

Инж. Десислава Антонова Маринкова-Калоянова

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

Изследвания върху формирането, структурата и приложението на биофилми

за придобиване на образователната и научна степен „доктор“

по научна специалност

**„Биоорганична химия, химия на природните и физиологично
активните вещества“**

Научен ръководител: Проф. д-р инж. Любов Йотова

Научно жури:

1. Проф. д-р инж. Любов Йотова
2. Проф. д-тн Цонка Годжевъргова-рецензент
3. Доц. д-р инж. Ирен Цибранска-
председател и рецензент
4. Проф. д-бн Райчо Димков
5. Доц. д-р Стоян Русев

Дисертационния труд е изложен на 147 страници, включва 77 фигури, 3 таблици и 1 схема. Цитирани са 184 литературни източника. Резултатите са отразени в 5 научни публикации и са докладвани на 8 научни форума.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на разширен научен съвет на катедра „Биотехнология” при Химикотехнологичен и металургичен университет-София, състояло се на 25.10.2011г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 19.03.2012г. от 14.00 часа в зала 424, сграда „А” на Химикотехнологичния и металургичен университет-София.

Материалите са на разположение на интересувашите се на интернет страницата на ХТМУ и в отдел „Научни дейности”, стая 406, етаж 4, сграда ”А” на ХТМУ.

Изказвам своята най-сърдечна благодарност на научния ми ръководител проф. д-р Любов Йотова за получените знания, умения и опит, както и за неоценимата подкрепа, съвети, всестранна помощ и търпение, които ми оказа при разработването и оформянето на дисертационния труд.

Изказвам благодарност и за финансовата подкрепа на програма Еразмус и Българското Министерство на образованието, младежта и науката, фонд Научни изследвания, проект №213/VY 2006

Благодаря и на проф. д-р Паскал Гриесмар и проф. д-р Стефан Серфати за предоставената възможност за ценна и ползотворна работа в тяхната лаборатория SATIE, Париж, Франция, и за съдействието им при провеждане на реологичните измервания и тяхната оценка.

Използвани съкращения

МИК (MIC) (Microbiologically Influenced Corrosion)	Микробиологично повлияна корозия
SEM(SEM) (Scanning electron microscopy)	Сканираща електронна микроскопия
ВПС (EPS) (Extracellular polymeric substances)	Външноклетъчни полимерни субстанции
PVC	поливинилхлорид
ПММА(PMMA)	полиметилметакрилат
PAN+PAA	съполимер на акрилонитрил с акриламид
CAB (Cellulose Acetate Butyrate)	целулозен ацетат бутират
TBOT -Ti(OBu) ₄	титаниев бутоксид
DNS	динитросалицилова киселина
DMF	диметилформамид
ПВО	Пълно вътрешно отражение
LED Light Emitting Diode	Диод със светлинна емисия
CCD camera	Charge-coupled device camera
QCM (quartz crystal microbalance)	Кварцово-кристална микровезна
TSM (thickness shear mode)	резонаторен режим на срязване в дълбочина
AT-cut (temperature- compensated cut of quartz)	температурно-компенсирано срязване на кварца

ВЪВЕДЕНИЕ

Развитието на промишлеността предизвиква сериозни промени в състава на водата, почвата и въздуха, което от своя страна води до нарушения в екологичното равновесие. Това е проблем актуален за целия свят, обуславящ необходимостта от въвеждането на екологично по-чисти технологии и по-ефективни обработки на отпадъците. Води се целенасочена политика по отношение контрола върху състоянието на компонентите и факторите на околната среда. От изключително значение за нормалното функциониране на всички екосистеми е въпросът с пречистването на замърсените водни басейни и отпадъчни води. Целите на политиката в тази област са: да се намали или елиминира замърсяването с опасни вещества на всички води; да се прекратят постепенно емисиите, загубите и изхвърлените количества най-опасни вещества; и да се достигнат нива, които да запазят човешкото здраве и водните екосистеми.

Биоремедиацията е иновационна технология, която оказва контрол върху замърсяванията. Тя използва биологични системи, които катализират деградацията или трансформацията на различни токсични химикали до по-малко вредните им форми. Главните задачи на биоремедиацията са да повиши естествената биодеградация на природните организми и да осъществи модификация. Модификацията може да се дължи на вложени хранителни вещества или аерация /биостимулиране/, както и добавяне на микроорганизми (биодобавка). За разлика от конвенционалните технологии за пречистване на отпадъчни води, биоремедиацията може да се осъществява на мястото на замърсяването. Този процес е лимитиран от много токсични материали, но където може да се приложи той е икономически рентабилен.

Биодеградация, минерализация, биоремедиация, биотрансформация, биоаккумуляция и биосорбция са термини, които са в тясна взаимовръзка.

Биодеградацията е разлагането на химичните съединения под действие на микроорганизми. Пълното протичане на биодеградацията води до минерализация. Биотрансформацията е стъпка от даден биохимичен път, която води до конверсия на определена молекула /прекурсор–продукт/. Биоремедиацията се отнася до използването на биологични системи, които разграждат токсични съединения. Биоаккумуляцията или така наречената биосорбция се изразяват в акумулиране на токсични съединения в клетките без да се извършва деградация на токсичните вещества. Тези методи са подходящи за използване, когато микроорганизмите могат да се отстранят след като поемат токсичните вещества.

За много страни от Източна Европа, включително и за България е от изключително значение въвеждането на нови, модерни технологии за отстраняване на замърсители в отпадъчни промишлени води. Това до голяма степен ще способства за достигане на адекватни норми и критерии за опазване на околната среда и постигане на екологичен баланс в дългосрочен аспект на Стария Континент. Химическата промишленост, нейното развитие и разширяване при новите икономически условия в нашата страна представлява определен интерес, но това води и до увеличаване на получаваните замърсители.

Неестествени за обкръжаващата среда химични продукти, постъпващи в природната среда в резултат на човешката дейност в отделни случаи достигат такива концентрации, които оказват вредно влияние върху екосистемите, живите същества и особено върху човека. Вредното въздействие на химическите продукти върху околната среда може да има хроничен характер, да се проявява вследствие акумулиране, химически превръщания, а също и в резултат на синергични процеси.

През последните години основна роля в биоремедиацията играят биофилмите. Те намират приложение, както при пречистването на отпадъчни води от токсични замърсители и тежки метали, така и при процеса на метанизация. Някои биофилми са полезни, осигуряващи ценно обслужване на човешкото общество или функционирането на естествените екосистеми. Други биофилми са вредни, причиняващи сериозни здравословни и икономически проблеми. Изследването на механизмите на образуване на биофилмите, растежа и отстраняването им е ключът към произвеждането на полезни и редуцирането на вредни биофилми.

С оглед казаното по-горе целта на настоящата дисертационна работа е **да се изследват формирането и структурата на биофилми от клетки на грам отрицателни, грам положителни бактерии и дрожди с оглед възможностите за приложение на получените биофилми в биотехнологичните процеси.**

Във връзка с изпълнението на тази цел си поставихме следните конкретни задачи:

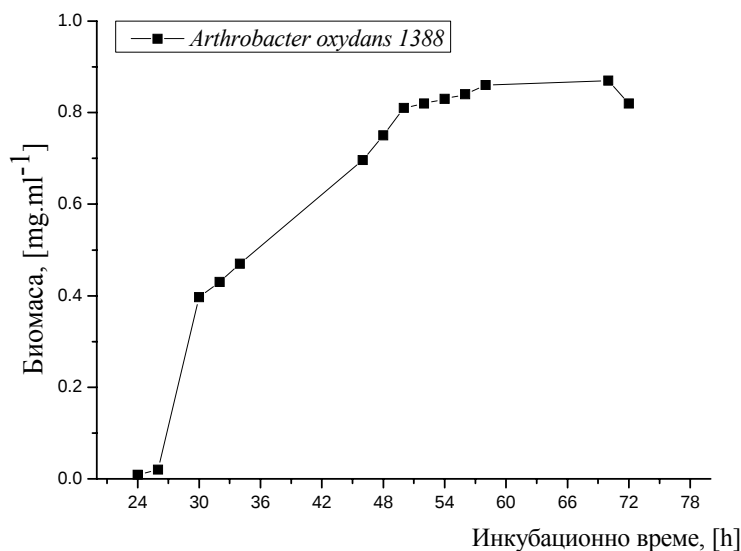
1. Да се синтезират и охарактеризират различни видове полимерни, хибридни матрици с оглед избирането и приложението на подходящи носители за биофилми;
2. Да се формират биофилми от клетки на щамове *Arthrobacter oxydans* 1388, *Pseudomonas species* 1625, *Saccharomyces cerevisiae* върху така синтезираните матрици;
3. Получените биофилми да бъдат охарактеризирани по отношение на кинетиката на растеж на биомасата, продуциране на белтъци и полизахариди от формираните биофилми;
4. Да се визуализират биофилмите с помощта на оптична микроскопия, плазмонна микроскопия, микроскоп на пълно вътрешно отражение и сканираща електронна микроскопия;
5. Да се охарактеризират получените подходящи носители за биофилми и формираните биофилми по отношение на реологичните им свойства с помощта на измервания с кварцово-кристална микровезна.
6. Да се изследва възможното приложение на получените биофилми в биотехнологичните процеси.

РЕЗУЛТАТИ

1. Изследвания върху формирането на биофилми от *Arthrobacter oxydans* 1388 върху синтезираните мембрани, кинетика на продуциране на общи белтъци и полизахариди и приложение на формираните биофилми.

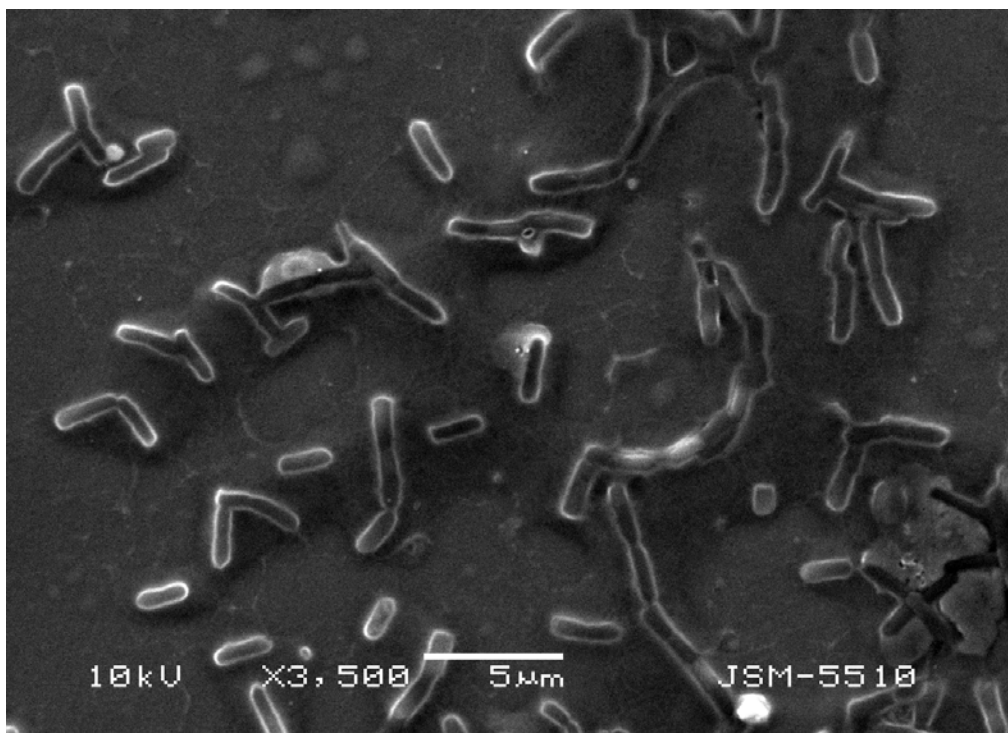
1.1.Култивиране на свободни клетки от *Arthrobacter oxydans* 1388

Щамът бе развит последователно на твърда агарова среда и течна хранителна среда, съгласно методичната част.



Фигура 1. Растежна крива на свободни клетки от *Arthrobacter oxydans* 1388

Зависимостта беше построена с използване на биомаса от клетки на *Arthrobacter oxydans* 1388. От фигурата проличават ясно основните фази на растеж на клетките, като лаг фазата е до 26 час, а експоненциалната фаза е от 26 до 48 час. При нея има бързо развитие на биомасата. След това се наблюдава забавяне на растежа на културата и навлизане в стационарната фаза от 48 до 72 час. След което клетките навлизат в леталната фаза от развитието си.

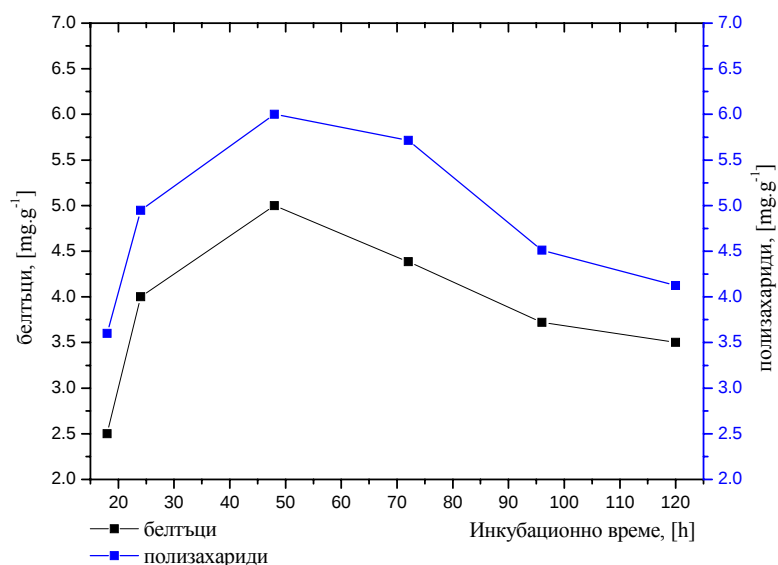


Фигура 2. СЕМ изображение на 48 часова биомаса от *Arthrobacter oxydans* 1388

1.2. Проследяване на кинетиката на нарастване на биофилми от клетки на *Arthrobacter oxydans* 1388 върху различни полимерни матрици

След развитие на културата и натрупване на биомаса към клетъчната суспензия бяха добавени полимерни хибридни носители за имобилизиране на бактериалните клетки чрез адхезия и формиране на биофилми според методичната част. Проследена беше кинетиката на нарастване на биомасата, продуциране на белтъци и полизахариди от биофилмите върху различни видове матрици в продължение на 120 часа като за начален беше приет 18 час от инкубационното време.

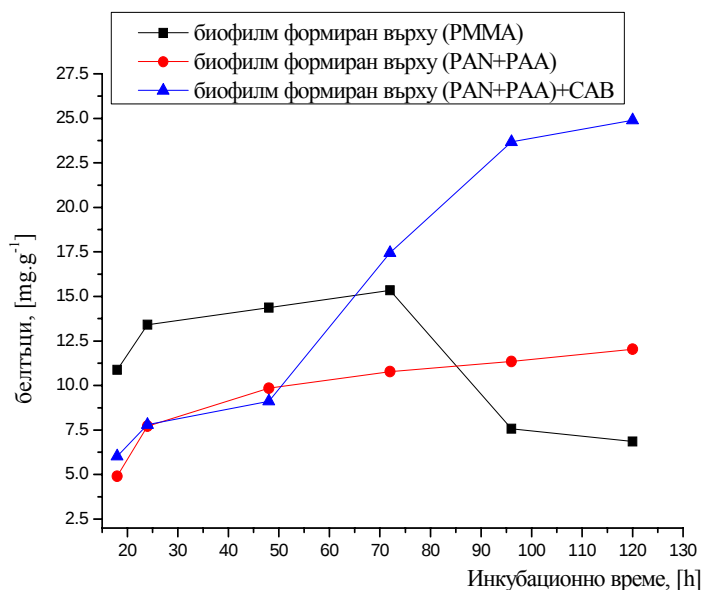
Количественото отношение–синтезирани белтъци и полизахариди от биофилмите на *Arthrobacter oxydans* 1388 върху стъклена матрица покрита с валеролактон е показана на фигура 3.



Фигура 3. Кинетика на продуциране на белтъци и полизахариди от биофилми, формиращи върху матрица от блок съполимер на валеролактон

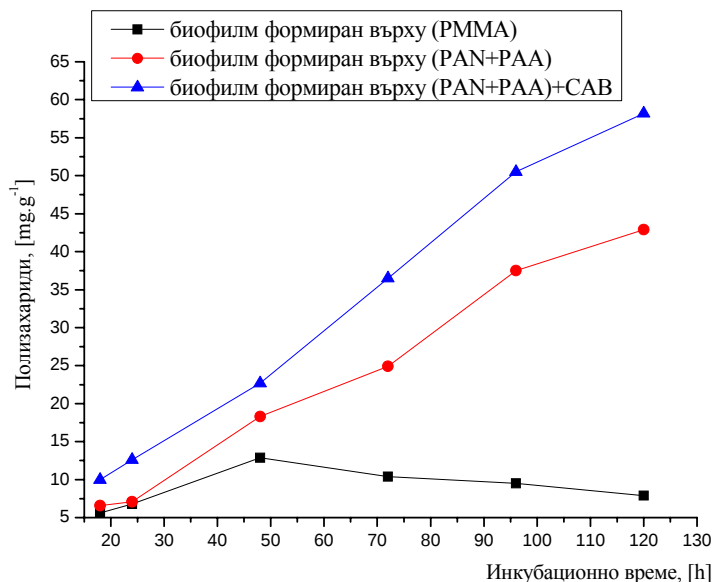
От фигурата се вижда, че има пик на количеството белтъци и полизахариди при 48h от началото на образуването на биофилми, но след това на 70h количествата им започват да намаляват. На 48h белтъците са около 5 [mg.g⁻¹], а полизахаридите са приблизително 6 [mg.g⁻¹]. Тези показатели са значително ниски, което от една страна се дължи на идеално гладката повърхност на нанесения върху стъклото полимер, а от друга страна на сравнително малката площ на стъклената подложка (приблизително 4 cm²).

В процеса на изследванията на кинетиката на продуциране на белтъци и полизахариди от формираните биофилми беше осъществено сравнение между биофилмите от клетки на *Arthrobacter oxydans* 1388 формиращи върху три различни вида носителя: полиметилметакрилат (PMMA), съполимер на акрилонитрил с акриламид (PAN+PAA) и смес от съполимер на акрилонитрил с акриламид и целулозен ацетат бутират (PAA+PAN)+CAB.



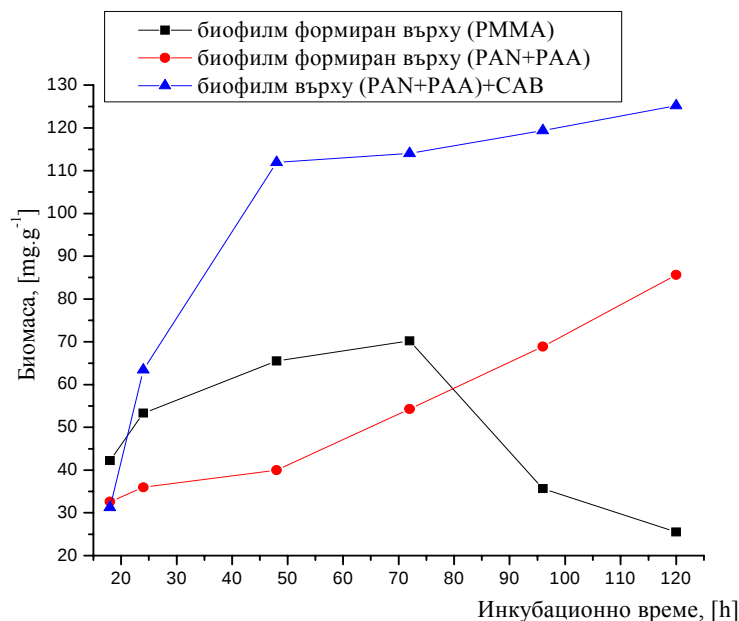
Фигура 4. Кинетика на продуциране на белтъци от биофилми, формиращи върху различни носители

От фигурата се вижда, че при биофилмите формиращи върху матрици на основата на съполимер на акрилонитрил с акриламид (PAN+PAA) количеството продуцирани белтъци нараства пропорционално с инкубационното време. Като при матрицата от смес на съполимер на акрилонитрил с акриламид и целулозен ацетат бутират (PAA+PAN)+CAB след 48 час се наблюдава рязко покачване на концентрацията на белтъците. При биофилмите формиращи върху носители от полиметилметакрилат след 72 час, количеството продуцирани белтъци намалява.



Фигура 5. Кинетика на продуциране на полизахариди от биофилми, формиращи върху различни носители

Фигурата представя кинетиката на продуциране на полизахариди от биофилми формиращи върху три вида носителя, като отново при биофилмите формиращи върху матрици от полиметилметакрилат, количеството им намалява след 48 час. При биофилмите формиращи върху другите две матрици, се наблюдава постепенно и пропорционално покачване на концентрацията на синтезираните полизахариди, като количеството им е повече при биофилми образувани върху матрици от (PAA+PAN)+CAB.



Фигура 6. Кинетика на нарастване на биофилмите от клетки на *Arthrobacter oxydans* 1388, формиращи върху различни носители

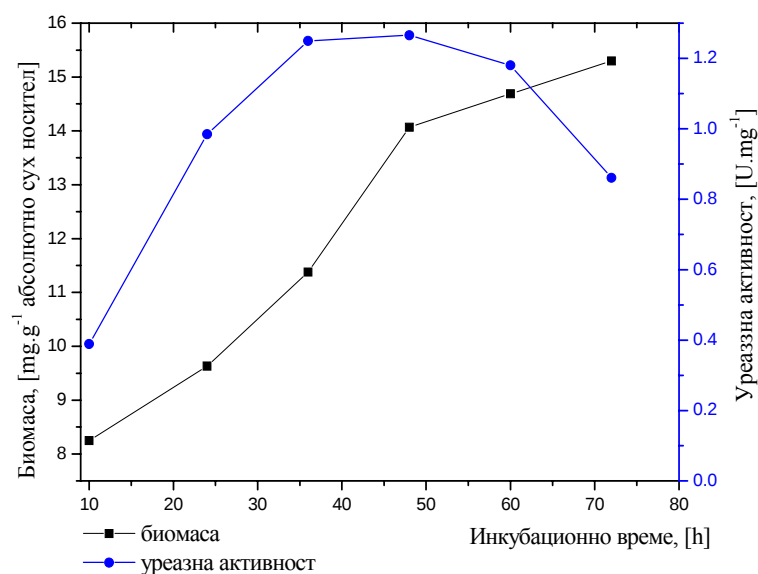
Фигурата представя кинетиката на нарастване на биомасата, имобилизирана чрез адхезия върху трите вида матрици, чрез метода за определяне на сухо тегло на клетките. При биофилми, формиращи върху гранули от (PAN+PAA)+CAB, концентрацията на клетките (mg.g^{-1} абсолютно сух носител) нараства равномерно и пропорционално на инкубационното време на развитие на биофилмите като след 48 час рязко се покачва. При биофилмите, формиращи върху гранули от (PAN+PAA) се наблюдава постепенно и слабо нарастване на биофилмите през целия период от развитието им. Според фигурата, биомасата на формираните биофилми върху матрици от полиметилметакрилат рязко намалява след 72 час.

Имайки предвид експерименталните резултати, представени в графиките по-горе, можем да предположим, че по-добри подложки за развитие на биофилми от клетки на *Arthrobacter oxydans* 1388 са тези, които са на основата на съполимер на акрилонитрил с акриламид.

1.3. Приложение на формираните биофилми от клетки на *Arthrobacter oxydans* 1388

След развитие на културата и натрупване на биомаса към клетъчната суспензия беше добавен полимерен носител от блок съполимер на валеролактон за свързване на бактериалните клетки чрез адхезия. Пет дневният биофилм беше промит с физиологичен разтвор и прехвърлен на свежа хранителна среда. След това на клетките от формирания биофилм беше проследена уреазната активност съгласно методичаната част.

Следващата фигура представя кинетиката на нарастване на биомасата и уреазната активност на свързани клетки на *Arthrobacter oxydans* 1388 в продължение на 72 часа (фигура 7).

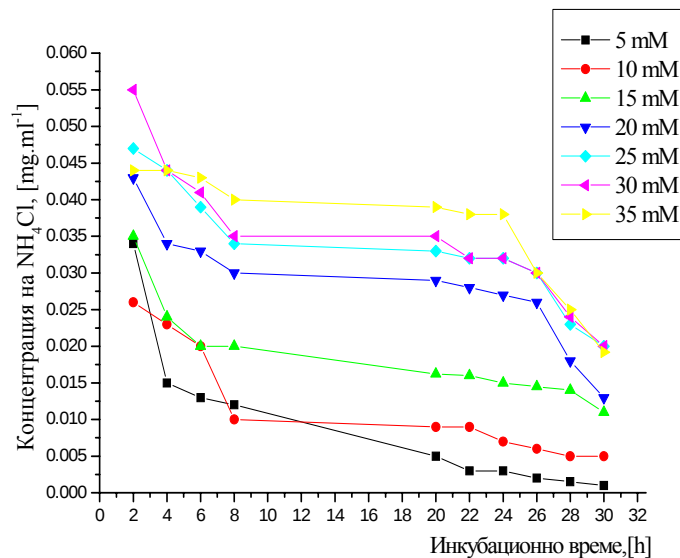


Фигура 7. Кинетика на нарастване на клетъчната биомаса и уреазната активност в условия на формиране на биофилм върху блок съполимер на валеролактон

Както се вижда от фигура 7, формирането на уреазна активност започва след 10 час на култивиране, тогава когато културата се намира в експоненциална фаза на развитие. Най-висока активност се наблюдава на 50 час - 1.24 U/mg. След което, уреазната активност рязко спада. Това може да се отдаде на факта, че в хранителната среда се съдържа карбамид, който се разгражда от уреазата на амониеви йони и въглероден диоксид. От литературата е известно, че амониевите катиони са продуктни инхибитори на уреазната активност и тяхното натрупване влияе върху скоростта на ензимокатализираната реакция. Така също се променя и рН на средата, тъй като се получава самобуферираща се система при рН 8.2.

Поради ниската уреазна активност на формирания биофилм от клетки на *Arthrobacter oxydans* 1388 върху блок съполимер на валеролактон, понататъшните изследвания бяха насочени към промяна на избора на носител за формиране на биофилми и промяна на условията на култивиране.

Следващата фигура представя динамиката на конверсия на NH_4Cl от биофилми на клетки от *Arthrobacter oxydans* 1388 формирани върху матрици от (PAN+PAA)+CAB. Биофилмите бяха култивирани и развити съгласно методичната част.



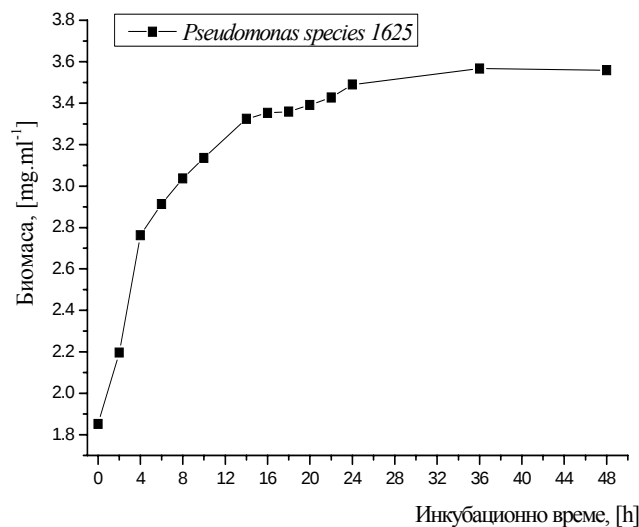
Фигура 8. Динамика на конверсия на NH_4Cl в различни концентрации от биофилм на *Arthrobacter oxydans* 1388 формиран върху (PAN+PAA)+CAB

Фигура 24 показва окислението на NH_4Cl . От фигурата проличава, че най-подходящата концентрация на NH_4Cl за култивиране на биофилми от клетки на *Arthrobacter oxydans* 1388 е между 10mM и 20mM. Концентрациите на NH_4Cl намаляват пропорционално с времето на инкубация.

2. Изследвания върху формирането на биофилми от *Pseudomonas species* 1625 върху синтезираните мембрани, кинетика на продуциране на общи белтъци и полизахариди и приложение на формираните биофилми.

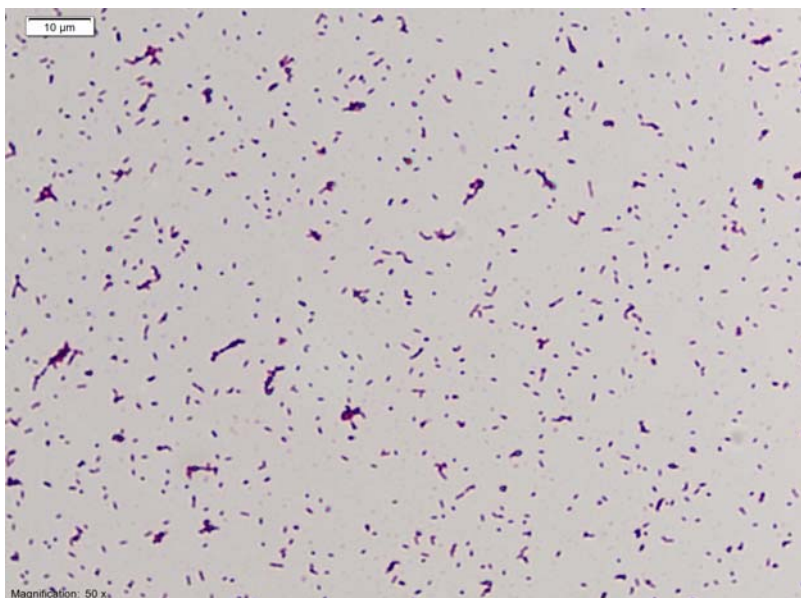
2.1. Култивиране на свободни клетки от *Pseudomonas species* 1625

Щамът беше развит последователно на твърда агарова среда и течна хранителна среда, съгласно методичната част.



Фигура 9. Растежна крива на свободни клетки от *Pseudomonas species* 1625

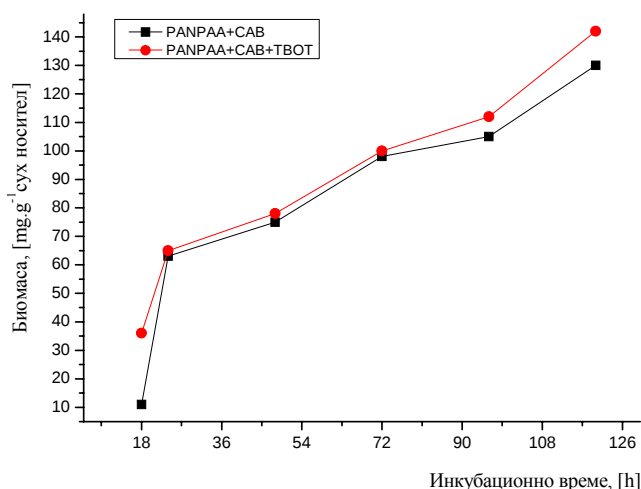
Зависимостта беше построена с използване на биомаса от клетки на *Pseudomonas species 1625*. От фигурата проличават ясно основните фази на растеж на клетките, като лаг фазата е до 4 час, а експоненциалната фаза е от 4 до 24 час. При нея има бързо развитие на биомасата. След това се наблюдава забавяне на растежа на културата и навлизане в стационарната фаза от 24 до 48 час.



Фигура 10. Микроскопска снимка на *Pseudomonas species 1625*

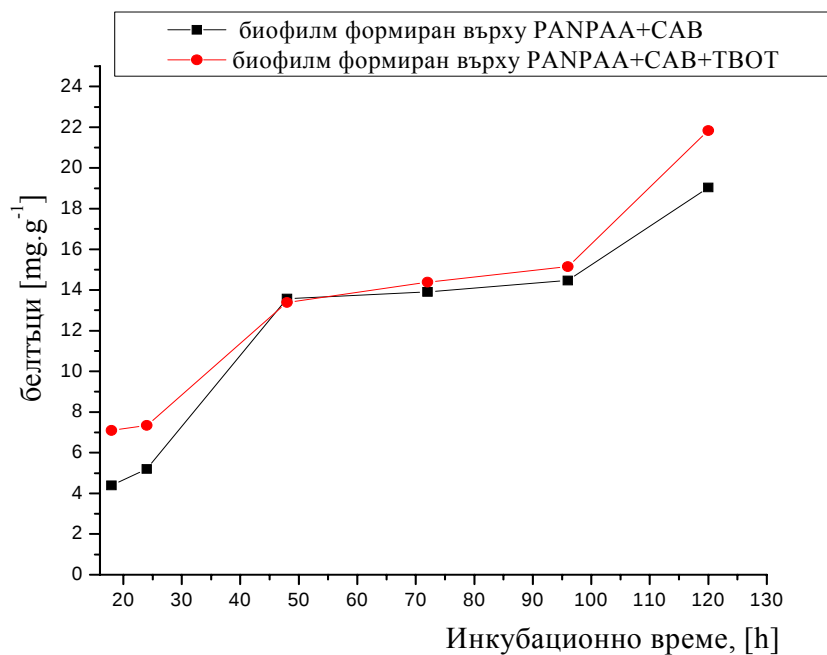
2.2. Проследяване на кинетиката на нарастване на биофилм от клетки на *Pseudomonas species 1625*

След развитие на културата и натрупване на биомаса към клетъчната суспензия бяха добавени два вида полимерни хибридни гранули за имобилизиране на бактериалните клетки чрез адхезия и формиране на биофилми според методичната част. Проследена беше кинетиката на нарастване на биомасата, продуциране на белтъци и полизахариди от биофилмите върху двата вида матрици в продължение на 120 часа като за начален беше приет 18 час на инкубационното време (фигури 11, 12, 13).



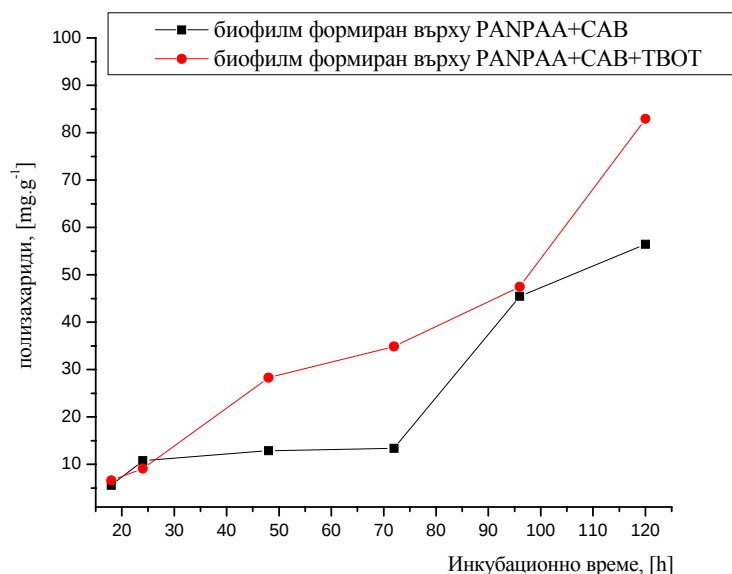
Фигура 11. Кинетика на нарастване на биофилмите от клетки на *Pseudomonas species 1625*, формиращи върху различни носители

Фигурата представя кинетиката на нарастване на биомасата, имобилизирана чрез адхезия върху двата вида матрици, чрез метода за определяне на сухо тегло на клетките. При биофилми, формирані върху гранули от (PAN+PAA)+CAB+TBOT, концентрацията на клетките (mg.g^{-1} абсолютно сух носител) нараства равномерно и пропорционално с инкубационното време на развитие на биофилмите. При биофилмите, формирані върху гранули от (PAN+PAA)+CAB се наблюдава стъпаловидно нарастване на биофилмите през целия период от развитието им.



Фигура 12. Кинетика на продуциране на белтъци от биофилми, формирані върху различни носители

На фигура 12 е представена кинетиката на продуциране на белтъци от формираните биофилми върху двата вида матрици. При биофилма, формиран върху (PAN+PAA)+CAB, рязко покачване на концентрацията на външноклетъчните белтъци се наблюдава до 24 час. При биофилма, формиран върху (PAN+PAA)+CAB+TBOT, покачването настъпва след 24 час. След това и при двете матрици се наблюдава известно задържане като при матрицата, съдържаща метален прекурсор то е по-кратко – от 72 до 96 час. След този период натрупването на белтъци се ускорява и при двете матрици като при 120 час количеството на белтъци, продуцирани от биофилми развити върху PAN+PAA+CAB+TBOT е по-голямо – $21,84 \text{ mg.g}^{-1}$.



Фигура 13. Кинетика на продуциране на полизахариди от биофилми, формиращи върху различни носители

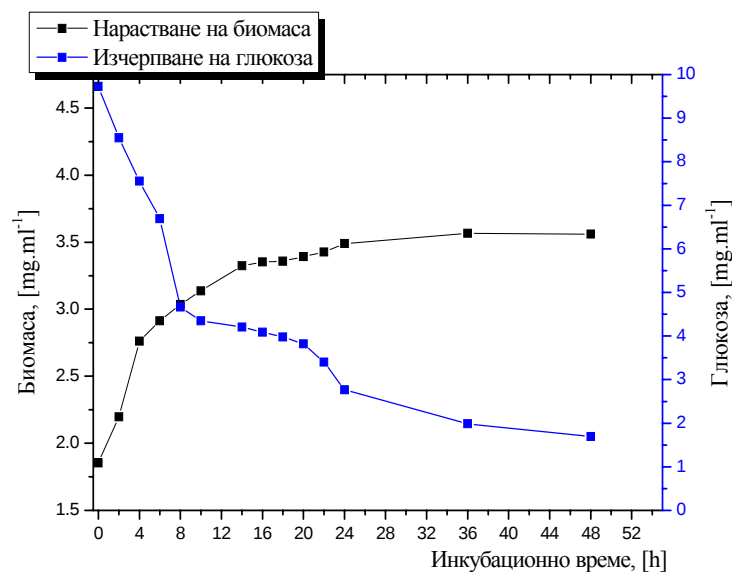
От фигурата се вижда, че до 24 час от инкубационното време продуцирането на полизахариди от биофилмите, формиращи върху двата вида матрици протича равномерно. От 24 до 72 час, при биофилма, развит върху (PAN+PAA)+CAB покачването на концентрацията на екзополisahаридите е минимално, докато при матрицата, съдържаща метален прекурсор се наблюдава равномерно нарастване на този компонент. След 72 час започва повишаване на концентрацията и при двата вида матрици, свързано вероятно с натрупване на биомаса върху повърхността на подложките и нуждата на клетките от повече хранителни източници. Нарастването е по-ясно изразено при биофилма, формиран върху (PAN+PAA)+CAB+TBOT – 82,9 mg.g⁻¹ при 120 час.

Имайки предвид експерименталните резултати, представени в графиките по-горе, можем да предположим, че по-добра подложка за развитие на биофилми от клетки на *Pseudomonas species 1625* е тази, която съдържа и метален прекурсор в състава си освен органични полимери.

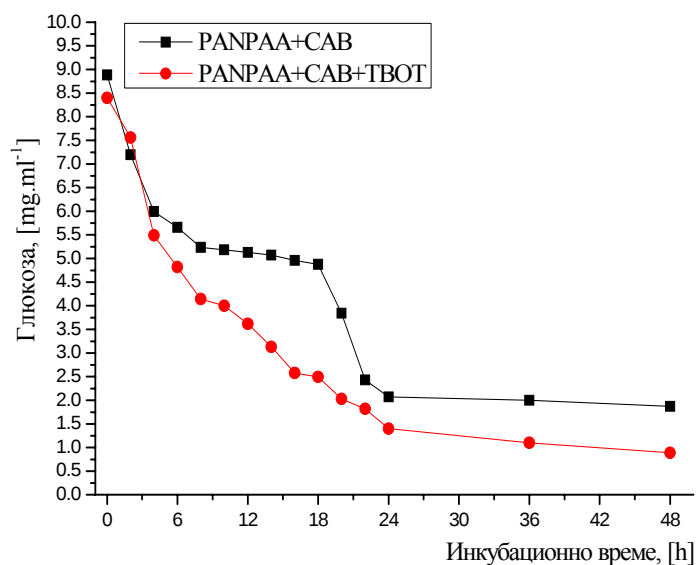
2.3. Проследяване асимилирането на глюкоза от свободни клетки и биофилми от клетки на щам *Pseudomonas species 1625*

Първоначално за определяне консумацията на глюкоза от свободни клетки и биофилми от клетки на щам *Pseudomonas species 1625* беше приложен DNS метода описан в методичната част. Получените резултати бяха неточни, тъй като чрез този метод се детерминира наличието на различни метаболити с редуциращи свойства. Точността на експерименталните данни беше необходима, за да бъде направено сравнение между асимилирането на глюкоза като единствен въглероден източник и изчерпването на фенол и бензилов алкохол самостоятелно, и смес от фенол и бензилов алкохол като субстрати за развитието на свободни клетки и биофилми на щам *Pseudomonas species 1625*. За това беше предпочетено приложението на антронов метод за определяне на консумацията на глюкоза тъй като е известно [40], че този метод е специално разработен за детектиране на монозахаридно съдържание (определяне на хексози).

На фигури 14 и 15 е представена скоростта на изчерпване на субстрат глюкоза при развитие на съответно на свободни клетки и биофилми на щам *Pseudomonas species 1625*.



Фигура 14. Динамика на нарастване на клетъчна биомаса при свободни клетки на среда съдържаща 10 mg.ml^{-1} глюкоза и скорост на изчерпване на субстрата



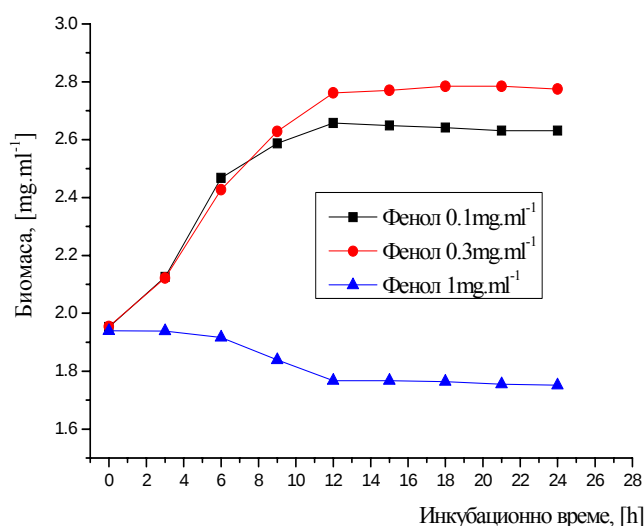
Фигура 15. Динамика на изчерпване на субстрат глюкоза при биофилми развити върху различни матрици при концентрация на глюкоза 10 mg.ml^{-1}

От графиките се вижда, че изчерпването на глюкозата при свободните клетки е пропорционално на нарастването на биомасата. Първоначално се наблюдава рязък спад в концентрацията на субстрата до около 6 час от инкубационното време, който е последван от равномерно изчерпване от 6 до 48 час.

При биофилма, формиран върху матрица, съдържаща метален компонент, изчерпването на субстрата се характеризира с продължително рязко намаляване на концентрацията до 24 час, след което се наблюдава задържане. При биофилма формиран върху матрица от (PAN+PAA)+CAB кривата показва, че след първоначален рязък спад в концентрацията на глюкоза до 8 час, има задържане до 18 час, последвано от нов спад до 24 час, след което отново има задържане до 48 час.

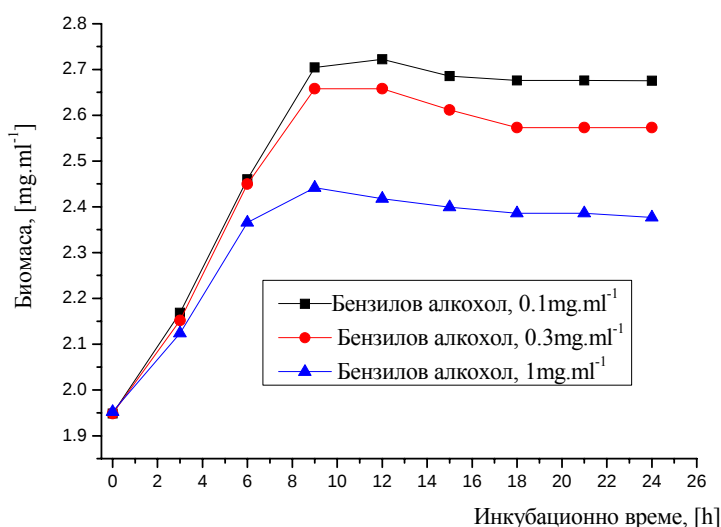
2.4.Култивиране на свободни клетки от щам *Pseudomonas species 1625* и биофилми на клетки от същия щам върху различни матрици на среда съдържаща самостоятелно фенол и бензилов алкохол в следните концентрации: 0,1 mg.ml⁻¹, 0,3 mg.ml⁻¹, 1 mg.ml⁻¹

След проследяване развитието на свободните клетки и биофилмите върху глюкозна среда, те бяха прехвърлени на среда съдържаща фенол и в последствие бензилов алкохол като самостоятелни въглеродни източници в следните три концентрации: 0,1 mg.ml⁻¹, 0,3 mg.ml⁻¹, 1 mg.ml⁻¹.



Фигура 16. Динамика на нарастване на клетъчна биомаса на среда съдържаща фенол като единствен въглероден източник в концентрации 0,1 mg.ml⁻¹, 0,3 mg.ml⁻¹, 1 mg.ml⁻¹

От фигура 16 се вижда, че свободните клетки на щам *Pseudomonas species 1625* се развиват сравнително добре при концентрации на фенол като единствен въглероден източник при концентрации 0,1 mg.ml⁻¹ и 0,3 mg.ml⁻¹. В тези случаи лаг фазата продължава до 4 час, последвана от експоненциална фаза от 4 до 12 час. След 12 час започва стационарната фаза на развитие. При концентрация на фенол 1 mg.ml⁻¹ се наблюдава субстратно инхибиране и клетки не се развиват.

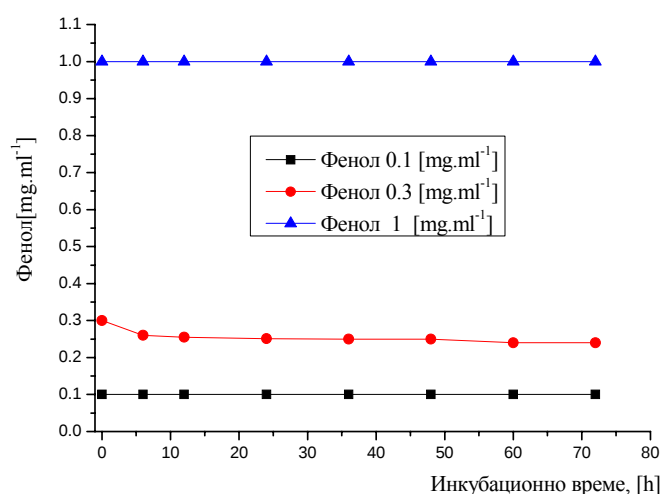


Фигура 17. Динамика на нарастване на клетъчна биомаса на среда съдържаща бензилов алкохол като единствен въглероден източник в концентрации 0,1 mg.ml⁻¹, 0,3 mg.ml⁻¹, 1 mg.ml⁻¹

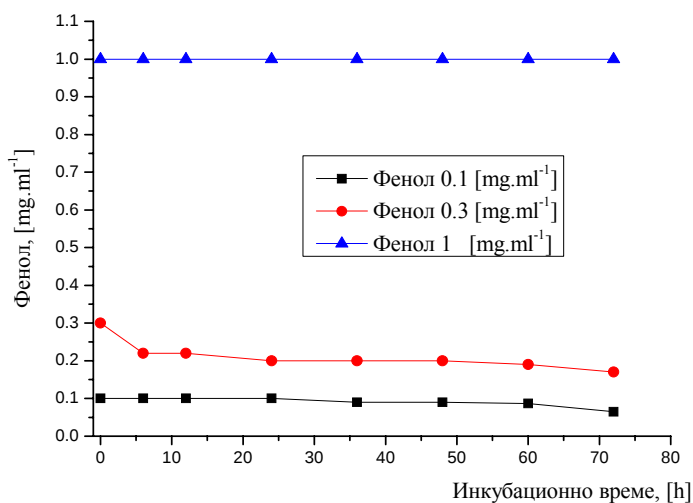
От фигура 17 се вижда, че свободните клетки на щам *Pseudomonas species 1625* се развиват сравнително добре при наличие на бензилов алкохол като единствен въглероден източник и при трите концентрации. Лаг фазата продължава до 4 час, последвана от експоненциална фаза от 4 до 8 час. След 8 час започва стационарната фаза на развитие.

След 24 часово адаптиране на хранителни среди съдържащи самостоятелно фенол и бензилов алкохол в концентрация-0.3 mg.ml⁻¹, свободните клетки и впоследствие биофилмите бяха прехвърлени на среди, съдържащи самостоятелно двете токсични вещества в концентрации; 0.1 mg.ml⁻¹, 0.3 mg.ml⁻¹, 1 mg.ml⁻¹.

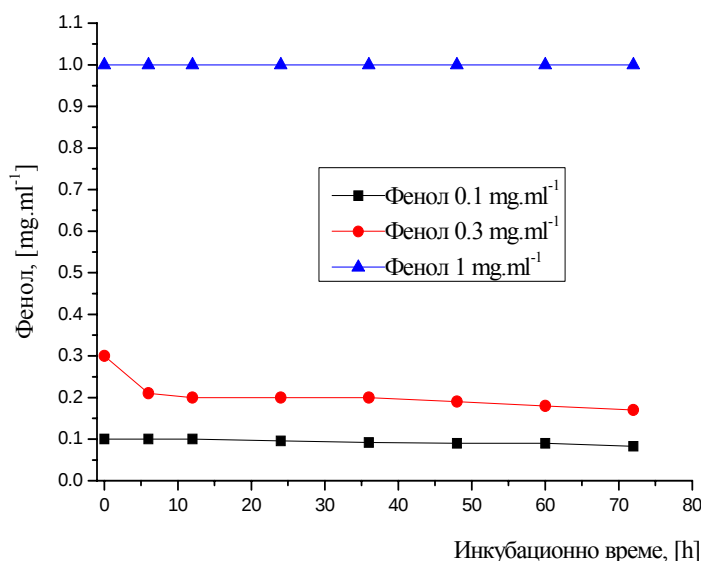
Фигури 18, 19 и 20 показват изчерпването на субстрат фенол в трите различни концентрации при развитието на свободни клетки и биофилми на щам *Pseudomonas species 1625*, формирани върху два вида матрици.



Фигура 18. Динамика на изчерпване на фенол като единствен въглероден източник с концентрации 0,1 mg.ml⁻¹, 0,3 mg.ml⁻¹, 1 mg.ml⁻¹ от свободни клетки на щам *Pseudomonas species 1625*



Фигура 19. Динамика на изчерпване на фенол като единствен въглероден източник с концентрации 0,1 mg.ml⁻¹, 0,3 mg.ml⁻¹, 1 mg.ml⁻¹ от биофилм, формиран от щам *Pseudomonas species 1625* върху матрица, съдържаща (PAN+PAA)+CAB



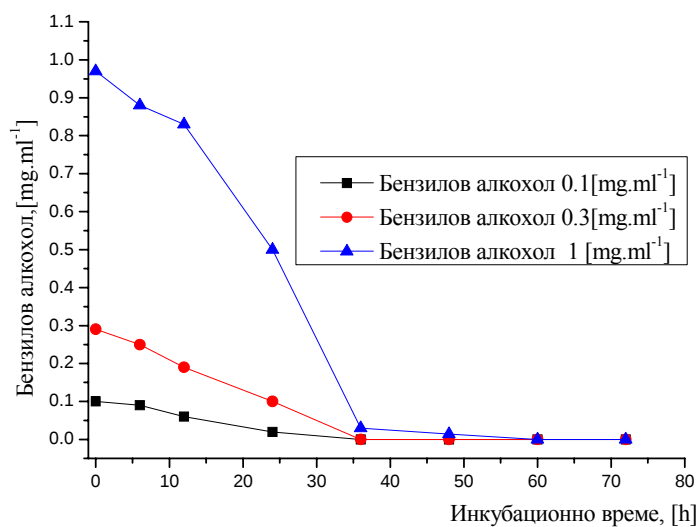
Фигура 20. Динамика на изчерпване на фенол като единствен въглероден източник с концентрации 0,1 mg.ml⁻¹, 0,3 mg.ml⁻¹, 1 mg.ml⁻¹ от биофилм, формиран от щам *Pseudomonas species 1625* върху матрица, съдържаща (PAN+PAA)+CAB+TBOT

От графиките се вижда, че изчерпването на субстрата е най-добре изразено при концентрация 0,3 mg.ml⁻¹ както за свободните клетки, така и за биофилмите, формиращи върху различните видове матрици. И в трите случая се забелязва рязък спад в концентрацията на субстрата в началото на инкубационното време (около 6 – 8 час), след което има задържане, което е с различна продължителност. При свободните клетки спадът в началото е по-малък и задържането продължава и след 72 час. При биофилмите, формиращи върху двата вида матрици изчерпването в първите часове е по-силно изразено, задържането продължава до 48 час за биофилм върху матрица, съдържаща (PAN+PAA)+CAB и до 36 час за матрица, съдържаща (PAN+PAA)+CAB+TBOT. След това и при двете матрици отново се наблюдава изчерпване на субстрата, което продължава до 72 час от инкубационното време.

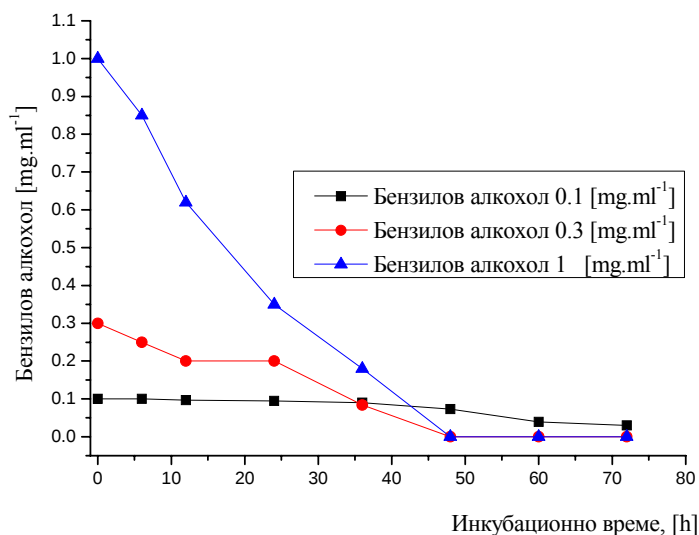
При концентрация на фенол 0,1 mg.ml⁻¹ при свободните клетки почти не се наблюдава изчерпване на субстрата, докато при биофилмите, формиращи върху двете различни матрици, след първоначално задържане до около 60 час се отчита нисък спад в концентрацията на въглеродния източник.

При концентрация на въглеродния източник 1 mg.ml⁻¹, фенолът се явява субстратен инхибитор. При тази концентрация биомаса под формата на свободни клетки или биофилми, формиращи върху различни носители не се развива. Спад в концентрацията на въглеродния източник не се наблюдава.

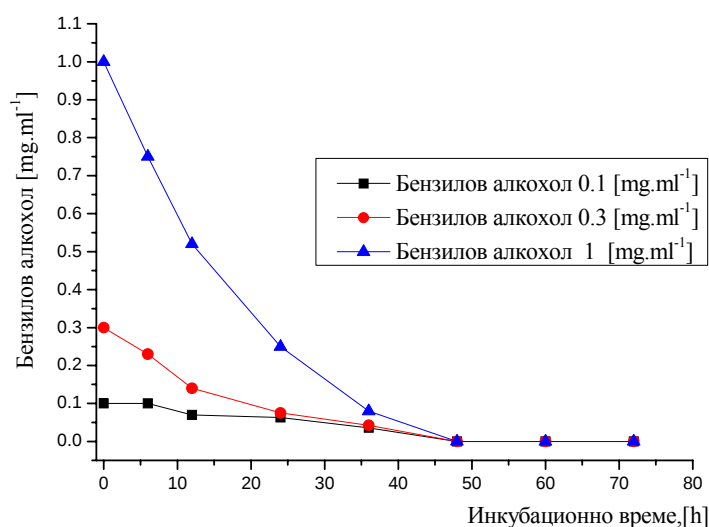
Следващите три фигури 21, 22 и 23 показват изчерпването на субстрат бензилов алкохол в три различни концентрации при развитието на свободни клетки и биофилми на щам *Pseudomonas species 1625*, формиращи върху два вида матрици.



Фигура 21. Динамика на изчерпване на бензилов алкохол като единствен въглероден източник с концентрации 0,1 mg.ml⁻¹, 0,3 mg.ml⁻¹, 1 mg.ml⁻¹ от свободни клетки на щам *Pseudomonas species 1625*



Фигура 22. Динамика на изчерпване на бензилов алкохол като единствен въглероден източник с концентрации 0,1 mg.ml⁻¹, 0,3 mg.ml⁻¹, 1 mg.ml⁻¹ от биофилм, формиран от щам *Pseudomonas species 1625* върху матрица, съдържаща (PAN+PAA)+CAB

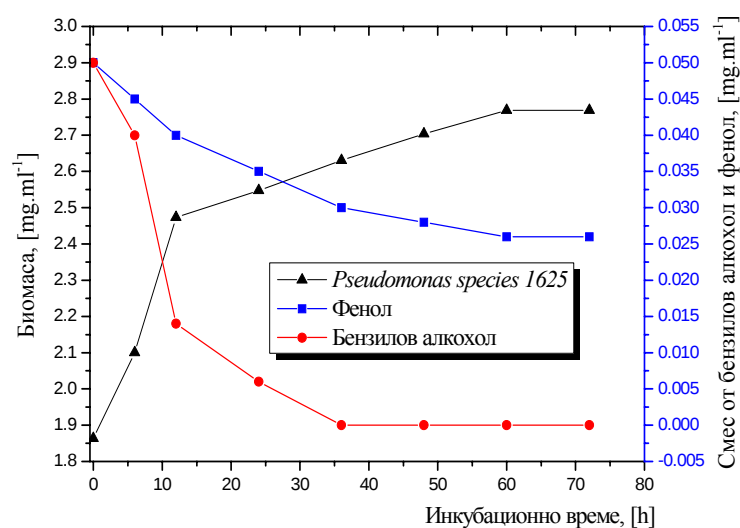


Фигура 23. Динамика на изчерпване на бензилов алкохол като единствен въглероден източник с концентрации 0,1 mg.ml⁻¹, 0,3 mg.ml⁻¹, 1 mg.ml⁻¹ от биофилм, формиран от щам *Pseudomonas species 1625* върху матрица, съдържаща (PAN+PAA)+CAB+TBOT

От графиките се вижда, че изчерпването на субстрата е най-добре изразено при концентрации 0,3 mg.ml⁻¹ и 1 mg.ml⁻¹ както за свободните клетки, така и за биофилмите, формиращи върху различните видове матрици. И в двата случая се забелязва рязък спад в концентрацията на субстрата в началото на инкубационното време (около 10 час), след което при свободните клетки, субстратът е изцяло изчерпан след 36 час. При биофилмите формиращи върху матрица от (PAN+PAA)+CAB+TBOT бензиловият алкохол е напълно изчерпан при тези две концентрации след 48 час. При биофилмите формиращи върху матрица от (PAN+PAA)+CAB изчерпването на бензиловия алкохол при концентрации 0,3 mg.ml⁻¹ и 1 mg.ml⁻¹ е също след 48 час, като при концентрация 0,1 mg.ml⁻¹, се наблюдава задържане и слабо изчерпване след 48 час на инкубационното време.

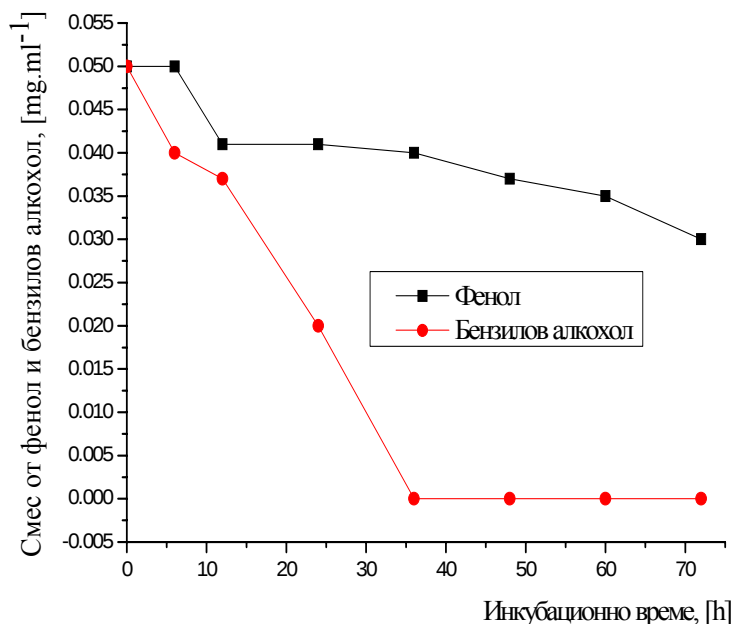
2.5. Култивиране на свободни клетки от щам *Pseudomonas species 1625* и биофилми на клетки от същия щам върху различни матрици на среда съдържаща смес от фенол и бензилов алкохол с концентрация: 0,1 mg.ml⁻¹ (0,05 mg.ml⁻¹ фенол + 0,05 mg.ml⁻¹ бензилов алкохол)

След проследяване изчерпването на токсичните вещества-фенол и бензилов алкохол от свободни клетки и биофилми на щам *Pseudomonas species 1625* като самостоятелни въглеродни източници беше анализирано поведението на свободните клетки и биофилмите в среди съдържащи смес от фенол и бензилов алкохол в най-ниската обща концентрация -0,1 mg.ml⁻¹.

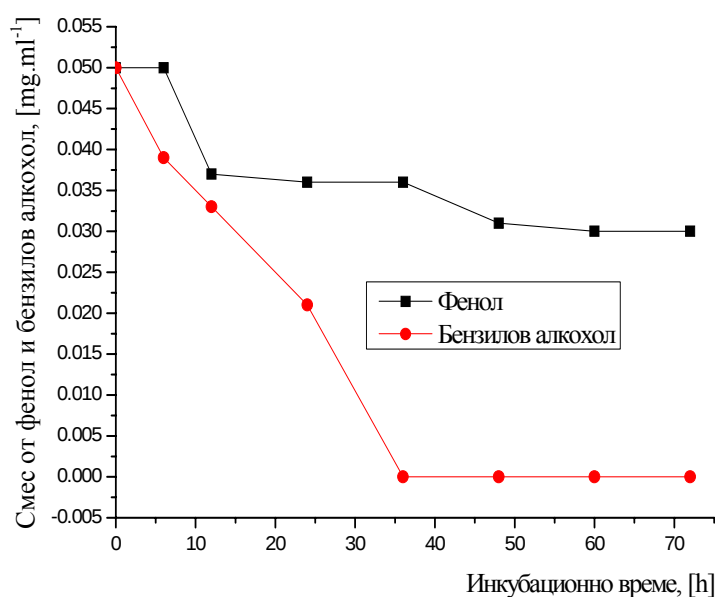


Фигура 24. Динамика на изчерпване на смес от фенол и бензилов алкохол като единствен въглероден източник с концентрация $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ и нарастване на биомасата от свободни клетки на щам *Pseudomonas species 1625*

От фигура 24 се вижда, че свободните клетки на щам *Pseudomonas species 1625* се развиват сравнително добре при концентрация на смес от фенол и бензилов алкохол като единствен въглероден източник $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$. В този случай лаг фазата продължава до 6 час, последвана от експоненциална фаза от 6 до 18 час. След 18 час клетките навлизат в стационарна фаза на развитие.



Фигура 25. Динамика на изчерпване на смес от фенол и бензилов алкохол като единствен въглероден източник с концентрация $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ от биофилм, формиран от щам *Pseudomonas species 1625* върху матрица, съдържаща (PAN+PAA)+CAB



Фигура 26. Динамика на изчерпване на смес от фенол и бензилов алкохол като единствен въглероден източник с концентрация $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ от биофилм, формиран от щам *Pseudomonas species 1625* върху матрица, съдържаща (PAN+PAA)+CAB+TBOT

От графики 24, 25 и 26 се забелязва, че при въглероден източник смес от фенол и бензилов алкохол свободните клетки и биофилмите, формирани върху двата вида матрици, предпочитано усвояват бензиловия алкохол поради по-малката му токсичност. И при свободни клетки, и при биофилми на щам *Pseudomonas species 1625* бензиловият алкохол се изчерпва напълно до 36 час. Спадът в концентрацията му е най-равномерен и най-ясно изразен при биофилм, формиран върху матрица, съдържаща и метален компонент.

При фенола от сместа, спадът в концентрацията е значително по-голям, отколкото в случаите, когато фенолът се използва самостоятелно като въглероден източник. При свободните клетки намаляването на концентрацията на фенола е равномерно през цялото инкубационно време, макар и да е по-слабо изразено от това на бензиловия алкохол. При биофилмите, формирани върху различни матрици след първоначално рязко намаляване на концентрацията се наблюдава задържане, което продължава до 36 час. След това, изчерпването на фенола продължава сравнително равномерно до 72 час. Причината спадът да се наблюдава след 36 час е изчерпването на другия компонент в сместа (бензилов алкохол). По-значителното изчерпване на фенола в този случай се дължи най-вероятно на по-ниската начална концентрация – $0,05 \text{ mg.ml}^{-1}$.

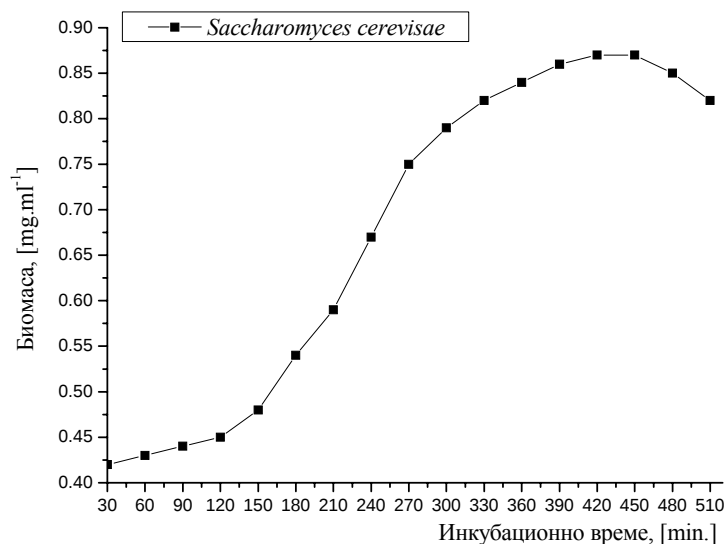
3. Изследвания върху формирането на биофилми от *Saccharomyces cerevisiae* върху синтезираните мембрани, кинетика на продуциране на белтъци и полизахариди и приложение на формираните биофилми.

3.1. Култивиране на *Saccharomyces cerevisiae*

При култивиране на клетки *Saccharomyces cerevisiae* в течна хранителна среда беше проследена динамиката на натрупване на биомаса.

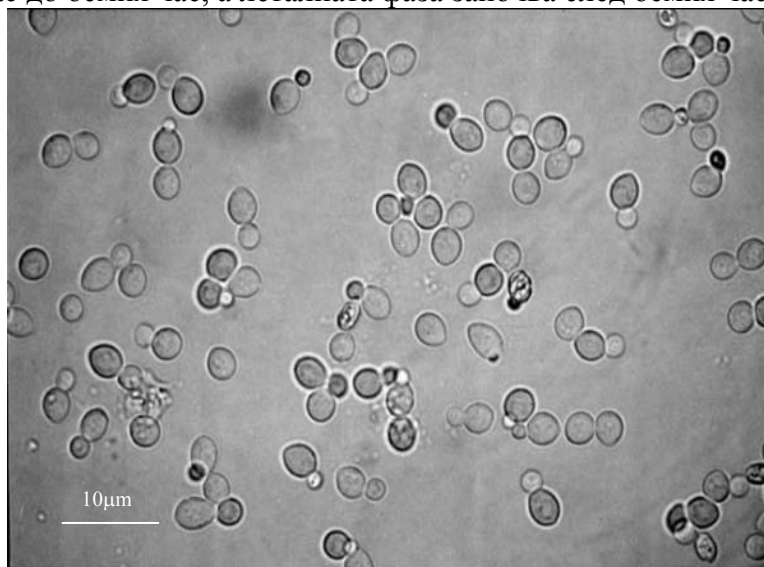
Хранителната среда използвана за развитие на щама осигурява бърз растеж на микроорганизма и възможност да се наблюдават отделните фази на развитие на популацията, които очертават общите закономерности на растеж (фигура 27). От значение за нормалното развитие на изследвания щам е поддържането на подходящи условия. Оптималната температура за развитие на използвания щам е в границите 30–

35⁰С. Всички изследвания бяха проведени при температура 30⁰С. Друг фактор от съществено значение е рН на средата. Изследваният щам дрожди показва най-висока скорост на растеж при стойност на рН 5,0–5.5, при всички експерименти се използва хранителна среда с буферни свойства, поддържаща рН 5.



Фигура 27. Динамика на нарастване на биомасата на свободни клетки на *Saccharomyces cerevisiae*

Зависимостта беше построена с използване на биомаса от свободни клетки на *Saccharomyces cerevisiae*. От фигура 27 проличават ясно основните фази на растеж на клетките, като лаг-фазата протича от 30 минута до втория час, експоненциалната фаза е от втория до петия час, при което има бързо развиване на биомасата. След което се наблюдава забавяне на растежа на културата и навлизане в стационарната фаза след петия час до осмия час, а леталната фаза започва след осмия час.

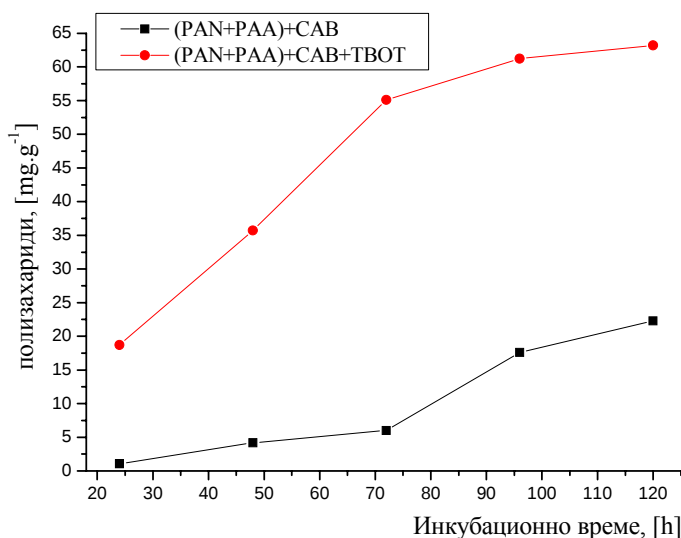


Фигура 28. Микроскопска снимка на свободни клетки на хлебни дрожди *Saccharomyces cerevisiae*

3.2. Проследяване на кинетиката на нарастване на биофилм от клетки на *Saccharomyces cerevisiae*

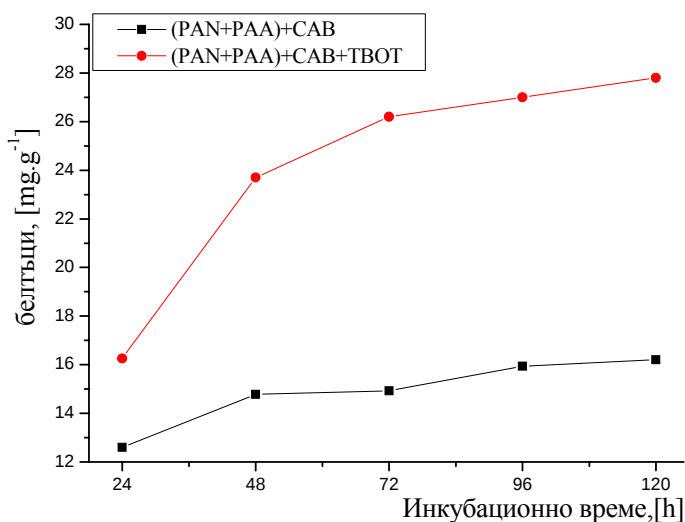
След развитие на културата и натрупване на биомаса към клетъчната суспензия бяха добавени два вида полимерни хибридни гранули за имобилизиране на бактериалните клетки, чрез адхезия и формиране на биофилми според методичната

част. Кинетиката на нарастване на биомасата, продуциране на белтъци полизахариди от биофилмите върху двата вида матрици беше проследено в продължение на 120 часа (Фигури 29, 30, 31).



Фигура 29. Кинетика на продуциране на полизахариди от биофилми формиращи върху различни носители

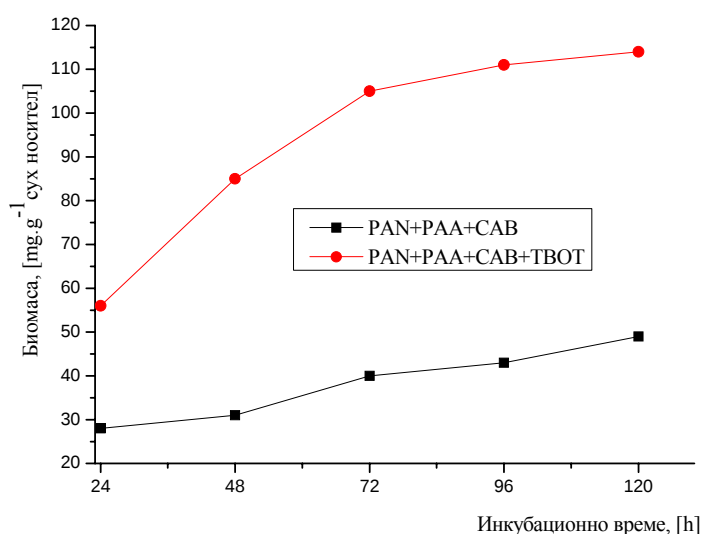
От фигурата се вижда равномерно нарастване на продуцирането на полизахариди от биофилмите развити и върху двата вида матрици. По-ясно изразено покачване на концентрацията на полизахариди се наблюдава при биофилми формиращи върху гранули от (PAN+PAA)+CAB+TBOT. След 72 час започва повишаване на концентрацията и при двата вида матрици, свързано вероятно с натрупване на биомаса върху повърхността на матриците и нуждата на клетките от повече хранителни източници.



Фигура 30. Кинетика на продуциране на белтъци от биофилми формиращи върху различни носители

На фигура 30 е представена кинетиката на продуциране на белтъци от формираните биофилми върху двата вида матрици. След 24 час се наблюдава рязко покачване на концентрацията на белтъците и при двата биофилма. След 48 час се

наблюдава равномерно натрупване на белтъци и при двата вида матрици, като по-голямо количество се забелязва при биофилма формиран върху гранули от (PAN+PAA)+CAB+TBOT.



Фигура 31. Кинетика на нарастване на биофилмите от клетки на *Saccharomyces cerevisiae*, формирани върху различни носители

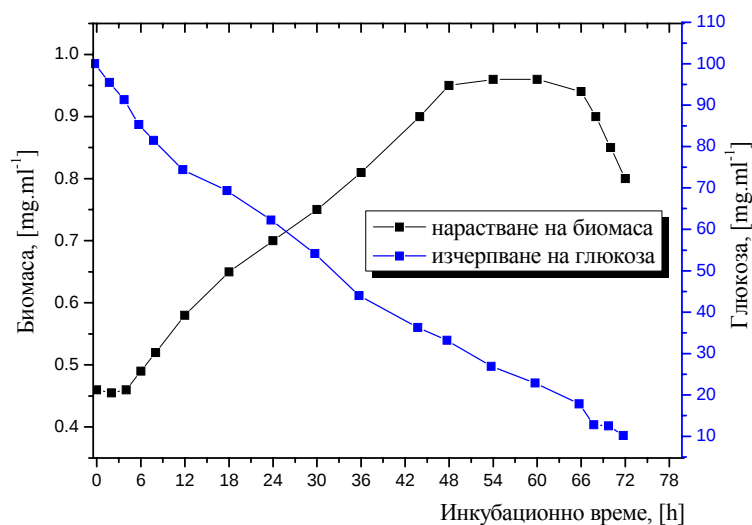
Фигура 31 представя кинетиката на нарастване на биомасата, имобилизирана чрез адхезия върху двата вида матрици, чрез метода за определяне на сухо тегло на клетките. При биофилми формирани върху гранули от (PAN+PAA)+CAB+TBOT, концентрацията на клетките mg.g^{-1} абсолютен сух носител, нараства равномерно и пропорционално на инкубационното време на развитие на биофилмите. А при биофилмите формирани върху гранули от (PAN+PAA)+CAB се наблюдава нарастване на количеството клетки, но в значително по-малки концентрации.

Имайки предвид експерименталните резултати, представени в графиките по-горе, можем да предположим, че по-добра повърхност за развитие на биофилми от клетки на *Saccharomyces cerevisiae* е тази, която съдържа и метален прекурсор в състава си освен органични полимери.

3.3. Култивиране на свободни клетки и биофилми от *Saccharomyces cerevisiae* на течна хранителна среда съдържаща 100 mg.ml^{-1} глюкоза.

Преди сравнението на продуциране на етанол от свободните клетки и биофилмите в процеса на алкохолна ферментация беше извършено култивиране на свободни клетки и биофилми върху двата вида матрици в продължение на 72 часа, като беше проследена и консумацията на глюкоза от дрождите. Асимилирането на глюкозата беше проследено съгласно методичната част.

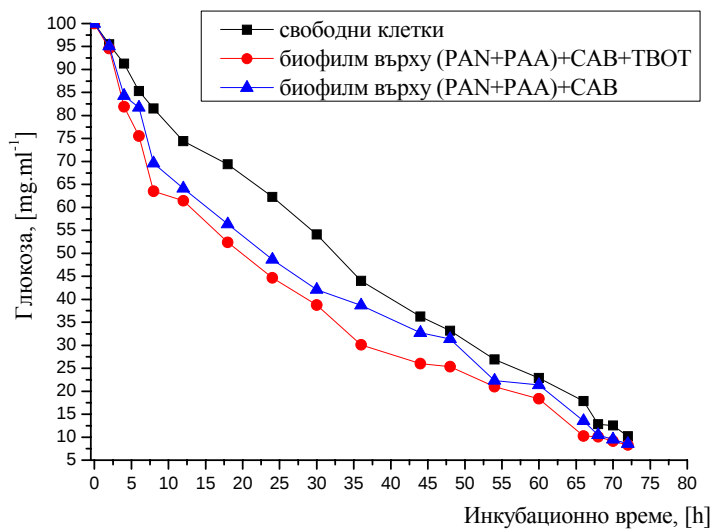
На фигура 32 е представена динамиката на растеж на свободна биомаса и консумацията на глюкоза от клетките. Свободните клетки показаха развитие типично за растеж на култура в периодичен режим с ясно разграничени растежни фази.



Фигура 32. Скорост на динамика на нарастване на клетъчна биомаса и на изчерпване на субстрата при свободни клетки на среда съдържаща 100,0mgml⁻¹ глюкоза.

Началната фаза беше с продължителност 6 часа, след което културата навлезе в логаритмичен растеж, който продължи 40 часа и достигна своята стационарна фаза след 48 час. Леталната фаза започна след 66 час.

На фигура 33 е представено сравнението на изчерпването на глюкоза между свободни клетки и биофилми от *Saccharomyces cerevisiae* при 72 часово култивиране.



Фигура 33. Скорост на динамика на изчерпване на субстрата на среда съдържаща 100 mg.ml⁻¹ глюкоза

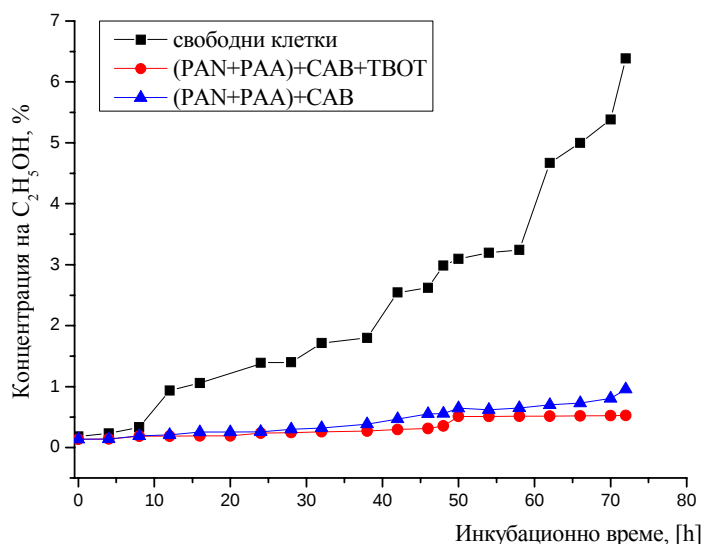
Както се вижда от фигурата изчерпването на глюкоза протича равномерно и в трите разгледани случая, като при биофилма развит върху матрица от (PAN+PAA)+CAB+TBOT консумацията на глюкоза протича сравнително по-бързо от другите два случая.

3.4. Приложение на получените биофилми от клетки на *Saccharomyces cerevisiae* в процесите на алкохолна ферментация

В представените изследвания беше проведена серия от експерименти за изясняване на възможностите за получаване на етанол от свободни клетки и биофилми от *Saccharomyces cerevisiae*.

Алкохолната ферментация беше осъществена съгласно методичната част.

На фигура 34 е представено продуцирането на етанол от свободни клетки и биофилми от *Saccharomyces cerevisiae* при субстрат глюкоза.

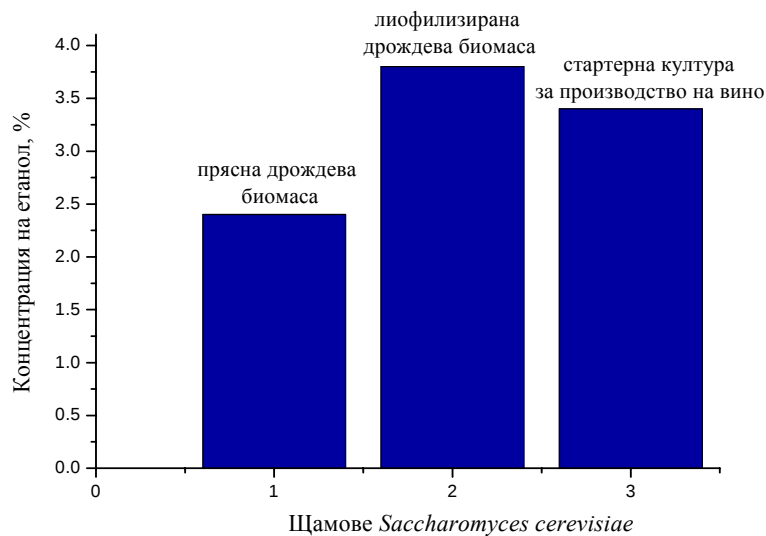


Фигура 34. Динамика на продуциране на етанол от свободни клетки и биофилми от *Saccharomyces cerevisiae*

Както се вижда от демонстрираните на фигурата резултати ферментацията на глюкозата протече със задоволителна скорост при свободните клетки, докато при биофилмите продуцираният етанол е в доста по-малка степен. При биофилма формиран върху матрица от CAB+(PAN+PAA) концентрацията на получения етанол е повече в сравнение с биофилма формиран върху матрица с метален компонент в състава си.

3.4.1. Алкохолна ферментация на лигноцелулозни хидролизати

Първоначално бяха подбрани три различни източника на дрожди *Saccharomyces cerevisiae*. Експериментите бяха проведени съгласно методичната част. Резултатите от изследванията са обобщени на фигура 35.

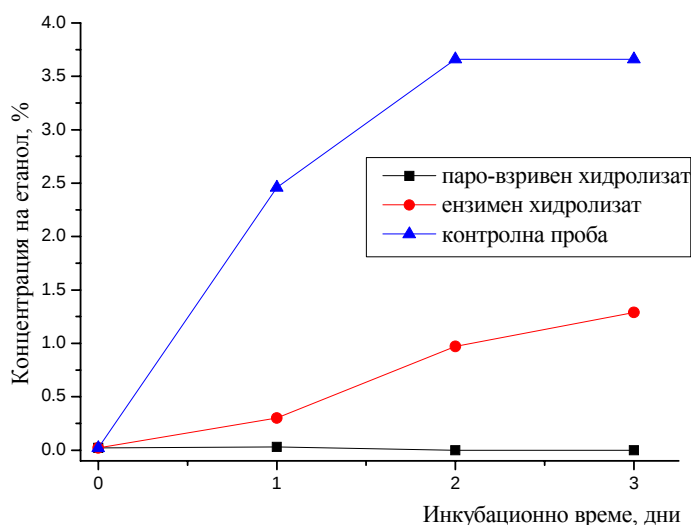


Фигура 35. Ефективност на ферментационния процес при различни щамове *Saccharomyces cerevisiae*

Както се вижда от резултатите представени на фигурата, култура 2 изолирана от лиофилизирана дрождева биомаса показва най-висока ефективност на трансформиране на глюкоза в етанол, поради което бе избрана за провеждане на понататъшните експерименти за ферментиране на лигноцелулозни хидролизати.

С подобреният щам на *Saccharomyces cerevisiae* бе проведена серия от експерименти за изясняване на възможностите за получаване на етанол от различни типове лигноцелулозни хидролизати.

Алкохолната ферментация бе проведена съгласно методичната част. Следващите три фигури представят количеството продуциран етанол от свободни клетки *Saccharomyces cerevisiae* и от биофилми от клетки на същия щам върху два вида матрици.



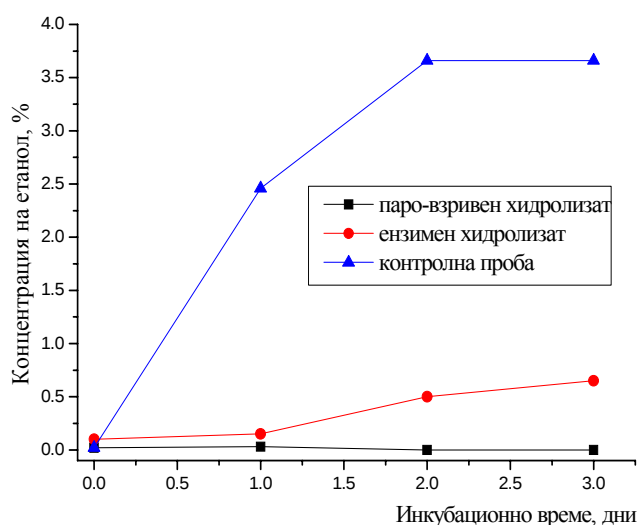
Фигура 36. Кинетика на продукцията на алкохол при ферментация на лигноцелулозни хидролизати от свободни клетки на щам *Saccharomyces cerevisiae*

Както се вижда от демонстрираните на фигура 36 резултати ферментацията на ензимния хидролизат протече със задоволителна скорост и добив сравними с

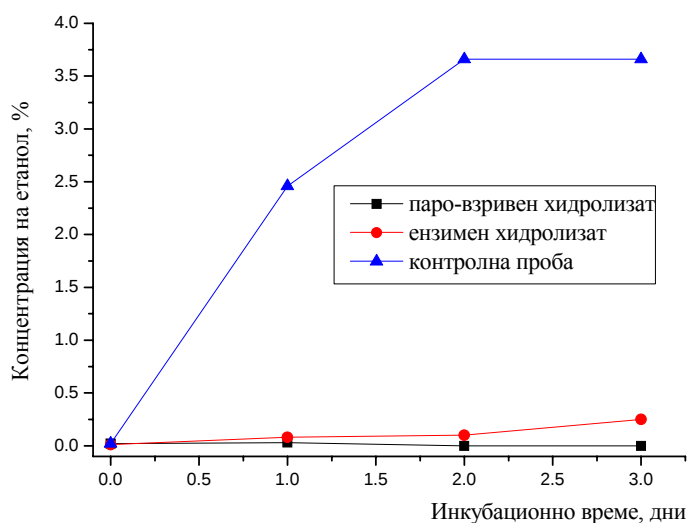
процеса на контролна ферментация като се вземе предвид изходното съдържание на захари (съответно 10% за контролната среда на Хансен и 2,3% за ензимния хидролизат). Подобен резултат може до голяма степен да бъде приет за доказателство за успешното протичане на хидролизния процес, в резултат на който е постигната много висока степен на трансформация на лигноцелулозния материал във ферментируеми захари.

При паровзривния хидролизат, обаче, не бе наблюдавано протичане на процес на алкохолна ферментация в забележителна степен.

На следващите две фигури са представени резултати от ферментацията на разглежданите лигноцелулозни хидролизати от биофилми на клетки от щам *Saccharomyces cerevisiae* формирани върху двата вида матрици.



Фигура 37. Кинетика на продукцията на алкохол при ферментация на лигноцелулозни хидролизати от биофилм от клетки на щам *Saccharomyces cerevisiae* върху матрица от CAB+(PAN+PAA)



Фигура 38. Кинетика на продукцията на алкохол при ферментация на лигноцелулозни хидролизати от биофилм от клетки на щам *Saccharomyces cerevisiae* върху матрица от CAB+(PAN+PAA)+TBOT

От демонстрираните резултати се наблюдава незначително покачване на концентрацията на етанол при ферментацията на лигноцелулозните хидролизати и при двата биофилма. При биофилмът формиран върху матрица съдържаща метален компонент в състава си се наблюдава задържане на продукцията на етанол.

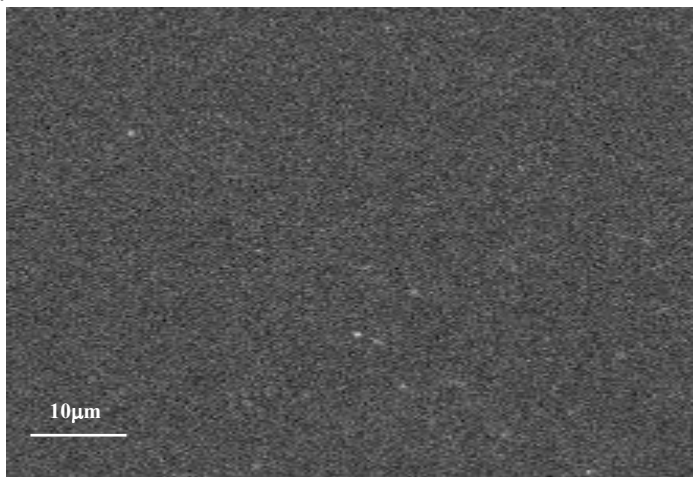
4. Визуализация на синтезираните мембрани и получените биофилми от щамове *Arthrobacter oxydans* 1388, *Pseudomonas species* 1625 и *Saccharomyces cerevisiae* с помощта на сканираща електронна микроскопия, плазмонна микроскопия, микроскоп на пълно вътрешно отражение и оптична микроскопия.

4.1. Визуализация на синтезираните матрици и формираните биофилми чрез СЕМ

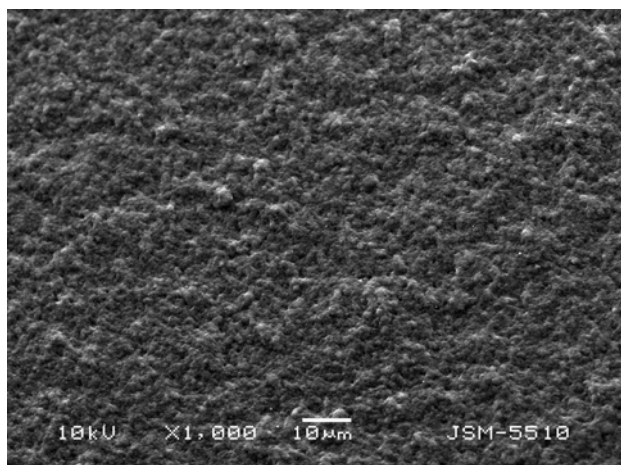
Процесът на формиране на биофилм и продуциране на външноклетъчна полимерна субстанция беше онагледен чрез сканираща електронна микроскопия.

Сканиращата електронна микроскопия позволява изследвания с висока разделителна способност, но не може да се използва *in situ* поради нуждата от специфична обработка. Това води до дехидратиране на биофилма и до промяна на тяхната технология. Освен това е известно, че електронните лъчи причиняват промени в биофилма.

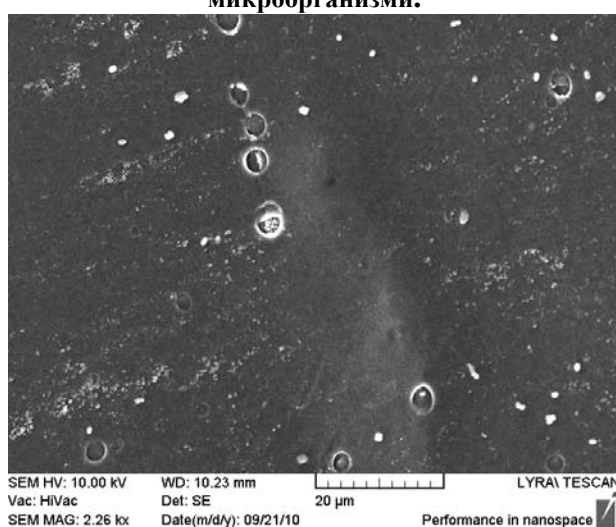
Имайки предвид експерименталните резултати от проследяване кинетиката на нарастване на биомасата и продуциране на външноклетъчни белтъци, и екзополисахариди от разгледаните биофилми бяха подбрани матриците при които биофилмите показаха най-добри показатели. СЕМ позволява да се наблюдават и повърхностите на полимерните матрици, които бяха подбрани и приложени за формиране на биофилмите. От СЕМ снимките на полимерните подложки от (PAN+PAA), (PAN+PAA)+CAB и (PAN+PAA)+CAB+TBOT (Фигури 39, 40 и 41) се вижда, че повърхностите на тези матрици са сравнително гладки с изключение на матрицата от съполимер на акрилонитрил с акриламид и целулозен ацетат бутират, която е релефна и порьозна.



Фигура 39. СЕМ изображение на матрица (PAN+PAA) без имобилизирани върху нея микроорганизми.

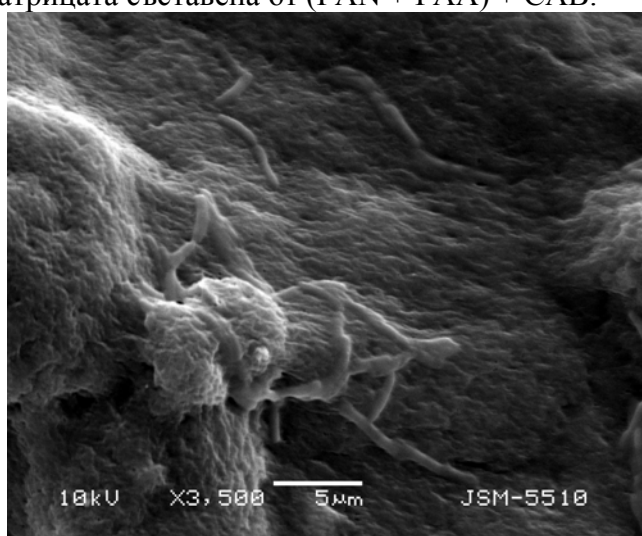


Фигура 40. СЕМ изображение на матрица (PAN+PAA) +CAB без имобилизирани върху нея микроорганизми.



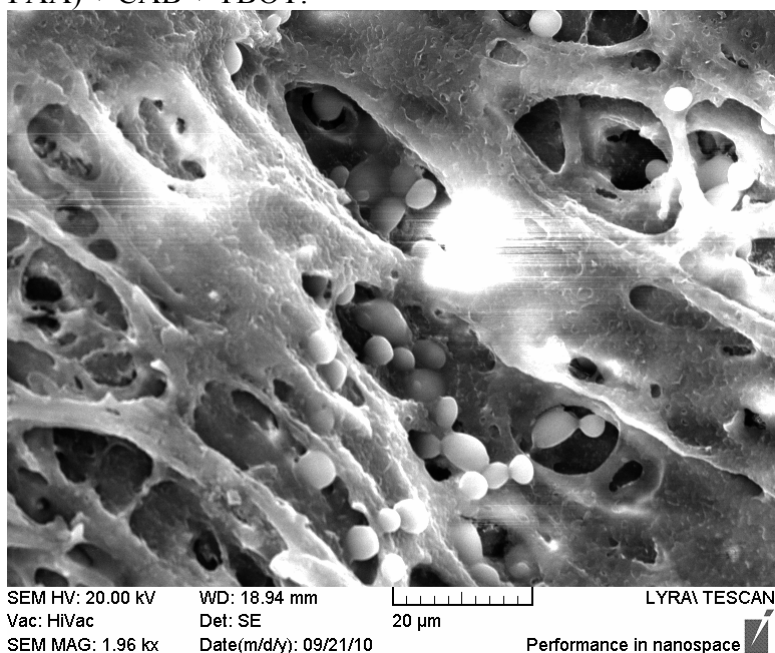
Фигура 41. СЕМ изображение на матрица от CAB + (PAN+PAA)+TWOT без имобилизирани върху нея микроорганизми.

От следващата фигура се наблюдава началния стадий от формирането на биофилм от *Arthrobacter oxydans* като клетките се разпределят по релефната повърхност на матрицата съставена от (PAN + PAA) + CAB.



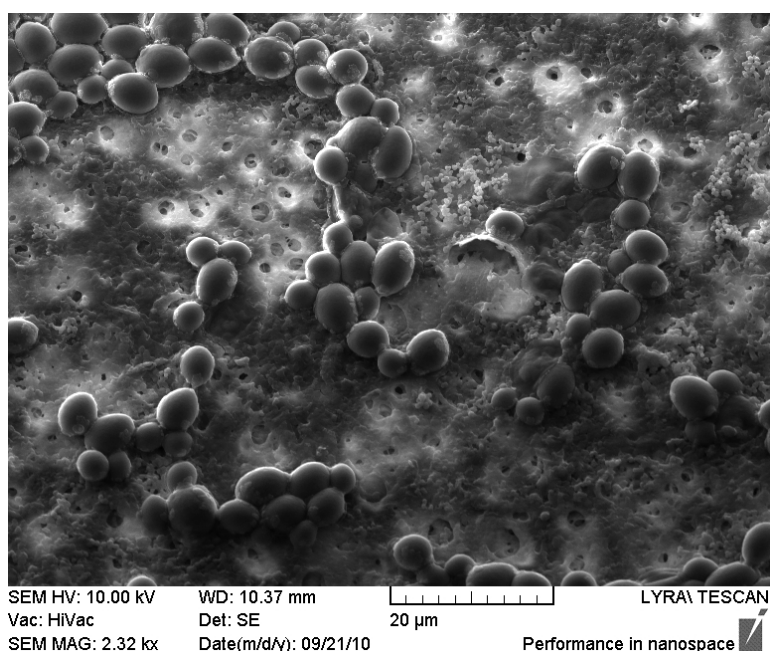
Фигура 42. СЕМ изображение на начален стадий от формиране на биофилм от клетки на *Arthrobacter oxydans* 1388 върху матрица от (PAN + PAA)+ CAB

Следващите СЕМ снимки представят визуализация на биофилми от клетки на шам *Saccharomyces cerevisiae* формирани върху два вида матрици ((PAN + PAA) + CAB и (PAN + PAA) + CAB + TBOT.



Фигура 43. СЕМ изображение на 24 часов биофилм от клетки на *Saccharomyces cerevisiae* върху матрица от (PAA+PAN)+CAB

Фигура 43 представя формирането на 24 часов биофилм, като клетките са ориентирани в порите на матрицата, което е доказателство, че матрицата е подходящ носител за формиране на биофилм.



Фигура 44. СЕМ изображение на 24 часов биофилм от клетки на *Saccharomyces cerevisiae* върху матрица от CAB+(PAA+PAN)+TBOT

Фигурата представя изображение на 24 часов биофилм от клетки на *Saccharomyces cerevisiae* формиран върху матрица, която освен органични компоненти съдържа и метален прекурсор в състава си. Въпреки, че повърхността

на мембраната е сравнително гладка, това не възпрепятства образуването на биофилм, който е равномерен и плътен.

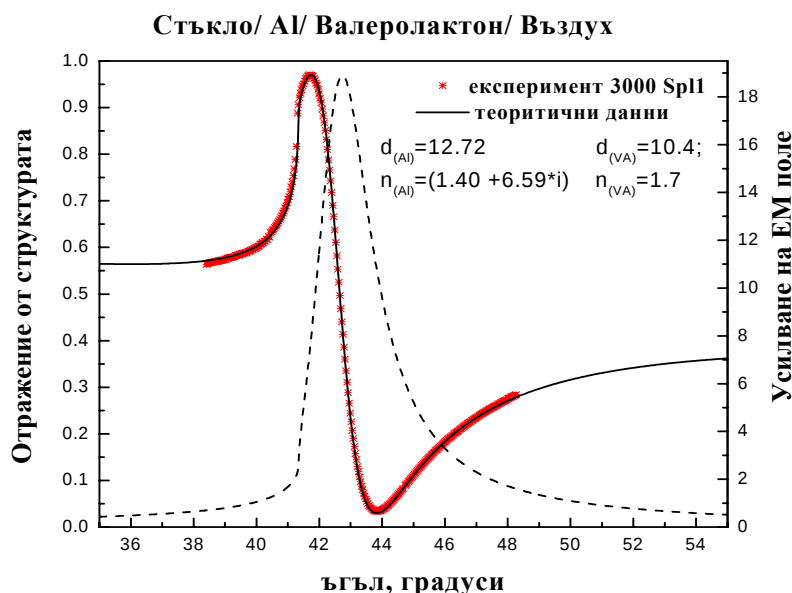
От изобразените по-горе СЕМ-снимки проличава, че и двете матрици са подходящи за формирането на биофилми от дрождеви клетки. Това е доказателство за биологичната съвместимост между клетките и носителите, и благоприятните условия за развитие на структурата.

4.2. Визуализация на синтезираните матрици и формираните биофилми чрез повърхнинна плазмонна микроскопия

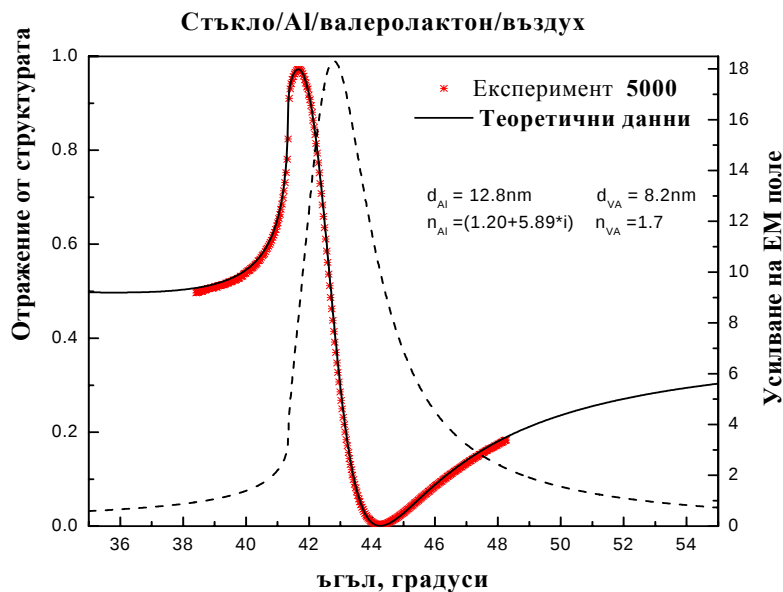
Едно от предимствата на повърхнинната плазмонна микроскопия е възможността за постигане на високи контрастни изображения на обекти, с показател на пречупване близък до заобикалящата ги среда.

Образците с полимерен слой за носители на биофилми от клетки на щам *Arthrobacter oxydans* 1388 бяха подготвени съгласно методичната част. Получените биофилми бяха изследвани посредством повърхнинната плазмонна микроскопия.

Резонансните криви на образците с полимерен слой, нанесен при 3000 и 5000 оборота са представени на фигурите 61 и 62. При 3000 об./мин. минимумът на отражение е при ъгъл 43.72° и дебелината на валеролактона е 10.4 nm. При 5000 об./мин. резонансният ъгъл е при 44,92° и дебелината на полимера е 8.2 nm.



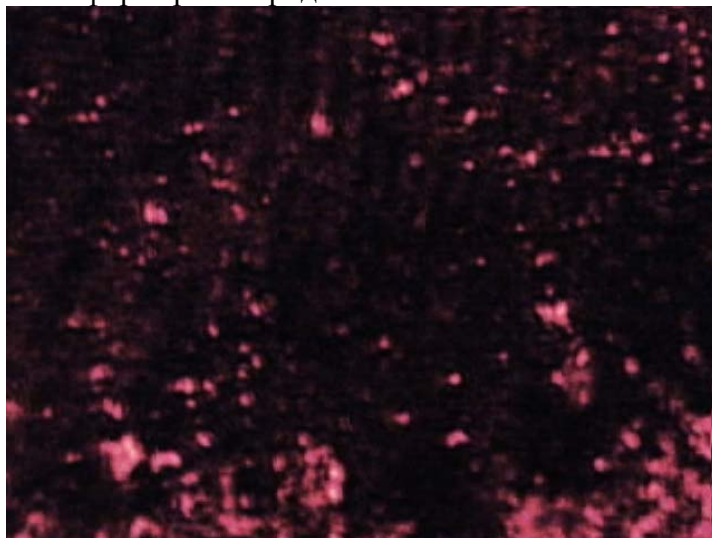
Фигура 45. Съпоставка на теоретичните и експерименталните резултати от определянето на резонансната крива на структурата съгло/ AI слой/ валеролактон, нанесен при 3000 оборота за 60 сек



Фигура 46. Съпоставка на теоретичните и експерименталните резултати от определянето на резонансната крива на структурата съгло/Al слой/ валеролактон, нанесен при 5000 оборота за 60 сек.

Плазмонната микроскопия е отличен метод чрез който могат да бъдат изследвани дебелини на слоеве в nm. Ъгълът на отражение е много чувствителна величина, която както се вижда от фигури 45 и 46 веднага е регистрирана съответно при дебелини 10,4 nm и 8,2 nm.

На фигура 47 е представено изображение на биофилм от клетки на *Arthrobacter oxydans* 1388 формиран в продължение на 24 часа.



Фигура 47. Плазмонно микроскопска снимка на биофилм от клетки на *Arthrobacter oxydans* 1388 формиран за 24 часа върху слой от блок съполимер на валеролактон

Както може да се види от снимката оцветените в червено обекти представляват единични клетки и сгрупвания от клетки върху повърхността на носителя, като след 24^{-ия} час те са разположени равномерно по повърхността на полимерния слой.

За разлика от обикновенните микроскопски техники и СЕМ, повърхнинната плазмонна микроскопия може да служи, като неструктивен метод за проследяване дебелината на слоя на формиращ се биофилм в поточен режим. Това може да бъде обект на бъдеща работа, като се конструира поточна камера при стерилни условия.

4.3. Визуализация на формираните биофилми от клетки на *Saccharomyces cerevisiae* чрез микроскоп на пълно вътрешно отражение

Основните предимства на микроскопа на пълно вътрешно отражение са неговата сравнително лесна реализация и възможността за селективна визуализация на контактната област на изследвания обект със субстрата (например покривното стъкло) без да е необходимо маркиране на клетките, което може да внесе промени в процеса на растеж на биофилма. Това се осъществява благодарение на малката дълбочина на проникване на възбудените затихващи вълни (от порядъка на няколко стотици нанометра).

Образците с биофилми на клетки от щам *Saccharomyces cerevisiae* за визуализация с микроскоп на ПВО, бяха получени съгласно методичната част.

От направените снимки проличава, че гъстотата на формирания биофилм от клетки на *Saccharomyces cerevisiae* е доста голяма, дори се наблюдават три слоя. Схематично тези слоеве са представени на схема 1.

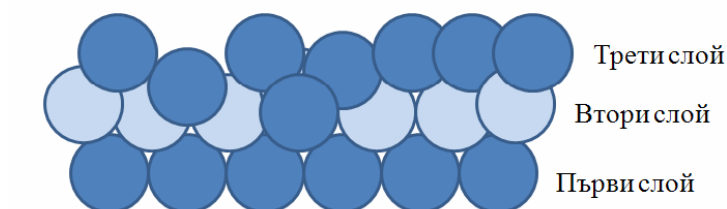
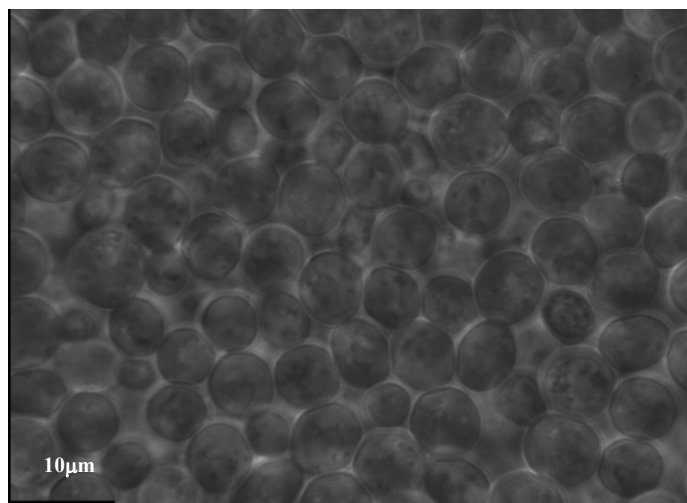
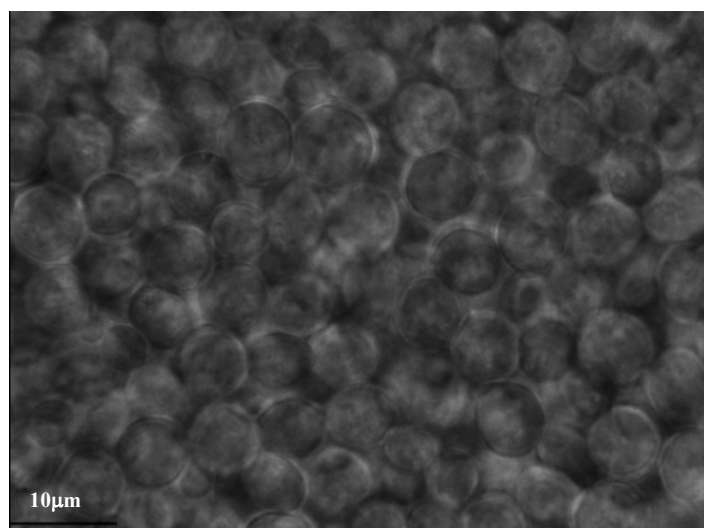


Схема 1. Наблюдаваните слоеве, образувани от *Saccharomyces cerevisiae*

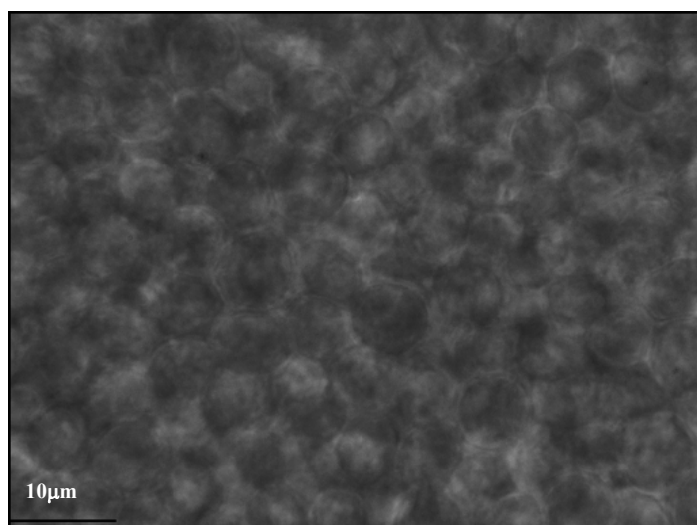
Слоевите се получават поради бързото утаяване на клетките и голямата им гъстота. Логично е да се очаква, че на преминаване ще се виждат и трите слоя, а на затихващи вълни – не. Това се илюстрира на следващите 3 фигури (47, 48 и 49). Направени са снимки на всеки слой по двете схеми. На всички снимки оразмеряващата линейка е с дължина 10 μm . При микроскопия на преминаване вторият и третият слой не се виждат ясно като първия поради разсейването. При микроскопия на ПВО тези два слоя дори не се виждат, както и би трябвало да бъде, ако наистина се постига ПВО и свързаните с него затихващи вълни.



Фигура 47. Първи слой биофилм от клетки на *Saccharomyces cerevisiae* формиран върху полимерен носител

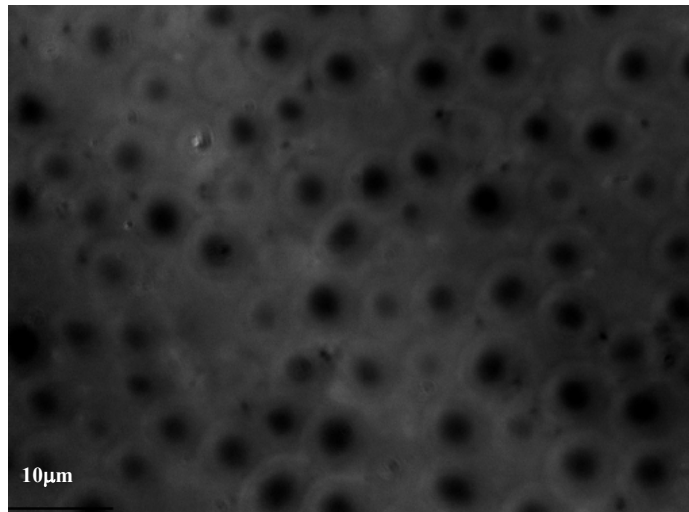


Фигура 48. Втори слой биофилм от клетки на *Saccharomyces cerevisiae* формиран върху полимерен носител



Фигура 49. Трети слой биофилм от клетки на *Saccharomyces cerevisiae* формиран върху полимерен носител

От проведените експерименти с биофилми от клетки на *Saccharomyces cerevisiae* се показват предимствата на ПВО. При наслагване на снимка, направена със схема на преминаване и снимка с микроскоп на ПВО ясно се вижда кои клетки са захванати към подложката и кои не [фигура 50]. Тъмните области от снимката показват клетките, които са прикрепени към повърхността на полимерния носител снимани отдолу.



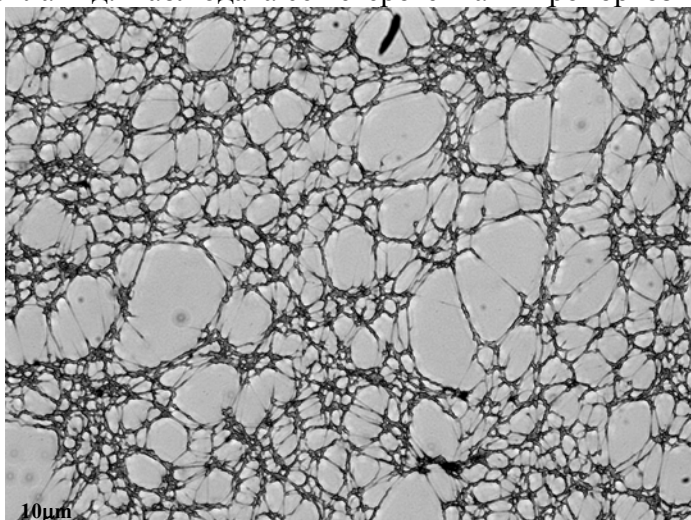
Фигура 50. Биофилм от клетки на *Saccharomyces cerevisiae* формиран върху полимерен носител

С помощта на филм, заснет със CCD камера беше наблюдавано динамичното поведение на биофилма като контактната област периодично се изменяше. Трептенията на биофилма не можеха да се наблюдават с микроскоп на преминаване.

4.4. Визуализация на формираните биофилми от клетки на *Pseudomonas species 1625* чрез оптична микроскопия

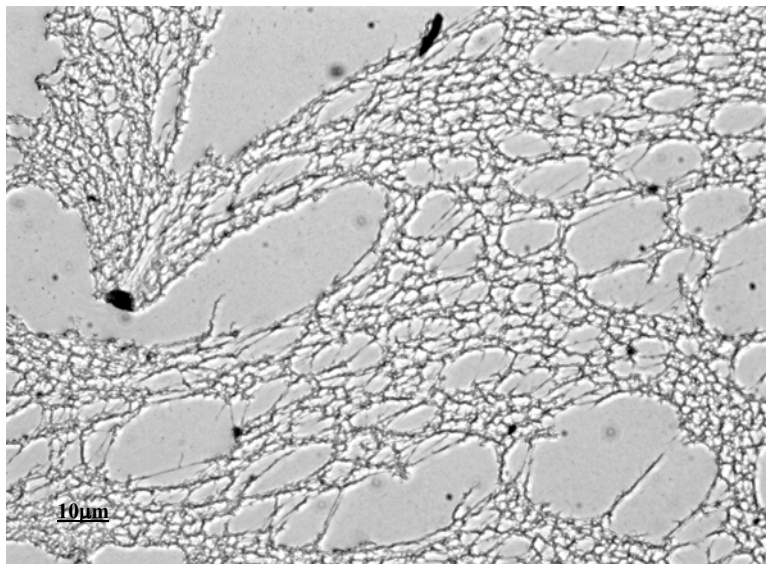
С помощта на оптичен микроскоп – Olympus CX21 [Japan], предоставен от Физическия факултет на „Софийски Университет” бяха визуализирани биофилми, формиращи от клетки на *Pseudomonas species 1625* върху два вида полимерни хибридни носители.

На фигура 51 е представена повърхността на хибридна матрица, синтезирана по зол-гелен метод, съдържаща целулозен ацетат бутират и съполимер на акрилонитрил акриламид. Наблюдава се хетерогенна микропорозна повърхност.



Фигура 51. Изображение на мембрана от PAN+PAA+CAV без имобилизирани върху нея микроорганизми

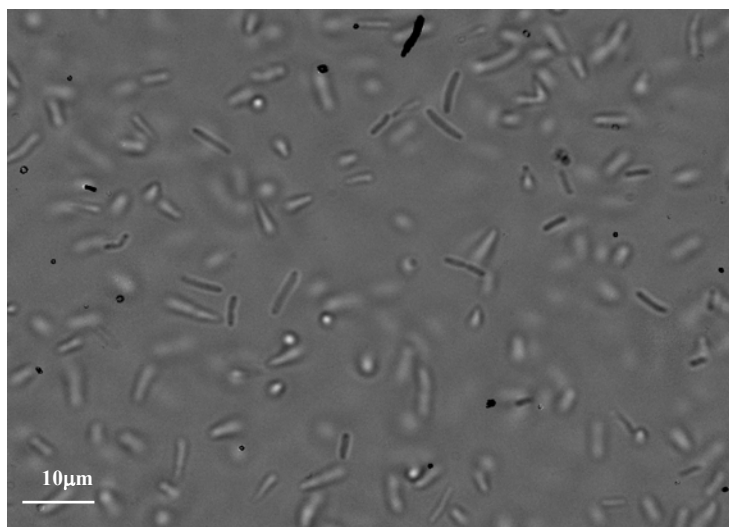
Фигура 52 показва повърхността на полимерна, хибридна мембрана, синтезирана по зол-гел метод с участието на целулозен ацетат бутират, съполимер на акрилонитрил акриламид и титанов буютоксид. Наблюдава се разнообразна повърхностна топология, която представлява сферични образувания, с правилна форма и размери от 1 до 8 μm , разпределени неравномерно по цялата повърхност на мембраната, както и във вътрешността и.



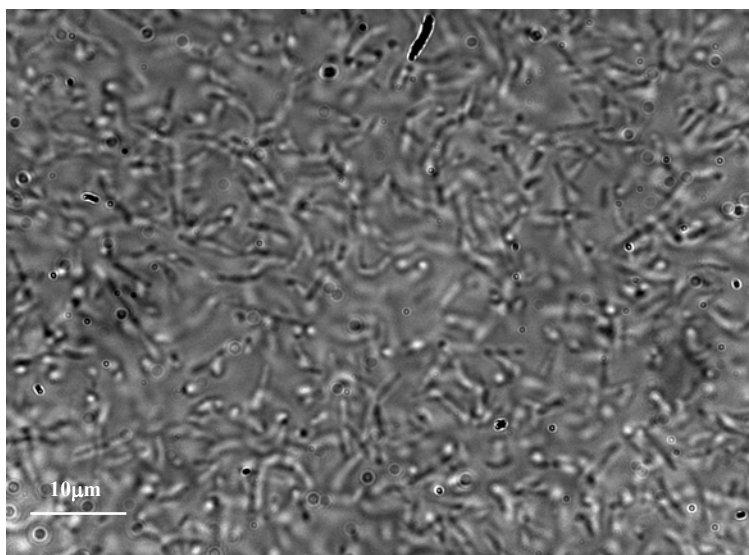
Фигура 52. Изображение на мембрана от PAN+PAA+CAB+TBOT без имобилизирани върху нея микроорганизми

Следващите две фигури представят изображения на биофилми от клетки на щам *Pseudomonas species 1625*, развити върху различни повърхности на глюкозна среда. Те бяха заснети при определени часове от развитието на културата.

На фигури 53 и 54 са показани микроскопски снимки на биофилми върху матрица от (PAN+PAA)+CAB, които са развити в продължение съответно на 6 и 24 часа.



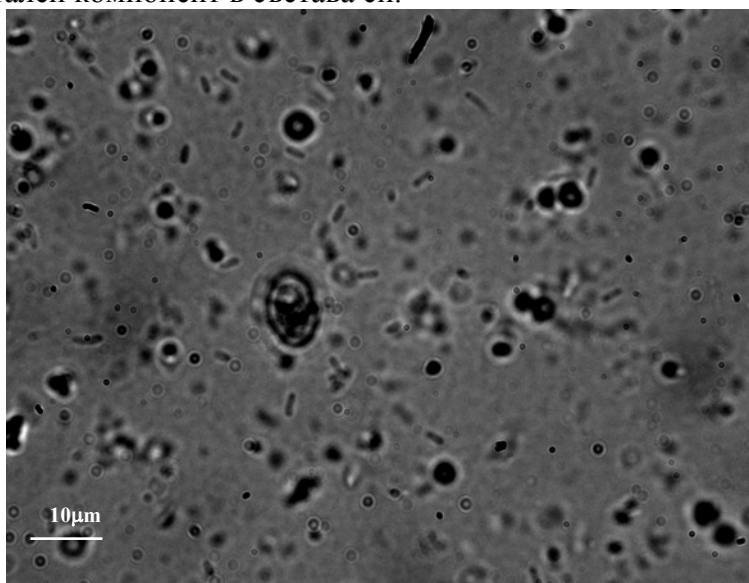
Фигура 53. Изображение на 6 часов биофилм от *Pseudomonas species 1625* върху мембрана от (PAN+PAA)+CAB



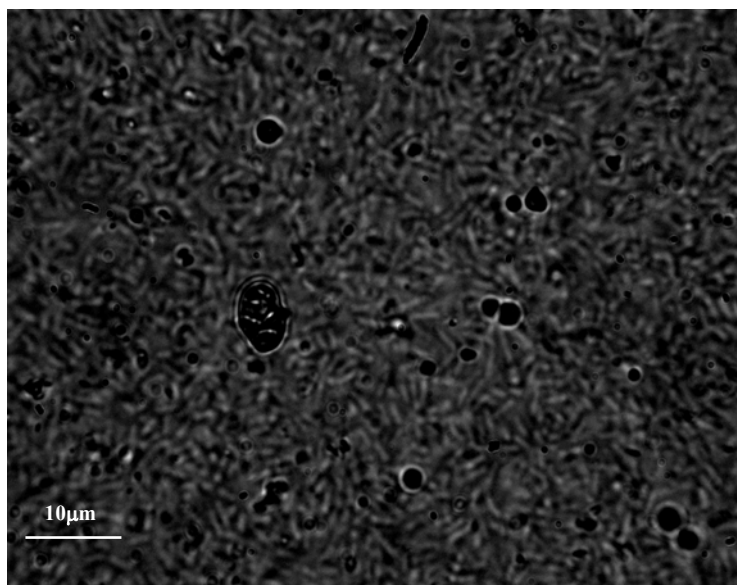
Фигура 54. Изображение на 24 часов биофилм от *Pseudomonas species 1625* върху мембрана от (PAN+PAA)+CAB

Снимките показват равномерно развиване на биофилми върху повърхността на мембраните. Повърхността е силно порьозна, което е предпоставка за проникване на микроорганизми във вътрешността на мембраната, като на 24 час се наблюдава цялостно покритие на мембраната. Поради това може да се обобщи, че тази структура е подходяща за развиване на биофилми.

На следващите две фигури са представени микроскопски снимки на биофилми от клетки на щам *Pseudomonas species 1625*, формирани върху матрици съдържащи метален компонент в състава си.



Фигура 55. Изображение на 6 часов биофилм от *Pseudomonas species 1625* върху мембрана от (PAN+PAA)+CAB+ TBOT



Фигура 56. Изображение на 24 часов биофилм от *Pseudomonas species 1625* върху мембрана от (PAN+PAA)+CAB+ TBOT

Фигури 55 и 56 показват, че матрици съдържащи Ti в състава си са също подходящи носители за формиране на биофилми, като на 24 час от инкубационното време биофилмът е значително по-плътен, от този развит върху матрица без метален компонент.

5. Охарактеризиране на получените подходящи носители за биофилми и формираните биофилми по отношение на реологичните им свойства с помощта на измервания с QCM.

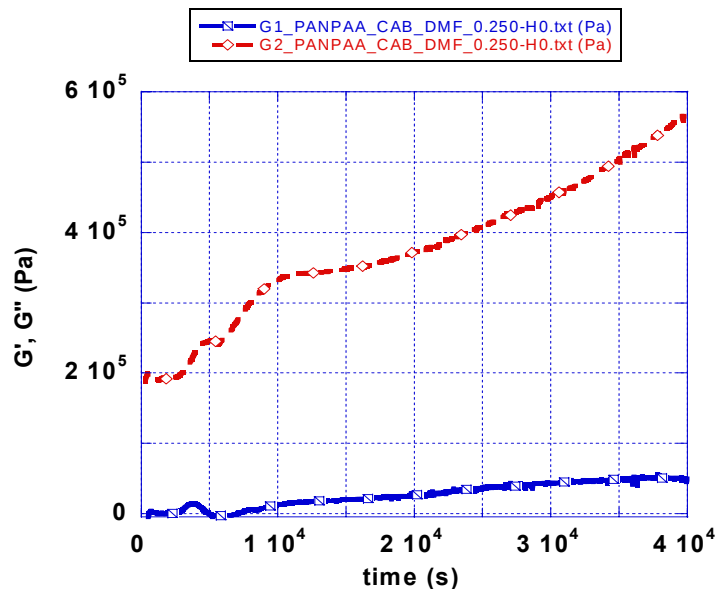
Чрез приложение на измервания с кварцово-кристална микровезна (QCM) бяха проследени вискоеластичните свойства на синтезираните мембрани, както и на формираните биофилми.

Подготовката на образците с полимерните хибридни мембрани и формираните биофилми беше осъществено съгласно методичната част.

В настоящата дисертация чрез реологична техника базирана на измервания в дълбочина в резонаторен режим (TSM) бяха изследвани модулите на натрупване и модулите на загуби, изразяващи съответно изменението на еластичността ($\Delta G'$) и вискозитета ($\Delta G''$) на получените хибридни мембрани и формираните биофилми от клетки на *Saccharomyces cerevisiae* и *Pseudomonas species 1625*.

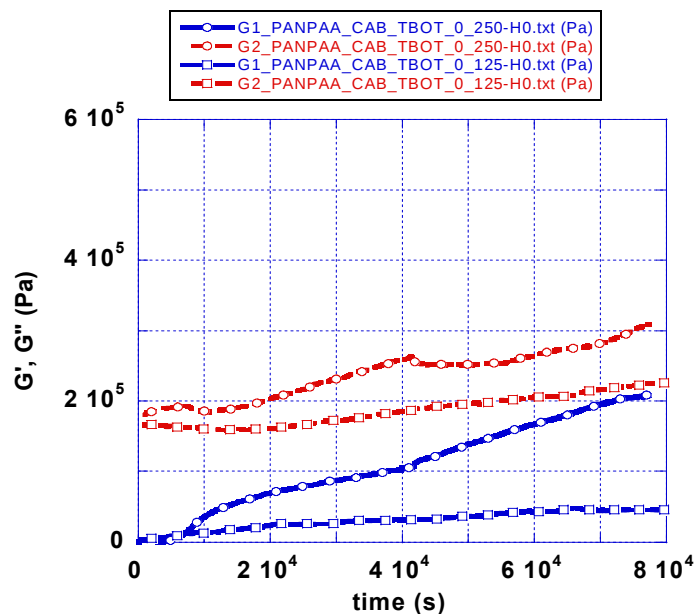
За проследяване процеса на гелиране на хибридните мембрани тази техника беше избрана след различни изследвания и тестове на електричната кондуктивност, електронни микроскопски изображения и динамично светлинно разсейване.

Резултатите получени чрез QCM анализа на изходните органични метериали: целулозен ацетат бутират и съполимер на полиакрилонитрил акриламид разтворени в диметилформамид са представени на фигура 57. Фигурата показва, че началната смес има минимално изменение на модула на натрупване (G') в сравнение с изменението на модула на загуби (G''), който нараства с времето.



Фигура 57. QCM анализ на изходните гелове от CAB+(PAN+PAA)

QCM анализите (фигура 58) показват, че разгледаните концентрации на $\text{Ti}(\text{OBu})_4$ не влияят върху модула на натрупване (G' не се променя) на получените мембрани, но значително се променя модула на загубите (G'') им.

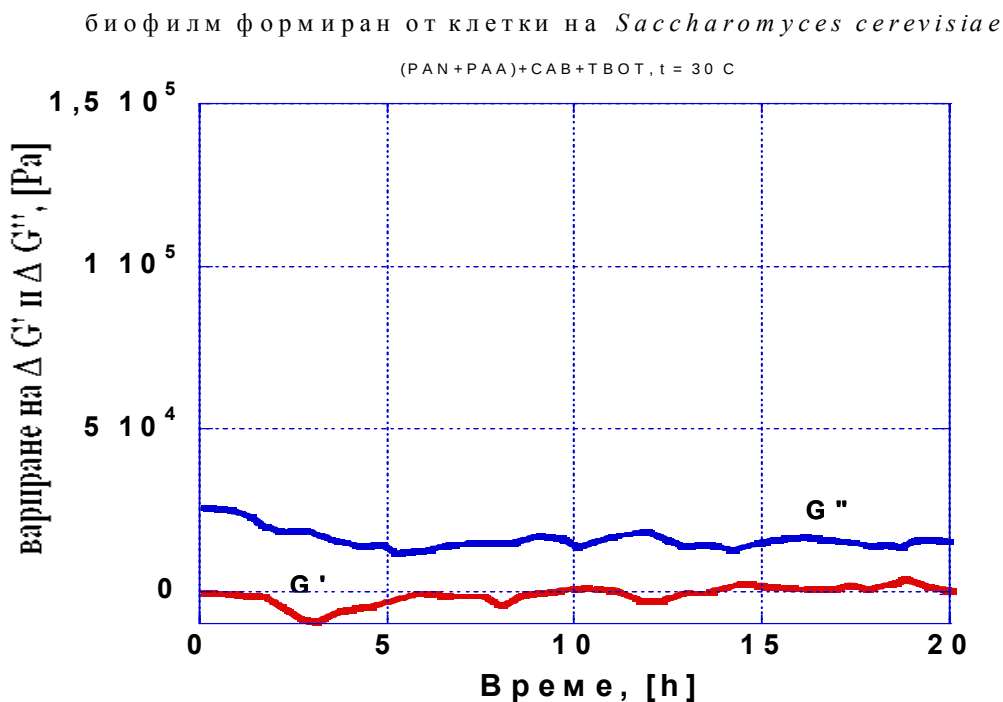


Фигура 58. Сравнение на влиянието на концентрацията на титан върху вискоеластичните свойства на получените хибридни мембрани

Повишаването на концентрацията на $\text{Ti}(\text{OBu})_4$ води до значително увеличаване на модула на загубите, докато модула на натрупване е в същите граници, както е при по-ниските концентрации на $\text{Ti}(\text{OBu})_4$.

На следващите две фигури са представени реологичните свойства на биофилми от клетки на *Saccharomyces cerevisiae* и *Pseudomonas species 1625* формирани върху матрици от (PAN+PAA)+CAB+TBOT. Измерванията бяха проведени при постоянна температура, $t=30^\circ\text{C}$.

И двата биофилма бяха разглеждани като ненютонови течности, с начална стойност на модула на натрупване. Поради трудности при извеждане на масовия ефект, стойностите на изменението на модулите на натрупване ($\Delta G'$) и модулите на загуби ($\Delta G''$) на формираните биофилми бяха представени като вариране на $\Delta G'$ и $\Delta G''$.



Фигура 59. Реологични свойства на формиран биопилм от клетки на *Saccharomyces cerevisiae* върху матрица от (PAN+PAA)+CAB+TBOT

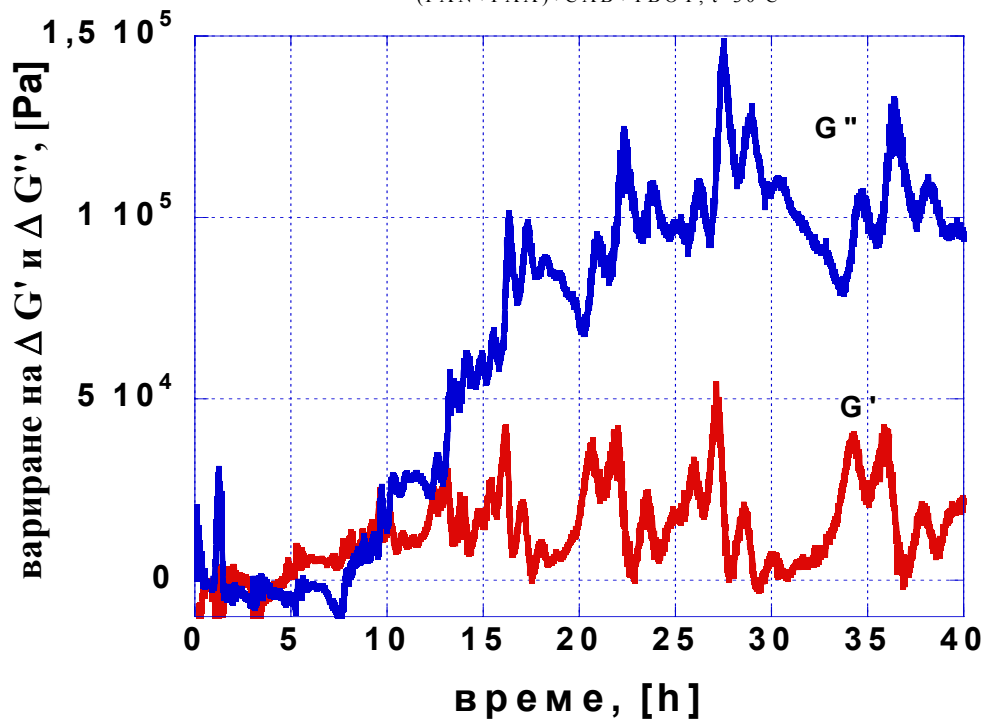
От фигурата проличава, че изследвания биофилм от клетки на *Saccharomyces cerevisiae* формиран върху матрица от (PAN+PAA)+CAB+TBOT не проявява изменение на модулите на натрупване и модулите на загуби. Това вероятно е свързано с факта, че клетките умират и биофилм не се формира при разглежданите условия. Появата на отрицателни стойности на модула на натрупване, предполага утаяване на клетъчната суспензия върху матрицата.

От следващата фигура проличават спадове и пикове на изменение на модулите на натрупване и модулите на загуби. Това вероятно е свързано с факта, че отговорът на кварца е в следствие на развитие на биофилм от клетки на *Pseudomonas species* върху разглежданата матрица. Симетричните спадове и пикове на стойностите на модулите на натрупване и модулите на загуби в рамките на 5 часа е в следствие на факта, че клетките се делят и биофилмът нараства при което се формира вискозната екстрацелуларна полимерна матрица. Всяка промяна в материала, който е отложен върху кварца, променя импеданса на кварца.

От фигурата проличава, че биофилмът проявява по-ясно изразени вискозни свойства, отколкото еластични ($\Delta G'' > \Delta G'$).

биофилм формиран от клетки на *Pseudomonas species*

(PAN+PAA)+CAB+TBOT, $t=30$ C



Фигура 60. Реологични свойства на формиран биопилм от клетки на *Pseudomonas species* 1625 върху матрица от (PAN+PAA)+CAB+TBOT

ДИСКУСИЯ

Биофилмите намират приложение в промишлеността и екологията. Биофилми ефективно се прилагат при пречистването на отпадъчни и индустриални води, замърсявания на въздуха и др.

Макар, че повечето замърсители от химичен характер имат инхибиращ ефект върху развитието на микроорганизмите, е доказано, че биофилми, формирани от различни щамове са в състояние да преодолеят това въздействие и да разграждат споменатите замърсители използвайки ги като въглеродни източници [153].

1. Сравнителни изследвания на биофилми формирани от три различни вида микроорганизми върху новосинтезирани хибридни мембрани

Примери за щамове, които могат да формират ефективни биофилми са: *Bacillus cereus*, *Arthrobacter species*, *Bacillus licheniformis*, *Halomonas salina*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas species 1625*, *Candida albicans* и др. [10, 17, 44, 69, 94].

От посочените по-горе щамове за нашето изследване ние подбрахме три вида микроорганизми, участващи във формирането на биофилми върху новосинтезирани хибридни мембрани, както следва: *Arthrobacter oxydans 1388*, *Pseudomonas species 1625* и клетки от хлебните дрожди *Saccharomyces cerevisiae*.

От литературата е известен ковалентен метод, успешно прилаган при имобилизиране на Грам-положителни микроорганизми като *Arthrobacter simplex* [95] и *Arthrobacter oxydans* [164] към целулозни гранули. Този метод се състои от последователни стъпки на активация, включващи обработката на целулозата с перйодна киселина, карбамид и накрая с формалдехид, при което се създават хидроксиметилови групи, способни да се свържат с аминогрупи от клетъчната стена на бактериите.

С цел оптимизиране и опростяване на процеса на свързване обект на нашите изследвания беше свързване на клетки от *Arthrobacter oxydans 1388* чрез адхезия към повърхността на 4 вида синтетични мембрани на основата на блок съполимер на валеролактон, полиметилметакрилат, PAN+PAA и (PAN+PAA)+CAB, синтезирани от нас. Методът на имобилизация чрез адхезия е сравнително прост и лесен за изпълнение, приложим за по-чувствителни клетки. По време на нашите изследвания ние установихме, че този начин на свързване на микроорганизмите и образуване на стабилен биофилм зависят от различни фактори: природа на клетъчната повърхност, възраст на клетъчната култура, йонизирани групи, вид на полимерната матрица и др. Тези параметри оказват съществено влияние върху адхезията на клетките. Изменения в горните фактори могат да доведат до десорбция на микроорганизмите.

В настоящото изследване беше доказано, че биофилми от клетки на *Arthrobacter oxydans 1388* успешно се формират върху новосинтезирани от нас матрици със състав: PAN+PAA и (PAN+PAA)+CAB. От проведените изследвания установихме, че натрупването на белтъци и полизахариди върху разгледаните матрици, е равномерно на инкубационното време на развитие при двете матрици поотделно.

По нататък нашите изследвания бяха насочени към проследяване формирането на биофилми от клетки на Грам отрицателните бактерии-*Pseudomonas species 1625* и дрожди-*Saccharomyces cerevisiae*. Като носители за формиране на биофилмите, подбрахме матрици съставени от (PAN+PAA)+CAB и от (PAN+PAA)+CAB+TBOT, обосновавайки се на получените положителни

експериментални резултати от развитието на биофилми от клетки на *Arthrobacter oxydans* 1388 върху матрица на основата на (PAN+PAA)+CAB.

Резултатите от направените изследвания на биофилмите формирани от Грам-отрицателните бактерии и дрождите върху двата вида матрици показаха, че натрупването на белтъци и полизахариди е пропорционално на инкубационното време на развитие на биофилмите при всяка една от използваните матрици поотделно. Нарастването на биофилмите върху двете матрици също се определя от времето на развитие. В същото време, сравнението между показателите при двете матрици показва по-стабилното им повишаване при матрицата, съдържаща метален прекурсор.

Таблица 1 представя обобщени експериментални данни от продуцирането на полизахариди и белтъци от трите вида биофилми, както и нарастването на биомасата върху различните видове матрици.

Таблица.1.Сравнителна таблица на количеството синтезирани белтъци и полизахариди от биофилми на клетките *Arthrobacter oxydans 1388*, *Pseudomonas species 1625* и *Saccharomyces cerevisiae* върху различни носители при определен начален и краен час от инкубационното време на развитие

Микроорганизми	Вид матрица	белтъци при 24h [mg.g ⁻¹]	полизаха- риди при 24h [mg.g ⁻¹]	белтъци при 120h [mg.g ⁻¹]	полизаха- риди при 120h [mg.g ⁻¹]	биомаса при 24h [mg.g ⁻¹]	биомаса при 120h [mg.g ⁻¹]
<i>Arthrobacter oxydans 1388</i>	Блок съполимер на валеролактон	4	4.95	3.50	4.12	9.63	15.3
	ПММА	13.34	6.8	6.85	7.90	54	24
	PAN+PAA	7.68	7.1	12.03	42.9	35	85.5
	PAN+PAA+CAB	7.74	12.6	24.89	58.2	63.6	125.04
<i>Pseudomonas species 1625</i>	PAN+PAA+CAB	5.2	10.8	19	56,44	63	130
	PAN+PAA+CAB+TBOT	7,15	9.1	21,84	82,9	65	142
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PAN+PAA+CAB	12.6	1.05	16.2	22.3	27.91	48.4
	PAN+PAA+CAB+TBOT	16.25	18.7	27.8	63.2	56	114

От експерименталните данни представени в таблицата установихме, че биофилми от клетки на *Arthrobacter oxydans* 1388 върху матрица от блок съполимер на валеролактон и матрица на основата на полиметилметакрилат показват по-слабо развитие на биофилмите в сравнение с биофилми от същите клетки върху матрици на основата на PAN+PAA и PAN+PAA+CAB. При биофилми формирани върху матрица на основата на блок съполимер на валеролактон, количеството на белтъци и полизахариди продуцирани от биофилмите при определен начален и краен час от инкубационното време на развитие не нараства. При биофилма формиран върху матрица на основата на ПММА, количеството на синтезираните белтъци намалява два пъти в рамките на инкубационното време на развитие (при 24-я час количеството белтъци е 13.34 mg.g^{-1} , докато след 5 дни е 6.85 mg.g^{-1}). Биомасата на свързаните клетки също намалява два пъти при разглежданото инкубационно време на развитие (при 24 час е 54 mg.g^{-1} , а при 120 час е 24 mg.g^{-1}).

При биофилми формирани върху полимерна матрица със състав PAN+PAA, количеството свързани белтъци в началния стадий от формиране на биофилма беше 7.68 mg.g^{-1} , а в края на разглеждания период от развитие на биофилма (в рамките на 5-я ден) беше 12.03 mg.g^{-1} . При биофилма формиран върху матрица от (PAN+PAA)+CAB количеството белтъци на 24-я час беше 7.74 mg.g^{-1} , а след 5-я ден количеството им се повиши до 24.89 mg.g^{-1} . Относно натрупването на полизахариди синтезирани от клетките формиращи биофилмите, количеството им в началния стадий при биофилми формирани върху матрица на основата само на PAN+PAA беше 7.1 mg.g^{-1} , но след 5 дни инкубиране на развития биофилм количеството им нарасна около 6 пъти (42.9 mg.g^{-1}). При биофилми формирани върху матрица, която освен PAN+PAA, съдържа и CAB в състава си, количеството на продуцираните полизахариди в началния стадий беше 7.74 mg.g^{-1} , а след 5 дни нарасна около 8 пъти (58.2 mg.g^{-1}). Тези резултати показаха, че и двете матрици са подходящи за формиране на биофилми от клетки на *Arthrobacter oxydans* 1388, като по-подходящ носител се оказва матрицата, която съдържа CAB в състава си.

От направените по-късно микроскопски снимки със сканираща електронна микроскопия установихме, че матрицата, съдържаща CAB в състава си е с порелефна и порьозна повърхност, което е предпоставка за проникване на клетките в порите на матрицата и формиране на стабилен биофилм.

При биофилми от клетки на *Pseudomonas species* 1625 формирани върху матрица съставена от (PAN+PAA)+CAB, количеството синтезирани белтъци се повишава около 4 пъти в рамките на инкубационното време на развитие (при 24 час е 5.2 mg.g^{-1} , а при 120 час е 19 mg.g^{-1}). Същата тенденция се наблюдава и при синтезирането на полизахариди. Количеството им в началния стадий от развитието на биофилма е 10.8 mg.g^{-1} , а в разглеждания краен час от инкубационното време е 56.44 mg.g^{-1} . Биомасата на свързаните клетки също нараства пропорционално на инкубационното време на развитие (при 24 час е 63 mg.g^{-1} , а при 120 час е 130 mg.g^{-1}).

При биофилми формирани от същите клетки но върху матрица, която съдържа освен органични полимери и неорганичен компонент в състава си, количеството на синтезираните белтъци и полизахариди е по-голямо, отколото при матрица от (PAN+PAA)+CAB: 7.15 mg.g^{-1} белтъци при 24 час и 21.84 mg.g^{-1} при 120 час. Полизахаридите в началния стадий от инкубационното време на развитие са 9.1 mg.g^{-1} , а в 120 час са 82.9 mg.g^{-1} . Биомасата на 5 дневен биофилм формиран върху тази матрица е около 142 mg.g^{-1} .

Тези резултати показват, че матрицата, която съдържа неорганичен компонент в състава си е по-подходящ носител от мембраната, съставена само от органични полимери.

Подобно поведение показаха и биофилмите от клетки на дрождите *Saccharomyces cerevisiae*. Обект на нашите изследвания беше сравнението на формираните биофилми от дрождите върху двата вида матрици: (PAN+PAA)+CAB и PAN+PAA+CAB+TBOT. Според данните в таблицата, матрицата, която съдържа неорганичен компонент в състава си, се оказва по-подходящ носител за формиране на биофилми. При биофилми формирані върху матрица от (PAN+PAA)+CAB количеството белтъци нараства пропорционално на инкубационното време на развитие (при 24 час количеството белтъци е 12.6 mg.g^{-1} , а при 120 час 22.3 mg.g^{-1}). Количеството полизахариди се повишава почти десетократно в рамките на инкубационното време на развитие. Биомасата на свързаните клетки при началния час от инкубационното време е 56 mg.g^{-1} , а в крайния час от разглежданото развитие е два пъти повече (114 mg.g^{-1}).

От данните представени в таблицата може да се направи следното заключение: биофилми от клетки на щам *Arthrobacter oxydans* 1388 успешно се развиват и върху двата вида полимерни матрици: (PAN+PAA) и (PAN+PAA)+CAB.

Биофилми от клетки на щамове: *Pseudomonas species* 1625 и дрожди-*Saccharomyces cerevisiae* също се развиват успешно и върху двата разглеждани вида матрици ((PAN+PAA)+CAB и (PAN+PAA)+CAB+TBOT), но по-добро развитие показват биофилмите формирані върху гранули, синтезирани по зол-гелен метод, съдържащи и неорганичен компонент, освен органична част.

Присъствието на Ti в състава на новосинтезираните матрици, вероятно създава предпоставка за промяна в свойствата на структурата на носителя по такъв начин, че се повишава сродството на мембранната повърхност към формирането на биофилма. Инкорпорирането на титаниеви йони в матрицата предполага повишаване на повърхността и, което е предпоставка за по-доброто прикрепяне на микроорганизмите към носителя.

Сравнение на получените данни от нашето изследване може да се направи с някои проучвания върху формирането и развитието на биофилми от други щамове, формирані върху други видове синтетични матрици.

Сравнителните данни са представени в таблицата по-долу. Макар че изследователите разглеждат поведението на биофилми от консорциум на различни видове микроорганизми, те получават сходни резултати с нашите изследвания.

Изследователите [6] установяват пропорционално повишаване на количеството белтъци и полизахариди в рамките на разглежданото инкубационно време на развитие. Количеството белтъци и полизахариди в началния стадий от формиране на биофилмите е съответно 58 mg.g^{-1} и 5 mg.g^{-1} . След 8 дневен период на инкубационно развитие на биофилмите, количеството на белтъците се повишава около 3 пъти (193 mg.g^{-1}), а на полизахаридите около 20 пъти (94 mg.g^{-1}).

Таблица.2.Сравнителна таблица на количеството синтезирани белтъци и полизахариди от биофилми формирані върху синтетични носители.

Микроорганизми	Вид матрица	белтъци	полизахариди	инкубационно време, [дни]	източник
Активна утайка, съдържаща смес от различни щамове	Синтетична полимерна мембрана	58 mg.g^{-1}	5 mg.g^{-1}	1	Ahimou F., Semmens M.J., Haugstad G., and Novak P.J., (May 2007),[6]
		193 mg.g^{-1}	94 mg.g^{-1}	8	
Активна утайка от битови отпадъчни води	Синтетична полимерна мембрана (плексиглас)	190 mg.g^{-1}	30 mg.g^{-1}	5	McSwain B. S, Irvine R. L, Hausner M, Wilderer P. A, (Feb 2005), [114]

2. Сравнителни изследвания на приложението на получените биофилми от клетки на *Pseudomonas species 1625* и *Saccharomyces cerevisiae* в процесите съответно на биоразграждане на токсични вещества и алкохолна ферментация

2.1. Сравнителни изследвания на биоразграждането на фенол и бензилов алкохол от свободни клетки и биофилми от щам *Pseudomonas species 1625*

Фенолът е токсичен и в много ниски концентрации, поради което е необходимо да се прилагат различни методи за редуциране на фенолните концентрации в отпадъчни води до нормативни стойности. От няколко възможни метода, биологичното третиране на водите е най-атрактивно. При него фенолът се разгражда до безвредни крайни продукти и минерални вторични отпадъчни вещества [16, 23, 77, 180].

Биологичното разграждане на фенола е било дълго време изучавано и няколко изследвания доказват, че аеробното разграждане на фенола се осъществява с помощта на широка разновидност от микроорганизми включващи бактерии като: *Arthrobacter chlorphenolicus* [107], *Pseudomonas pictorum* [13], *Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas fluorescens* [126, 128], *Acinetobacter Sp.* [4], *Nocardioides sp.* [39], както и някои дрожди като *Candida tropicalis* [57, 179] и *Trichosporon cutaneum* [9, 68, 75].

В настоящото проучване обект на нашите изследвания беше приложението на биофилми от клетки на *Pseudomonas species 1625* формирани върху два вида матрици ((PAN+PAA)+CAB и (PAN+PAA)+CAB+TBOT) в процесите на биоразграждане на фенол и бензилов алкохол, присъстващи както самостоятелно в средата на култивиране, така и в смес.

От литературата е известно приложението на биофилми от клетки на два ксенобиотично-толерантни бактериални изолати-KCM R₅ и KCM RG₅, формирани върху криогел в процесите на биоразграждане на фенол. Изследователите разглеждат способността на формираните биофилми да разграждат фенол в концентрации: 300, 400, 600 и 1000 mgL⁻¹ в рамките на 28 дни. Биофилмите формирани от клетки на KCM RG₅ разграждат 600 mgL⁻¹ фенол в рамките на 24 часа, докато биофилмите от KCM R₅, разграждат за 24 часа най-високата концентрация на фенол-1000 mgL⁻¹ [150].

Изследователи съобщават за приложението и на имобилизирани клетки в процесите на разграждане на фенол. Клетки от филаментозите дрожди *Trichosporon cutaneum* R 57 са ковалентно имобилизирани върху полимерни мембрани на основата на полиакрилонитрил, както и полиамидни мембрани. Така имобилизираните клетки са култивирани на среда съдържаща 1g.l⁻¹ фенол, като имобилизираните върху PAN клетки, разграждат фенола в рамките на 45 часа, докато клетки имобилизирани върху полиамидни гранули разграждат фенола за около 51 часа [74].

Позовавайки се на литературните данни ние разгледахме възможността на биофилми от клетки на щам *Pseudomonas species 1625* да разграждат фенол в три различни концентрации съответно 0.1mg.ml⁻¹, 0.3mg.ml⁻¹ и 1mg.ml⁻¹ в рамките на 3 дни инкубационно време на развитие. Беше направено сравнение между свободни клетки и биофилми формирани върху два вида матрици. По време на нашите експерименти установихме, че биофилмите разграждат минимално фенол в концентрация 0.3 mg.ml⁻¹ и то в първите 6 часа от инкубационното време. Подобно поведение показаха и свободните клетки, но разграждането на фенол в първите 6 часа беше в по-малка степен в сравнение с биофилмите (фиг.18, фиг.19 и фиг. 20). При разглеждане влиянието на фенол в концентрация 1 mg.ml⁻¹ ние установихме, че токсичното съединение се явява инхибитор на растежа, както на свободните клетки така и на

биофилмите. Биоразграждане не се наблюдаваше и в двата случая. Освен това при култивиране на свободни клетки от щам *Pseudomonas species 1625* в среда съдържаща фенол в концентрация 1 mg.ml^{-1} , клетките след 6 час от инкубационното време попадат в летална фаза на развитие [фигура 16].

Сравнение на получените от нас резултати, може да се направи с изследвания на учени в областта на разграждане на фенол от свободни и имобилизирани клетки на дрождите *Trichosporon cutaneum*. Учените докладват за биодеградацията на фенол с имобилизирани клетки *Trichosporon cutaneum* R57, при което е установено, че скоростта на трансформация на субстрата е най-висока при $0,35 \text{ g.l}^{-1}$ фенол. С увеличаване на субстратната концентрация, намалява скоростта на неговото разграждане, което показва субстратно инхибиране [3]. Установено е, че максималната фенолна концентрация, която може да бъде използвана е $1,0 \text{ g.l}^{-1}$ за свободни и имобилизирани клетки, след което се наблюдава силно инхибиране на процеса [3].

По нататък нашите изследвания продължиха в проследяване биоразграждането на бензилов алкохол в концентрации - 0.1 mg.ml^{-1} , 0.3 mg.ml^{-1} и 1 mg.ml^{-1} от свободни клетки и биофилми на щам *Pseudomonas species 1625*, формирани върху два вида матрици ((PAN+PAA)+CAB и (PAN+PAA)+CAB+TBOT).

От литературата са известни научни публикации, свързани с биодеградация на бензилов алкохол при анаеробни и аеробни условия от някои щамове микроорганизми, като: *Acinetobacter calcoaceticus* [136], *Pseudomonas fluorescens* [155], *Geobacter metallireducens* [89], *Mucor hiemalis* [142], и др.

В настоящото проучване ние направихме сравнение на биоразграждането на бензилов алкохол от свободни клетки и биофилми от щам *Pseudomonas species 1625*.

Резултатите от нашето изследване показаха, че свободните клетки разградиха напълно бензиловия алкохол във всички разглеждани концентрации след 36 час от инкубационното време. При биофилмите формирани върху носител на основата на (PAN+PAA)+CAB бензиловия алкохол в по-високите концентрации (0.3 mg.ml^{-1} и 1 mg.ml^{-1}) беше напълно разграден след 48 час от инкубационното време. При концентрация 0.1 mg.ml^{-1} се наблюдаваше задържане до 50 час, след което бензиловия алкохол беше напълно разграден. Причина за подобно задържане вероятно е ниската концентрация на въглероден източник, който клетките използват като единствен хранителен субстрат. При биофилми формирани върху матрица на основата на (PAN+PAA)+CAB+TBOT бензиловия алкохол беше напълно разграден и в трите разглеждани концентрации след 48 час от инкубационното време.

Според фигура 17 в среда само на бензилов алкохол свободните клетки показаха сравнително добро развитие и при трите разглеждани концентрации.

В настоящото изследване беше направено сравнение между свободните клетки и биофилми от щам *Pseudomonas species 1625* култивирани на среда съдържаща смес от фенол и бензилов алкохол в концентрации 0.05 mg.ml^{-1} за всеки един от токсичните компоненти. Резултатите показаха, че свободни клетки от щам *Pseudomonas species 1625* се развиват сравнително добре на бисубстратна хранителна среда (фигура 24). Според фигурата бензиловият алкохол е напълно изчерпан след 36 час, а фенолът е наполовина изчерпан до 72 час. Подобно поведение показват и биофилмите култивирани на същата среда. Бензиловият алкохол е напълно изчерпан след 36 час и при двата биофилма (фигури 25 и 26). Относно изчерпването на фенол при биофилмите се наблюдава първоначално рязко понижаване на концентрацията след 6 час, последвано от задържане до 36 час, свързано вероятно с факта, че клетките предпочитано усвояват първо бензиловия алкохол поради по-ниската му токсичност. След изчерпване на единия субстрат в средата биофилмите формирани и върху двата вида матрици усвояват наполовина фенола, като по-ясно биоразграждане се

наблюдава при биофилми формирани върху матрица на основата на (PAN+PAA)+CAB.

Най вероятно това поведение на свободните клетки и биофилмите се дължи на факта, че фенолът в тази среда е в по-ниска начална концентрация. Освен това присъствието на втория компонент в средата индуцира продуцирането на специфични ензими, които катализират разграждането на токсичните вещества.

Според данни от литературата подобно е и поведението на клетки от щам *Burkholderia species JS 150*, култивирани на бисубстратна система, състояща се от фенол и толуен. Резултатите показват, че клетките предпочитано усвояват толуена пред фенола. Тoluена се явява инхибитор на скоростта на усвояване на фенола, докато присъствието на фенола, оказва малък ефект върху скоростта на разграждане на толуена [143].

2.2. Сравнителни изследвания на приложение на свободни клетки и биофилми от щам *Saccharomyces cerevisiae* в процесите на алкохолна ферментация

В настоящото проучване ние проследихме вероятното приложение на биофилми от клетки на хлебни дрожди – *Saccharomyces cerevisiae* в процесите на алкохолна ферментация.

Предимствата на използването на имобилизирани клетки за алкохолна ферментация пред приложението на свободни клетки във ферментационния процес, се характеризират с по-високи скорости на реакция поради по-голямата гъстота на клетките, подобрена доходност и жизнеспособност на клетката в продължение на няколко цикъла на ферментация [28, 72, 92, 166, 169].

В настоящото изследване ние проследихме възможността на клетки на *Saccharomyces cerevisiae* да осъществят ферментация на различни субстрати в условията на формиране на биофилми. Бяха направени сравнения между свободни клетки и биофилми формирани върху два вида матрици (PAN+PAA)+CAB и (PAN+PAA)+CAB+TBOT.

От направените експерименти установихме, че по-голямо количество етанол (приблизително 6.5% C_2H_5OH) се получава от субстрат-10%^{на} глюкоза при приложение на свободни клетки. При биофилмите количеството продуциран етанол беше минимално, като в малко по-висока концентрация беше етанолът получен от биофилм формиран върху матрица съставена само от органични полимери (приблизително 1 % C_2H_5OH) (фигура 34).

Висока ефективност в алкохолната ферментация може да се постигне, чрез контролиране на основните параметри на ферментацията, например температура и рН. Известно е, че максимален добив на етанол при минимално ферментационно време на алкохолна ферментация от лигноцелулозни хидролизати, използвани от *Saccharomyces cerevisiae* се получават при 33,2°C и рН 5,3 [38].

Позовавайки се на литературата в настоящото проучване ние използвахме два вида лигноцелулозни хидролизати (ензимен и паровзривен) като субстрати за получаване на етанол от свободни клетки на *Saccharomyces cerevisiae* и биофилми (фигури 36, 37 и 38). При свободните клетки установихме, че ферментацията на глюкоза като контролна проба показва задоволително количество етанол (около 4 %), докато при приложението на ензимния хидролизат и в трите случая етанол беше продуциран в ниски концентрации. В най-ниска концентрация етанол беше получен при биофилм формиран върху матрица на основата на органични полимери и метален компонент в състава си. При използване на паровзривен хидролизат етанол не се продуцираше и в трите разгледани случая.

При приложение на ензимен хидролизат от биофилма формиран върху матрица съдържаща и метален компонент в състава си установихме задържане на ферментацията (фигура 38).

Причините за подобно задържане на ферментационния процес биха могли да са основно две: или в средата съществуват значителни концентрации от инхибиращи развитието на ферментиращия микроорганизъм съединения, или получените при хидролизата захари не са усвоими от този микроорганизъм. По време на паровзривната хидролиза на лигноцелулозни материали се образуват фурфурали, инхибиращи развитието на микроорганизмите. От друга страна наличието на ферментационен процес в сместа от двата хидролизата подсказва, че най-вероятно лимитирането на процеса е обусловено от невъзможността на дрождите да усвояват захарите получени в резултат на паровзривната хидролиза. Подобно виждане се потвърждава и от някои литературни източници подчертаващи съчетаването на относителната толерантност на дрождите *Saccharomyces cerevisiae* спрямо инхибиторните съединения, получавани при киселинна хидролиза с недостатъка на доста тесния диапазон от достъпни за усвояване от тях захари [132, 102].

Остава открит въпросът за ефективността на ферментацията на пентозни захари до етанол. За това са необходими специални щамове. Показател за технологичните трудности пред въвеждането им е и факта, че единственият пилотен завод за биоетанол от слама в Европа в Калънборг, Дания, стартирал септември 2010 г. не преработва водния хидролизат до биоетанол, а го използва за храна на животните.

3. Сравнителни изследвания на новосинтезираните хибридни мембрани и биофилмите от клетки на *Pseudomonas species 1625*, и *Saccharomyces cerevisiae* по отношение на реологичните им свойства

В момента има нарастващ интерес към механичните свойства на биофилмите, които проявяват поведение на реологични флуиди. Разбирането на тези свойства осигурява необходимата основа за ефективен контрол на биофилма в промишлени и медицински среди. Изследователи подробно представят вискоеластичните свойства на биофилми от клетки на *Pseudomonas aeruginosa* [177]. Други учени доказват, че бактериалното прикрепяне зависи от критичното, повърхностно напрежение на твърдата повърхност [29].

В настоящото проучване чрез измервания с кварцово-кристална микровезна проследихме модулите на натрупване (G') и загуби (G''), съответстващи на вискоеластичните свойства на новосинтезираните матрици и формираните биофилми от клетки на *Pseudomonas species 1625* и *Saccharomyces cerevisiae*.

Според литературни данни изследователи проследяват модулите на натрупване и загуби съответстващи на еластичност и вискозитет на кисело мляко. Те установяват, че модулът на вискозитет показва по-високи стойности в сравнение с модула на еластичност [131].

Подобен е случаят и в настоящото изследване, при което ние проследихме началния стадий на гелиране на новосинтезираните матрици на основата на (PAN+PAA) +CAB и (PAN+PAA) +CAB+ TBOT. От експерименталните данни установихме, че при матрица съдържаща само органични полимери в състава си се наблюдават по-високи стойности на модула на вискозитет (фигура 57). Освен това при сравнение влиянието на различни концентрации на $Ti(OBu)_4$, модула на вискозитет нараства правопрпорционално на концентрацията на $Ti(OBu)_4$.

Според изследователи присъствието на Ti в сместа значително намалява модулът на еластичността в сравнение с модула на вискозитет [135]. Те проследяват изменението

на модулите на еластичност и вискозитет на два вида матрици. Едната е на основата на силикон, а другата съдържа Ti в състава си.

В настоящото проучване ние проследихме изменението на модулите на натрупване и модулите на загубите, базирани на принципите на вискоеластичната теория, като модули съответно на еластичност и вискозитет. В експериментите ние проследихме изменението на вариране на модулите на еластичност и вискозитет, разглеждайки биофилмите като ненютонови течности с изразени начални стойности на еластичност. Подобни проучвания са известни и от литературата. Изследователи докладват за изменението на модула на натрупване и модула на загуби по време на началния стадий от формиране на биофилм от патогенните клетки на *Streptococcus mutans* като зъбна плака. Те установяват, че по отношение на разглежданите характеристики, биофилмът проявява свойства на органични полимери [170].

Други изследователи сравняват механичните свойства на два вида биофилми-биофилми формирани от клетки на *Streptococcus mutans* (зъбна плака) и езерни биофилми. Те установяват следните стойности на G' и G'' :

Таблица.3. Реологични свойства на биофилми [176]

Модули на натрупване и модул на загуби	Биофилм от клетки на <i>Streptococcus mutans</i>	Езерни биофилми
G'	63.9 Pa	1.225 Pa
G''	283 Pa	2.526 Pa

Според данните в таблицата и двата биофилма проявяват вискоеластични свойства с ясно изразени вискозни свойства ($G'' > G'$) [176].

Подобно поведение установихме и ние при проследяване вискоеластичните свойства на биофилми формирани от клетки на *Saccharomyces cerevisiae* и *Pseudomonas species 1625*. (фигури 59 и 60)

При формиране на биофилм от клетки на щам *Saccharomyces cerevisiae*, не получихме добри резултати, свързано вероятно с факта, че клетките попадат в летална фаза на развитие и биофилм не се развива при разглежданите условия. Като обект на бъдеща работа нашите усилия ще бъдат насочени към приложението на микроскопско наблюдение на разглеждания биофилм по време на проследяването на вискоеластичните свойства на формирания биофилм.

При втория вид биофилм ние установихме по-високи стойности на модула на загубите, съответстващо на повишаване на вискозните свойства на биофилма. Това е свързано вероятно с факта, че при формирането на биофилма се продуцира синтезирането на екстрацелуларна полимерна субстанция, за която от литературата е известно, че наподобява лепкава материя, “слуз” [55].

Отрицателните стойности на модулите на натрупване, съответстващо на еластичността се дължи на факта, че измерванията ни започнаха от начална стойност на еластичност. Нелинейното поведение на отговора на кварца е свързано вероятно с факта, че по време на формирането на биофилма, в следствие деленето и отмирането на клетки, което също така може да е свързано с утаяване се получава отрицателен отговор на кварца.

Съвременното познаване на структурата и особеностите на биофилмите значително променя подходите на изследователите в микробната екология и биотехнологиите. Това създава възможност за ефективно използване на биофилми при пречистването на отпадъчни води.

ИЗВОДИ

I. Получени са биофилми от три различни щама микроорганизми – *Arthrobacter oxydans* 1388, *Pseudomonas species* 1625 и *Saccharomyces cerevisiae* върху синтетични полимерни носители.

1. Синтезирани са и подбрани нови, хибридни мембрани като подходящи носители за формиране на биофилми.
2. След проследяване кинетиката на нарастване на биофилмите от щам *Arthrobacter oxydans* 1388 и кинетиката на продуциране на белтъци и полизахариди е установено, че най-подходящи матрици за формиране на биофилми са тези изградени от (PAN+PAA), (PAN+PAA)+CAB.
3. Изследвана е уреазната активност на формирания биофилм от клетки на щам *Arthrobacter oxydans* 1388, като е установено, че след прибавяне на NH_4Cl в концентрации между 10mM и 20mM в средата, тази концентрация е оптимална за успешно приложение и развитие на биофилма.
4. Изследвана е динамиката на нарастване на биофилми и продуциране на белтъци и полизахариди от биофилми на клетки от щам *Pseudomonas species* 1625 върху матрици съдържащи метален прекурсор в състава си. Според количеството синтезирани белтъци и полизахариди е установено, че най-подходяща матрица за формиране на биофилм от клетки на този щам е тази, която съдържа Ti в състава си.
5. Изследвана е биодеградацията на фенол и бензилов алкохол, присъстващи самостоятелно в хранителната среда за култивиране на биофилми от клетки на щам *Pseudomonas species* 1625, в три различни концентрации, както и в смес от фенол и бензилов алкохол. При това изследване беше установено, че самостоятелно фенол в разгледаните концентрации не се разгражда, докато бензиловият алкохол се разгражда напълно и в трите разгледани концентрации след 36 час от инкубационното време. При култивиране на биофилмите в смес от фенол и бензилов алкохол е установено, че фенолът се разгражда в значителна степен но не напълно, докато бензиловият алкохол отново е напълно разграден.
6. Изследвана е динамиката на нарастване на биофилми от клетки на щам *Saccharomyces cerevisiae*, както и продуцирането на белтъци и полизахариди от формираните биофилми върху два вида матрици. Установено е, че най-подходяща матрица за формиране на биофилми от този щам е тази, която съдържа метален прекурсор в състава си.
7. Биофилми от клетки на щам *Saccharomyces cerevisiae* бяха успешно приложени в процесите на алкохолна ферментация на глюкоза и два вида лигноцелулозни хидролизати.
8. От изследванията се установи, че етанол се получава и от трите субстрата, като от ензимния хидролизат е в по-голяма концентрация. По-голямо количество етанол продуцират свободните клетки от щам *Saccharomyces cerevisiae*.

II. Формираните биофилми бяха визуализирани чрез СЕМ, плазмонна микроскопия, микроскоп на ПВО и оптична микроскопия.

1. От получените микроскопски изображения се установи, че и трите вида разгледани матрици са подходящи за формиране на биофилми.
2. Плазмонната микроскопия и микроскопа на ПВО са неdestructивни методи за изследване и визуализация на биофилми. Те позволяват наблюдение в реално време на формираните биофилми.

III. Синтезираните мембрани и получените биофилми са охарактеризирани според реологичните си характеристики чрез QCM

1. Установено е, че присъствието на Ti не влияе върху модула на натрупване (еластичност) на получените мембрани, но значително променя модула на загуби (вискозитет).
2. При изследване на формиране на биофилм от клетки на *Pseudomonas species 1625* се установи, че модулът на загуби нараства пропорционално на инкубационното време на развитие.

ПРИНОСИ

1. Извършен е синтез и подбор на най-подходяща хибридна мембрана като носител за формиране на биофилми от три вида микроорганизми.
2. Формирани са биофилми от клетки на Грам положителни бактерии-*Arthrobacter oxydans 1388*, Грам отрицателни бактерии-*Pseudomonas species 1625* и дрожди-*Saccharomyces cerevisiae*.
3. Формираните биофилми са охарактеризирани по отношение на динамиката на нарастване на биофилма и продуциране на белтъци, и полизахариди.
4. Изследвана е биодеградацията на фенол и бензилов алкохол от биофилми на клетки от щам *Pseudomonas species 1625*.
5. Изследвана е алкохолната ферментация на биофилми от клетки на щам *Saccharomyces cerevisiae* при субстрати-глюкоза и два вида лигноцелулозни хидролизати.
6. Успешно са приложени алтернативни, иновационни техники за визуализация и наблюдение в реално време на формираните биофилми, чрез плазмонна микроскопия и микроскоп на ПВО
7. Успешно са изследвани реологичните характеристики на формираните биофилми чрез QCM

Резултатите представени в настоящата дисертация са обобщени в следните публикации в международни и национални специализирани списания:

1. Plasmon microscopy and imaging ellipsometry of *Arthrobacter oxydans* attached on polymer films”, **Dessislava Marinkova**, Maria Bivolarska, Lyubomir Ahtapodov, Lyubov Yotova, Rosa Mateva, Tzvetan Velinov, Colloids and Surfaces B:Biointerfaces 65, 2008, 276-280; IF – 2.975
2. Investigation of formation, development and application of *Arthrobacter Oxydans* 1388 biofilm, L. Yotova, **D. Marinkova**, V. Mironova and R. Dulgerova, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 23, 2009, 823-826; IF-0.3
3. Characterization of New Titanium oxide polymer hybrid membranes for biofilm formation, **D. Marinkova**, D. Danalev, S. Serfaty, L. Yotova, E. Caplain, P.Griesmar, Phosphorous, sulfur, silicon and related elements, 2011, *in press*; IF-0.67

4. Velinov Tz., Asenovska Y., Marinkova D., Yotova L., Stoitsova S., Bivolarska M., Stavitskaya L., (2011 Nov 1), Total internal reflection imaging of microorganism adhesion using an oil immersion objective, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 88 (1): 407-12; IF-2.975
5. "Influence of Polymer Substratum onto *Arthrobacter Oxydans* 1388 Biofilm Formation, Yotova L., **Marinkova D.**, Mironova V., Ivanov T., *Bioautomation*, 2009, 13 issue 4, 211-220;

Научни публикации отпечатани в пълен текст в сборници на научни конференции:

"Immobilization of Biocatalysts and Cells on Hybrid Membranes Synthesis on Sol-gel Method", Yaneva S., **Marinkova D.**, Yotova L., Samuneva B., *BioPS'07, 20st International Symposium Bioprocess Systems, Proceedings*, November 6-7, 2007, Sofia, Bulgaria, Bulgarian Academy of Sciences;

Участия в конференции и симпозиуми

1. **D. Marinkova**, M. Bivolarska, Tz. Velinov, L. Yotova, R. Mateva, *Vizualization of Arthrobacter Oxydans 1388 biofilm*, 23 November, 2007, UCTM, Sofia,
- 2.
3. Anniversary scientific conference, Department of Physicochemistry, poster presentation;
4. **D. Marinkova**, M. Bivolarska, Tz. Velinov, L. Yotova, *Development and application of Arthrobacter Oxydans and Pseudomonas species biofilms*, VIth scientific poster session, University of chemical technology and metallurgy, 21 May 2009, poster presentation;
5. **D. Marinkova**, L. Yotova, M. Bivolarska, T. Velinov, *Development and application of Arthrobacter oxydans and Pseudomonas species biofilms*, 34th FEBS Congress, July 4-9, 2009, Prague Czech Republic;
6. Yotova L., **Marinkova D.**, Mironova V., Ivanov T., *Influence of Polymer Substratum onto Arthrobacter Oxydans 1388 Biofilm Formation*, First national conference with international participation on biomedical and bioprocess engineering BM&BPE'09, December 3-4, 2009, Sofia, Bulgaria report;
7. Lyubov Yotova, **Dessislava Marinkova**, Ivan Stoychev, *Investigation of formation of Pseudomonas species 1625 biofilm onto matrixes based onto new hybrid membranes containing titanium*, VIIth scientific poster session, University of chemical technology and metallurgy, 19 May 2010, poster presentation, Sofia;
8. **Dessislava Marinkova**, Lyubov Yotova, Dancho Danalev, Stephan Serfaty, Emanuel Caplain, Pascal Griesmar, Ivan Stoychev, *Investigation of Pseudomonas Species 1625 biofilm formation onto matrixes based on new hybrid membranes containing titanium*, 6^{eme} Colloque Franco – Roumain de Chimie Appliquee, 7-10 July, 2010, Orleans, France;
9. **Dessislava Marinkova**, Lyubov Yotova, D. Danalev, S. Serfaty, E. Caplain, P. Griesmar, *New titanium oxide based hybrid matrices for biofilm application*, VIIIth scientific poster session, University of chemical technology and metallurgy, 18 May 2011, poster presentation, Sofia;
10. Optical investigation of biofilms based onto TiO₂ – polymer nanoparticles, **Dessislava Marinkova**, Lyubov Yotova, Tzvetan Velinov, *Poster presentation, International Workshop, Implementation of Nanomembrane Technology in the Pharmaceutical Industry*, 9-10 September, 2011, UCTM-Sofia, Bulgaria;