



ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНО И СИСТЕМНО ИНЖЕНЕРСТВО

КАТЕДРА „БИОТЕХНОЛОГИЯ”

инж.Филадия Павлова Тилева-Дилчовска

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

Кинетични и диелектрични изследвания върху биodeградация на фенол

за придобиване на образователната и научна степен „доктор”

по научна специалност

„Биоорганична химия, химия на природните и
физиологично активни вещества”

Научни ръководители: доц. д-р Любов Йотова
 проф. д-р Джерард Маркс

Научно жури: 1. доц. д-р Силиян Чаушев
 2. проф. д.б.н. Яна Топалова
 3. доц. д-р Светла Илиева
 4. проф. д-р Венко Бежков
 5. доц. д-р Любов Йотова

София, 2011

Дисертационния труд е написан на 118 страници, включва 43 фигури, 11 таблици и 1 схема. Цитирани са 150 литературни източника.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет на защита на заседание на разширен катедрен съвет на катедра „Биотехнология” при Химикотехнологичен и металургичен университет-София, състояло се на 22.03.2011г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 14.07.2011г. от 14,00 часа в зала 424, сграда „А” на ХТМУ.

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 доц. д-р Любов Йотова за получените знания и умения, както и за съветите и всестранната помощ, която ми оказа при разработването и оформянето на дисертационния труд.

Благодаря на д-р Gerard Mark за ценния и ползотворен престой в неговата лаборатория в UMIS, Manchester, England и за съдействието му при провеждане на диелектричните измервания и тяхната оценка.

Благодаря на доц.д-р Ирен Цибранска- катедра „Инженерна химия” за неоценимата помощ, съвети и съдействие.

Благодаря на фирма „Биовет”-АД за разбирането и подкрепата.

ВЪВЕДЕНИЕ

Особено актуален днес е проблемът за пречистване на битовите и промишлени отпадъчни води. За непрекъснато променящия се динамичен съвременен свят е от изключително значение въвеждането на нови, модерни технологии за отстраняване на органичните замърсители в промишлените отпадъчни води. Това до голяма степен ще помогне за достигане на адекватни норми и критерии за опазване на околната среда и съхраняване на екологичния баланс в природата. Химическата промишленост, нейното развитие и разширяване представлява определен интерес от една страна, а от друга води до увеличаване на органичните замърсители в природата.

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 организми и особено върху човека. Вредното въздействие на химическите продукти върху околната среда може да има хроничен характер, да се появява в следствие на акумулиране или химически превръщания. Известни са различни класификации на химическите замърсители. Една от тях ги дели на природни (като някои целулозни и лигниннови отпадъци от селскостопанската, текстилната и целулозно-хартиената промишлености) и неестествени за обкръжаващата среда вещества – ксенобиотици.

Ксенобиотиците са вещества, които по своята структура и биологични свойства са чужди на биосферата. Степента на “неестественост” на такива химически вещества е различна, в зависимост от това до колко по своята структура могат да бъдат много близо до природни вещества или напълно се различават от тях. Този показател обаче не характеризира степента на токсичност на тези вещества.

Друга класификация на замърсители от химическата промишленост може да се направи във връзка с вида на произвежданите продукти и тяхното предназначение, а също и по принадлежността и към неорганичната или органичната технология. В отраслите на органичните технологии се произвеждат продукти като въглеводороди, халогено- и нитропроизводни, алкохоли, феноли, естери, алдехиди, кетони, карбоксилни киселини и техни производни, амини, хетероциклени съединения и др. Влиянието на тези продукти върху обкръжаващата среда е различно.

Ксенобиотиците са едни от най-токсичните замърсители отпадащи от коксохимичната, нефтопреработвателната, фармацевтичната, текстилната, целулозно-хартиената промишленост, както и производството на средства за растителна защита. Фенолите и фенолните производни, като хлорофеноли, нитрофеноли и багрила на

фенолна основа, диоксини в някои случаи преобладават във високи концентрации в отпадъчни води в тези производства и са резистентни на биодegradация от повечето микроорганизми. Водата получава оцветяване и специфичен мирис на карбол, покрива се с флуоресциращ тънък слой, пречещ на естественото протичане на биологичните процеси.

Други основни компоненти на отпадъчните води от коксохимическата прамияшеност са амонячните съединения и суспендираните вещества, които образуват утайки по дъното. Опасни за водоемите замърсители са големият брой органични компоненти, които макар и в сравнително ниски концентрации са особено токсични. Това са бензен, толуен, нафтаген, пиридинови производни, масла и смолисти вещества. Те се намират в разтворено или емулгирано състояние и изискванията към пределно допустимите им концентрации в отпадъчните води са много строги.

Изборът на метод за пречистване на отпадъчни води зависи от редица фактори, но предимствата на биохимичните методи за третиране на отпадъчни води пред механичното, физикохимичното, термичното и химическото пречистване са следните:

1. Биохимичното пречистване на отпадъчни води се основава на способността на дадени микроорганизми, притежаващи мулти ензимни системи да разграждат органични съединения, превръщайки ги в безвредни продукти. Пречистените по биохимичен начин производствено отпадъчни води в голяма степен отговарят на санитарно хигиените изисквания и могат да се изпускат в обратното водоснабдяване.
2. Едно от най- значимите постижения на биотехнологията са методите за имобилизиране на живи клетки. Свързването на клетки от микроорганизми има редица преимущества. Живата клетка представлява готов реактор, в който се реализират не само процесите, водещи до образуване на крайния продукт, но и ред други процеси способстващи за подържане на каталитичната активност на системата.
3. Тези методи се отличават с висока специфичност, нисък разход на енергия и могат лесно да бъдат превърнати в непрекъснати процеси.
4. Години на ред, след откриването на активната утайка през 1914 год. тя е използвана широко като биологичен метод за преработка на отпадъци във води.

В последните години постепенно обаче се търсят интензивно нови пречистващи биотехнологични методи, тъй като използването на открити басейни с биологичен материал са свързани с неудобства. Те заемат огромни площи и излъчват неприятен мирис в околната среда. Изследванията са насочени към използването на закрити биореактори- периодичен, колонен и флуидизиран тип, които имат предимство да заемат малко място, като е възможно отделящите се газове да бъдат улавяни ефективно и сведени до минимум емисиите с неприятен мирис. Освен това преимущество е, че такива системи достигат голяма ефективност при използване на кислород особено при оксигеназните много-функционални системи за окисление на ксенобиотици от една страна, а от друга се повишава скоростта на ензимокатализираните реакции, като едновременно с това става възможно използването на селектирани щамове микроорганизми.

С оглед казаното по-горе целта на настоящата дисертационна работа е ***да се изследва биодegradацията на фенол с помощта на свободни и имобилизирани клетки върху синтетичен носител с оглед възможностите за приложение за пречистване на отпадъчни води.***

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

1. Да се свържат ковалентно клетки от *Trichosporon cutaneum* R57 към съполимер на акриламид и акрилонитрил.
2. Получените имобилизирани клетки да бъдат охарактеризирани по отношение на свойствата им за биодegradация на фенол при различни условия и сравнени със свободните клетки.
3. Да се определят кинетичните параметри на изследваните процеси и да се намери адекватен математически модел описващ процеса на биоразграждане със свободни и имобилизирани клетки.
4. Да се изследва устойчивостта на клетки *Trichosporon cutaneum* R57 спрямо различни токсични органични съединения чрез диелектрични измервания.
5. Да се изследва биодegradацията и биоаккумуляцията на други токсични замърсители от клетки *Trichosporon cutaneum* R57.

РЕЗУЛТАТИ

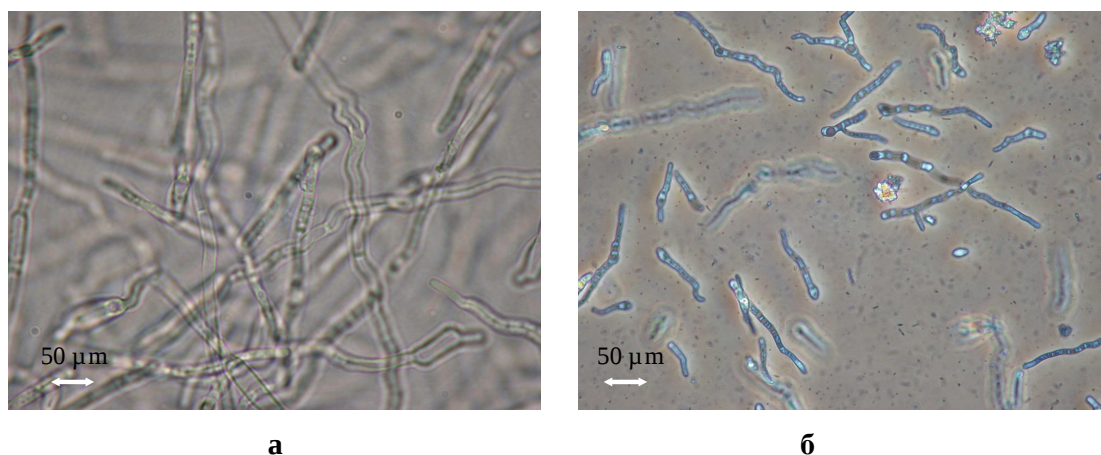
I. Изследвания върху кинетиката на фенол и влиянието на други органични замърсители със свободни и имобилизирани клетки.

1. Култивиране и охарактеризиране на свободни клетки от *Trichosporon cutaneum* R57.

1.1. Култивиране на *Trichosporon cutaneum* R57 на течна хранителна среда съдържаща глюкоза или фенол, като единствен въглероден източник.

Щамът *Trichosporon cutaneum* R57 принадлежи към филаментозни дрожди от род *Trichosporon* и е изолиран от биомасата на дрождеразвъдните апарати, като съпътстваща култура. Клетките на този щам са сравнително големи, притежават добре развит мицел и псевдомицел. Доказано е, че щамът не е патогенен.

В началото на проучването беше проследено развитието на щама *Trichosporon cutaneum* R57 на течна хранителна среда съдържаща глюкоза (2,0g/l) или фенол (0,35g/l), като единствен въглероден източник. При преминаването от един въглероден източник към друг, беше наблюдавано, че микробните клетки претърпяват морфологични изменения, които носят адаптационен характер.



Фиг.1. Електронномикроскопска снимка на клетки *T. cutaneum* R57, растящи на среда съдържаща глюкоза (а) и среда съдържаща фенол (б).

От електронномикроскопските снимки се вижда, че клетки използвали, като въглероден източник глюкоза са по-големи, имат по-дебел септиран мицел в сравнение с клетки прораснали на фенолна среда, които са дребни, по-тъмни и разположени във верижка и по единично.

За изследваните двата въглеродни източника – глюкоза и фенол по отношение трансформационната възможност на клетките са изчислени кинетичните параметри при оптимално съдържание на фенол 0,35 g/l и съответно на глюкоза 2,0g/l (табл.1).

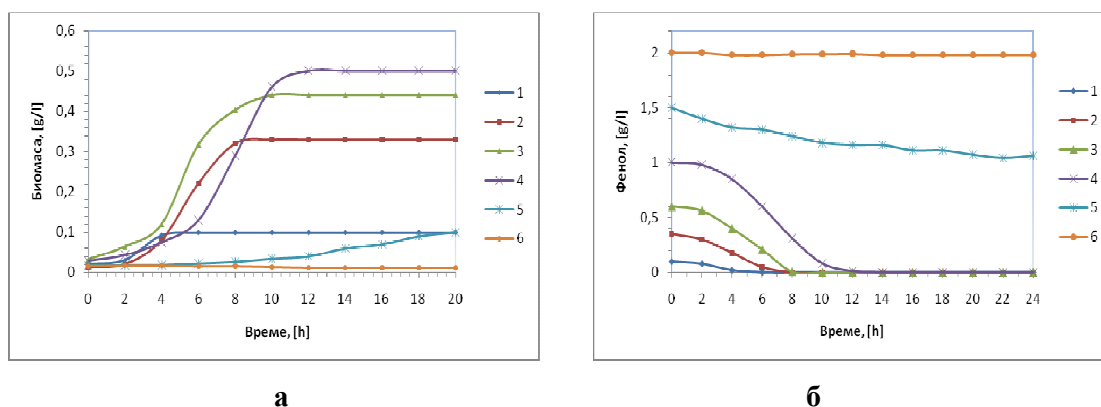
Табл.1. Кинетични параметри получени при различни въглеродни източници.

Въглероден източник, [g/l]	Специфична скорост на растеж μ , [h ⁻¹]	Максимална скорост на растеж μ_{max} , [h ⁻¹]	Константа на Моно K_s , [g/l]
Глюкоза, 2,0 g/l	0,52	0,68	0,60
Фенол, 0,35 g/l	0,34	0,51	0,17

Както може да се види от таблицата кинетичните параметри μ и μ_{max} са с по-високи стойности за глюкозата.

1.2. Култивиране на *Trichosporon cutaneum* R57 на хранителна среда съдържаща различна концентрация на фенол.

На фиг.2а се проследява скоростта на натрупване на клетъчната биомаса, а на фиг.2б динамиката на изчерпване на субстрата съответно при различна концентрация на фенол.



Фиг.2. Кинетика на натрупване на клетъчна биомаса (а) и скорост на изчерпване на субстрата (б) при концентрация на фенол: 0,1 g/l (1); 0,35 g/l (2); 0,6 g/l (3); 1,0 g/l (4); 1,5 g/l (5); 2,0 g/l (6).

От графиката ясно се вижда, че биодеградацията на фенол е най-бърза при 0,1 g/l (за около 6 часа), но с увеличаване концентрацията на фенол в средата се увеличават и биодеградационните времена. Процеса протича с малка разлика в скоростта и пълното изчерпване на фенола (с концентрации от 0,35g/l до 0,1g/l) се осъществява за 6 до 12 часа, докато при 1,5 g/l и 2,0 g/l имаме силно инхибиране на процеса.

За сравнимост на проведените експерименти при среда съдържаща различна начална концентрация на фенол бяха изчислени кинетичните параметри. Резултатите са показани в табл.2, при което се вижда, че максималната скорост на растеж постепенно намалява, докато при 1,5 g/l и 2,0 g/l този факт е драстичен.

Табл.2. Кинетични параметри изчислени за свободни дрождеви клетки *T.cutaneum* R57 при различна концентрация на фенол.

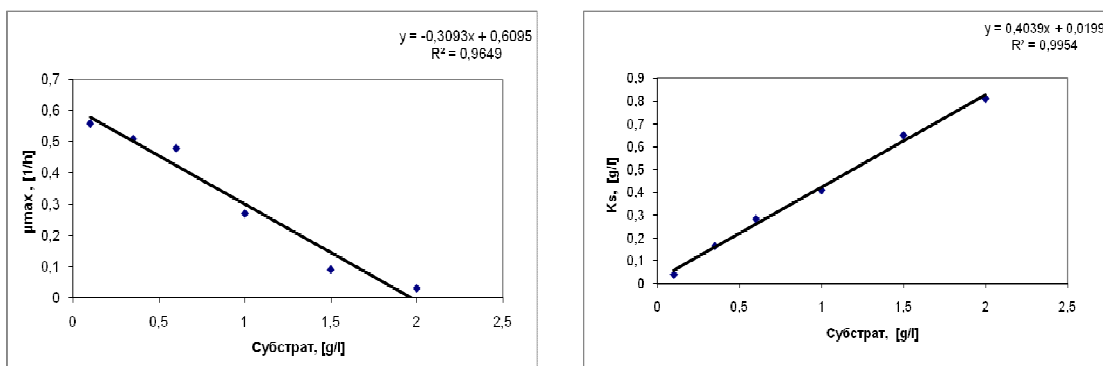
Фенолна концентрация, [g/l]	Специфична скорост на растеж μ , [h ⁻¹]	Максимална скорост на растеж μ_{max} , [h ⁻¹]	Константа на Моно K_s , [g/l]
0,10	0,37	0,56	0,04
0,35	0,34	0,51	0,17
0,60	0,32	0,48	0,28
1,00	0,18	0,27	0,41
1,50	0,06	0,09	0,65
2,00	0,02	0,03	0,81

С всички тези изследвания нашите предположения бяха потвърдени, а именно че концентрация от 1,0 g/l фенол в хранителната среда действа на изследвания щам *T. cutaneum* R57, като минимално действаща или прагова доза.

1.3. Избор на кинетичен модел в условията на субстратно инхибиране.

За да се намери подходящ кинетичен модел в зависимост от неговата способност да опише експерименталните криви в целия концентрационен обхват (от 0,1 g/l до 2,0g/l фенол) бяха определени кинетичните параметри μ , μ_{max} , K_s и K_i , използвайки кинетиката на *Monod*.

От получените параметри дадени в табл.2, бяха намерени пределните стойности за μ_{max} и K_s , изобразявайки ги графично, като функция от субстрата. Резултатите са показани на фиг.3. Графиките илюстрират също и влиянието на инхибиращият ефект.



а **б**
Фиг.3. Ефект на фенолната концентрация върху μ_{max} (**а**) и K_s (**б**).

Както може да се види от фигурите отрязъците дават $\mu_{max}=0.6095 \text{ h}^{-1}$, и $K_s=0,0199 \text{ g/l}$. Така получените пределни стойности отговарят на субстрат под $0,1\text{g/l}$, в зона, в която инхибирането е пренебрежимо малко.

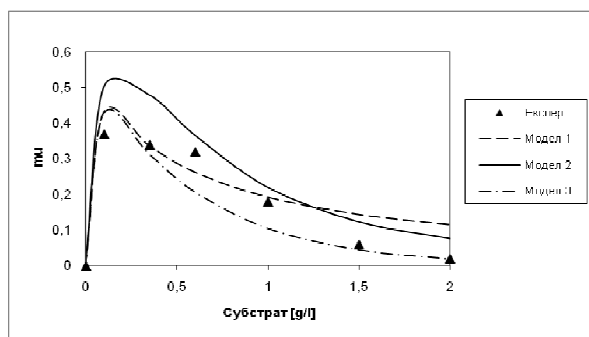
За да предскажем инхибиторния ефект на фенола използвахме три от най-често използваните кинетични модели в литературата, включващи различно субстратно инхибиране. Това бяха уравненията на *Haldane*, *Yano u Koga*, както и уравнението на *Edward*. Тези три уравнения в нашия случай описахме като *Модел 1*, *Модел 2* и *Модел3*.

$$\mu = \frac{\mu_{max}}{(1 + K_s / S + S / K_i)} \quad (\text{Модел 1, уравнение на } Haldane)$$

$$\mu = \frac{\mu_{max}}{[1 + K_s / S + (S / K_i)^2]} \quad (\text{Модел 2, уравнение на } Yano \text{ и } Koga)$$

$$\mu = \frac{\mu_{max}}{(1 + K_s / S)} \exp(-S / K_i) \quad (\text{Модел 3, уравнение на } Edward)$$

Пресметнатите стойности за μ , сравнени с експерименталните стойности от шестте субстратни концентрации са показани на фиг.4.



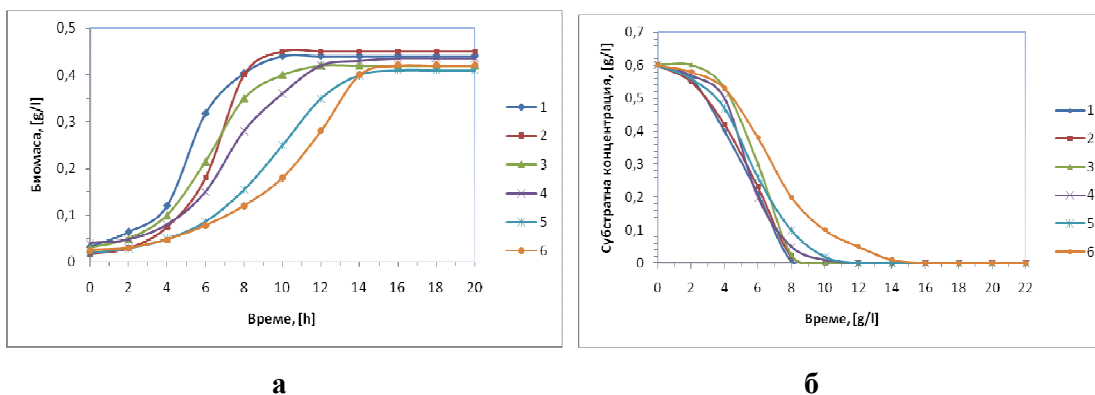
Фиг.4. Специфична скорост на растеж, пресметната с различни модели и сравнена с експерименталните данни при различна стартова фенолна концентрация.

От фигурата се вижда, че така симулираните кинетични криви за μ в зависимост от S в целия изследван от нас концентрационен обхват, *Модел 2* най-много съответства на нашата експериментална крива.

1.4. Влияние на различни токсични органични съединения върху биодegradацията на фенола.

Изследвано беше влиянието на различни органични и неорганични съединения върху биодegradацията на фенол чрез клетки *T. cutaneum* R57, както по отделно, така и комплексно. Дрождите бяха култивирани в моделни води, съдържащи фенол, както и различни компоненти намиращи се в отпадъчните води на коксохимичното производство.

На фиг.5а се проследява скоростта на натрупване на клетъчна биомаса, а на фиг.5б скоростта на изчерпване на субстрата. При направените експерименти са използвани хранителни среди с концентрация на фенол 0,6g/l и различни токсични органични съединения.



Фиг.5. Кинетика на нарастване на клетъчна биомаса (а) и скорост на изчерпване на субстрата (б) при концентрация на фенол 0,6g/l (1) и среда съдържаща фенол плюс компонентите: бензен 0,1 g/l (2), толуен 0,05 g/l (3), амониев роданид 0,8g/l (4), пиридин 0,6 g/l (5), нафтален 0,05 g/l (6).

От графиката се вижда, че при прибавянето на други вещества в средата, нарастването на клетъчната биомаса, както и скоростта на изчерпване на субстрата са почти съизмерими. Само когато в средата се съдържа нафтаден (0,05g/l) имаме слабо инхибиране, при което се увеличава времето на биодеградация.

С оглед сравняване на резултатите от измерванията бяха изчислени кинетичните параметри. Резултатите са показани в табл.3.

Табл.3. Кинетични параметри изчислени за свободни клетки *T. cutaneum* R57.

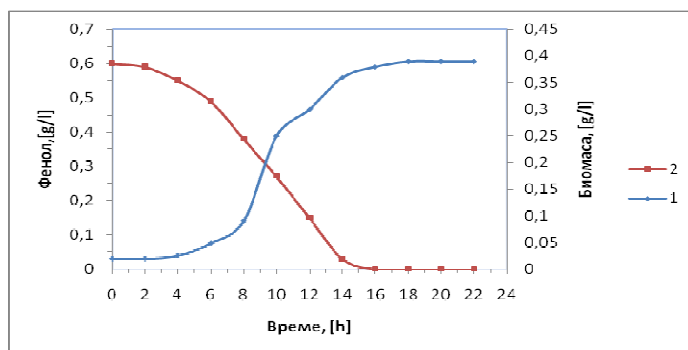
Компоненти	μ , [h ⁻¹]	μ_{max} , [h ⁻¹]	K_s , [g/l]
0,6 g/l фенол	0,32	0,48	0,28
0,1g/l бензен и 0,6 g/l фенол	0,30	0,46	0,27
0,05g/l толуен и 0,6 g/l фенол	0,25	0,38	0,26
0,8g/l амониев роданид и 0,6 g/l фенол	0,21	0,31	0,26
0,6g/l пиридин и 0,6 g/l фенол	0,19	0,28	0,27
0,05g/l нафтаден и 0,6 g/l фенол	0,16	0,24	0,28

От таблицата се вижда, че органичните съединения, които са токсични макар и в ниски концентрации за клетките не оказват съществено инхибиращо влияние. Скоростта на растеж намалява, но K_s остава почти непроменена.

1.5. Пречистване на отпадъчни води с помощта на свободни клетки *T. cutaneum* R57.

Моделните води, на които бяха култивирани дрождите имаха състав: 0,6 g/l фенол, 0,8 g/l амониев роданид, 0,6 g/l пиридин, 0,1 g/l бензен, 0,05 g/l тоуен, 0,05 g/l нафтаден, съобразени с обобщени данни характеризиращи отпадъчните води на коксохимическото производство.

Моделните води бяха инокулирани с посевен материал от *T. Cutaneum* R57, култивиран на течна хранителна среда съдържаща глюкоза. Резултатите бяха идентични с опитите направени с реални отпадъчни води, след като беше премахнато диспергираното масло.



Фиг.6. Кинетика на натрупване на биомаса (1) и скорост на изчерпване на субстрата (2) във води.

От графиката се вижда, че при прибавянето на всички замърсители се удължава с около 2 часа лаг-периода, а пълното деградиране на фенола се осъществява за около 16 часа.

1.6. Рециркулация на биомаса.

Експериментите с рециркулация на биомасата бяха направени с цел да се провери възможността за многократното използване на един и същ биологичен материал за биодеградация на фенол в отпадъчни води. Опитите бяха направени с моделни води съдържащи фенол с концентрация 0,6g/l по схема 1.

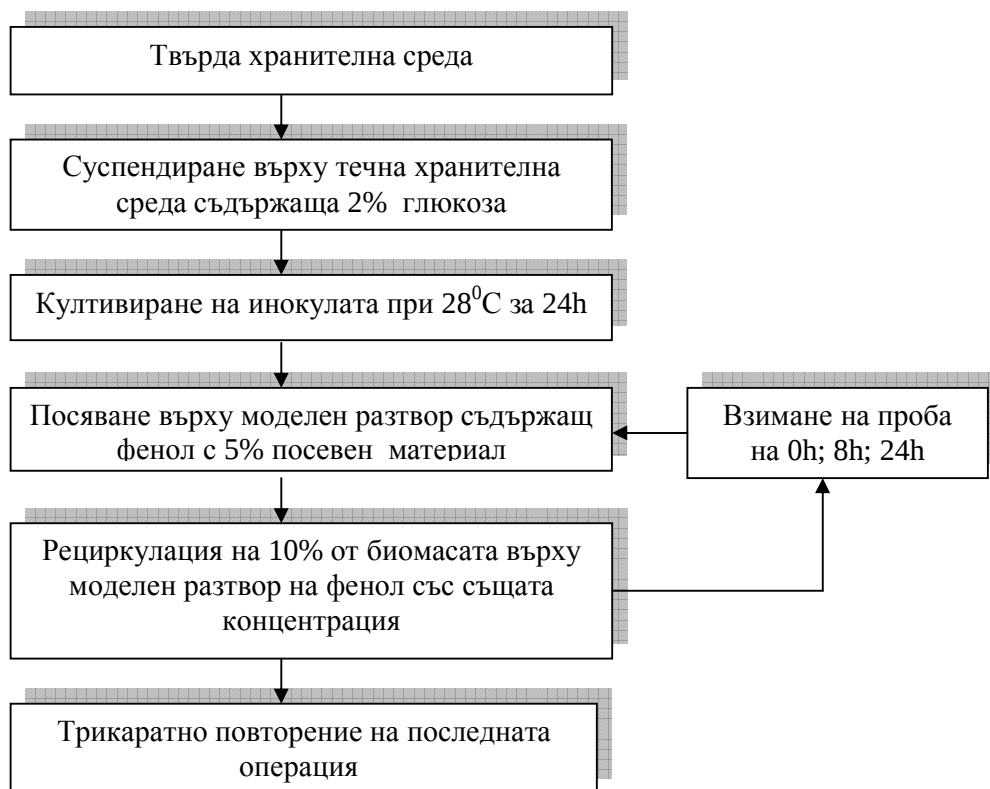


Схема 1. Рециркулация на биомаса за биодеградация на фенол.

II. Получаване и охарактеризиране на ковалентно имобилизирани клетки *Trichosporon cutaneum* R57.

1. Получаване на имобилизирани клетки.

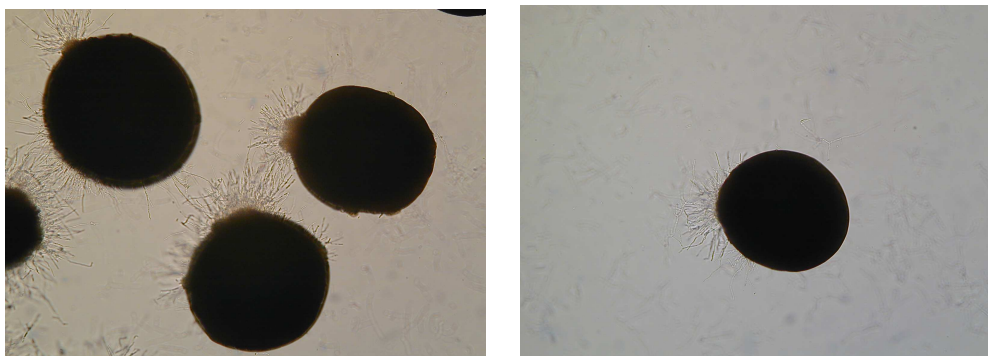
Ковалентната имобилизация на клетки от *Trichosporon cutaneum* R57 е извършена посредством два последователни етапа: активиране на носителя и свързване на дрождевите клетки към получената матрица. След тази процедура имобилизираните клетки бяха адаптирани първоначално на глюкозна среда, а след това прехвърлени на среда съдържаща фенол, като единствен въглероден източник. Количеството на имобилизираните клетки е представено на табл.4 и е сравнено с количеството имобилизирани клетки от същия и подобни дрождеви щамове върху целулозни носители, направени преди нашите изследвания.

Табл.4. Количество имобилизирани клетки на целулозни и синтетични носители.

Дрождеви щам	Носител	Количество свързани клетки, [mg/g сух носител]
<i>Candida tropicalis</i>	Целулозни гранули	8,4
<i>Trichosporon cutaneum</i> R57	Целулозни гранули	9,8
<i>Trichosporon cutaneum</i> R57	Синтетичени полимерни гранули	40,0±0,2 (Настоящото изследване)

Както се вижда от таблицата, количеството имобилизирани клетки от дрождеви култури е почти еднакво, но има разлика в случая, когато са използвани синтетични полимерни гранули. Количеството клетки *Trichosporon cutaneum* R57, свързани към синтетичните полимерни гранули са 4 пъти повече, отколкото същите клетки свързани към целулозни гранули.

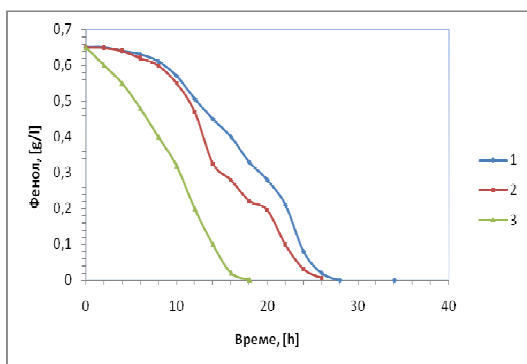
От направеното микроскопско изследване беше установено, че клетките са ситуйрани неравномерно върху твърдата повърхност на носителя (фиг.7).



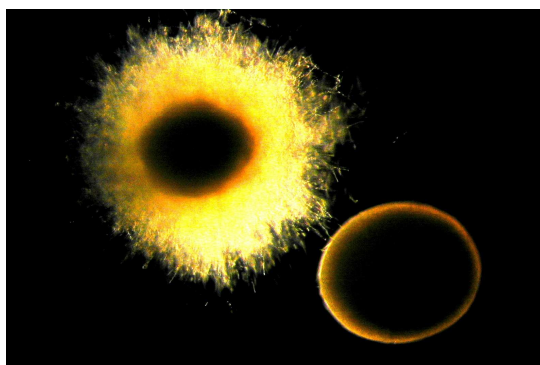
Фиг.7. Електронномикроскопски снимки на ковалентно имобилизирани клетки *Trichosporon cutaneum* R57.

Този метод запазва цялостта на клетките и не ограничава техния контакт със средата, в която се намират. Съгласно предишни изследвания с имобилизирани ензими е установено, че в присъствие на формалдехид в средата за активиране, амидните групи на съполимера се превръщат във високо реактивни N-хидроксиметилни групи, способни да образуват стабилни ковалентни връзки със протеини. Процесът на свързване на носителя към протеините зависи от рН на реакционната среда, където при кисело рН, кондензационният процес вероятно се осъществява от аминокиселините аспарагин (Asp) и глутамин (Gln).

За да бъде проследено поведението на имобилизираните клетки върху гранулирания носител, последователно бяха култивирани на течна хранителна среда съдържаща фенол (фиг.8).



Фиг.8.Изчерпване на субстрата с течение на времето при последователно култивиране на имобилизирани клетки на среда съдържаща фенол 0.65g/l, веднага след глюкозна среда (1); клетки използващи фенол за 3^{ти} път (2) и клетки използващи фенол за 5^{ти} път (3).



Фиг.9.Електронномикроскопска снимка с флуоресценция на ковалентно имобилизирани клетки на носител акрилонитрил/акриламид след 20 дни последователно култивиран в сравнение с изходен носител.

От графиката се вижда, че клетките усвояват фенола за около 28 часа, когато го използват за първи път като въглероден и енергиен източник. Процесът на адаптация на микробните клетки вероятно включва преди всичко подходящи промени в нейната структура и след петия цикъл на разграждане на фенола, имобилизираните клетки разграждат субстрата за по-малко от 20 часа.

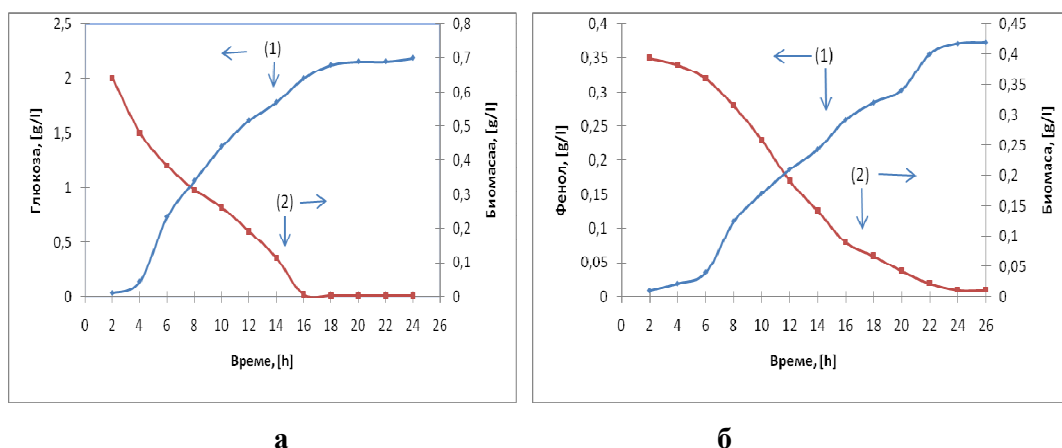
От направената електронно микроскопска снимка (фиг.9) ясно се вижда, че с течение на времето се образува биофилм около гранулката.

Имобилизираните клетки бяха използвани 20 пъти за разграждане на фенол, като последователно бяха инкубирани. По това време жизнеността на клетките и

активността беше на високо ниво, което показва, че клетките са жизнеспособни и запазват стабилността си с течение на времето.

2. Култивиране на имобилизирани клетки от *Trichosporon cutaneum* R57 на среда съдържаща 2,0 g/l глюкоза и среда съдържаща 0,35 g/l фенол, като единствен въглероден източник.

Имобилизираните клетки бяха култивирани в ерленмаерови колби, съдържащи 100ml течна хранителна среда за 24 часа при 28⁰C и pH=6.0. Началната концентрация имобилизирани клетки в средата беше около 0.0167 g/l, както и при свободните клетки. По време на експериментите на всеки два часа бяха взети проби и анализирани.



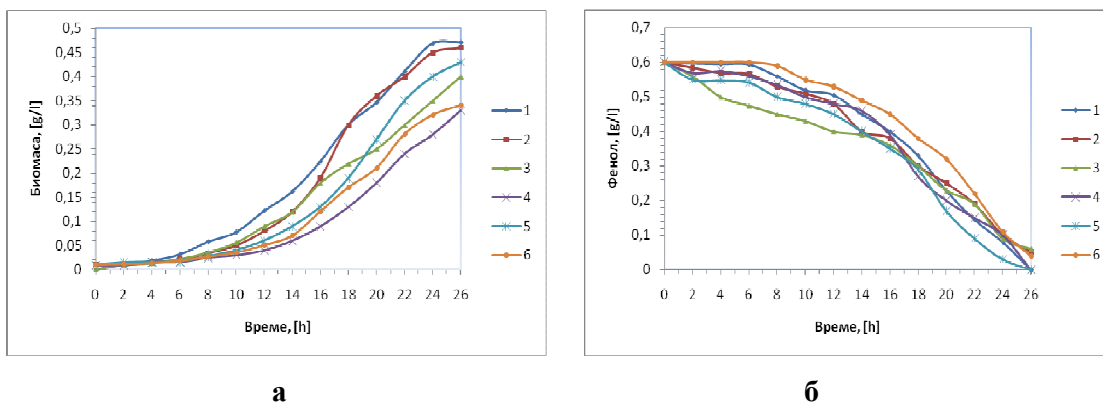
Фиг.10. Динамика на нарастване на клетъчна биомаса на среда съдържаща 2,0g/l глюкоза (а,1) и среда съдържаща 0,35g/l фенол (б,1) и скорост на изчерпване на субстрата (2).

От фигурите се вижда, че клетките се развиват по-добре на глюкозна среда, отколкото на фенолна. От графиката може да се установи, че лаг-фазата при клетки прораснали на фенолна среда е с около 4 часа по-дълга в сравнение с лаг-фазата на клетки прораснали на глюкозна среда.

3. Култивиране на имобилизирани клетки *T. cutaneum* R57 на моделни води съдържащи различни токсични органични съединения.

Прибавянето на токсичните компоненти в хранителната среда с концентрация сравнима с тези в реалните отпадъчни води показва, че всички тези вещества почти не оказват влияние върху скоростта на клетъчния растеж на *T. cutaneum* R57 и биотрансформацията на фенола.

На фиг. 11 е показано натрупването на клетъчна биомаса (а) и изчерпването на субстрата фенол (б) плюс компонентите прибавени поотделно в моделни води.



Фиг.11. Кинетика на нарастване на клетъчна биомаса (а) и скорост на изчерпване на субстрата (б) при концентрация на фенол 0.6g/l (1) и среда съдържаща фенол плюс компонентите: 0,6g/l пиридин (2), 0,8 g/l амониев роданид (3), 0,05 g/l толуен (4), 0,1 g/l бензен (5), 0,05 g/l нафтаген (6).

От графиките се вижда, че прибавянето на токсични замърсители към средата за култивиране не оказват съществено влияние върху биодеградиционната скорост и натрупването на клетъчна биомаса. С оглед сравняване на резултатите, на табл.5 са представени изчислените кинетични параметри получени от експерименталните данни използвайки кинетиката на *Monod*.

Табл.5. Кинетични параметри описващи клетъчния растеж на имобилизирани клетки *T. cutaneum* R57 в присъствие на различни компоненти в моделни води.

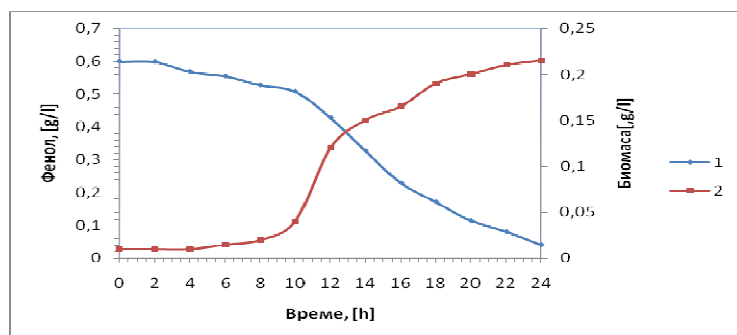
Компоненти	μ , [h ⁻¹]	μ_{max} , [h ⁻¹]	K_s , [g/l]
0,6 g/l фенол	0,19	0,27	0,30
0,6 g/l фенол + 0,6 g/l пиридин	0,17	0,26	0,30
0,6 g/l фенол + 0,8 g/l амониев роданид	0,16	0,24	0,30
0,6 g/l фенол + 0,05 g/l толуен	0,14	0,22	0,31
0,6 g/l фенол + 0,1 g/l бензен	0,14	0,22	0,29
0,6 g/l фенол + 0,05 g/l нафтаген	0,12	0,18	0,30

От таблицата се вижда, че μ е по-ниска при среда съдържаща различни токсични замърсители в сравнение със среда съдържаща само фенол, докато K_s практически не се променя.

Тъй като отпадъчните води съдържат и диспергирано масло, бяха симулирани тези води, като бе сложено наред с всички компоненти и масло в моделните води.

Резултатите показаха, че част от маслената фракция, която в последствие беше отделена е от съществено значение, тъй като при култивирането на имобилизираните клетки върху реални отпадъчни води, шамът не показва клетъчен растеж и не беше наблюдавана субстратна консумация. След последващото премахване на диспергираното масло, се установи, че фенолната концентрация е главния лимитиращ фактор при клетъчния растеж на клетки *T. cutaneum* R57 в отпадъчните води.

На фиг.12 е проследена кинетиката на натрупване на клетъчна биомаса и скоростта на изчерпване на субстрата в отпадъчни води.

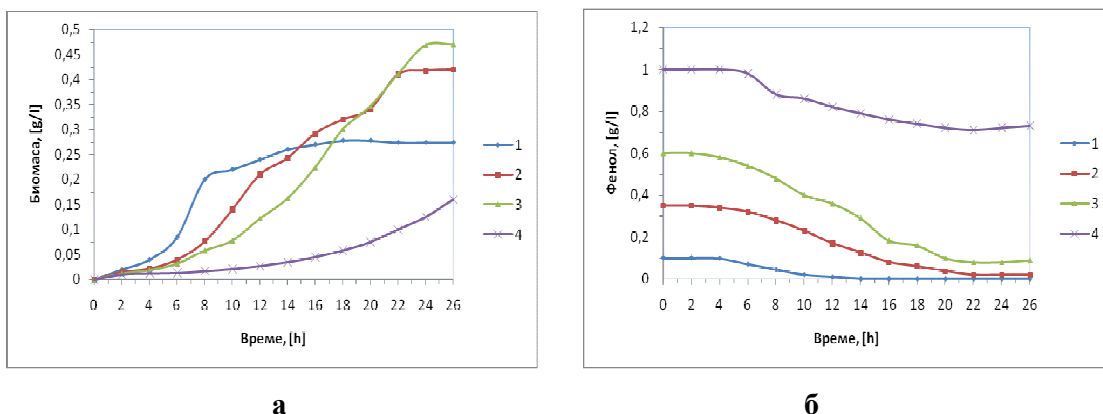


Фиг.12. Скорост на изчерпване на субстрата (1) и кинетика на натрупване на биомаса (2) в отпадъчни води.

4. Кинетични изследвания и анализ на експерименталните криви при култивиране на имобилизирани клетки *Trichosporon cutaneum* R57 на моделни води съдържащи различна концентрация на фенол.

Кинетиката на клетъчния растеж беше изследвана при различна субстратна концентрация в границите от 0,1g/l до 1,0g/l фенол в моделни води. Опитите показаха, че при концентрация на фенол в средата от 0,6 g/l и 1,0 g/l лаг-фазата и експоненциалната фаза са по-дълги в сравнение с другите концентрации, което показва инхибиращ ефект.

На фиг.13а е проследена кинетиката на натрупване на клетъчна биомаса, а на фиг.13б скоростта на изчерпване на субстрата.



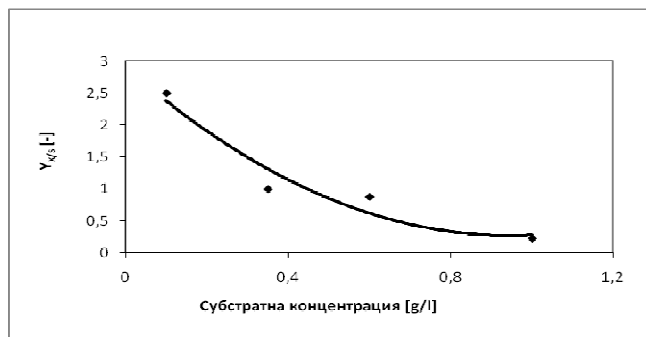
Фиг.13. Кинетика на натрупване на биомаса(а) и скорост на изчерпване на субстрат (б) при количество на фенол 0,1 g/l (1); 0,35 g/l (2); 0,6 g/l (3); 1,0 g/l (4).

Кинетичните параметри изчислени използвайки кинетиката на *Monod* са представени на табл.6.

Табл.6. Кинетични параметри изчислени за имобилизирани дрождеви клетки *T. Cutaneum* R57 при различна концентрация на фенол.

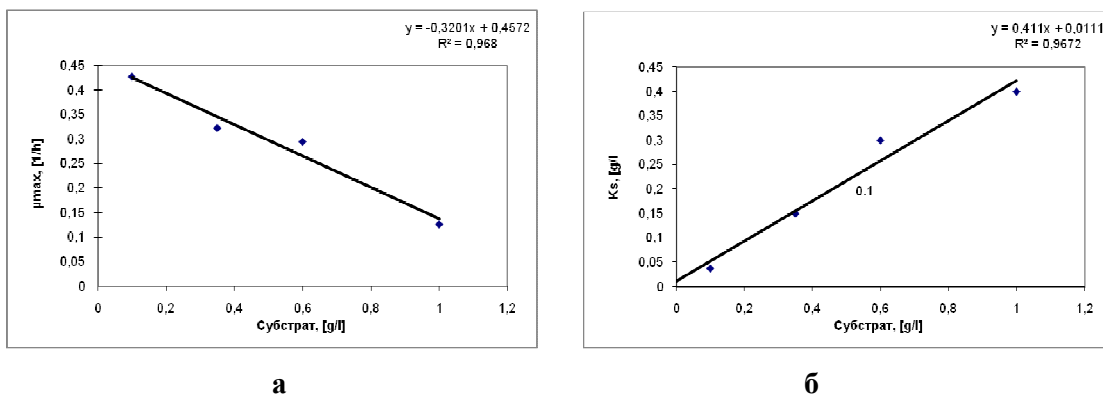
Фенолна концентрация, [g/l]	Специфична скорост на растеж μ , [h ⁻¹]	Максимална скорост на растеж μ_{max} , [h ⁻¹]	Константа на Моно K_s , [g/l]
0,10	0,28	0,43	0,04
0,35	0,22	0,32	0,15
0,60	0,19	0,27	0,30
1,00	0,09	0,13	0,40

Вижда се, че намаляването на максималната скорост на клетъчен растеж с увеличаване на фенолната концентрация, съвпада с увеличаването на K_s , което показва субстратно инхибиране. В потвърждение на това са и стойностите на добивните коефициенти ($Y_{x/s}$), които бяха определени от експерименталните данни при различна стартова фенолна концентрация (фиг. 14).



Фиг.14. Ефект на фенолната концентрация върху $Y_{x/s}$.

От така получените параметри (табл.6), бяха намерени пределните стойности за μ_{max} и K_s , изобразявайки ги графично, като функция от субстрата (фиг.15).

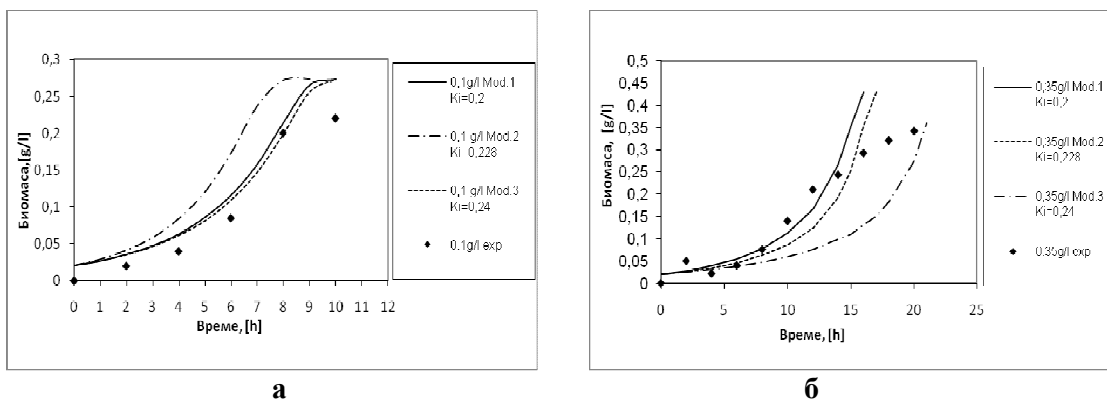


Фиг.15. Ефект на фенолната концентрация върху μ_{max} (а) и K_s (б).

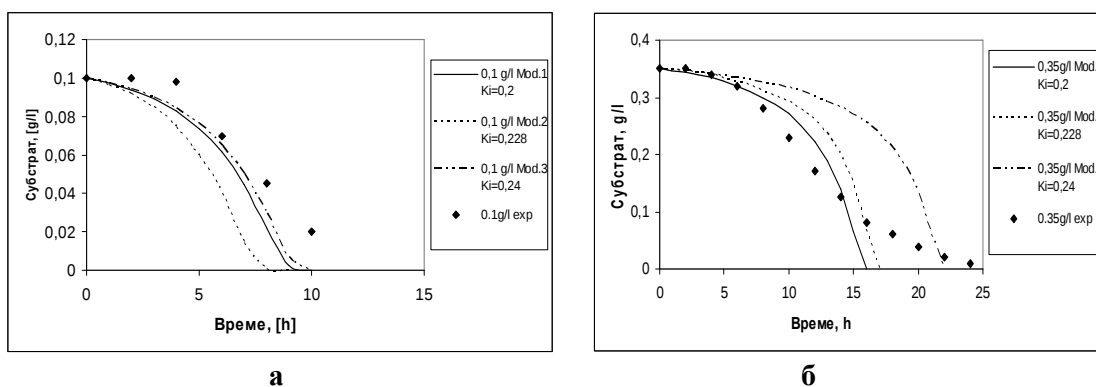
От фигурите се вижда, че отрезите дават $\mu_{max} = 0,4572 \text{ h}^{-1}$ и респективно $K_s = 0,0111 \text{ g/l}$. Получените стойности за привидните параметри много зависят от субстратната концентрация (μ_{maxapp} е от $0,43 \text{ h}^{-1}$ до $0,13 \text{ h}^{-1}$ и K_{sapp} от $0,04 \text{ g/l}$ до $0,4 \text{ g/l}$).

За да се изчисли ефекта на инхибиторната константа K_i , бяха приложени експерименталните данни с пресметнатите кинетични криви за $\mu_{max} = 0,475 \text{ h}^{-1}$ и $K_s = 0,011 \text{ g/l}$, а K_i беше с различни стойности за различните модели. За Модел 1- $0,2 \text{ g/l}$, за Модел 2- $0,228 \text{ g/l}$ и за Модел 3- $0,24 \text{ g/l}$. Кривата на клетъчен растеж и субстратната консумация беше симулирана чрез използването на компютърна програма, основаваща се на *Runge-Kutta* техника.

На фиг. 16 са представени натрупването на биомасата и изчерпването на субстрата, изчислени с различните модели и сравнени с експерименталните данни.



Фиг.16. Експериментална (точки) и калкулирани (линии) кинетични криви изчислени с различни модели за клетъчен растеж при стартова фенолна концентрация $0,1 \text{ g/l}$ (а) и $0,35 \text{ g/l}$ (б).

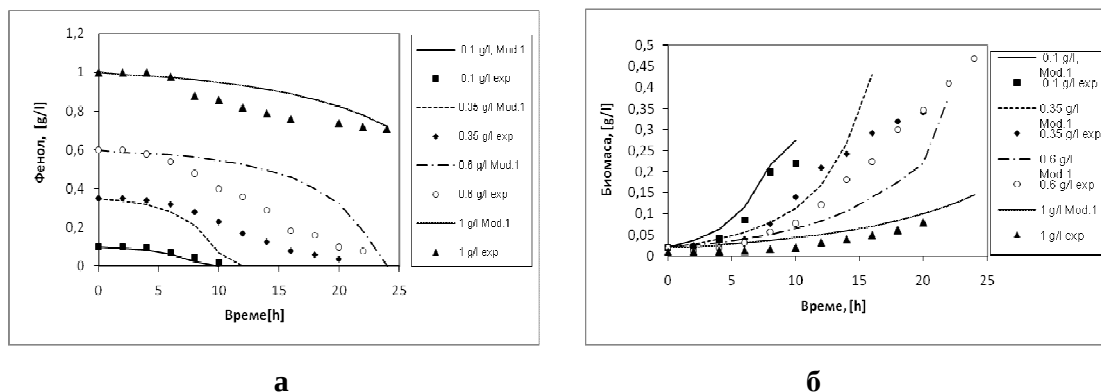


Фиг.17. Експериментална (точки) и калкулирани (линии) кинетични криви изчислени с различни модели за изчерпване на субстрата при стартова фенолна концентрация 0,1 g/l(а) и 0,35 g/l (б).

Както може да се види от фигурите при налична фенолна концентрация от 0,1g/l, стойността за $K_i = 0,24$ g/l съответства най-добре на експерименталната крива при Модел 3, докато при начална фенолна концентрация от 0,35 g/l тази стойност не дава добри резултати.

За да се намери подходящ кинетичен модел, в зависимост от неговата способност да опише експерименталните криви в целия концентрационен обхват (от 0,1 g/l до 1,0 g/l фенол) бяха използвани моделите (*Модел1*- уравнение на *Haldane*, *Модел2*- уравнение на *Yano и Koga* и *Модел3*- уравнението на *Edward*) включващи различно субстратно инхибиране. Описаните 3 модела са измежду най-често срещаните модели описващи субстратно инхибиране по време на фенолната биодеградация.

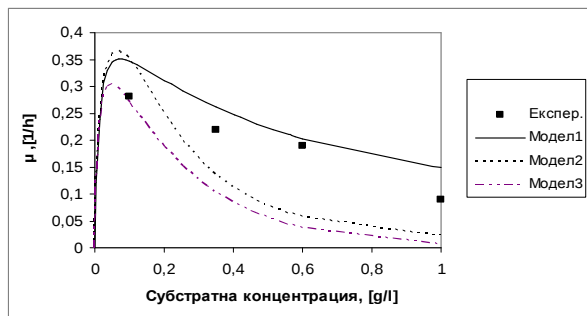
На фиг. 18 е показано пресметнатите криви с *Модел 1* за субстратно разграждане (а) и клетъчен растеж (б) в сравнение с експерименталните стойности в реални води.



Фиг.18. Пресмятане с *Модел 1* и експериментални кинетични криви при субстратно разграждане (а) и клетъчен растеж (б) с различна начална фенолна концентрация ($S_0 = 0,1$ g/l; 0,35 g/l; 0,60 g/l; 1,0 g/l).

При така получените резултати беше установено, че *Модел 1* с една и съща стойност за $K_i = 0,2 \text{ g/l}$ корелира най-добре на експерименталните криви в целия концентрационен обхват (от $0,1 \text{ g/l}$ до $1,0 \text{ g/l}$ фенол).

Още едно числено изследване на чувствителността на трите модела по отношение на μ към началната фенолна концентрация е представено на фиг.19. Използвани са фиксирани стойности на параметрите μ_{max} , K_s и K_i .



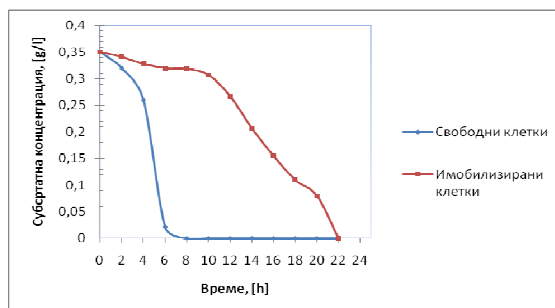
Фиг.19. Специфична скорост на растеж, пресметната с различни модели и сравнена с експерименталните данни при различна стартова фенолна концентрация.

От фигурата се вижда, че *Модел 1* отново съвпада с експерименталните данни, което е още едно доказателство, че той съответства най-добре на целия изследван от нас концентрационен обхват.

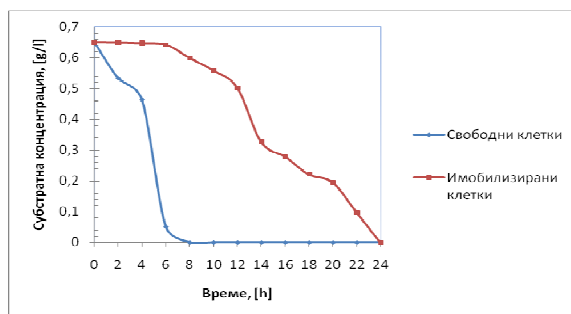
2.1. Сравнение на резултатите получени при фенолна биодегradация със свободни и имобилизирани клетки при периодичен процес с различна стартова фенолна концентрация.

Експериментите бяха проведени успоредно при едни и същи условия с предварително адаптирани на фенолна среда свободни и имобилизирани клетки.

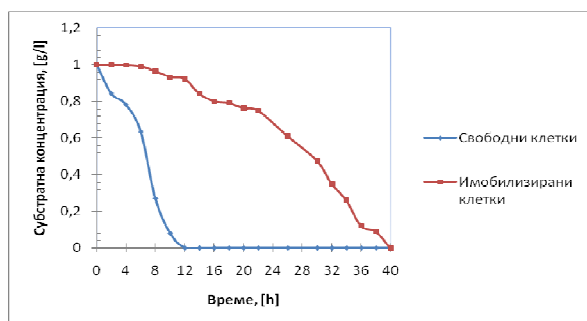
На фиг.20 е показано разграждането на фенол със свободни и имобилизирани клетки при различна стартова субстратна концентрация.



Фиг.20а. Разграждане на фенол с концентрация $0,35 \text{ g/l}$ фенол в средата.



Фиг.20б. Разграждане на фенол с концентрация 0,65g/l фенол в средата.



Фиг.20в. Разграждане на фенол с концентрация 1,0 g/l.

От фиг.20 се вижда, че скоростта на трансформация на субстрата е най-висока при 0,35g/l фенол. С увеличаване на субстратната концентрация, намалява скоростта на неговото разграждане, което показва субстратно инхибиране. От фигурата също се вижда, че разграждането на фенола със свободни клетки е по-бързо в сравнение с имобилизираните клетки. Биодegradацията на фенола до 0,001 g/l се достига за около 12 часа при свободните клетки а при имобилизираните клетки за 40 часа, използвайки по-висока субстратна концентарция от 1,0g/l (Фиг.20в).

Освен изследванията за влиянието на други токсични замърсители, съпътстващи фенола в реални отпадъчни води бяха направени и други измервания чрез неразрушаващи методи.

III. Диелектрични измервания на устойчивостта на клетки *Trichosporon cutaneum* R57 спрямо различни токсични органични съединения. Проследяване клетъчния растеж посредством *Biomass monitor*.

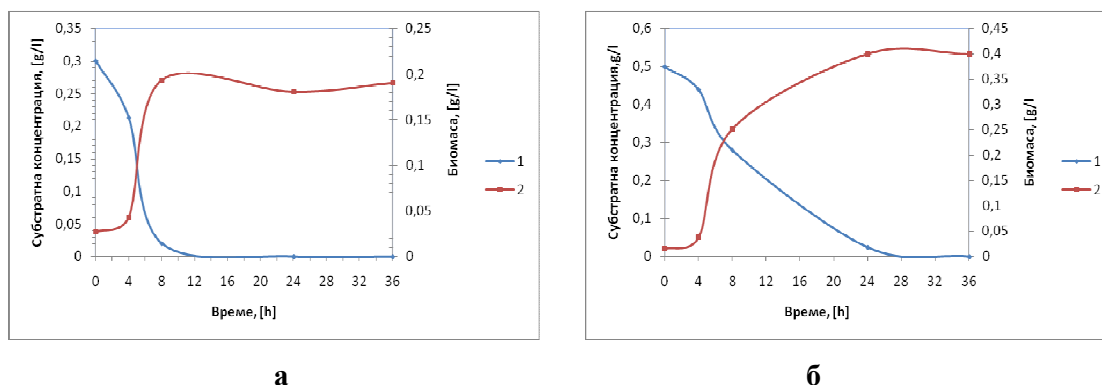
1. Кинетика на биодegradация на бензилов алкохол.

Бензиловият алкохол, както и фенолът е едно от често срещаните токсични вещества в отпадъчните води. За да се осъществят диелектричните изследвания относно токсичността на различните вещества, включващи и бензиловият алкохол

върху щама *T. cutaneum* R57 беше изследвана възможността, шамът да се развива върху моделни води съдържащи бензилов алкохол.

Първоначално шамът беше култивиран за 24 часа на течна хранителна среда съдържаща глюкоза и след това ресуспендиран на среда съдържаща 0,3g/l бензилов алкохол, като единствен въглероден източник.

На фиг.21 е проследена кинетиката на натрупване на биомасата и скоростта на изчерпване на субстрата с начална концентрация на бензилов алкохол в средата 0,3g/l и 0,5g/l.



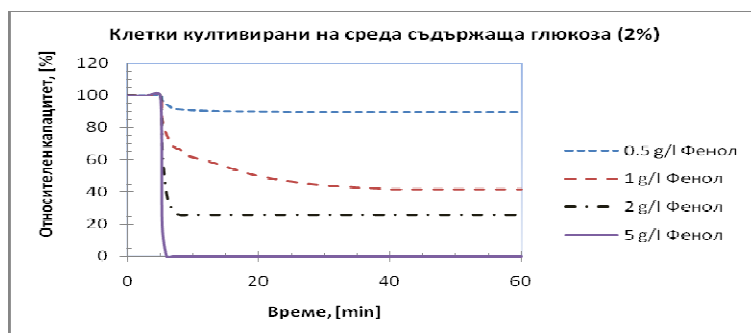
Фиг.21. Динамика на нарастване на клетъчна биомаса на среда съдържаща 0,3g/l бензилов алкохол (1а) и 0,5g/l (1б). Скорост на изчерпване на субстрата (2а, 2б).

Анализите показаха, че шамът разгражда субстрата и натрупва клетъчна биомаса с течение на времето, аналогично на фенолната биодеградация с подобна концентрация.

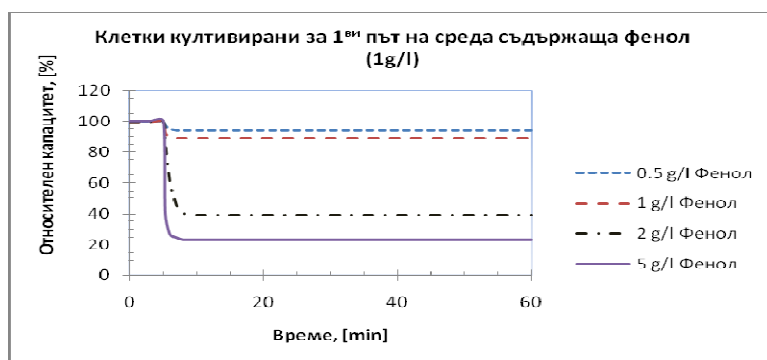
1. Изследване токсичното действие на фенол, бензилов алкохол и *n*-октанол върху клетки *Trichosporon cutaneum* R57 чрез диелектрични измервания в радиочестотната област.

Полярността на веществата е един от важните параметри, които характеризират химичните свойства на веществата. В нашия случай, полярността беше представена чрез $\log P_{ow}$, коефициент получен чрез използването на октанол/вода двуфазна система.

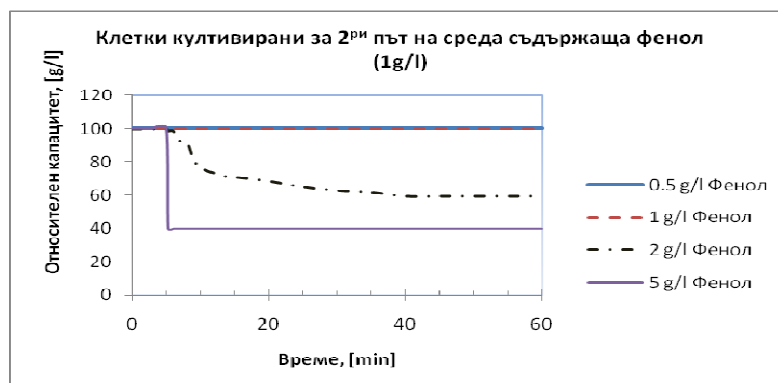
На фиг. 22 и 23 е показано измерването на капацитета на клетъчна суспензия, като функция от времето при директното прибавяне на различни концентрации на фенол и бензилов алкохол посредством *Biomass monitor*.



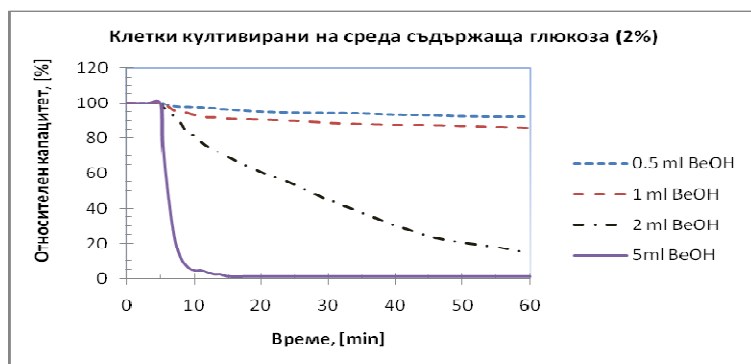
Фиг.22а. Промяна в капацитета на клетъчна суспензия *T. cutaneum* R57, след прибавяне на различна концентрация на фенол при клетки култивирани на глюкозна среда (неадаптирани към фенол)



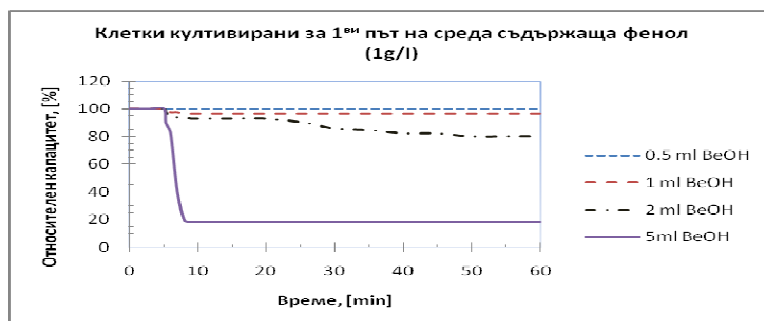
Фиг.22б. Промяна в капацитета на клетъчна суспензия *T. cutaneum* R57, след прибавяне на различна концентрация на фенол при клетки култивирани за 1^{ви} път на фенолна среда.



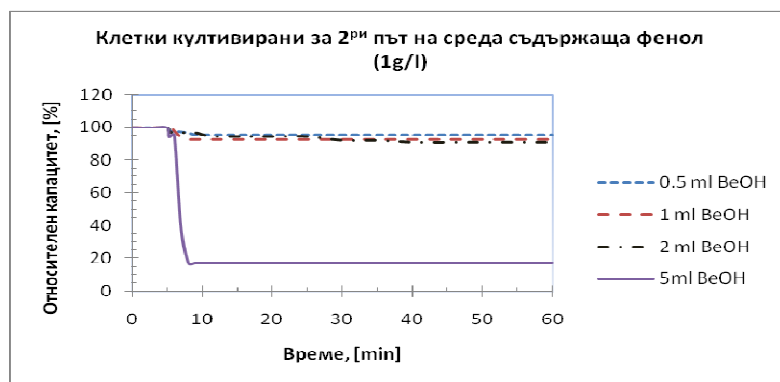
Фиг.22в. Промяна в капацитета на клетъчна суспензия *T. cutaneum* R57, след прибавяне на различна концентрация на фенол при клетки култивирани за 2^{ри} път на фенолна среда.



Фиг.23а. Промяна в капацитета на клетъчна суспензия *T. cutaneum* R57, след прибавяне на различна концентрация на бензилов алкохол при клетки култивирани на глюкозна среда (неадаптирани към фенол)



Фиг.23б. Промяна в капацитета на клетъчна суспензия *T. cutaneum* R57, след прибавяне на различна концентрация на бензилов алкохол при клетки култивирани за 1^{ви} път на фенолна среда.



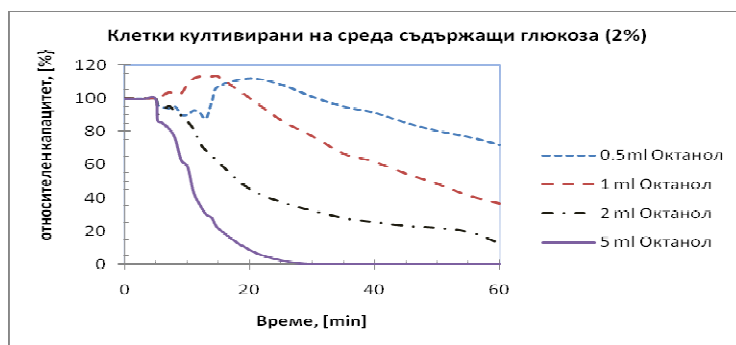
Фиг.23в. Промяна в капацитета на клетъчна суспензия *T. cutaneum* R57, след прибавяне на различна концентрация на бензилов алкохол при клетки култивирани за 2^{ри} път на фенолна среда.

От фиг.22 и фиг.23 се вижда, че клетки култивирани на среда съдържаща фенол или глюкоза са много чувствителни към директното прибавяне на 5,0g фенол и респективно 5,0ml бензилов алкохол. Тези концентрации са летални за

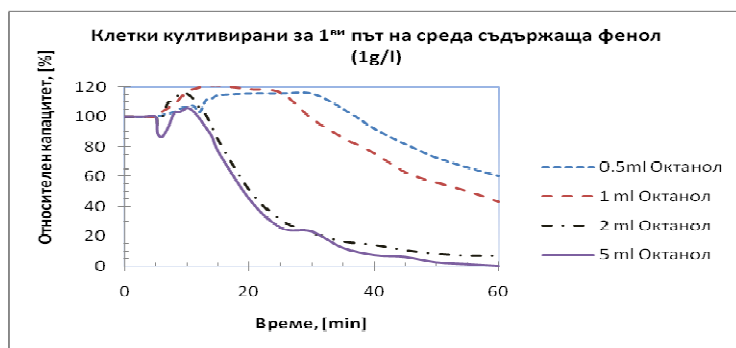
микроорганизмите и в рамките от 5 до 10 часа относителния капацитет силно намалява, дори в някои случаи (фиг.22а, фиг.23а) той достига нула. При по-ниските концентрации клетките проявяват по-голям толеранс. Прибавянето на 0,5g и 1,0g фенол и респективно 0,5ml и 1,0ml бензилов алкохол, относителния капацитет се променя незначително, с изключение на случая при фиг.36а (клетки култивирани на среда съдържаща 2%глюкоза), той достига до около 30%.

Фенолът и бензиловият алкохол са относително полярни вещества в сравнение с *n* –октанола. Фенолът е с $\log Pow=1,46$, бензиловият алкохол е с $\log Pow=1,1$, а *n* –октанола е с $\log Pow=2,9$.

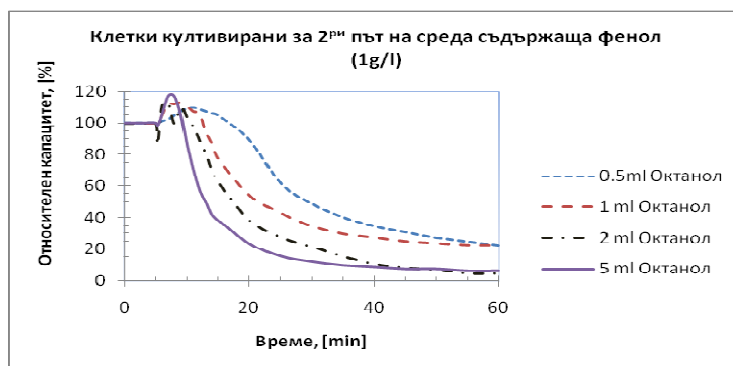
На фиг.24 е показано измерването на капацитета на клетъчна суспензия, като функция от времето при директното прибавяне на различни концентрации на *n*-октанол посредством *Biomass monitor*.



Фиг.24а. Промяна в капацитета на клетъчна суспензия *T. cutaneum* R57, след прибавяне на различна концентрация на *n*-октанол при клетки култивирани на глюкозна среда (неадаптирани към фенол).



Фиг.24б. Промяна в капацитета на клетъчна суспензия *T. cutaneum* R57, след прибавяне на различна концентрация на октанол при клетки култивирани за 1^{ви} път на фенолна среда.



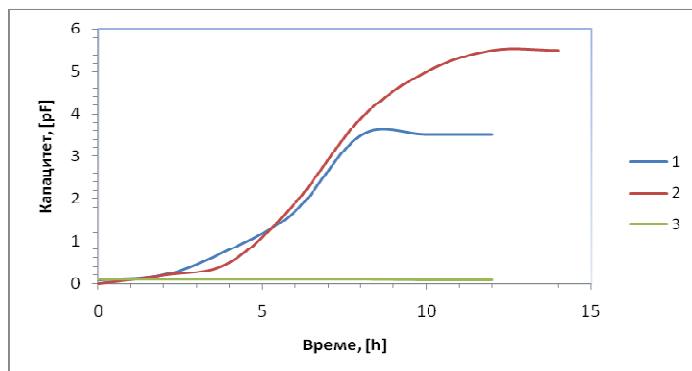
Фиг.24в. Промяна в капацитета на клетъчна суспензия *T. cutaneum* R57, след прибавяне на различна концентрация на бензилов алкохол при клетки култивирани за 2^{ри} път на фенолна среда.

От фиг.22, фиг.23 и фиг.24 се вижда, че клетки адаптирани към полярни вещества (фенол и бензилов алкохол) могат да станат по-податливи и чувствителни към други по-неполярни вещества (*n*-октанол).

2. Проследяване клетъчния растеж посредством *Biomass monitor* в “On-line” режим при трансформация на фенол с различна концентрация с помощта на свободни клетки и имобилизирани клетки.

Проследяването на клетъчния растеж с помощта на *Biomass monitor* в “On-line” режим при трансформация на фенол с различна концентрация бе осъществено посредством директното поставяне на електрода в биореактора.

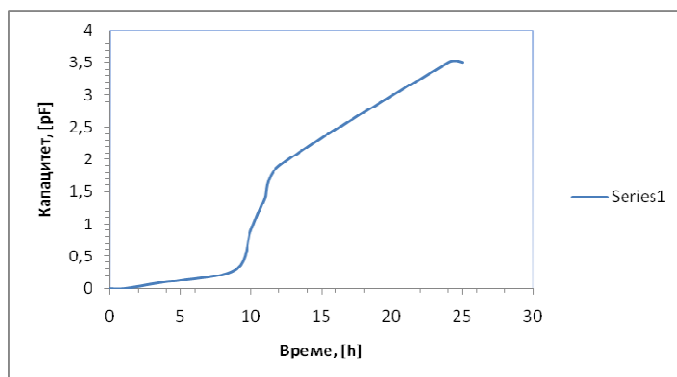
На фиг.25 са отразени диелектричните свойства в “on-line” режим на продуцираните клетки в средата, започващо с нулево време на поставяне на свободна биомаса (0,18g/l клетки) в реакционната среда.



Фиг.25. Проследяване на промяната в капацитета на клетъчна суспензия *T. cutaneum* R57, като функция от времето при среда съдържащ фенол с концентрация: 0,7 g/l (1), 1,0 g/l (2), 2,0 g/l (3).

От фигурата се вижда, че увеличаването на капацитета е свързано с нарастването на клетъчната биомаса.

На фиг.26 е показано промяната в капацитета на клетъчна биомаса, продуцирана от имобилизирани клетки, като функция от времето при среда съдържаща 0,7g/l фенол.

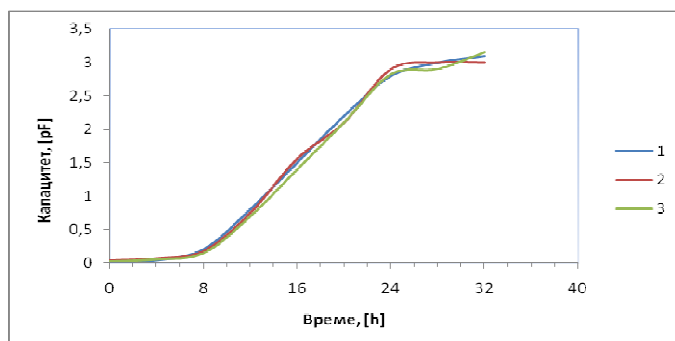


Фиг.26. Проследяване на промяната в капацитета на клетъчна биомаса, продуцирана от имобилизирани клетки, като функция от времето при среда съдържаща 0,7g/l фенол.

От получените резултати беше установено, че диелектричното измерване с помощта на *Biomass monitor* в радиочестотната област е един подходящ метод за изследване клетъчния растеж при свободни и имобилизирани клетки *Trichosporon cutaneum* R57.

3. Изследване токсичното действие на мед върху клетки *T. cutaneum* R57.

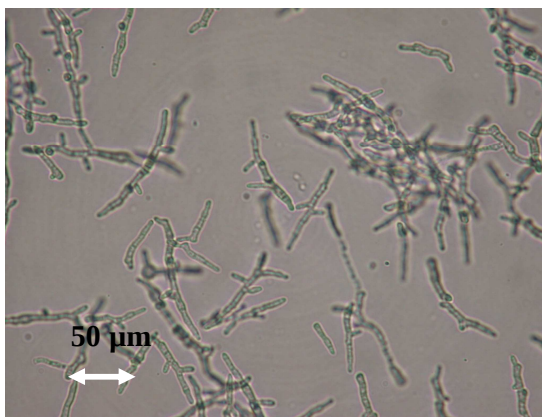
Солите на различните метали и особено тези на оловото, медта, желязото, цинка и хрома са обект на многобройни проучвания и съпътстват в много случаи във фенолни отпадъчни води. Поради тази причина култивирахме клетки *Trichosporon cutaneum* R57 на 2% глюкозна среда съдържаща медни йони с различни концентрации- 1,28µg/ml (0,02mM), 3,2µg/ml (0,05mM), 5,12µg/ml (0,08mM) и с помощта на *Biomass monitor* беше проследен растежът на клетките (фиг.27).



Фиг.27. Проследяване капацитета на клетъчна биомаса, продуцирана от свободни клетки, като функция от времето при среда съдържаща 2% глюкоза плюс 1,28µg/ml (1), 3,2 µg/ml (2) и 5,12 µg/ml медни йони (3).

От графиката се вижда, че и при трите концентрации на мед в средата, растежната крива запазва своя ход, което ясно показва, че се натрупва клетъчна биомаса независимо от количеството медни йони в средата.

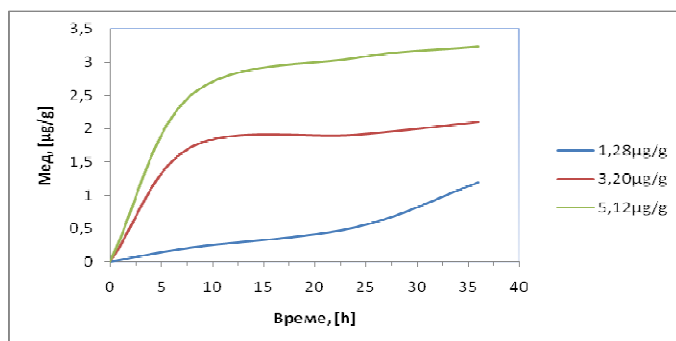
Чрез микроскопско наблюдение на клетки *Trichosporon cutaneum* R57 култивирани на хранителна среда съдържащи медни йони се установиха отклонения в морфологията.



Фиг.28. Електронно микроскопска снимка на клетки *T. cutaneum* R57, култивирани на глюкозна хранителна среда съдържаща 5,12ppm CuSO₄.

От фигурата се вижда, че клетките прораснали на среда съдържаща медни йони много приличат на клетки прораснали на среда съдържаща фенол. Те са дребни, разположени във верижка или по едично.

Анализът за съдържание на мед се извърши на 10^{тия} и 24^{тия} час от култивирането, съответстващи на експоненциалната и стационарната фаза на растеж. На Фиг.29 са представени графично резултатите.



Фиг.29. Съдържание на медни йони в клетките по време на периодичен процес на култивиране.

От фигурата се вижда, че използваните концентрации мед неинхибират растежа на културата в условия на периодично култивиране. Тук се забелязва тенденцията, че колкото повече медни йони се съдържат в средата толкова повече този метал се биоакмулира от клетките.

ДИСКУСИЯ

Някои микробниални шамове имат способността да използват въглеродните, като основен източник на въглерод и енергия. Те са получени чрез селекция, мутация или чрез генно инженерни подходи, при което микроорганизмите имат свойството да индуцират специфични ензимни системи, необходими за биотрансформацията на някои токсични компоненти. Пример за това може да се даде с щама *Pseudomonas stutzeri* OX, изолиран от промишлена отпадъчна вода и щама *Arthrobacter circeus* изолиран от пясък взет от място замърсено с въглеродороди. Широко се използват и бактериите *Pseudomonas putida*, както и дрождите *Trichosporon cutaneum*, които имат също възможността да използват фенолни вещества, като въглероден и енергиен източник.

Когато в новата среда, източниците на въглерод и енергия се различават от тези на старата, адаптацията към новите условия е свързана с биосинтезата на нови ензими. Синтезирането на адаптивни ензими става под индуциращото действие на новите субстрати. Като доказателство за това служи явлението диауксия. То се установява на среди, които съдържат смес от хранителни вещества. Например от смес на глюкоза и сорбит *E.coli* усвоява първо глюкозата. Последната индуцира в клетката синтезата на ензими, които са необходими за нейното използване и успоредно с това подтилка

синтезата на ензими, необходими за усвояването на сорбита. След усвояването на глюкозата заточва да се използва и сорбита.

Друг такъв пример е култивирането на клетки *Arthrobacter* на среда съдържаща глюкоза, фенол или смес от двата субстрата. Резултатите показват, че клетки адаптирани на смесена среда предпочитат фенола като субстрат и след това разграждат глюкозата. Докато клетки прораснали само на глюкозна среда, първо използват глюкозата, като въглероден източник и след това фенола.

Почвената дрожда *Trichosporon cutaneum* се развива добре на хранителна среда съдържаща фенол, глюкоза или и двете, като единствени въглеродни източници. Експериментите доказват, че глюкозата от части ограничава целия фенолен метаболизъм. Фенолната биодеградация и активността на катехол 1,2 оксигеназата намаляват съответно с 60% и 75%. При смяна на субстрата от фенол на глюкоза, активността на катехол 1,2 оксигеназа се ограничава, но не се инактивира. Активността на пируваткиназа остава непроменена по време на растеж върху глюкоза в присъствието на фенол. Активността на аспартатаминотрансфераза е по-висока в клетки растящи на фенол и глюкоза, докато активността на аланинаминотрансферазата намалява, само когато в средата присъстват и двата субстрата.

От резултатите получени при култивиране на фенол с различни концентрации беше установено инхибиращото въздействие на субстрата. При концентрации на фенол от 1,5g/l и 2,0g/l културата не навлиза в логаритмичен растеж, но все пак се намалява съдържанието на фенол в средата, което ясно показва, че щамът консумира субстрат без да натрупва съществено количество биомаса.

При изследване на кинетичните параметри за свободни клетки при присъствие на различни други замърсители се установи, че K_s практически не се изменя. Промени настъпват в стойностите на μ и μ_{max} , което показва, че това се отнася за неконкурентно инхибиране. Това не се отнася за присъствието на бензен, тъй като при μ и μ_{max} стойностите спрямо тези за фенола се променят незначително. Както може да се види от фиг.6 изчерпването на субстрата при 0,6g/l в моделни води съдържащи всички замърсители става за около 16 часа и напълно съвпадат резултатите получени за тази концентрация само в присъствие на фенол и нафтален, което показва инхибиране на процеса.

Сравнителни изследвания върху кинетичните параметри за свободни клетки.

Намерените от нас стойности за $\mu_{max}=0,6095h^{-1}$ и $K_s=0,0199g/l$ са получени при пределни стойности на субстрат клонящ към $0,1g/l$ т.е. в зона в която инхибирането е пренебрежимо малко.

При получените параметри, инхибиторният двучлен в експоненциалния модел на *Edwards* (Модел 3) силно се влияе от фенолната концентрация в средата и оказва съществено влияние върху кинетичната крива в концентрационния обхват от $0,1g/l$ до $2,0g/l$ фенол. Модела на *Yano и Koga* (Модел 2), съдържащ многочлена $(S / K_i)^2$ е над Модел 1 и Модел 3 и също е чувствителен към фенолното инхибиране. В нашия случай при фенолна концентрация в хранителната среда над $0,60g/l$ Модел 1 и Модел 3 предсказват приблизително еднакво инхибиторния ефект на фенола, при което може да се каже, че те отчасти съвпадат. Стойностите за μ в условия на инхибиране получени от други автори са много подобни.

Направени са изследвания за биодеградация на фенол при периодично култивиране на чиста култура *Pseudomonas putida* DSM 548. Целта на експеримента е била да се установи кинетиката на разграждане чрез измерване на скоростта на клетъчен растеж и фенолната концентрация, като функция от времето при периодично култивиране. Установено е, че уравнението на *Haldane* адекватно описва клетъчния растеж с кинетични константи $\mu_{max}=0,463 h^{-1}$, $K_s=0,00619 g/l$, $K_i=0,0541 g/l$.

При изследване кинетиката на биоразграждане на толуен, фенол и смес от толуен и фенол с *Burkholderia* JS150 е било установено също както и при нас $\mu_{max} = 0,38 h^{-1}$, че се променя стойността на μ_{max} в присъствие на толуен. И двата компонента са използвани, като основен въглероден и енергиен източник от тези микроорганизми. Кинетиката на еднoсубстратно биоразграждане е била описана добре посредством уравнението на *Monod*, с моделни константи $\mu_{max,\phi} = 0,309 h^{-1}$ и $K_{s,\phi} = 0,00051g/l$ при култивиране на фенолна среда и $\mu_{max,T} = 0,39 h^{-1}$ и $K_{s,T} = 0,00103 g/l$ при култивиране на толуен. Разграждането на смеси от толуен и фенол следва кинетиката описана за толуен, който е предпочитан субстрат от микроорганизмите. Установено е, че толуенът инхибира скоростта на изчерпване на фенола, докато присъствието на фенол в средата оказва само малко влияние при скоростта на разграждане на толуена.

Едно интересно сравнение може да се направи с халофилни бактерии. Успешно може да се проведе биодеградация на органични замърсители при високо съдържание на сол в средата. До скоро данни в литературата не са били публикувани относно кинетиката на разграждане при такова алтернативно третиране на отпадъчни

води. Водни, почвени и утаечни проби са били взети от околната среда в западна Америка. Пробите са били допълнително обогатени и съдържали 10% (w/v) NaCl, pH 7,0 и фенол, като субстрат. Проведени са експерименти със смесени култури при температура 30°C и първоначална ниска фенолна концентрация от 50mg/l. Изчисленията на фенолно разграждане и съответния клетъчен растеж, като функция от времето с моделите на *Monod* и *Haldane*, показали че кинетиките се описват с уравнение от нулев порядък. При което специфичната скорост на растеж е в интервала от 0,22 h⁻¹ до 0,32h⁻¹ при пет различни култури. За една от културите, скоростта на фенолното разграждане също е било количествено определено, но при концентрация на фенол в средата над 0,320 g/l. Получена е специфичната скорост на растеж от 0,09 h⁻¹ до 0,22 h⁻¹, намалявайки с увеличаване на първоначалната фенолна концентрация. Последната стойност е значително по-ниска от получената от нас стойност за μ_{max} при подобна фенолна концентрация.

Изследователи от Университета в Анкара изследват щама *Pseudomonas putida* F1 за ефекта на адаптация и последващо биоразграждане на бензен (Б), толуен (Т) и фенол (Ф). Установено е, че адаптацията на микроорганизмите на БТФ среда, намалява биодеградиационното време от 24 часа до 6 часа за бензен (0,09g/l), толуен (0,09g/l) и от 90 до 18 часа за фенол(0,050g/l). Нашите изследвания в присъствието на същите органични съединения с подобни концентрации, но много по-висока концентрация на фенол, около десет пъти и без предварително адаптиране, субстратът се изчерпва също за 6 часа. Кинетичен модел на *Andrew (Haldane)* за един субстрат е бил решен за получаване на константите за максимална специфична скорост на растеж и субстратно инхибиране. Клетъчния растеж използвайки толуен ($\mu_{max,T} = 0,61$ h⁻¹) и бензен ($\mu_{max,B} = 0,62$ h⁻¹) като въглероден източник е бил по-голям и по-бърз отколкото растежа на фенол ($\mu_{max,\Phi} = 0,051$ h⁻¹). За субстратна смес е използван сумарен кинетичен модел, при който са определени взаимодействищите параметри. Този модел, както и при описаните по-горе изследвания дава много добро предсказване на кинетиката на растеж и взаимодействията между тези субстрати. Толуенът инхибира усвояването на бензена ($I_{T,B} = 5,16$ h⁻¹), много повече отколкото бензена инхибира използването на толуена, като субстрат ($I_{B,T} = 0,49$ h⁻¹). Бензенът ($I_{B,\Phi} = 0,27$ h⁻¹) и толуенът ($I_{T,\Phi} = 0,14$ h⁻¹) увеличават биоразграждането на фенол, а фенолът инхибира биоразграждането на бензен ($I_{\Phi,B} = 1,08$ h⁻¹) и толуен, използвани като субстрати ($I_{\Phi,T} = 1,03$ h⁻¹).

Както беше подчертано по-горе бензенът и толуенът при нашите изследвания не оказват такова драстично инхибиращо действие върху щама *Trichosporon cutaneum* R57.

Фенолна биодеградация при периодично култивиране в реактор е изследвана, използвайки смесена култура. Целта на настоящата работа е била да се моделира изчерпването на фенол в реактор. При това изследване, използваната култура е била с възможност да разгражда фенол с начална концентрация (S_0) над 1,45 g/l. Уравнението на *Haldane* е било използвано да опише връзката между специфичната скорост на растеж μ и S_0 . Кинетичните параметри изчислени от *Haldane* уравнението са били $\mu_{max} = 0,143 \text{ h}^{-1}$, $K_S = 0,0874 \text{ g/l}$, $K_i = 0,107 \text{ g/l}$. При симулираното изследване е доказано, че моделът на *Haldane* не съответства с измерените и пресметнати фенолни концентрации, когато S_0 е над 0,1 g/l. Недостатък на този модел е невъзможността да се определи инхибирането на метаболитните продукти при фенолното разграждане. Модел, предложен в литературата за чиста култура, включващ концентрацията на междинните продукти е бил тестван за смесена култура. Този нов модел има заслуги за това, че при тези експерименти напълно се отхвърля класическия модел на *Haldane* при високи стойности на S_0 . Новия модел дава доста по-добра оценка за биоразграждането, отколкото класическия модел на *Haldane* при изследвания интервал за S_0 (0,020 ÷ 1,45g/l).

Нашите резултати също показаха, че уравнението на *Haldane* не е подходящо да опише получените от нас експериментални данни за свободните клетки, а най-подходящ се оказва Модел 2 (Модел на *Yano u Koga*).

Изследвана е биодеградацията на фенол в отпадъчни води във флуидизиран биореактор. Експериментите са направени със различна скорост на потока, преминаващ през реактора, разтворения кислород и различна стартовата концентрация на субстрата. Използваната отпадъчна вода с концентрация на фенол 1,254 g/l е била успешно биодеградирана до 0,05g/l, докато при начална концентрация до 1,034g/l, фенола напълно се разгражда и достига стойност нула. Кинетичните параметри за клетъчен растеж са определени при последователните експерименти и е получено, че $\mu_{max} = 0,024 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$, $K_S = 0,022 \cdot 10^{-3} \text{ g/l}$, $K_i = 0,522 \cdot 10^{-3} \text{ g/l}$.

Кинетиката на биодеградация на фенол представлява огромен интерес, поради установения субстратен инхибиторен ефект. Много автори използват фенола, като модел за субстратно инхибиране и изследват кинетичните параметри при биоразграждането на фенол с различни концентрации със смесени и чисти култури.

На табл.11 са показани кинетичните параметри за биодegradация на максимална фенолна концентрация с различни клетъчни култури.

Табл.11. Кинетични параметри изчислени за аеробното биоразграждане на максимална фенолна конц. с различни клетъчни култури при свободни клетки.

Микроорганизми, начин на култивиране	Макс. фенолна конц., (g/l)	μ_{max} , (h ⁻¹)	K_s , (g/l)	K_i , (g/l)	Източници
<i>Trichosporon cutaneu</i> R57, периодичен процес	1,000	0,270	0,410	0,860	Настоящото изследване
<i>Trichosporon cutaneum</i> , непрекъснат процес	0,900	0,464	0,0017	0,380	Yang & Humphrey, 1975
<i>Candida parapsilopsia</i> , периодичен процес	1,000	0,174	0,011	0,298	M.Rigo, 2004
<i>Nocardia</i> sp. CF222, непрекъснат процес	2,100	0,29	<0,001	0,730	Mizobuchi et al., 1980
<i>Acinetobacter</i> , периодичен процес	0,350	0,83	0,0015	0,250	Hao et al., 2002
<i>P.putida</i> ATCC 17484, периодичен процес	0,700	0,534	<0,001	0,470	Hill & Robinson, 1975
<i>P.putida</i> Q5, периодичен процес	0,200	0,119	0,0053	0,377	Kotturi et al., 1991
<i>P.putida</i> DSM548, периодичен процес	0,100	0,436	0,0062	0,054	Montiero, 2000
<i>P.putida</i> ATCC 17514, непрекъснат процес	0,500	0,567	0,0024	0,106	Yang & Humphrey, 1975
<i>P.putida</i> ATCC 17514, периодичен процес	0,150	0,897	0,0122	0,204	Dikshitulu et al., 1993
<i>P. resinovorans</i> ATCC 14235, периодичен процес	0,150	1,007	0,0130	0,118	Dikshitulu et al., 1993
<i>Pseudomonas fluorescense</i> , периодичен процес	0,500	0,045	0,556	0,068	S.A.Agarrry,2008
<i>P.aeruginosa</i> & <i>P.fluorescense</i> , периодичен процес	0,500	0,083	0,211	0,050	S.A.Agarrry,2008

От таблицата се вижда, че максималната специфична скорост на растеж при различните клетъчни култури варира от 0,045 h⁻¹ до 1,007 h⁻¹, като при нашите изследвания за *Trichosporon cutaneu* R57 има съизмерима стойности в този обхват $\mu_{max}=0,27$ h⁻¹. Същото може да се каже и за константата на Моно, която варира от 0,001g/l до 0,556g/l, при което нашата получена стойност $K_s=0,41$ g/l също влиза в този обхват. Повечето стойности за инхибиторната константата, описани от изследователите са между 0,05g/l и 0,73g/l, докато нашите стойности са малко по-

високи, за свободните клетки $K_i = 0,86 \text{ g/l}$, което също показва пример за едно типично субстратно инхибиране.

Сравнителни изследвания върху кинетичните параметри на имобилизирани клетки

Ковалентната имобилизация на дрождеви клетки беше осъществена чрез метод прилаган за грам положителни микроорганизми, като *Artrobacter simplex* и *Artrobacter oxidans* към целулозни носители. Разликата е, че бяха избегнати редица предварителни стъпки и директно амидните групи на носителя бяха активирани с формалдехид, при което веднага бе престъпено към имобилизационна процедура. Установено беше, че за разлика от посочените бактериални клетки и метаногенен консорциум, успешната имобилизация на дрождевите клетки се осъществи само в присъствие на среда съдържаща 1% глюкоза.

В случая на имобилизация на дрождеви клетки, подобна хипотеза също може да бъде приложена за механизма на свързване на клетки към съполимер, тъй като дрождите се отличават с по-особен, дву-пластов строеж на клетъчната си стена. Манан-белтъчен комплекс, открит във външния пласт, осигурява здравина на клетъчната стена, поради което клетките се свързват към съполимера без да се извършат сериозни промени в самата клетка. Ковалентното свързване вероятно възниква между някои аминокиселинни остатъци в клетъчната стена и N-хидроксиметилната група на активирания носител съполимер на полиакриламид с акрилонитрил.

С удължаване на последователните цикли на среда съдържаща фенол в периодичен процес се наблюдаваше образуването на плътен биофилм около гранулите, показан на фиг.9. Клетките запазиха жизнените си функции с течение на времето и имаха възможност да се делят в хранителната среда. При това формиране на биофилм част от клетките се адхизират върху слоя клетки върху гранулата, а други остават в културалната течност. Поведението на биофилма не е било обект на нашето изследване, това се прави в следващи дисертационни работи и публикации със същия носител.

Trichosporon cutaneum клетки са били имобилизирани и на комерсиални продукти, като полиакрилонитрил и полиамид. Носителите предварително са били активирани с няколко стъпки за химична модификация, след което клетките са имобилизирани с помощта на глутаров алдехид.

Сравнени бяха резултатите от кинетичните параметри на свободните клетки и получените от нас имобилизирани клетки. Около два пъти намалява стойността на μ_{max} , но K_s можем да кажем, че остава непроменена. Това е едно сигурно доказателство, че имобилизационната процедура не е повлияла на сродството на ензимните системи като цяло в клетката към субстрата, а също не се повлиява и от присъствието на други замърсители.

По отношение на експериментите извършени в моделни отпадъчни води се запазва характерът на растежните криви, наблюдавайки отново неравномерна експоненциална фаза. Наблюдава се удължена лаг-фаза на 8 часа, докато при свободните клетки е 4 часа. Също неравномерна експоненциална крива на растеж се наблюдава и при 0,35g/l фенол веднага след цикъла на адаптиране, но тук при свободните клетки при същите условия има равномерна експоненциална фаза. Намерените стойности на кинетичните параметри при различните концентрации на фенол отново показаха тенденция към намаляване на μ_{max} , но стойността на константата на *Monod* K_s в изследванията до 0,1g/l не се променя. Получените стойности съответно за $\mu_{max}= 0.457 \text{ h}^{-1}$ и респективно $K_s=0,011\text{g/l}$ са близки до резултатите публикувани в литературата за фенолна биодеградация $\mu_{max}= 0,47 \text{ h}^{-1}$ и 0,436g/l; $K_s=0,02\text{g/l}$ и $K_s=0,062\text{g/l}$.

В повечето публикации съответстващият модел за процеса на фенолна биодеградация е моделът на *Haldane* (Модел 1). Стойностите публикувани в литературата за чиста и смесена култура разграждащи фенол са в границите за K_i от 0,4g/l до 0,6g/l. В някои последни изследвания с култура *Pseudomonas*, модифициран двуфазов модел е бил приложен и получените стойности за μ_{max} , K_s и K_i са били 0,38 h^{-1} ; 18 g/l и респективно 0,214 g/l. Моделни параметри определени за фенолната биодеградация за Са-алгинатни имобилизирани клетки от *Ralstonia eutropa* са били за $\mu_{max}=0,89 \text{ h}^{-1}$, $K_s=0,055 \text{ g/l}$ и $K_i= 0,257 \text{ g/l}$. Получените кинетични параметри за фенолна биоконверсия с *P.stutzeri* OX1, имобилизирани чрез адхезия на активен биофилм са били $\mu_{max}=0,71 \text{ h}^{-1}$; $K_s=0,310 \text{ g/l}$ и $K_i= 0,130 \text{ g/l}$.

В нашето изследване използвахме моделите от 1 до 3 при начална фенолна концентрация от 0,1 g/l до 1,0g/l. Адекватния математически модел, описващ процеса субстратно инхибиране бе определен чрез сравняване на експерименталните и изчислени кинетични криви с получените стойности за $\mu_{max}=0,457 \text{ h}^{-1}$; $K_s=0,011 \text{ g/l}$, а параметъра K_i , като приспособим параметър. Кривите за клетъчен растеж и субстратна консумация симулирахме, като използвахме компютърна програма

(основаваща се на *Runge-Kutta* техника). Числените стойности за добивния коефициент Yx/s определихме от експерименталните данни при различна начална фенолна концентрация.

Както е показано в предишна публикация, полезността на моделите е в предсказването на инхибиторния ефект на фенола в зависимост от концентрационния му обхват в средата. Изборът на адекватен математически модел, описващ процеса на субстратно инхибиране беше направен в зависимост от неговата способност да опише експерименталните криви в целия концентрационен обхват (от 0,1g/l до 1,0g/l) с фиксирани стойности на параметрите μ_{max} , K_s и K_i . От фиг.16 и фиг.17 се вижда, че стойността за $K_i=0,24g/l$, съответства най-добре на експерименталната крива при *Модел 3* за 0,1g/l фенол, докато при фенолна концентрация 0,35g/l е доста по-различно от задоволителното предвиждане на кинетичния процес. По късно е добре описано с *Модел 2*, при $K_i=0,23g/l$, но за 0,1g/l респективно пресметнатата крива е доста по-далече от експеримента. При високите фенолни концентрации (0,6g/l и 1,0g/l) *Модел 2* и *Модел 3* предвиждат много по-силен инхибиторен ефект, където и стойностите за K_i са драстично различни.

Уставихме, че моделът на *Haldane* (*Модел 1*) има възможност задоволително да опише експерименталните криви в целия концентрационен обхват с една и съща стойност на $K_i = 0,2 g/l$. Поради което направихме заключението, че този модел дава адекватно обяснение на фенолния инхибиторен ефект.

В нашите изследвания направихме сравнение на кинетичните параметри между свободни и имобилизирани клетки *Trichosporon cutaneum* R57, при различни въглеродни източника, както и при различна концентрация на фенол в средата. И в двата случая, свободните и имобилизирани клетки показаха типичен процес на периодично култивиране, при което се описаха общите закономерности на растеж. Изчислените кинетични параметри при усвояването на глюкоза и фенол бяха съизмерими, което показва, че фенолът може да се използва, като въглероден източник. С увеличаване на фенолната концентрация в средата, кинетичните параметри се променяха закономерно. Установихме, че максималната фенолна концентрация в средата, която може да бъде използвана е 1,0 g/l за свободни и имобилизирани клетки, след което имаме силно инхибиране на процеса.

Сравнителни изследвания върху токсичното действие на фенол, бензилов алкохол и *n*-октаноол върху клетки *Trichosporon cutaneum* R57

Основният ефект на фенола върху бактериите и дрождите се базира в промяната на способността на мембраната да пропуска различни вещества. Липидният слой в цитоплазмената мембрана е една от основните бариери между бактериалната цитоплазма и външния свят, разрушаването на която лесно причинява клетъчна смърт. Има сведения за бактерии, които имат развити механизми за устойчивост на фенол с различни концентрации, както и срещу различни токсични разтворители. Тези изградени резистентни механизми се изразяват в ограничаване на дифузията през мембранните структури. Един такъв механизъм е изомеризацията на *цис*-ненаситени мастни киселини в *транс*-конфигурация, както е описано за фенолно разграждане при *Pseudomonas putida* P8. Тези микроорганизми трансформират дълга въглеродна верига изградена от 16 въглеродни атома на ненаситените мастни киселини в *транс*-конфигурация след попадането им във фенолна среда. Тъй като веригите на *транс* мастните киселинни молекули вече могат да се подредят по близко една до друга в биологична мембрана, отколкото когато са в *цис*-конфигурация, молекулите образуват още една твърда, нееластична мембрана. Така, по този начин клетки от *P. putida* P8 са адаптирани чрез култивиране на фенолна среда и могат да се развиват при концентрации над 0,750 g/l. Докато неадаптирани клетки от *P. putida* P8 не могат да растат при фенолни концентрации по високи от 0,250 g/l.

Друг механизъм е увеличаване на съотношението между наситени мастни киселини към ненаситени киселини в мембраната, както е описано за *Escherichia coli* K-12. Тази бактерия може да продължава да се развива в присъствие на фенол в средата над 1,0 g/l чрез превръщането на ненаситени мастни киселини в наситени. Така както *транс* мастните киселини, така и веригите на наситените мастни киселини могат да се подредят по-близко една до друга в мембраната, което може да компенсира увеличената мембранна активност в присъствието на фенол.

Диелектричните измервания в радиочистотната област е добър метод за бързото изучаване на токсичното действие на различните разтворители върху клетъчната култура. Успехът на метода се базира на големите разлики в електричните свойства на мембраната, (диелектрична проникваемост или диелектрична константа и електропроводимост) в сравнение с тези на цитоплазмата и суспендираните вещества в средата. В случаите на диелектрично поле, клетките се разделят в зависимост от тяхния заряд, придобивайки диполен момент, който пък от своя страна силно зависи

от мембрания капацитет в специфичната област на радиочистотния обхват (от 0,1 до 20MHz).

Нашите експерименти показани от фиг.22 до фиг.24 демонстрираха, че промяната в капацитета на суспензиите са близки до тези описани за други органични вещества. В случая директното прибавяне на фенол, *n*-октанол и бензилов алкохол към клетъчна суспензия води до навлизане на молекулите на токсичните вещества през мембраните, които при достатъчно висока концентрация, дестабилизируют мембраната и води до тяхното разкъсване. Вижда се, че клетки *T. cutaneum* R57 култивирани на среда съдържаща фенол стават все по-резистентни към фенол и бензилов алкохол, което е безспорно доказателство, че култивираните на фенолна среда клетки води до частична адаптация на клетъчната мембрана. Сравнявайки резултатите с тези при прибавянето на *n*-октанол към клетъчна суспензия доказваме, че култивираните клетки на фенолна среда са по-малко резистентни към *n*-октанол и умират по-бързо съдейки от по-бързото намаляване на капацитета на суспензията. Докато клетки *T. cutaneum* R57 прораснали на глюкозна среда са относително по-резистентни към *n*-октанол, но по-малко резистентни към фенол и бензилов алкохол.

Различните физични и химични свойства на веществата влияят на тяхното разпределение в околната среда. Водоразтворимите токсични вещества са лесно подвижни и навлизат в почвата, а от там и в подземните води. Разпределителният коефициент $LogP_{ow}$ се използва за да се изчисли колко полярно е едно вещество, което от своя страна дава информация каква е вероятността то да се биоакмулира и по този начин да доведе до летален край на растенията, животните, както и на микроорганизмите обитаващи околната среда. В присъствие на различни разтворители микроорганизмите променят свойствата на техните мембрани. Относително полярните и късоверижни алкохоли увеличават синтеза на липиди съдържащи ненаситени мастни киселини, докато полярните и дълговерижни алкохоли имат обратен ефект, увеличават количеството на наситените мастни киселини.

Hanch използвал *n*-октанол ($C_8H_{17}OH$) за представяне на хидрофобността на веществата. Равно количество от *n*-октанол и вода се смесват в делителна фуния и се прибавя изследваното вещество. Разклаща се динамично за определен период от време и сместта се оставя да престои, за да се раздели водният от органичния слой. Концентрацията на тестваното вещество се определя и в двата слоя- водния и октаноловия чрез GC или HPLC методи за анализ. *Hanch* коефициента се определя по

следния начин: *Hanch* коефициент = $\log_{10} \frac{[X]_{\text{octanol}}}{[X]_{\text{water}}}$, където X е количеството

вещество присъстващо във всеки един от слоевете. *Hanch* коефициентът понастоящем се нарича *logP*_{октанол/вода} разпределителен коефициент (*logPow*). Ако този параметър е по-голям от 3 (т.е. тестваното вещество е 1000 пъти по-разтворимо във *n*-октанол отколкото във вода), то тогава е много вероятно веществото да се насочи към хранителната верига. В нашия случай изследваните от нас вещества фенол и бензилов алкохол са относително полярни с $\log P_{ow}=1,46$ за фенола и $\log P_{ow}=1,1$ за бензиловия алкохол, докато *n*-октанолът е относително неполярен ($\log P_{ow}=2,9$). Чрез нашите експерименти показахме, че клетки култивирани на фенол са по-резистентни към относително полярните вещества, фенол и бензилов алкохол, но по малко резистентни срещу относително неполярното вещество, *n*-октанол. И обратно клетки култивирани на глюкозна среда са по-резистентни срещу *n*-октанол и по-малко резистентни към фенол и бензилов алкохол. Така получените от нас експерименти индикират, че клетки адаптирани към полярни вещества могат да станат по-податливи и чувствителни към други по-неполярни вещества.

Получените от нас резултати могат да се приложат при третирането на отпадъчни води и биотрансформация на токсични вещества, от гледна точка на възможен начин за увеличаване или намаляване на клетъчната смърт. Като пример, сепарарирането на полярни вещества при отпадъчните води от неполярните преди или по време на биодеградацията може да се използва за да се подобри тяхното третиране.

ИЗВОДИ

I. Получени са ковалентно свързани клетки *Trichosporon cutaneum* R57 към синтетичен полимерен носител.

1. Изследвана е биодеградацията на фенол с имобилизирани клетки *Trichosporon cutaneum* R57, при което беше установено, че скоростта на трансформация на субстрата е най-висока при 0,35g/l фенол. С увеличаване на субстратната концентрация, намалява скоростта на неговото разграждане, което показва субстратно инхибиране.

2. Трансформацията на фенол до 0,001g/l се достига за около 10 часа при свободните клетки а при имобилизираните клетки за 40 часа, използвайки по-висока субстратна концентарция от 1,0g/l фенол.

3. Иммобилизирани клетки *Trichosporon cutaneum* R57 към съполимер акрилонитрил с акриламид след предварителна адаптация могат да разграждат фенол с концентрация от 0,65g/l за по-малко от 10 часа.

4. С увеличаване на фенолната концентрация в средата, кинетичните параметри се променяха закономерно. Установихме, че максималната фенолна концентрация която може да бъде използвана е 1,0 g/l за свободни и иммобилизирани клетки, след което имаме силно инхибиране на процеса.

II. Установени бяха кинетичните параметри на процеса биодеградация на фенол с иммобилизирани клетки.

1. Анализирането на експерименталните криви използвайки кинетиката на *Monod* показва, че получените стойности за параметрите на привидната скорост на растеж варира в зависимост от субстратната концентрация (μ_{maxapp} е от 0,43 h⁻¹ до 0,13 h⁻¹ и K_{sapp} от 0,037 g/l до 0,4g/l). Намаляването на максималната скорост на клетъчен растеж с увеличаване на фенолната концентрация, съвпада с увеличаването на константите на *Monod*, което показва, че субстратът оказва инхибиращ ефект.

2. Изследвана беше адекватността на три модела описващи процеса на субстратното инхибиране и беше установено, че най-подходящ е модела на *Haldane* (Модел 1)

$$\mu = \frac{\mu_{max}}{(1 + K_s / S + S / K_i)}$$

3. Тъй като фенолната концентрация в реални отпадъчни води, анализирана чрез ВЕТХ беше 0,603g/l и субстратния инхибиторен модел беше симулиран точно с тази концентрация при фиксирани стойности на параметрите μ_{max} , K_s и K_i . Сравнението между пресметнатите с трите модела кинетични криви и експерименталните данни показаха, че и в двата случая при моделните и реални отпадъчни води, изчислените криви по модела на *Haldane* съвпадат най-добре.

III. Изследвано беше токсичното действие на фенол, бензилов алкохол и n-октанол върху клетки *Trichosporon cutaneum* R57 чрез диелектрични измервания в радиочестотната област.

1. Клетките *Trichosporon cutaneum* R57 проявяват известен толеранс при директното прибавяне на органичните съединения с ниска концентрация

(0,5g/l и 1,0g/l), но при по-високите концентрации (2,0g/l и 5,0g/l), клетките култивирани на различни хранителни среди показват различно поведение.

2. Клетки *Trichosporon cutaneum* R57 култивирани на среда съдържаща 1,0g/l фенол са по-резистентни към полярни ароматни токсични вещества, като фенол ($\log P_{ow}=1,48$) и бензилов алкохол ($\log P_{ow}=1,1$), но по-малко резистентни към неполярни ароматни вещества, като *n*-октанол ($\log P_{ow}=2,9$). Това означава, че предварително адаптирани клетки на среда съдържаща фенол са по-устойчиви към неблагоприятните условия, включващи висока субстратна концентрация, което вероятно се дължи на вече изградения механизъм за разграждане на фенол.
3. Щамът *T.cutaneum* R57 разгражда и може да използва глюкоза, фенол и бензилов алкохол, като въглероден източник, но не може да разгражда *n*-октанол.
4. Щамът *T.cutaneum* R57 може да биоакумулира мед, което е едно предимство, когато щамът се използва за пречистване на отпадъчни води съдържащи тежки метали.

ПРИНОСИ

1. Извършено е ковалентно свързване на филаментозни дрожди *Trichosporon cutaneum* R57 към синтетичен гранулиран полимерен носител.
2. Имобилизитаните клетки са охарактеризирани по отношение на свойствата им за биодegradация на фенол при различни условия.
3. Определени са кинетичните параметри описващи клетъчния растеж на свободни и имобилизирани клетки в присъствие на различни токсични вещества, както и при различна субстратна концентрация.
4. Намерен е адекватен математически модел описващ процеса на разграждане със свободни и имобилизирани клетки.
5. Изследвана е устойчивостта на клетки *Trichosporon cutaneum* R57 спрямо различни токсични органични съединения чрез диелектрични измервания.
6. Имобилизирани клетки са успешно използвани за биодegradация на фенол в отпадъчни води.

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

1. Lyubov Yotova, Irene Tzibranska, Filadia Tileva, Gerard Markx, Nelly Georgieva, Kinetics of the biodegradation of phenol in wastewaters from the chemical industry by covalently immobilized *Trichosporon cutaneum* cels. ***J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (2009) 36:367-372, IF 1.95**
2. Filadia P.Tileva, Lyubov K.Yotova and Gerard H. Markx, Dielectric measurement of the resistance of *Trichosporon cutaneum* against toxic chemicals. ***African Journal of Microbiology Research* (2007) 1:117-120, IF 0.6**
3. I.Tsibranska, L.Yotova, G.Markx, F.Tileva
Modelisation de la biodegradation de phenol par *T. cutaneum* immobilize sur un support polymere synthetique. ***Journal of the university of chemical technology and metallurgy*, XXXVII, 5 (2002), 145-152.**

II. Статии отпечатани в пълен текст в сборници на научни конференции:

1. I.Tsibranska, L.Yotova, G.Markx, F.Tileva
Biodegradation of phenol by yeast cells covalently immobilized to synthetic polymer granules. ***International Symposium and young scientist's Sschool, BioPS'03, November 11-13, IV. 6***
2. Georgieva N., D.Barbutova, Tzibranska I., Tileva F., Yotova L.
Effect of copper on growth of *Trichosporon cutaneum*. ***International Symposium and young scientist's Sschool, BioPS 2001, October 1-3***

III. Симпозиуми и международни конференции:

1. Filadia Tileva-Dilchovska, N.A.Marinova, Rositsa Chalina, V.V.Georgieva
Options for CO₂-free hydrogen sources from biomass, ***Science technology and Research seminar, Essen, Германия, 25^{та}-26^{та} Юни, 2003.***
2. Filadia Tileva, Lyubov Yotova, Gerard Markx
Dielectric measurement of yeast cells resistance against toxic chemicals, Научна конференция на младите научни работници, ХТМУ-София, България, май, 2007 г.