoner vid olika koncentrationer och inkubationstider. Studien genomfördes som ett experimentellt in vitro försök där bakterietillväxt analyserades med OD600 och metallkoncentrationen bestämdes spektrofotometriskt efter centrifugering och separation av supernatant.

Resultaten visade att *Weissella* sp. kunde växa i närvaro av både koppar och aluminium. För koppar observerades statistisk signifikanta minskningar i koncentration efter 6 timmars inkubering, vilket tyder på en initial interaktion mellan bakterierna och kopparjonerna. Aluminiumresultaten var mer osäkra, då analysmetoden påverkades av pH förändringar som försvårade tolkningen.

Sammantaget indikerar resultaten att *Weissella* sp. har potential att interagera med metalljoner, särskilt koppar, men ytterligare studier med mer robust metodik krävs för att bekräfta resultaten och undersöka möjlig framtida användning inom biologisk metallreduktion.

1. Inledning

Tungmetaller i miljö och livsmedel är en viktig fråga inom livsmedelssäkerhet eftersom förhöjda halter kan ha negativa effekter på både hälsa och miljö. Metaller som aluminium och koppar förekommer naturligt i miljön och vissa metaller är essentiella för biologiska processer. Vid förhöjda koncentrationer kan de dock bli toxiska och påverka växter, djur och människor negativt (Naturvårdsverket, 2026a).

Metaller är grundämnen som förekommer naturligt i berggrund, jord och vatten och kan inte brytas ned biologiskt. Även efter att ett aktivt utsläpp har upphört kan metaller finnas kvar i miljön under lång tid och spridas vidare till mark, sjöar och vattendrag. Detta kan leda till långvariga miljöproblem och påverka levande organismer negativt. Problemet är särskilt tydligt i områden kring metallindustrier där höga metallhalter ofta förekommer i mark och vatten. I Sverige sker den vanligaste exponeringen för metaller via livsmedel men även genom inandning av dammpartiklar som kan transporteras långa sträckor i luften (Naturvårdsverket, 2026a).

I denna studie undersöktes hur mjölksyrabakterien *Weissella* sp. kan användas för att reducera koncentrationen av koppar och aluminiumjoner, vid olika koncentrationer och inkubationstider. Tidigare studier har visat att mjölksyrabakterier har potential att binda och reducera metalljoner genom biosorption och andra interaktioner. De studierna inom området har fokuserat på tungmetaller såsom kadmium, där *Weissella viridescens* ZY-6 visat lovande resultat (Li et al., 2020). I föreliggande studie användes dock inte kadmium av praktiska och säkerhetsmässiga skäl, eftersom försöket genomfördes i undervisningslaboratorium vid Lunds universitet. Istället valdes kopparsulfat (CuSO_4) och aluminiumsulfat ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) som modellmetaller, då dessa är relevanta inom livsmedels och miljösammanhang samtidigt som de möjliggjorde ett säkrare experimentellt genomförande.

Weissella sp. är därför intressant som ett potentiellt alternativ för reduktion av tungmetalls koncentrationer och därmed möjlig minskning av metallers negativa påverkan på miljö och hälsa. Trots detta är studier specifikt kopplade till koppar och aluminium fortfarande begränsade, vilket gör området relevant att undersöka vidare.

1.1 Syfte

Syftet med denna studie var att undersöka om mjölksyrabakterien *Weissella* sp. kunde reducera koppar och aluminiumjoner genom biosorption vid olika koncentrationer och inkubationstider i MRS buljong. Studien syftade även till att analysera förändringar i metallkoncentration genom spektrofotometrisk metallanalys efter separering av bakteriebiomassa och supernatant via centrifugering. Genom att undersöka förmågan att reducera metallkoncentrationen hos *Weissella*

sp. kan studien bidra till ökad kunskap inom livsmedelsmikrobiologi och potentiella biologiska metoder för reduktion av metallkoncentrationer i livsmedel och miljö.

1.2 Frågeställning

1. Har *Weissella* sp. förmåga att reducera koncentrationen av koppar och aluminiumjoner?
2. Finns det skillnader i hur *Weissella* sp. interagerar med koppar respektive aluminiumjoner?
3. Hur förändras metallkoncentrationen i supernatanten efter olika inkubationstider (0 h, 6 h & 24 h).

2. Teori och bakgrund

2.1 *Weissella* sp.

Weissella är av släktet grampositiva fakultativt anaeroba mjölksyrabakterier. *Weissella* stammen har även påträffats i den mänskliga tarmfloran, där den har visat sig vara en av de essentiella cellulosanedbrytande släktena. Det vill säga en specialiserad enzymatisk mjölksyra för att bryta ner polysackarider för att skydda tarmbarriären. (Ma et al., 2025). Att *Weissella* är en fakultativ anaerob mjölksyrebakterie innebär att den har en unik förmåga att kunna anpassa sig i olika miljöer med eller utan syre (André et al., 2012). *Weissella* släktet finns inte bara enbart i tarmfloran utan man finner även denna i olika spontan fermenterade grönsaker (Ahmed et al., 2022) Med dess unika och mångsidiga egenskaper har *Weissella* bakterien visat sig ha en potential inom både den probiotiska och industriella tillämpningar (Ma et al., 2025).

Som en mångsidig mjölksyrebakterie har *Weissella* visat funktionella egenskaper när det gäller att binda tungmetaller via biosorption. *Weissellas* egenskap att binda åt sig tungmetaller kan appliceras som en funktionell miljösanering både i ett industriellt perspektiv men även inom livsmedelsbranschen som en gynnsam probiotika samtidigt som den absorberar tungmetaller (Ma et al., 2025).

I studien (Li et al., 2020) har de använt sig av en lactic acid bacteria (LAB) *Weissella viridescens* ZY-6 för att se dess biosorption av kadmium. I deras studie visade de hur mjölksyrabakterier *Weissella* kunde tillämpas som biosorption av tungmetall specifikt kadmium. Detta gjordes i syfte att använda sig av LAB som är en probiotisk stam som är livsmedelsklassad och anses vara säker inom livsmedelsindustrin. Men för att se om *Weissella* har potentialen att biologisk adsorption för att kunna reducera tungmetallkoncentrationen. Att använda sig av en biologisk adsorption har även sina fördelar där den kostar mindre, tillgängligheten och förnybar jämfört med det traditionella kemiska sättet att göra det på (Li et al., 2020).

2.2 Biosorption

Biosorption är en metod där man använder sig av bakterier och växter för att reducera eller sanera miljöföroreningar från tungmetaller, den process kallas även bioremediering.

Bioremediering är en av de mer vanliga metoderna att använda sig av vid rening av tungmetaller i förorenade miljöer. Metoden används med hjälp av biologiska hjälpmedel såsom bakterier eller växter för att reducera föroreningar och återställa förorenade miljöer på ett mer hållbart sätt för att återställa miljön till sitt normala tillstånd. (Priya et al., 2022).

Denna metod har fått uppmärksamhet för sina miljömässiga fördelar samt ekonomiska fördelar jämfört med de mer traditionella adsorption-metoden där man använder kemiskt alternativ eller aktivt kol. Dessa traditionella metoder har visat sig vara effektiva men har även visat sig vara väldigt dyra (Farooq et al., 2010). Därför söker man efter nya alternativ och det är här biosorption med bakterier visat sig vara ett bra alternativ jämfört med det traditionella sättet att använda sig av kemiska alternativ.

Här har man sett en fördel med biosorption såsom sina miljömässiga och ekonomiska fördelar där man kan se ett mer hållbart sätt att reducera tungmetaller gentemot det traditionella kemiska (Priya et al., 2022). Biosorption är en process som fungerar att bakterien eller växterna som är biosorbent binder till sig metalljonerna på ytan. Detta har visat sig vara en effektiv metod att binda tungmetaller på ett effektivt och miljövänligt vis som kan appliceras i industrin som ett mer hållbart sätt att reducera tungmetaller (Priya et al., 2022).

Det har gjorts studier på biosorption med *Weissella* och de har sett att det är väldigt pH-känslig process och varierar mellan vilken typ av tungmetall som används. pH-värdet har varit en kritisk punkt för att uppnå optimala resultat (Shrestha et al., 2021). Enligt (Li et al., 2020) i deras studie där de kolla biosorption av kadmium med *Weissella viridescens* ZY-6 testade de olika pH-värdena där de kunde se att det hade en betydelse parameter för slut resultatet av biosorption där de fick bäst resultat runt pH 6.0 (Li et al., 2020).

2.3 Exopolysaccharides

Exopolysaccharide (EPS) återfinns i en mängd olika grampositiva samt gramnegativa bakterier såsom *Weissella sp.* EPS har en biologisk roll att skydda bakteriernas celler mot oönskade förhållanden såsom temperaturer, salthalter, pH-förändringar samt metalljoner och fungera som en hinna runt bakteriecellerna (Netrusov, A et al., 2023). EPS består av största delen av polysackarider och kan skapa en negativ laddning. Den negativa laddningen skapar en tät grupp celler som sitter samman som attraherar med positiva metalljoner. Genom att utnyttja EPS förmåga att skapa denna täta sammansättning av celler bidrar denna process till flera ytor och

möjligheter att binda åt sig metalljoner som i sin tur förbättrar biosorption (Anchal, S et al., 2026).

I studien av (Jin, H et al., 2019) undersökte de åtta olika modifierade MRS-buljonger för att optimera EPS-tillväxten hos *Weissella confusa* VP30. Studiens syfte var att tillsätta olika sockerarter för att öka tillväxten av EPS där resultatet visade att sackaros var en viktig komponent för att öka EPS-tillväxten (Jin, H et al., 2019).

EPS är ett sätt för bakterier att skydda sig mot metalljoner genom att bilda ett skyddande lager runt cellen. EPS skyddar bakteriens cellyta och minimerar risken för att metalljoner tar skada på cellmembranet. Biosorption sker genom interaktion mellan positivt laddade metalljoner och negativt laddade EPS och mikrobiella celler där bindningen framförallt sker på cellytan. Interaktionen mellan EPS och mikrobiella celler har visat sig vara en viktig faktor för att optimera biosorption från föroreningar (Netrusov, A et al., 2023).

2.3 Koppar och Aluminium

2.3.1 CuSO₄

Kopparsulfat CuSO₄ är ett vattenlösligt salt som skapas genom att kombinera koppar med svavelsyra. Genom att kombinera dessa två skapar man en oorganisk förening som bildar blåa stora kristaller. Inom industrin används kopparsulfat framförallt som ett bekämpningsmedel inom jordbruk (National Center for Biotechnology Information, 2026a).

Koppar har både en positiv och negativ påverkan på miljön eftersom ämnet är livsnödvändigt, dock vid för höga halter kan det vara skadligt för vattenlevande organismer. Tidigare kom spridningen av koppar främst från metallindustrin där utsläppet transporterades via luften. Detta har dock minskat tack vare mer effektivare reningstekniker som används inom dagens industrier.

I dagsläget kommer den huvudsakliga spridningen av kopparföroreningar från bilars bromsbelägg. Människor får i sig koppar via luft, livsmedel som konsumeras men även genom dricksvattnet (Naturvårdsverket, 2026).

2.3.2 Al₂(SO₄)₃

Aluminiumsulfat Al₂(SO₄)₃ är ett fast färglöst vitkristall som är vattenlösligt. Aluminiumsulfat är ett aluminiumsalt som bildas med hjälp av svavelsyra som tillämpas i många olika industrier. Aluminiumsulfat används framförallt inom avloppsreningsverk, byggindustrin samt inom rening av dricksvatten (National Center for Biotechnology Information, 2026b).

Aluminium likt koppar återfinns i dricksvatten samt i de livsmedel vi konsumerar dagligen. Aluminium finns i en stor mängd av våra dagliga produkter. Vi använder oss idag av aluminium både inom förpackningar men även köksutrustning såsom stekpannor och kastruller. Att använda sig av aluminiumförpackningar och förvara sura livsmedel kan detta med hjälp av pH-sänkningen lösa ut aluminium och öka mängden aluminium som återfinns i maten. Mängden aluminium som återfinns i livsmedel och dricksvatten har med den kunskapen vi har idag ingen större negativ påverkan på hälsan om man är generellt frisk, detta är ett undantag om man har en nedsatt njurfunktion då kan man vara känslig för större intag av aluminium (Livsmedelsverket, 2025)

2.4 MRS-buljong

MRS-buljong (de Man, Rogosa and Sharpe broth) är ett näringsrikt odlingsmedium som används för odling av mjölksyrabakterier, särskilt arter inom släkten såsom *Lactobacillus* och *Weissella* eftersom det innehåller komponenter som främjar deras tillväxt och metabolism. MRS-buljong innehåller bland annat pepton, kött och jästextrakt, glukos, polysorbit 80 samt olika salter. Dessa komponenter fungerar som källor till kol, kväve, vitaminer och mineraler som bakterierna behöver för tillväxt. Mjölksyrabakterier använder främst kolhydrater som energikälla genom fermentativa metaboliska processer. Glukosen i MRS-medium fungerar därför som en viktig energikälla för bakteriernas tillväxt och reproduktion. Under fermenteringen bildas organiska syror, vilket kan leda till att pH i mediet successivt sjunker (De Man et al., 1960).

2.5 Spektrofotometer

Spektrofotometri är en analytisk metod där koncentrationen av ett ämne bestäms genom att mäta hur mycket ljus som absorberas vid en specifik våglängd. Metoden bygger på Beer-Lamberts lag, där absorbansen är proportionell mot koncentrationen inom ett linjärt område (Harris, 2020). För att bestämma koncentrationen av okända prover används standardkurvor, där absorbansen för lösningen med kända koncentrationer mäts och jämförs med provens absorbans. Om lösningen följer Beer-Lamberts lag erhålls ett linjärt samband mellan absorbans och koncentration (Marczenko & Balcerzak, 2000 sid.26-38).

2.5.1 Analys av koppar med hjälp av DDTC

DDTC (natriumdietylditiokarbamat) är en vanlig färgreagens inom spektrofotometrisk metallanalys och används särskilt för bestämning av kopparjoner. Reagenset reagerar med Cu^{2+} och bildar ett färgat Cu(DDTC)_2 -komplex som absorberar ljus vid cirka 435 nm. Absorbansen kan därefter mätas med spektrofotometer och användas för att uppskatta metallkoncentrationen i lösningen (Uddin et al., 2013). DDTC används ofta inom analytisk kemi eftersom komplexet med koppar är relativt stabil och ger tydlig färgutveckling. Spektrofotometriska analyser med

DDTC påverkas dock av flera faktorer, exempelvis pH, reaktionstid och förekomst av andra metalljoner eller organiska ämnen i lösningen. Studien av Uddin et al. visade att Cu(DDTC)_2 -komplexet hade maximal absorbans vid 435 nm och att färgutvecklingen var beroende av bland annat pH och reagenskoncentration (Uddin et al., 2013). I komplexa lösningar kan även matriseffekter uppstå, där komponenter i provet interagerar med metalljoner eller färgreagens och därmed påverkar absorbansen. Detta kan leda till variationer i analysresultaten och är viktigt att ta hänsyn till vid spektrofotometrisk metallanalys (Uddin et al., 2013).

2.5.2 Analys av aluminium med hjälp av aluminon

Spektrofotometriska metoder för aluminiumanalys bygger på att aluminiumjoner bildar färgade komplex med olika organiska färgreagens. Aluminium förekommer i lösning huvudsakligen som Al^{3+} och dess kemiska form påverkas starkt av pH. Aluminiumhydroxid börjar precipiteras vid omkring pH 4 och vid högre pH kan aluminium övergå till hydroxokomplex och aluminatformer (Marczenko & Balcerzak, 2000 sid.83-91) I denna studie används aluminon som färgreagens för analys av aluminium. Aluminon bildar ett rödaktigt komplex med aluminiumjoner som kan analyseras spektrofotometriskt vid cirka 522 nm.

Färgintensiteten är proportionell mot koncentrationen av aluminium inom ett begränsat linjärt område. Analysen påverkas dock av flera faktorer såsom pH, komplexbildning och matriseffekter. Förändringar i pH kan påverka både aluminiumjonernas kemiska form och färgreagensets färgutveckling. I komplexa lösningar som MRS-medium kan organiska ämnen, salter och andra komponenter dessutom integrera med aluminiumjoner och påverka absorbansen. Sådana matriseffekter kan ge variationer i analysresultaten och påverka metodens tillförlitlighet (Marczenko & Balcerzak, 2000 sid.53-73).

3. Material och metod

3.1 Kemikalier

- MRS-buljong (de Man, Rogosa and Sharpe broth)
- Kopparsulfat (CuSO_4)
- Aluminiumsulfathexadekahydrat, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 16\text{H}_2\text{O}$
- Natriumdietylditiokarbamat (DDTC), 0,1 %
- Aluminon, 0,1%
- Natriumhydroxid (NaOH)
- Avjoniserat vatten

3.2 Biologiskt material

- *Weissella* sp. Bakterier isolerades från fermenterat ris från södra Indien. Bakterier identifierades som *Weissella confusa* / *Weissella cibaria* (Pavithra Sivakumar, 2020).

3.3 Utrustning

- Autoklav
- Spektrofotometer
- Centrifug
- Inkubator
- Vortexblandare
- pH-mätare
- Falconrör
- Kuvetter
- Mikropipetter och pipettspetsar
- Mätkolvar och bägare
- Provrör/ställ
- Analytisk våg
- Magnetomrörare
- kyl/frys

3.4 Metod

3.4.1 Bakterieodling

Bakteriestammen *Weissella* odlades i MRS-buljong (De Man, Rogosa and Sharpe broth). 25 ml Steril MRS fördelades aseptiskt i ett sterilt Falconrör och inokulerades med bakteriekultur. Detta inkuberades i 37°C under cirka 24 timmar för att erhålla aktiv bakterietillväxt inför försöket. Före försöksstart justerades bakteriekulturen till en optisk densitet på cirka 0,1 vid 600 nm (OD600) för att standardisera mängden bakterier mellan proverna.

3.4.2 Beredning av lösningar

MRS buljong framställdes genom upplösning av MRS pulver i avjoniserat vatten enligt tillverkarens anvisningar. Mediet steriliserades därefter genom autoklivering före användning. MRS buljongen förvarades i 4°C under hela experimentet.

En stamlösning av koppar framställdes från en CuSO₄ lösning med koncentrationen 1000 mg/L. Från stamlösningen bereddes arbetslösningar med önskade koncentrationer genom spädning med MRS medium.

För försöken användes koncentrationerna 50 mg/L och 100 mg/L.

För 50 mg/L användes:

- 22,5 ml MRS
- 1,25 ml bakteriekultur
- 1,25 ml CuSO₄ stocklösning (1000 mg/L)

Vilket gav en totalvolym på 25 ml, tre stycken replikat.

För 100 mg/L prover användes:

- 21,25 ml MRS
- 1,25 ml bakteriekultur
- 2,5 ml CuSO₄ stocklösning (1000 mg/L)

Vilket gav en totalvolym på 25 ml, tre stycken replikat.

Kontrollprover utan bakterier framställdes genom att ersätta bakteriekulturen med motsvarande volym MRS, två stycken replikat per koncentration. Ett ytterligare kontrollprov innehållande endast MRS och bakteriekultur utan tillsatt metall inkluderas också för att följa bakterietillväxt och bakgrundseffekter från mediet genom att ersätta metalllösning med motsvarande volym MRS, två stycken replikat.

En stamlösning av aluminium framställdes från Aluminiumsulfathexadekahydrat, Al₂(SO₄)₃·16H₂O. För att erhålla en aluminiumkoncentration på 1000 mg/L vägdes 1,168 g salt upp och löstes i avjoniserat vatten till en slutvolym av 100 mL Arbetslösningar för aluminium framställdes därefter genom spädning av stamlösningen med MRS medium enligt samma princip för kopparlösningarna.

3.4.3 Inkubering

Efter beredning fördelades proverna i sterila Falconrör av plast. Samtliga prover homogeniserades genom vortexblandning.

Proverna inkuberades vid 30 °C under olika tider:

- 0 h
- 6 h
- 24 h

Vid respektive tidpunkt togs 5 ml prov ut från varje falconrör för vidare provhantering och analys av OD600 bakterietillväxt.

0 h prover användes främst som initial referenspunkt för metallkoncentration och inkluderades därför inte i samtliga resultatdiagram

3.4.4 Centrifugering

Efter avslutad inkubering centrifugerades proverna vid 5000 x g i 20 minuter för att separera bakterieceller från supernatanten. Efter centrifugering överfördes supernatanten aseptiskt till nya sterila falconrör för vidare metallanalys. Vissa prover förvarades frysta före analys för att möjliggöra samtidigt analys av flera tidpunkter.

3.4.5 Kopparanalys

Kopparhalten analyserades spektrofotometriskt med hjälp av natriumdietylditiokarbamat (DDTC) som färgreagens. DDTC lösningen användes i koncentrationen 0,1%.

Kalibreringskurvor framställdes i MRS medium för att minimera matriseffekter.

Standardlösningar med koncentrationerna:

- 25 mg/L
- 12,5 mg/L
- 6,25 mg/L
- 3,12 mg/L
- 1,56 mg/L

Bereddes genom stegvisa spädningar.

Inför analys späddes prover och standarder lika mycket för att anpassa koncentrationerna till spektrofotometerns mätområde samt för att minska matriseffekter från MRS-mediet. Detta gjordes genom att 1 ml prov eller standard blandades med 4 ml avjoniserat vatten följt av tillsats av 1 ml DDTC lösning. Som blank användes 1 ml MRS, 4 ml avjoniserat vatten och 1 ml DDTC. Absorbans och koncentration avlästes med spektrofotometer vid 435 nm.

3.4.6 Aluminiumanalys

Aluminiumhalten analyserades spektrofotometriskt med aluminon som färgreagens.

Aluminonlösningen användes i koncentrationen 0,1%. Även för aluminium framställdes kalibreringskurvor i MRS medium med samma koncentrationsintervall som användes för kopparanalysen. Prover och standarder späddes före analys enligt samma princip, 1 ml prov eller standard, 4 ml avjoniserat vatten och därefter tillsattes aluminonlösning.

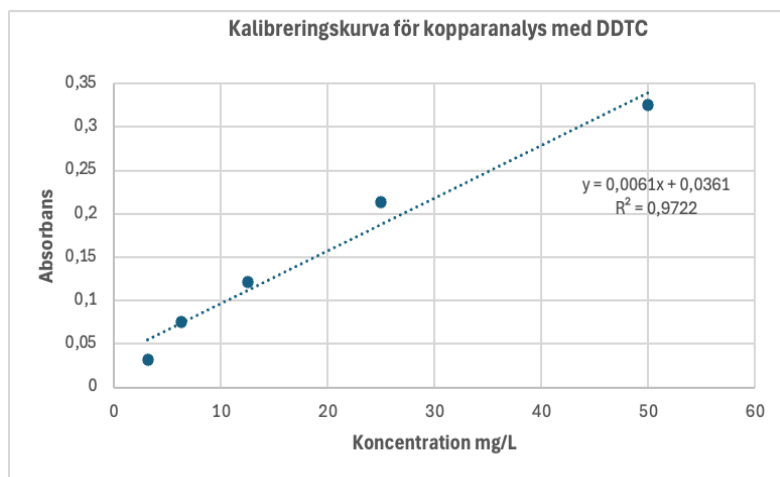
3.4.7 Databehandling

Metallkoncentrationerna jämfördes mellan kontrollprover och bakterieprover vid olika inkuberingstider. Förändringar i metallkoncentration över tid användes för att bedöma eventuell biosorption eller metallupptag av bakterierna. På grund av observerade matriseffekter och pH beroende färgreaktioner tolkades resultaten huvudsakligen relativt mellan olika tidpunkter och provtyper.

För att undersöka om förändringar i metallkoncentration över tid var statistiskt signifikanta genomfördes ett tvåsidigt parat t-test (paired t-test) i Excel. Jämförelser gjordes mellan 0 h och 6 h samt mellan 0 h och 24 h för prover innehållande *Weissella* sp. Signifikansnivån sattes till $p < 0,05$.

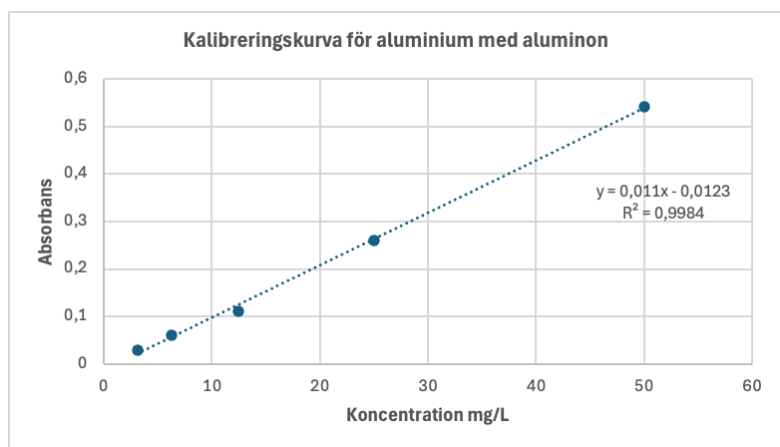
4. Resultat

4.1 kalibreringskurvor



Figur 1. Kalibreringskurva för kopparanalys med DDTC

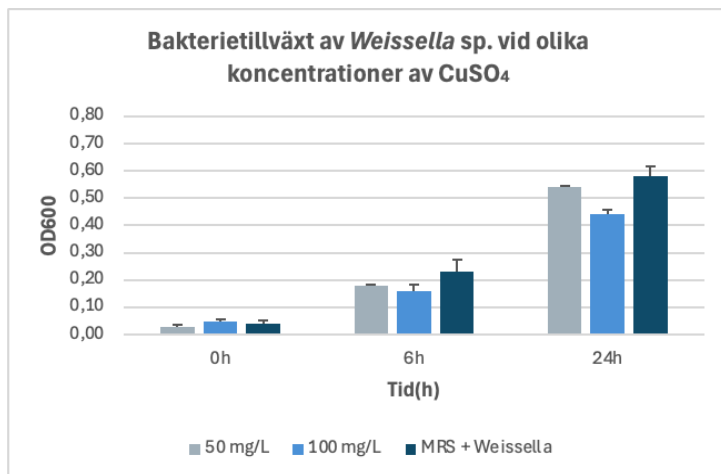
Kalibreringskurva för CuSO_4 framställd med DDTC som färgreagens och analyserad vid 435 nm. Kurvan visade god linjäritet med ett R^2 värde på 0,9722.



Figur 2. Kalibreringskurva för aluminiumanalys med aluminon

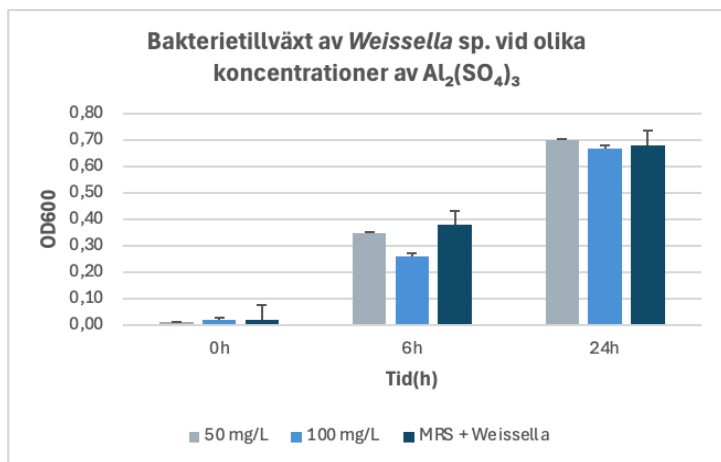
Kalibreringskurva för aluminium framställd med aluminon som färgreagens och analyserad vid 522 nm. Kurvan visade god linjäritet med ett R^2 värde på 0,9984.

4.2 Bakterietillväxt



Figur 3. Tillväxt av *Weissella* sp. vid olika koncentrationer av CuSO_4

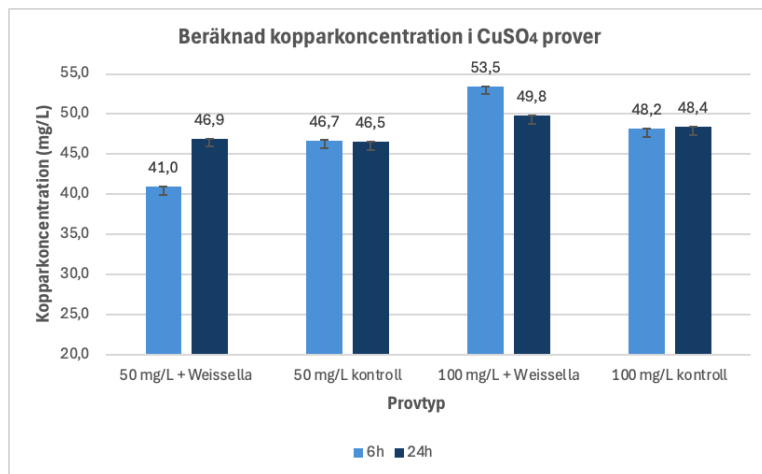
Bakterietillväxt mättes som optisk densitet vid 600 nm (OD600) efter 0 h, 6 h, och 24 h inkubation. Kontrollprovet innehöll endast MRS och *Weissella* utan tillsatt metall.



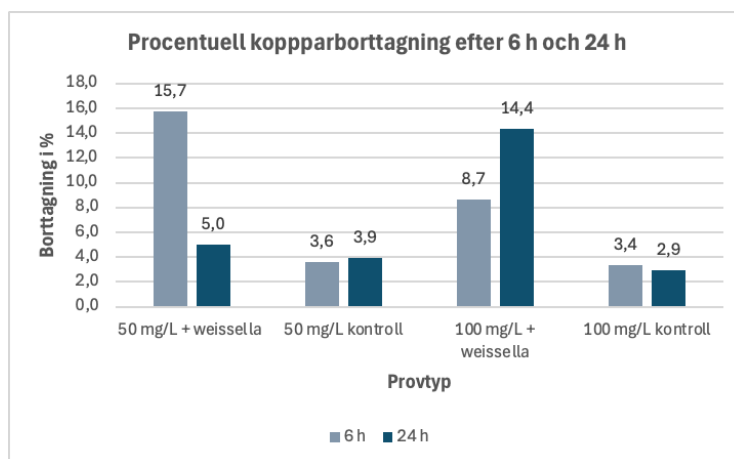
Figur 4. Bakterietillväxt av *Weissella* sp. vid olika koncentrationer av $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$

Bakterietillväxt vid 50 och 100 mg/L av $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ mättes som optisk densitet vid 600 nm (OD600) efter 0 h, 6 h, och 24 h inkubation. Kontrollprovet innehöll endast MRS och *Weissella* utan tillsatt metall.

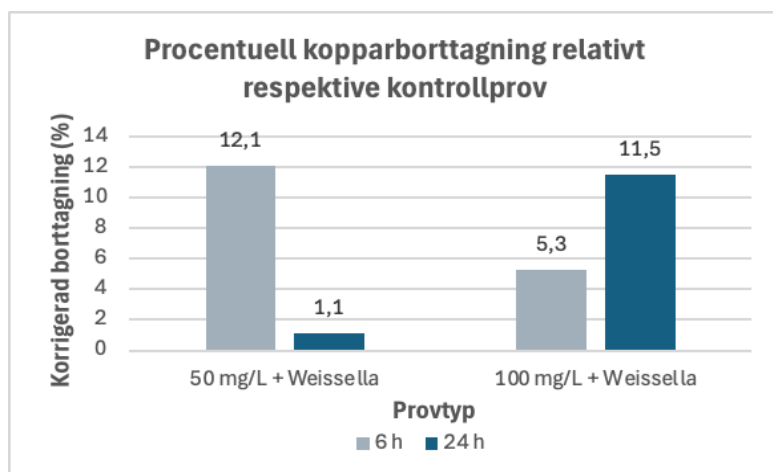
4.3 Metallanalys



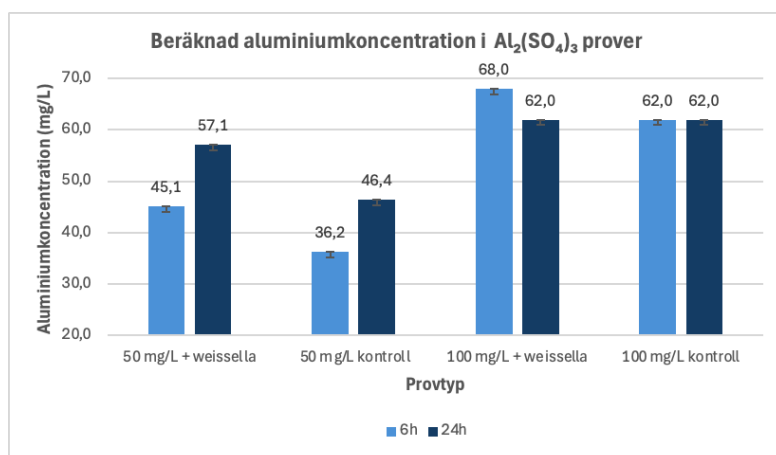
Figur 5. Beräknad kopparkoncentration i CuSO₄-prover efter 6 och 24 timmars inkubering
Kopparkoncentrationen (mg/L) beräknades utifrån kaliberingskurvans ekvation baserat på spektrofotometriska absorptionsmätningar vid 435 nm. Prover innehållande Weissella sp. jämfördes med motsvarande kontrollprover utan bakterier.



Figur 6. Procentuell minskning av koppar efter 6 och 24 h
Metallborttagning (%) beräknades relativt respektive 0 h-prov. Bakterieprover innehållande Weissella sp. jämförs med kontrollprover utan bakterier.



Figur 7. Kontrollkorrigerad procentuell minskning av koppar efter 6 och 24 h inkubering. Värdena beräknades genom att subtrahera respektive kontrollprovs procentuella kopparborttagning från motsvarande bakterieprov vid samma koncentration och tidpunkt.



Figur 8. Beräknad aluminiumkoncentration i $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ -prover efter 6 och 24 timmars inkubering

Aluminiumkoncentrationen (mg/L) beräknades utifrån kaliberingskurvans ekvation baserat på spektrofotometriska absorptionsmätningar vid 522 nm. Prover innehållande *Weissella sp.* jämfördes med motsvarande kontrollprover utan bakterier.

Under försöket observerades att aluminiumreaktionen påverkades kraftigt av pH. Prover med lägre pH gav tydligare röd färgutveckling än prover med högre pH. Detta observerades även i kontrollprover utan bakterier, vilket indikerade att pH hade stor påverkan på metodens respons. Eftersom 0 h proverna för aluminium visade avvikande värden redovisas resultaten främst som absorptions vid 6 h och 24 h istället för procentuell metallborttagning.

4.4 statistisk analys

Tabell 1. P-värden från parat t-test för jämförelse av kopparkoncentration mellan 0 h och senare tidpunkter i prover innehållande *Weissella* sp.

Grupp	Jämförelse	p-värde
50 mg/L CuSO ₄ + <i>Weissella</i>	0 h vs 6 h	0,016
50 mg/L CuSO ₄ + <i>Weissella</i>	0 h vs 24 h	0,294
100 mg/L CuSO ₄ + <i>Weissella</i>	0 h vs 6 h	0,020
100 mg/L CuSO ₄ + <i>Weissella</i>	0 h vs 24 h	0,159

Ett tvåsidigt parat t-test genomfördes i Excel för att undersöka förändringar i kopparkoncentration över tid. Signifikansnivån sattes till $p < 0,05$.

Statistisk analys genomfördes endast för kopparproverna, eftersom aluminiumprovernas 0 h värden bedömdes som otillförlitliga på grund av metodologiska begränsningar kopplade till pH-känslighet i aluminonanalysen.

5. Diskussion

5.1 Tolkning av resultat

Syftet med denna studie var att undersöka om mjölksyrabakterien *Weissella* sp. kunde reducera koppar och aluminiumjoner genom biosorption vid olika koncentrationer och inkubationstider. Resultaten indikerade att *Weissella* sp. hade en viss påverkan på kopparkoncentrationen, särskilt vid 50 mg/L där bakterieprover visade lägre kopparkoncentration än motsvarande kontrollprover efter 6 timmars inkubation. Detta kan tyda på att bakterierna hade förmåga att binda eller på annat sätt interagera med kopparjoner i lösningen. Vid 24 timmars inkubering var skillnaderna mellan bakterieprover och kontrollprover mindre tydliga, vilket kan indikera att den initiala metallbindningen minskade över tid eller att andra faktorer i systemet påverkade resultaten.

5.2 Bakterietillväxt

Bakteriekulturen standardiserades vid försöksstart till cirka OD₆₀₀ 0,1, vilket förklarar de låga värdena vid 0 h. Efter inkubering ökade OD₆₀₀ tydligt i samtliga prover vilket visar att *Weissella* sp. växte under försöksperioden även i närvaro av koppar och aluminiumjoner.

Som visas i figur 3 var bakterietillväxten i kopparproverna efter 24 h lägre vid 100 mg/L jämfört med 50 mg/L samt kontrollprovet med endast MRS och *Weissella* sp. Detta tyder på att den högre kopparkoncentrationen kan ha haft en hämmande effekt på bakterietillväxten. Trots detta observerades fortsatt tillväxt även vid 100 mg/L, vilket visar att bakterierna inte helt hämmades av kopparhalten.

För aluminiumproverna var skillnaderna i OD600 mellan 50 mg/L, 100 mg/L och kontrollprovet mindre tydliga efter 24 h inkubering, vilket framgår av figur 4. Detta tyder på att *Weissella* sp. växte relativt väl även i närvaro av aluminium under de använda försöksförhållandena.

Bakterietillväxten är viktig att ta hänsyn till vid tolkning av metallresultaten, eftersom mängden biomassa kan påverka hur mycket metall som kan bindas eller interagera med bakteriecellerna. Samtidigt visar tillväxtresultaten att försöket genomfördes med livskraftiga bakterier, vilket stärker tolkningen av metallförändringarna.

5.3 Kopparresultat

Resultaten för koppar antyder att *Weissella* sp. kan ha en viss metallreducerande förmåga särskilt vid lägre koncentrationer. Som framgår i figur 5 observerades, vid 50 mg/L, lägre kopparkoncentration i bakterieprover jämfört med kontrollprover, vilket kan förklaras genom biosorption där metalljoner binder sig till funktionella grupper i bakteriernas cellvägg. Detta stöds även av figur 6 och 7, där den procentuella kopparborttagningen var högre i bakterieproverna, särskilt efter 6 h inkubering. Detta tyder på att *Weissella* sp. kan ha haft en initial påverkan på kopparkoncentrationen.

För 100 mg/L resultaten var mindre tydliga då både bakterieprover och kontrollprover visade lägre koncentrationer än förväntat. Eftersom även kontrollproverna avvek tyder detta på att avvikelserna sannolikt inte berodde på biologisk aktivitet utan snarare på metodologiska begränsningar.

Kalibreringskurvan för koppar omfattade koncentrationer upp till 50 mg/L, men samtliga prover analyserades efter samma spädning (1:4), vilket innebär att även prover med initial koncentration på 100 mg/L hamnade inom kalibreringskurvans mätområde. Som framgår av figur 1 uppvisade kopparanalysen en god linjäritet, vilket stärker metodens tillförlitlighet. Trots detta observerades avvikelser vid de högre koncentrationerna, även i kontrollproverna, vilket tyder på att andra metodologiska faktorer såsom matriseffekter eller variation i provhantering kan ha påverkat resultaten.

Standarder och prover späddes på samma sätt för att minska påverkan från MRS-buljongens bakgrundsfärg, matriseffekter kan fortfarande ha påverkat färgreaktion mellan koppar och

DDTC. MRS-buljongen innehåller organiska ämnen såsom peptoner, jästextrakt och andra ämnen som potentiellt kan interagera med kopparjoner genom komplexbildning. Detta kan minska mängden fria kopparjoner som reagerar med DDTC och därmed ge lägre uppmätta koncentrationer än den teoretiskt tillsatta mängden.

5.4 Aluminiumresultat

Till skillnad från koppar var aluminiumresultaten betydligt svårare att tolka. Som framgår av figur 8 observerades variationer i aluminiumkoncentration mellan prover och tidpunkter, men resultaten var mindre tydliga och svårare att tolka. En tydlig observation var att aluminonanalysen påverkades kraftigt av lösningens pH, där prover med lägre pH uppvisade betydligt starkare färgutveckling än prover med högre pH. Detta överensstämmer med tidigare litteratur där aluminiumjonernas kemiska form beskrivs som starkt pH beroende. Vid förändrade pH förhållanden kan aluminium förekomma som fria joner, hydroxidkomplex eller utfällningar, vilket påverkar hur effektivt aluminon kan bilda färgade komplex. Detta blev särskilt tydligt eftersom 24 h proverna uppvisade betydligt starkare färgutveckling än 0 och 6 timmars proverna.

I Li et al., (2020) beskrivs hur känsligt kadmium är av pH-förändringar, där förändringar i surhetsgrad kan ha stor betydelse för metalljoners tillgänglighet och bindning. Detta visade sig vara ett kritiskt moment även för aluminiumanalysen. Efter 24 h inkubering uppmättes en pH-värden omkring 4,5, vilket sannolikt påverkade både aluminiumjonernas kemiska form och färgutvecklingen i analysen. För att möjliggöra tydligare analys justerades pH i vissa prover efter centrifugering till cirka 4,5 - 5. Eftersom *Weissella sp.* är en mjölksyrabakterie som producerar organiska syror under tillväxt är det rimligt att pH sjönk under inkubationstiden. Denna pH förändring var svår att kontrollera inom ramen för försöket och kan ha varit en bidragande faktor till variationen i aluminiumresultaten.

5.5 Felkällor och metodbegränsningar

Flera metodologiska faktorer kan ha påverkat studiens resultat och bör tas i beaktning vid tolkningen. Den mest betydande begränsningen var aluminiumanalysen, där aluminon visade tydlig känslighet för förändringar i pH. Eftersom aluminiumjonerna kemiska form påverkas starkt av lösningens surhetsgrad kan förändringar i pH ha påverkat färgutvecklingen och därmed de uppmätta resultaten. Detta innebär att förändringar i absorbans eller beräknad koncentration inte nödvändigtvis endast speglar biologisk metallreduktion.

För att möjliggöra tydligare analys av vissa aluminiumprover behövde pH justeras före analys. Eftersom aluminonreaktionen är känslig för även mindre förändringar i pH innebar detta att analysförhållandena inte var helt identiska mellan samtliga prover. Detta kan ha påverkat jämförbarheten mellan proverna. Analysen var dessutom praktiskt utmanande då många prover

analyserades samtidigt, vilket gjorde det svårt att säkerställa exakt samma behandling av varje prov inom samma tidsintervall.

För kopparanalysen observerades att prover med initial koncentration på 100 mg/L visade lägre koncentrationer än förväntat, även i kontrollprover utan bakterier. Eftersom både standarder och prover späddes på samma sätt före analys minskades påverkan från bakgrundsfärg i mediet, men resultaten tyder ändå på att metodens precision var begränsad vid högre koncentrationer.

En ytterligare metodologisk begränsning var centrifugeringssteget. Syftet med centrifugeringen var att separera bakteriebiomassan från supernatanten inför metallanalysen. Vid 0 och 6 h proverna observerades dock otillräcklig separation, både vid centrifugering vid 5000 x g i 15-20 minuter och vid 10 000 x g i 15 minuter. Däremot uppvisade 24 h proverna tydligare separation mellan pellet och supernatant. Detta kan bero på att bakterietillväxten efter längre inkubation gav ökad biomassa eller större cellaggregat, vilket underlättade sedimentering. Den otillräckliga separationen vid tidigare tidpunkter kan ha inneburit att cellmaterial eller metallbundet biomassa fanns kvar i supernatanten, vilket kan ha påverkat metallanalysen.

5.6 Resultatens tillförlitlighet och jämförelse med tidigare studier

Resultatens tillförlitlighet varierade mellan de två metallanalyserna. Som visas i figur 1 och figur 2 visade båda kalibreringskurvorna god linjäritet, med R^2 -värden på 0,9722 för kopparanalysen respektive 0,9984 för aluminiumanalysen. Detta indikerar att de spektrofotometriska analysmetoderna i grunden hade god förmåga att mäta metallkoncentration inom det valda koncentrationsintervallet.

Trots detta bedöms kopparresultaten som mer tillförlitliga än aluminiumresultaten, eftersom kopparanalysen uppvisade stabil färgutveckling, fungerade kalibreringskurva och jämförbara mätförhållanden mellan tidpunkterna. Aluminiumresultaten var däremot mer osäkra, eftersom vissa aluminiumprover behövde pH justeras för att möjliggöra tydlig färgutveckling kunde analysförhållandena inte hållas helt identiska mellan samtliga prov, vilket minskar resultatens tillförlitlighet.

Som visas i tabell 1 genomfördes statistisk analys för kopparproverna för att undersöka om förändringar i metallkoncentration över tid var statistiskt signifikanta. Resultaten visade signifikanta minskningar mellan 0 h och 6 h för både 50 mg/L ($p = 0,016$) och 100 mg/L ($p = 0,020$) i prover innehållande *Weissella* sp. Däremot observerades inga statistiskt signifikanta skillnader mellan 0 h och 24 h ($p > 0,05$). Detta tyder på att *Weissella* sp. kan ha haft en initial påverkan på kopparkoncentrationen, men att variationen mellan replikaten ökade vid senare tidpunkter.

Statistisk analys genomfördes inte för aluminiumproverna, eftersom de initiala 0 h värdena bedömdes som mindre tillförlitliga på grund av metodologiska begränsningar i analysmetoden. Aluminiumresultaten bör därför främst tolkas som indikativa observationer snarare än statistiskt säkerställda effekter.

Tidigare studier har visat att mjölksyrabakterier kan reducera eller binda metalljoner genom biosorption, där metalljoner interagerar med funktionella grupper i bakteriernas cellväggar (Li et al., 2020). Detta stödjer hypotesen att *Weissella* sp. kan ha potential att påverka metallkoncentrationen i lösning. Resultaten från denna studie överensstämmer delvis med detta, särskilt eftersom en signifikant minskning av kopparkoncentrationen observerades under de första 6 timmarna.

Som nämnt tidigare visade (Jin, H et al., 2019) att EPS-tillväxt kunde optimeras genom användning av sackaros i deras modifierade MRS-buljonger. I denna studie användes en MRS-buljong som innehöll pepton, kött och jästextrakt, glukos, polysorbat 80 samt olika salter. Eftersom den använda MRS-buljongen innehöll glukos istället för sackaros kan EPS tillväxten ha varit begränsad. I framtida försök hade det varit relevant att undersöka om användningen av MRS-buljong med sackaros kan ha en påverkan på resultatet.

Bakterietillväxten visade samtidigt att *Weissella* sp. Kunde växa i närvaro av både koppar och aluminium, även om högre kopparkoncentrationer verkade ha en viss hämmande effekt på tillväxten. Detta överensstämmer med tidigare kunskap om koppars toxiska egenskaper vid förhöjda koncentrationer (Naturvårdsverket, 2026). Sammantaget indikerar resultaten att *Weissella* sp. har potential att interagera med metalljoner, men att ytterligare studier med mer standardiserade analysförhållanden, större urval och mer robust metodik krävs för att kunna dra säkrare slutsatser

6. Slutsats

Syftet med denna studie var att undersöka om mjölksyrabakterien *Weissella* sp. kunde reducera koppar och aluminiumjoner vid olika koncentrationer och inkubationstider genom biosorption.

Resultaten visade att *Weissella* sp. hade potential att påverka kopparkoncentrationen, där en statistiskt signifikant minskning observerades mellan 0 h och 6 h för både 50 mg/L och 100 mg/L kopparprover. Detta tyder på att *Weissella* sp. relativt snabbt kan interagera med kopparjoner, sannolikt genom biosorption eller liknande mekanismer.

För aluminium var resultaten mer svårtolkade eftersom analysmetoden visade tydlig känslighet för pH-förändringar, vilket begränsade möjligheten att dra säkra slutsatser om faktisk aluminiumreduktion.

Bakterietillväxten visade samtidigt att *Weissella* sp. kunde växa i närvaro av både koppar och aluminium, även om högre kopparkoncentration verkade ha en viss hämmande effekt.

Sammantaget indikerar studien att *Weissella* sp. har potential att interagera med metalljoner, särskilt koppar, men att ytterligare studier med mer robust och standardiserad metodik krävs för att säkerställa resultaten.

7. Referenser

- Ahmed, S., Singh, V., Roberts, K. D., Zaidi, A., & Rodriguez-Palacios, A. (2022). The *Weissella* genus: Clinically treatable bacteria with antimicrobial/probiotic effects on inflammation and cancer. *Microorganisms*, 10(12),2427. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122427>
- Anchal, S., Sneha, R., Pinki, S. (2026). Exploring lead biosorption via *Lactobacillus*-based exopolysaccharides and biofilms: A structural and functional study. *Next sustainability* 7, 1002266. <https://doi.org/10.1016/j.nxsust.2025.100226>
- André, A. C., Debande, L., & Marteyn, B. S. (2021). The selective advantage of facultative anaerobes relies on their unique ability to cope with changing oxygen levels during infection. *Cellular microbiology*, 23(8), e13338. <https://doi.org/10.1111/cmi.13338>
- De Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130–135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188>
- Farooq, U., Kozinski, J. A., Khan, M. A., & Athar, M. (2010). Biosorption of heavy metal ions using wheat based biosorbents - A review of the recent literature. *Bioresource Technology*, 101(14), 5043-5053. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.030>
- Harris, D. C. (2020). *Quantitative chemical analysis* (10th ed.). W. H. Freeman.
- Jin, H., Jeong, Y., Yoo, S. H., Johnston, T. V., Ku, S., & Ji, G. E. (2019). Isolation and characterization of high exopolysaccharide-producing *Weissella confusa* VP30 from young children's feces. *Microbial cell factories*, 18(1), 110. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1158-1>
- Li, W., Chen, Y., & Wang, T. (2020). Cadmium biosorption by lactic acid bacteria *Weissella viridescens* ZY-6. *Food Control*, 123, 107747. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107747>
- Livsmedelsverket. (2025-09-25). *Aluminium*. <https://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/oonskade-amnen/metaller1/aluminium/#F%C3%B6rdjupning>
- Ma, W., Liu, X., Jing, Y., Zhang, M., Zhang, X., Wang, C., Khan, M. Z., & Zhu, M. (2025). *Weissella*: From Beneficial Probiotics to Opportunistic Pathogens—A Review. *Nutrients*, 17(19), 3162. <https://doi.org/10.3390/nu17193162>
- Marczenko, Z., & Balcerzak, M. (2000). *Separation, preconcentration and spectrophotometry in inorganic analysis*. [Elsevier](#).
- National Center for Biotechnology Information. (2026a). *PubChem Compound Summary for CID 24462, Copper sulfate*. Hämtad 2026-05-12, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Copper-Sulfate>

Naturvårdsverket. (2026a, 17 april). Metaller som miljögift.

<https://www.naturvardsverket.se/amnesomraden/miljofororeningar/metaller/>

Naturvårdsverket. (2026b, 16 april). Fakta om koppar.

<https://www.naturvardsverket.se/amnesomraden/miljofororeningar/metaller/fakta-om-koppar/>

Netrusov, A. I., Liyaskina, E. V., Kurgaeva, I. V., Liyaskina, A. U., Yang, G., & Revin, V. V. (2023). Exopolysaccharides Producing Bacteria: A Review. *Microorganisms*, 11(6), 1541.

<https://www.mdpi.com/2076-2607/11/6/1541>

Pavithra Sivakumar, (2020). Selection of Lactic Acid Bacteria from Neeragaram, a South Indian fermented rice product, and evaluation of Swedish oats as a matrix for fermentation. Master thesis;

<https://lup.lub.lu.se/student-papers/search/publication/9018756>

Priya, A. K., Gnanasekaran, L., Dutta, K., Rajendran, S., Balakrishnan, D., & Soto-Moscoso, M. (2022). Biosorption of heavy metals by microorganisms: Evaluation of different underlying mechanisms.

Chemosphere, 307, 135957. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135957>

Shrestha, R., Ban, S., Devkota, S., Sharma, S., Joshi, R., Tiwari, A. P., Kim, H. Y., & Joshi, M. K. (2021). Technological trends in heavy metals removal from industrial wastewater: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4), 105688.

<https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105688>