



ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНО И СИСТЕМНО ИНЖЕНЕРСТВО

КАТЕДРА „БИОТЕХНОЛОГИЯ”

инж. Невена Александрова Лазарова

**БИОСОРБЦИЯ НА ЙОНИ НА ТЕЖКИ МЕТАЛИ ОТ ЩАМ
TRICHOSPORON CUTANEUM R57**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

за придобиване на образователната и научна степен „доктор”
по научна специалност 5.11. Биотехнологии (Биоорганична химия,
химия на природните и физиологично активните вещества)

Научни ръководители: доц. д-р Нели Георгиева
проф. Мария Ангелова, дбн

Научно жури:

1. проф. д-р инж. Любов Йотова – председател, рецензент
2. проф. д-р Пенка Мончева - рецензент
3. доц. д-р Нели Георгиева
4. доц. д-р Светла Илиева
5. доц. д-р Румяна Велинова

София, 2015

Дисертационният труд е написан на 140 страници, съдържа 52 фигури и 10 таблици. Цитирани са 240 източника. Номерата на фигурите и таблиците в автореферата не съответстват на тези в дисертацията.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на разширен научен съвет на научното звено на катедра „Биотехнология”, състояло се на 08. 06. 2015 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 28.09. 2015 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 най-сърдечна благодарност на научните ми ръководители доц. д-р Нели Георгиева и проф. Мария Ангелова, дбн, за всичко, на което ме научиха през тези години, за ценните съвети, за търпението и огромната помощ при изготвяне на дисертацията. Също така благодаря на всички колеги, с които имах удоволствието да работя в ХТМУ и секция „Микология“, ИМ Стефан Ангелов – БАН за помощта и подкрепата им. Благодаря и на проф. Rudolf Müller и работната му група в Института по техническа биокатализа, ТУХХ, Германия, за възможността да работя по част от дисертацията си с тях, за добрите насоки и безценни съвети. Благодаря още за финансовата подкрепа на програма Еразмус и Фонд „Научни изследвания“: Договор DDVU 02-96/2010-2013г.

Не на последно по важност място – благодаря на семейството ми за обичта и подкрепата, с които ме даряват.

Използвани съкращения

АТФ (ATP) – аденозинтрифосфат
ДНФХ – 2,4-динитрофенилхидразин
ЕД (ED) – електродиализа
ЕПЗ (EPS) – екзополизахариди
КАТ (CAT) – каталаза
ЛПЗ (LPS) – липополизахариди
МНЗ (MCL) – максимално ниво на замърсителя
МИК (MIC) – минималната инхибиторна концентрация
НК – нуклеинови киселини
ПАМАМ (PAMAM) – полиамидоамин
СЕМ (SEM) – сканираща електронна микроскопия
СОД – (SOD) – супероксид дисмутаза
СОР – (ROS) – свободни окси-радикали/активни форми на кислорода
ТЕМ (TEM) – трансмисионна електронна микроскопия
ТМН (TMP) – трансмембранното налягане
УФ – ултрафилтрация
CDF – катион дифузионен посредник
CFU – колония-формиращи единици
 Cu^r – мед-резистентни щамове
 Cu^s – мед-чувствителни щамове
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – меден сулфат пентахидрат
FTIR (ИЧ) – инфрачервена спектроскопия с Фурие трансформация

GC – газова хроматография
GSH – редуцирана форма на глутатиона
HCl – солна киселина
HPC – хидроксипропил целулоза
 H_2O_2 – водороден пероксид
 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ – калиев бихромат
KCN – калиев цианид
MIT – метал-транспортна система
NBT – нитро син тетразол
NADPH –
никотинамидадениндинуклеотид фосфат
NaOH – натриев хидроксид
 NH_4OH – амониев хидроксид
PC – фитохелатин
PHGPx(s) – фосфолипид хидропероксид глутатион пероксидаза/и
PQ – паракват PQ
SDS-PAGE – натриев додецил сулфат полиакриламидна гел електрофореза
Smt – металотионин- подобни белтъци
SPVDF – поливинилдифлуоридна мембрана
TEOS – тетраетокси силан
USEPA – Агенцията за опазване на околната среда на САЩ
YEPD – дрождев екстракт пептон декстроза
 $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ – кадмиев сулфат октахидрат

ВЪВЕДЕНИЕ

Замърсяването на въздуха, водата и почвата с опасни и токсични химикали представлява висок риск за живите организми както директно, така и индиректно. В частност йоните на тежките метали са възприети като по-опасни замърсители дори при сравнително ниски концентрации. Основният източник на замърсяване с йони на тежки метали са ефлуентите от индустриалните процеси като галванопластиката, металургията, обработката на кожи, химическото производство, производството на батерии и минната индустрия. Непрекъснатото увеличаване на замърсяването на околната среда с йони на тежки метали влияе както върху растителните и животински видове, така и върху микроорганизмите. Йоните на много метали са необходими за растежа и развитието на микроорганизмите. Например K^+ и Na^+ йони регулират транспорта на вещества през мембраните, докато Cu^{2+} , Fe^{2+} и Mg^{2+} йони осъществяват електронният транспорт и фотосинтезата. Повишените нива на металните йони на Cd, Pb, Hg, Cr, Cu са токсични за микро- и макроорганизмите. При тях се наблюдават морфологични и физиологични промени. Нежеланите ефекти от емисиите на тежки метали са: денатурация и инактивация на ензимите и разрушаване на клетъчните органели, конформационни модификации, изместване на есенциални метални йони от биологично активни молекули. Отделянето на тежки метали в околната среда чрез земеделските, индустриалните и военните операции и ефектът от замърсяването на екосистемите оказва все по-сериозно влияние върху човешкото здраве.

С течение на еволюционното развитие някои микроорганизми са развили различни механизми за резистентност към йоните на тежките метали, което им позволява да преживяват и съхраняват клетките си в присъствие на високи концентрации на метали и да ги абсорбират за определен период от време. Употребата на биологични системи в ролята на сорбенти често се дефинира като биоремедиация. Биоремедиацията е процес, при който се използват микроорганизми за разграждането на вредни органични замърсители или превръщането на вредни неорганични замърсители в по-малко токсични или нетоксични замърсители на нива допустими за почви, подпочвени материали, води и др. Акумулацията на метали от микроорганизмите представлява интерес за учените поради важния екологичен аспект. Различните механизми за акумулиране на йони на металите от микроорганизми зависят основно от самия микроорганизъм и вида на металните йони. Биологичните системи имат предимство пред много технологии поради липсата на агресивни, концентрирани химикали, ниска цена, висока ефективност,

минимални отпадъчни утайки, възможност за регенерация на биосорбента, което прави тяхното изучаване и оптимизиране актуален проблем в последните десетилетия.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертационна работа е да се изследват възможностите на щам *Tr. cutaneum* R57 за извличане на йони на тежки метали от отпадъчни води и изясняване на оксидативния отговор на клетките.

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

1. Морфологична характеристика и периодично култивиране на *Tr. cutaneum* R57.
2. Установяване на минималната и максималната инхибиторни концентрации и летални концентрации на метални йони (хроматни, кадмиеви и медни) при *Tr. cutaneum* R57. Изследване ефекта на металните йони върху растежа, виталността и морфологията на *Tr. cutaneum* R57.
3. Изследване на метал-индуцирания оксидативен стрес върху щама.
4. Изследване на сорбционната способност на свободни и имобилизирани клетки *Tr. cutaneum* R57 при различни концентрации на металните йони (хроматни, кадмиеви и медни).
5. Изследване способността на щама за едновременно разграждане на фенол (като единствен С-източник) и сорбция на медни йони.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

- 1.1. Апарати
- 1.2. Микроорганизми
- 1.3. Хранителни среди
- 1.4. Хибридни материали като носители
- 1.5. Реактиви
- 1.6. Софтуер

2. МЕТОДИ

- 2.1. Условия за култивиране на *Tr. cutaneum* R57
- 2.2. Определяне на количеството клетки по степента на мътност на суспензия
- 2.3. Определяне на количеството клетки чрез посев върху твърди хранителни среди (CFU)
- 2.4. Микроскопско наблюдение
- 2.5. Сканираща електронна микроскопия
- 2.6. Определяне на биомасата чрез определяне на сухо тегло
- 2.7. Инфрачервена спектроскопия на биомасата
- 2.8. Количествено определяне на белтък
- 2.9. Получаване на безклетъчен екстракт
- 2.10. Антиоксидантни ензими
- 2.11. Определяне съдържанието на карбонилни групи в окислително – модифицирани белтъци
- 2.12. Определяне продукцията на свободни окси-радикали
- 2.13. Определяне съдържанието на гликоген и трехалоза
- 2.14. Изследване съдържанието на фенол
- 2.15. Определяне на съдържанието на метални йони и изследване на равновесието на сорбция
- 2.16. Възпроизводимост на резултатите

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Морфологична характеристика и периодично култивиране на щам *Tr. cutaneum* R57

Щам *Tr. cutaneum* R57 принадлежи към филаментозните дрожди от род *Trichosporon* и е изолиран от биомасата на дрождеразвъдните апарати като съпътстваща култура [Иванова – Георгиева, 1997].

Клетките на щама са с удължена форма и овални краища, единични или във вериги. Често се наблюдава псевдомицел и мицел с напречни прегради (септи). Клетките са сравнително големи (2-5)x(10-20) μm , срещат се цилиндрични артроспори. В цитоплазмата на клетките се наблюдават множество мастни капки. Колониите са кръгли с правилна форма, бели, силно нагънати с врасъл в агара мицел.

Във физиологично отношение, за щама е характерен оксидативния метаболизъм и способност за асимилиране на различни въглеродни източници – монозахари, органични киселини – млечна, янтьрна, лимонена киселини, както и капацитет за растеж при наличие на фенол като единствен въглероден източник. Широко разпространен е в природата – почва, вода. Характеризира се и с високата си резистентност към неблагоприятни условия на средата за култивиране. Тези негови качества показват изключителният му потенциал за превръщане на различни въглеродни източници в биомаса, в това число и фенол [Basha et al., 2010].

Изследваният щам филаментозни дрожди *Tr. cutaneum* R57 се култивира в условия на периодично култивиране в течна хранителна среда, съгласно описанието в раздел апарати и материали. Хранителната среда, използвана за развитие на щама осигурява бърз растеж на клетките и възможност да се наблюдават отделните фази на развитие на популацията, които очертават общите закономерности на растеж.

Според резултатите от CFU- метода културата следва нормален ход на развитие за дрождева култура. Наблюдават се ясно изразени четири фази на развитие [Madigan et al., 2014]. Лаг-фазата протича в първите 4-5 часа като се характеризира с почти идентична концентрация на клетките ($\sim 6.00\text{E}+05$ CFU/mL). След 5^{-я} час се наблюдава рязко нарастване на концентрацията, което отговаря на експоненциална фаза на развитие. Експоненциалната фаза продължава до 24^{-я} час, след което културата навлиза в стационарна фаза на развитие. До 50^{-я} час концентрация на клетките е относително

непроменлива, след което започва понижаване в броя на жизнените клетки (фаза на отмиране).

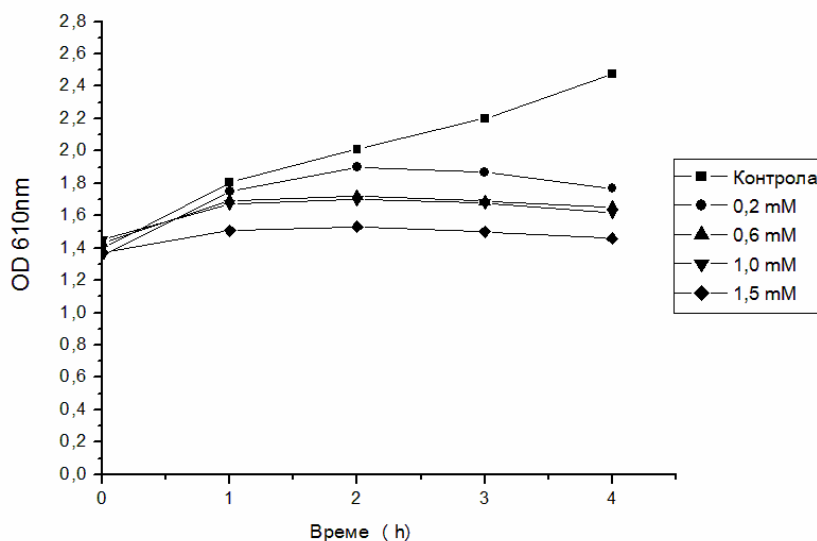
2. Установяване на минималната и максималната инхибиторни концентрации и летални концентрации на метални йони (хроматни, кадмиеви и медни) и изследване на ефекта им върху растежа, виталността и морфологията на *Tr. cutaneum* R57

Периодично култивиране на щама в присъствие на нарастващи концентрации на хроматни йони

След проследяване развитието на изследвания щам в минерална хранителна среда при оптимални условия, проведени са серия от експерименти с добавяне към хранителната среда на водни разтвори на йони на тежки метали – хром, кадмий и мед. В първата серия от експерименти, изследваният щам се култивира в присъствие на различни концентрации хроматни йони – от 0 до 1.5 mM $K_2Cr_2O_7$. На Фиг. 1 е проследена оптическата плътност на клетките, в продължение на четири часа в присъствие на хроматни йони. Оптическата плътност дава информация за общия брой клетки (както живите, така и мъртвите) в изследваната проба, което е важен фактор за изследвания по-късно процес на биосорбция, осъществяван и от двата вида клетки. Разтворът на металните йони е добавен на 24^{-я} час от култивирането на щама, което отговаря на късна експоненциалната фаза на развитие на културата (Фиг. 1). Контролната проба, в отсъствие на хроматни йони, следва нормален ход на развитие в периода на изследване. В пробите с добавени различни хроматни концентрации може да се забележи намаление в стойностите на оптическата плътност спрямо стойностите на контролата. Прави впечатление, че наблюдаваното снижаване на стойностите е пропорционално на увеличението на концентрацията на хроматните йони. Добавената концентрация от 0.2 mM $K_2Cr_2O_7$ може да се разглежда като праг на инхибиране, тъй като се наблюдава промяна в развитието на културата в сравнение с контролата (Фиг. 1). Леко занижение спрямо контролната проба има при оптическа плътност на втория час, а от третия час може да се забележи и инхибиране на растежа, което се изразява в занижени стойности на оптическата плътност в сравнение както с контролната проба, така и с оптическата плътност на пробата на втори час.

Подобни наблюдения отчитат и Ksheminska et al. (2008) при култивиране на различни дрождеви щамове в присъствие на хроматни йони [Ksheminska et al., 2008; Joutey et al., 2015]. Други автори определят минимална инхибиторна концентрация от 24

mg/L Cr^{6+} за бактериален щам *Eschericia coli* ASU7 [Abskharon et al., 2009] и 19 mg/L Cr^{6+} за бактериите *Sphaerotilus natans* [Caravelli & Zaritzky, 2009].

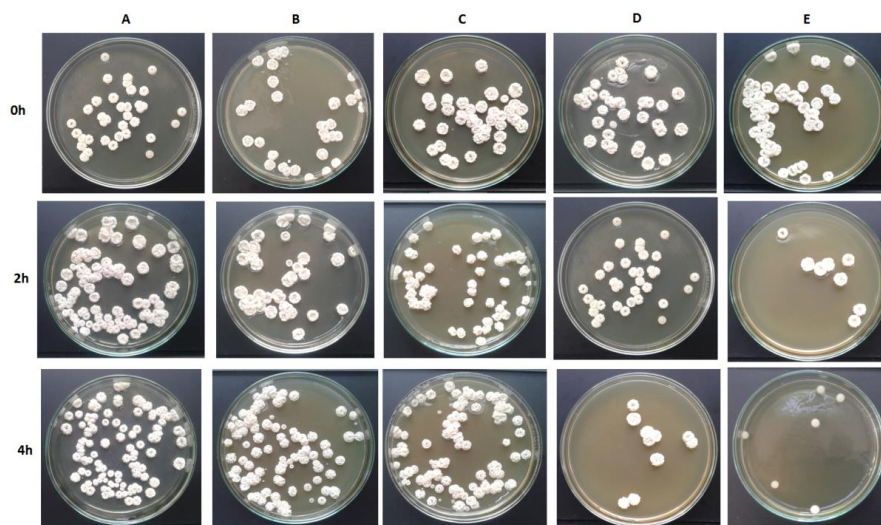


Фигура 1. Оптическа плътност на *Tr. cutaneum* R57 в присъствие на Cr^{6+}

Добавянето на 0.6 mM разтвор на $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ води до намален растеж на *Tr. cutaneum* R57 в сравнение с предходната концентрация и може да се разглежда като умерена инхибиторна концентрация. Изследван е и ефектът върху растежа на изследвания щам и на по-високи концентрации на $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (1 и 1.5 mM). При третирането с 1 mM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ разтвор, резултатите за оптичестката плътност следваха сходен ход на тези с добавена концентрация от 0.6 mM. Най-високата изследвана концентрация от 1.5 mM води до порязко изменение в развитието на щама в сравнение с предходните проби, в това число и контролната. Не се наблюдава рязко намаление в оптичестката плътност, а по-скоро едно силно изразено статично действие. По време на третирането клетките се характеризираха със забавен растеж и бързо навлизане в стадии на отмиране.

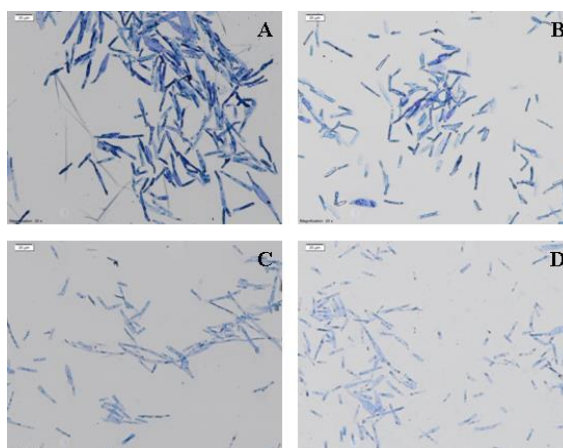
Концентрацията на жизнените клетки в различните варианти е проследена в течение на времето посредством CFU метода и е представена на Фиг. 2. Пробите са взети в първите 4 часа след добавяне на хроматни йони. В случая на контролната проба (Фиг. 2A) се наблюдава постепенно завишаване в клетъчната концентрация за изследвания период от $3.08\text{E} + 06$ CFU/mL до $8.10\text{E} + 06$ CFU/mL, което потвърждава и резултата от изследването на оптичестката плътност. При добавяне на разтвор на хроматни йони в концентрация от 0.2 mM (Фиг. 2B) и 0.6 mM (Фиг. 2C) се наблюдава сходна концентрация, с тази на контролната проба. На Фиг. 2D и 2E са представени резултатите за другите две концентрации на хромния разтвор – 1.0 и 1.5 mM. Забелязва се рязко намалени в клетъчната концентрация на втори час и за двете проби. На 4^{-я} час

концентрацията за пробата с 1.5 mM хромен разтвор е най-ниска, като това намаление достига до 86% (от 3.30E+06 до 5.00E+05 CFU/mL).



Фигура 2. *Tr. cutaneum* R57 култивиран в присъствието на Cr^{6+} йони (A) – контрола; (B) – с 0.2 mM; (C) – с 0.6 mM; (D) – с 1.0 mM; (E) – с 1.5 mM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Микроскопската картина показва филаментозна и витална структура на клетките за контролната проба (Фиг. 3A). При добавяне на $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ разтвор с концентрация от 0.2 и 1.0 mM, микроскопските наблюдения показаха клетки с относително по-малки размери и разрушаване на клетъчната стена (Фиг. 3B и 3C).



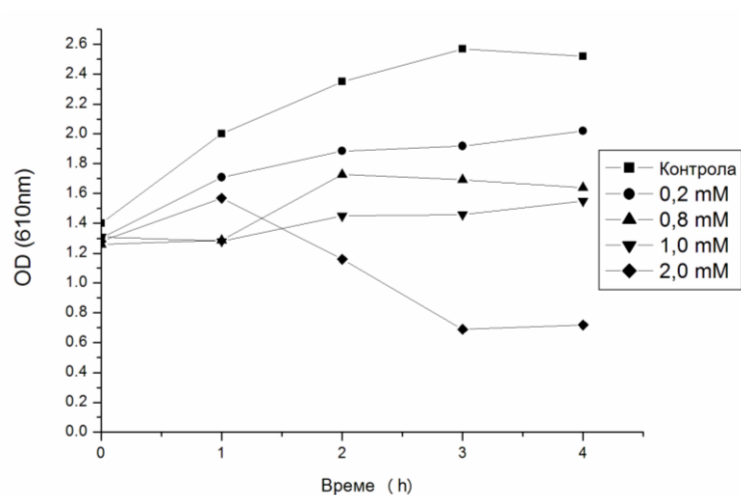
Фигура 3. *Tr. cutaneum* R57 култивиран в присъствие на Cr^{6+} йони (A) – контрола; (B) – с 0.2 mM; (C) – с 1 mM; (D) – с 1.5 mM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (оцветяване метиленово синьо, увеличение 400x)

В допълнение, при по-високата концентрация от 1.0 mM се наблюдава необичайна морфология на дрождите с наличието на къси и гъсти хифи. При анализ на пробата с добавена концентрация от 1.5 mM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ броят на клетки с разрушена клетъчна стена в изследваните зрителни полета е завишен, потвърждавайки резултатите за оптичната

плътност и CFU, което може да разглежда тази концентрация като летална за клетките. Подобни изменения в клетъчната морфология на *Candida intermedia* и *Enterobacter sp.* J1 преди и след добавянето на йони на тежки метали са наблюдавани с помощта на СЕМ [Paš et al., 2004; Lu et al., 2006]. Ефектът на Cr^{6+} йони върху развитието на *Pichia guilliermondii* изследват и Ksheminska et al. (2005) също с помощта на електронен микроскоп [Ksheminska et al., 2005]. Добавянето на хроматни йони в концентрация 1 mM води до значителни промени в клетката, като се наблюдава натрупване на йоните на метала предимно в областта на вакуолите. Екипът отчита и промяна в цялостната морфология на клетките, което се изразява в неправилна и различна структура на клетките.

Периодично култивиране на щама в присъствие на нарастващи концентрации на кадмиеви йони

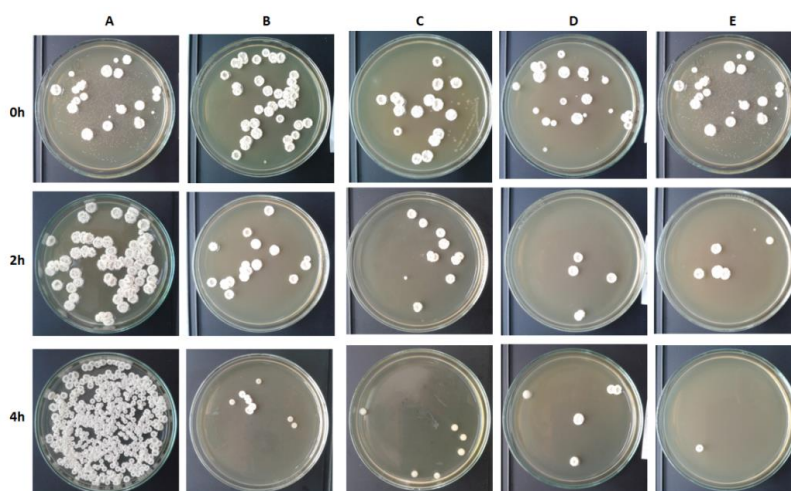
В следващата серия от експерименти е изследвано инхибиращото действие на кадмиевите йони спрямо изследвания щам *Tr.cutaneum* R57. На Фиг. 4 е представена оптичната плътност на пробите след добавяне на разтвор на кадмиеви йони с различна концентрация – от 0 до 2 mM $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$. Контролата показва нормално развитие на щама с ясно изразени растежни фази. Концентрацията от 0.2 mM CdSO_4 може да се приеме за праг на инхибиране, поради отчетено намаление в стойностите на оптичната плътност в сравнение с контролната проба. Подобно намаление в стойностите на оптичната плътност спрямо контролния вариант отчитат и Rehman и Anjum (2011) при култивиране на *Candida tropicalis* в присъствие на 100 mg/L Cd^{2+} . Следващата концентрация от 0.8 mM CdSO_4 може да се разглежда като умерено инхибираща, защото се наблюдава забавяне в скоростта на растеж както в сравнение с контролата, така и в сравнение с по-ниската концентрация на кадмиеви йони.



Фигура 4. Оптическа плътност на *Tr. cutaneum* R57 в присъствие на Cd^{2+}

Изследвано е влиянието и на по-високи концентрации на CdSO_4 (1.0 и 2.0 mM) спрямо растежа на изследвания шам. Въпреки повишените концентрации на кадмиеви йони при пробите с 1.0 mM, не се наблюдава намаление на оптическата плътност, а по-скоро едно статично действие вследствие на добавените йони. При изследване концентрацията на кадмий от 2 mM се наблюдава непостоянна тенденция при оптическа плътност, след леко повишение пробата показва тенденция на рязко намаление в оптическата плътност (Фиг. 4), което води до предложението, че тази концентрация е летална за изследвания шам. De Freitas Lima et al. (2011) изследват влиянието на кадмиеви йони с концентрации от 1 до 3 mM върху растежа на гъбите *Trichoderma harzianum*. Те наблюдават сходна тенденция, а именно – намаляване растежа на културата, пропорционално с увеличаване концентрацията на разтвора на кадмиеви йони.

На следващата Фиг. 5 са представени резултати от проведения CFU метод в условия на нарастващи концентрации на кадмиеви йони. В колона (A) на Фиг. 5 са резултатите за контролната проба, развита без добавяне на кадмиевите йони, както и на 2^{-я} и 4^{-я} час съответно. Наблюдава се ясно изразена тенденция за увеличение на клетъчната концентрация, което съответства на данните за оптическата плътност, както и на контролната от предходните изследвания с хроматни йони.

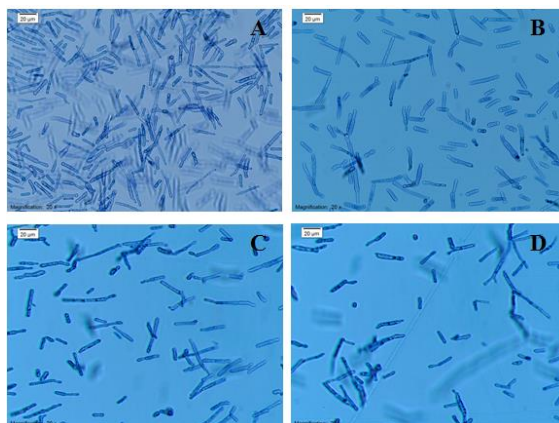


Фигура 5. *Tr. cutaneum* R57 култивиран в присъствието на Cd^{2+} йони (A) – контрола; (B) – с 0.2 mM; (C) – с 0.8 mM; (D) – с 1.0 mM ; (E) – с 2.0 mM $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$

При най-ниската концентрация от 0.2 mM CdSO_4 (Фиг. 5B) не се наблюдава значителна промяна в първите два часа от добавяне на кадмиевия разтвор, но на 4^{-ти} час има отчетено значително намаление в клетъчния растеж, достигащо до 80% в сравнение с отчетените резултати на нулев час (от $3.90\text{E}+06$ до $8.00\text{E}+05$ CFU/mL). При следващата концентрация от 0.8 mM тенденцията е сравнително непроменена с предходната проба (Фиг. 5C). При следващите две проби (1.0 и 2.0 mM) намалението в концентрацията на

клетките на 2^{-я} час е значително, а при най-високата концентрация, редукцията значително се увеличава, като в края на 4^{-я} час достига 95%, съответстващо на 1.00E+05 CFU/mL (Фиг. 5D и E).

Проведено е и микроскопско наблюдение по описания в методичната част начин на работа. Микроскопската картина показва отново филаментозна и витална структура на клетките в контролната проба (Фиг. 6A).



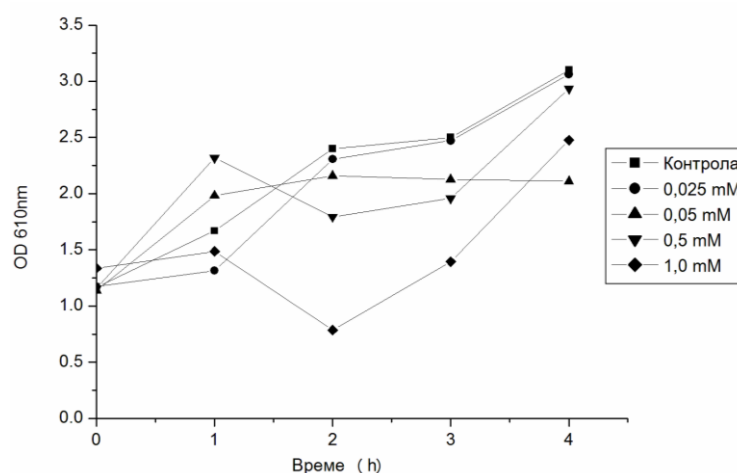
Фигура 6. *Tr. cutaneum* R57 култивиран в присъствие на Cd²⁺ йони (A) – контрола; (B) – с 0.8 mM; (C) – с 1.0 mM; (D) – с 2.0 mM 3CdSO₄·8H₂O (оцветяване метиленово синьо, увеличение 400x)

След добавяне на CdSO₄ разтвор в концентрация 0.8 и 1.0 mM се забелязва значителна редукция в броя и размера на клетките в сравнение с контролните, както и лизирани клетки (Фиг. 6B и C). Получените данни за културата с добавена концентрация от 2.0 mM CdSO₄ потвърждават наблюдаваното инхибиране на растежа от CFU метода, а така също и намалението в оптичестката плътност. Клетките са малки и се наблюдават морфологични промени, както и нарушения в клетъчните им стени, което е прична тази концентрация да бъде отчетена като летална за изследвания щам (Фиг. 6D). De Freitas Lima et al. (2011) в изследванията си върху растежа на *T. harzianum* в присъствие на кадмиеви йони, също установяват с помощта на светлинен микроскоп, че с увеличение на концентрацията на кадмиеви йони се увеличават и морфологичните изменения в хифите на изследваните гъби.

Периодично култивиране на щам в присъствие на нарастващи концентрации на медни йони

При следващата серия от експерименти е изследвано влиянието на различни концентрации медни йони – от 0 до 1.0 mM – CuSO₄·5H₂O спрямо растежа на изследвания щам *Tr.cutaneum* R57 (Фиг. 7). Както и в предходните изследвания, контролната проба показва увеличение на оптичестката плътност във времето. При добавяне на най-ниската

концентрация на медни йони от 0.025 mM не се наблюдава съществена разлика в сравнение с контролата. Леко занижена е единствено оптическата плътност на култивираните клетки в първия час от добавяне на йоните в сравнение с контролната проба, след което културата продължава и следва тенденцията на растеж на контролната проба. В трети и четвърти час от добавянето на медните йони, двете проби имат почти идентична оптическа плътност. Клетките, култивирани в присъствие на 0.05 mM CuSO₄ показват известно задържане в развитието си още след първия час от добавянето на йоните. Прави впечатление рязкото увеличение на оптическата плътност в първия час, което не се забелязва в контролната проба и в тази с концентрация от 0.025 mM CuSO₄, което вероятно е реакция на клетките, подложени на въздействието на тези йони. При следващата концентрация от 0.5 mM отново се наблюдава значително увеличение на оптическата плътност в първия час, след което се наблюдава изключително нестабилна оптическа плътност във времето на изследването. Ефектът на увеличение на растежа на дрожева култура в присъствие на медни йони е отчетен и от други автори. Наличието на йони на метали като Mn, Cu и Zn стимулират скоростта на растежа на клетките *S.cerevisiae*, като тя е по-висока в сравнение с контролния вариант [Stehlik-Tomas et al., 2004]. Gadd (1990) дефинира влиянието на медните йони върху микроорганизмите на няколко нива на ефект – неутрално, оптимално, ниво на дефицит, излишък и токсичност. Според авторите при хроматни и кадмиеви йони има само ефект на токсичност, защото те не изпълняват биологични функции, каквито са присъщи на медните йони [Gadd, 1990].



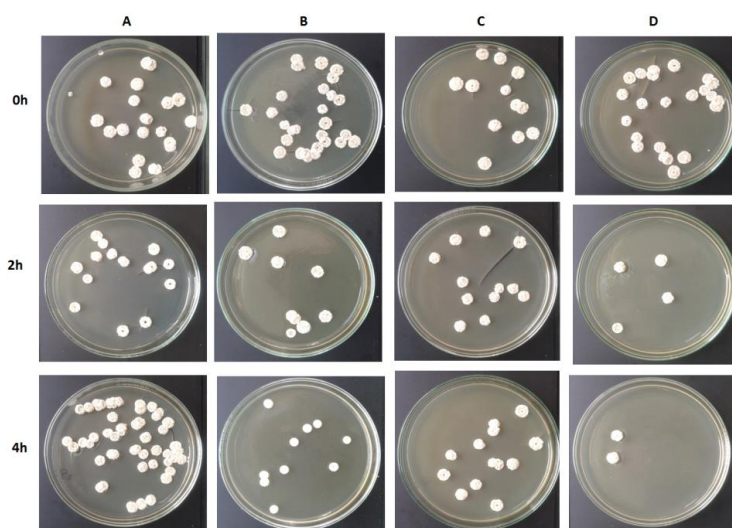
Фигура 7. Оптическа плътност на *Tr. cutaneum* R57 в присъствие на Cu²⁺

Подобна липса на ясна, отчетлива тенденция в оптическата плътност се наблюдава и при добавяне на по-високата концентрация от 1.0 mM CuSO₄.5H₂O. При добавяне на двойно по-високата концентрация на медните йони се наблюдава и най-ниската стойност

на оптичестката плътност на 2^{-я} час след добавянето. След това започва рязко покачване на оптичестката плътност.

На Фиг. 21 са представени резултати от CFU метода за съответните проби. Както и в предходните експерименти, контролната проба показва нарастване на клетъчната концентрация във времето (Фиг. 8A). За проби с концентрации 0.025 и 0.5 mM CuSO₄ няма ясно изразено намаляване, а по-скоро задържане в развитието на културата (Фиг. 8B и C). Това подкрепя и получените високи стойности при изследване на оптичестката плътност. При добавяне на концентрация от 1.0 mM (Фиг. 8D) има ясно изразено намаление на растежа, като то достига до 91% в края на 4^{-я} час от медната експозиция (от 2.50E+06 до 2.00E+05 CFU/ml).

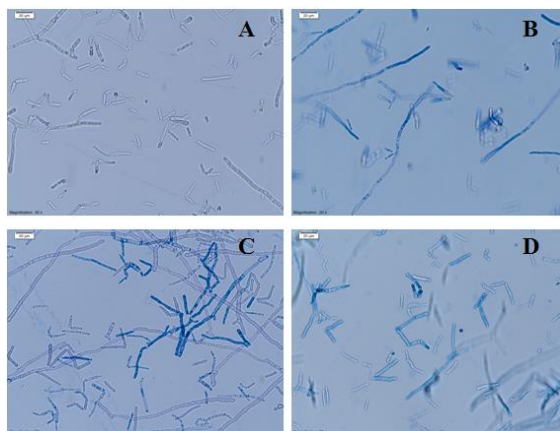
Проведено е микроскопско наблюдение на пробите, паралелно със CFU метода. Резултатите са илюстрирани на Фиг. 9, като подобно да предходните анализи със светлинния микроскоп, контролната проба (Фиг. 9A) се характеризира с витални клетки с филаментозна структура. При добавяне на най-ниската концентрация на мед от 0.025 mM не се наблюдава особена разлика в 4^{-ия} час след добавяне на металните йони (Фиг. 9B). С увеличение на концентрацията на медните йони – 0.5 mM и 1.0 mM CuSO₄ (Фиг. 9C и 22D) се наблюдава лизис на клетките и нарастване на броя мъртви клетки.



Фигура 8. *Tr. cutaneum* R57 култивиран в присъствието на Cu²⁺ йони. (A) – контрола; (B) – с 0.025 mM; (C) – с 0.5 mM ; (D) – с 1.0 mM CuSO₄·5H₂O

Прави впечатление и по-високият брой на удължени клетки, които вследствие на високите концентрации имат по-ниска способност за делене. От данните за оптичестката плътност, CFU метода, както и микроскопските наблюдения на изследвания щам, култивиран в присъствие на медни йони, може да се приеме, че концентрация от 0.025 mM CuSO₄ е прагова за щама, тъй като се наблюдава статичност и лека промяна в броя

жизнени клетки. Концентрациите 0.5 mM и 1.0 mM CuSO₄ могат да се разглеждат като съответно умерена и летална, тъй като броя на лизиралите клетки силно нараства, което съответно води до силно изразена редукция на жизнените клетки.



Фигура 9. *Tr. cutaneum* R57 култивиран в присъствие на Cu²⁺ йони (A) – контрола; (B) – с 0.025 mM; (C) – с 0.5mM; (D) – с 1.0 mM CuSO₄·5H₂O (оцветяване метиленово синьо, увеличение 400x)

3. Ефект на метал-индуцирания оксидативен стрес върху изследвания щам

Изследваните до момента концентрации на йоните на трите метала спрямо изследвания щам *Tr.cutaneum* R57 са съобразени както с виталността на клетките, така и със способността на щама да биосорбира йоните на изследваните метали.

В следващите експерименти концентрациите на металните йони са увеличени многократно с цел проследяване способността на трите вида йони за индуциране на оксидативен стрес в изследвания щам за кратък период от време. Проследена е реакцията на щама спрямо токсичните нива на металните йони и механизмът за отговор на тези дрожди. Интерес представлява и по-конкретно отговора на клетките на *Tr. cutaneum* R57 спрямо йоните на хром и мед, които са известни представители на редокс активното семейство, сравнени с отговора спрямо редокс неактивния кадмий. Групата на редокс неактивните метали е по-малко изучена и начинът по който отговаря дрождевата система не е напълно изяснен.

При повишение концентрацията на хроматните йони са използвани резултатите за максималната концентрация, анализирана до момента от 1 mM K₂Cr₂O₇ като следващите концентрации бяха пет и десет пъти по-високи. Контролната проба, както вече бе дискутирано, има нормален ход на развитие с времето, а именно увеличение на клетъчната концентрация. Добавянето на 5 и 10 mM K₂Cr₂O₇ води до рязко намаление в

клетъчната концентрация, като редукцията на жизнените клетки достигна 100% след 2^{-я} час от добавянето на хроматните йони в сравнение с пробата взета в нулевия час. На 6^{-ия} час не се наблюдава растеж на културата. Именно тогава, пробите бяха анализирани и за основните биомаркери на оксидативния стрес.

Клетките са наблюдавани с помощта на светлинен микроскоп като снимките са направени на 6^{-ия} час от добавянето на хроматните йони. При добавяне на концентрациите от 5 и 10 mM K₂Cr₂O₇ се наблюдава увеличение в броя на мъртвите клетки, цялостна редукция в броя клетки на наблюдаваните зрителни полета и резки морфологични промени, които не са наблюдавани при по-ниските концентрации. Ясно се забелязват нарушения в цялостта на клетъчната стена, изтичане на вътреклетъчен материал и крайно деформирани и нетипични клетки, както и спирализирани клетки. Аналогични резултати наблюдават и Cárdenas-González и Acosta-Rodríguez (2011) в свои изследвания при гъби *Paecilomyces sp.*, култивирани в присъствие на 500 mg/L Cr⁶⁺ йони. Авторите отчитат морфологичните промени при наблюдение със светлинен микроскоп. [Cárdenas-González & Acosta-Rodríguez, 2011].

По същия начин са проведени експерименти за култивиране на изследвания щам в присъствие на завишени концентрации на кадмиеви йони. Контролата следва нормален ход на развитие, а именно увеличение в клетъчната концентрация с времето. При пробите с добавени концентрации от 5 и 10 mM CdSO₄ се наблюдава силно изразен статичен ефект (при сравнение с контролната проба). На 6^{-я} час от култиването в присъствие на кадмиевите йони се наблюдава рязко намаление в клетъчната концентрация. При проба с добавяне на 5 mM CdSO₄ то е от 2.10E+06 до 2.00E+05 CFU/mL. При пробата с 10 mM CdSO₄ се наблюдава 100% намаление на жизнените клетки в сравнение с нулевия час.

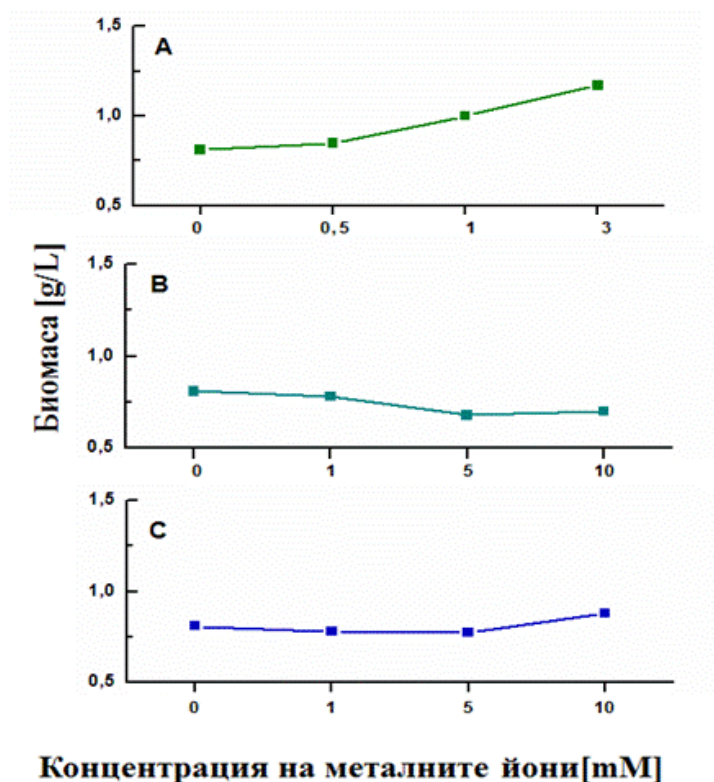
Клетките на съответните проби се наблюдават и под микроскоп. Контролната проба се характеризира с обичайните за щамата клетки. При добавяне на значително по-високите концентрации от 5 и 10 mM разтвор на CdSO₄ микроскопската картина има значително различен профил. Забелязват се висок брой на мъртви и морфологично изменени клетки – раздуване и спирализиране, както и лизис на клетките.

Изследвано е и действието на относително високата концентрация на мед от 3 mM CuSO₄.5H₂O върху развитието на изследвания щам. Контролата както във всички предходни изследвания има стандартен растеж във времето, който се свързва с увеличение на броя жизнени клетки, формиращи колонии. Забелязва се, че увеличението на концентрацията на медни йони до 3 mM CuSO₄.5H₂O води до драстично намаление на клетъчния растеж. Наблюдава се силно намаление на клетъчната концентрация до 100 % както на 2^{-ия} час от култивирането с медните йоните, така и на 6^{-ия}, съответно при

сравнение с контролата. Предвид резултатите тази концентрация е използвана като крайна за последващите експерименти.

Резултатите от микроскопското наблюдение показват, че клетките при контролната проба имат нормална морфология за изследвания щам. Срещат се както малки, новообразувани клетки, така и по-големи по дължина клетки. При добавяне на относително високата концентрация на мед от 3 mM CuSO₄ както и при останалите метални йони, тук също се наблюдава нарушение на клетъчната цялост и множество морфологични изменения, издължени и непъпкуващи клетки, както и издувания в клетките. Прави впечатление, че тук клетъчната плътност на наблюдаваните зрителни полета не е така понижена както при крайните концентрации на хроматни и медни йони, дължащо се вероятно на развитие на популацията и бързи морфологични промени с наличие на абнормални, отмиращи клетки.

Ефектът на металните йони спрямо растежа на дрождевите клетки зависи най-вече от механизма на проникване на йоните в клетката – метаболитен или пасивен. Най-високата концентрация, която е използвана за всеки метален йон, респективно е избрана в предходните изследвания.



Фигура 10. Концентрация на биомасата на щам R57 в присъствие на нарастващи концентрации на (A) Cu²⁺, (B) Cr⁶⁺ и (C) Cd²⁺ йони

Проследено е нарастването на клетъчната биомаса при дълбочинно култивиране на изследвания щам в присъствие на металните йони. Растежът на *Tr. cutaneum* R57 е изследван при добавяне в средата на медни йони в концентрации от 0 до 3 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Фиг. 10A). Наличието на медни йони в средата води до индуциране на клетъчния растеж. Растежът на клетъчната биомаса нараства с увеличаване на медната концентрация. Най-високо е количеството на биомасата при концентрация на медните йони 3 mM (167% в сравнение с контролната проба). Както се вижда от Фиг. 10B, хроматни концентрации от 5 и 10 mM водят до намаляване на клетъчната биомаса с 16% в сравнение с контролната. Незначителна редукция на клетъчната биомаса се наблюдава при третиране на щама с 1 и 5 mM разтвор на кадмиеви йони. При по-високата концентрация от 10 mM CdSO_4 се наблюдава леко увеличение (с 8%) на получената биомаса в сравнение с контролната проба (Фиг. 10C).

Ефект от металния стрес върху генерирането на COP

В проведените експерименти всички концентрации на металните йони водят до оксидативен стрес за изследвания дрождев щам. Трябва да се спомене, че наличието на медни, хроматни и кадмиеви йони драстично променя нивото на COP в клетките на *Tr. cutaneum* R57. На Табл. 1 е отразен ефектът на медни, хроматни и кадмиеви йони върху образуването на $\bullet\text{O}_2^-$ и H_2O_2 в клетките на *Tr. cutaneum* R57 след култивиране в присъствието на металните йони за период от 6 часа. Увеличение в нивото на $\bullet\text{O}_2^-$ е отчетено за всички изследвани концентрации. Както може да се забележи от Табл. 9, третирането с концентрации на медни йони от 0.5 до 3 mM води до постепенно нарастване в нивата на $\bullet\text{O}_2^-$. Най-висок отговор е отчетен при концентрация на медните йони от 3 mM (182% в сравнение с контролната проба).

Кратката експозиция на щама спрямо концентрации на хроматни йони от 1 до 5 mM води до увеличение нивото на $\bullet\text{O}_2^-$ с приблизително 1.5 и 2.7 пъти съответно, в сравнение с данните получени за контролата. Клетките третирани с 10 mM показват изключително високи нива на $\bullet\text{O}_2^-$ (3-пъти по-високи от тези на контролната проба).

Ефектът от кадмиевите йони има сходен ефект върху нивото на образуване на $\bullet\text{O}_2^-$. Нивото на $\bullet\text{O}_2^-$ се увеличава в зависимост от металната концентрация. Най-високо ниво на образуване на супероксид се наблюдава при третиране с 10 mM разтвор на кадмий (349% в сравнение с контролата).

Третирането с йоните на трите метала води и до увеличение нивото на H_2O_2 в зависимост от концентрацията. След 6-часово инкубиране с медни йони се наблюдава

значително увеличение в образуването на H_2O_2 (1.6- и 1.7-пъти по-високо в сравнение с контролата при концентрации на металния разтвор съответно 1 и 3 mM). Добавянето на 1.5 и 10 mM хромен разтвор води до значително увеличение нивата на H_2O_2 в пробите в сравнение с контролата (2.2-, 2.5- и 1.9-пъти, съответно). Същата зависимост се наблюдава при проби с добавени кадмиеви йони – 1.4-, 1.6- и 1.8-пъти увеличение след добавяне в средата на 1, 5 и 10 mM, съответно.

Направените експерименти показват, че третирането с йоните на съответните метали значително увеличават продукцията на $\bullet O_2^-$ и H_2O_2 . Това увеличение не зависи от вида на метала (редокс-активен или редокс-неактивен), а в зависимост от тяхната концентрация. Дори малко увеличение на металната концентрация води до повишение в образуването на COP. Редокс-активните метали, мед и хром образуват COP по добре изяснен път – Fenton-подобна реакция [Jomova & Valko, 2011]. Подобни директни анализи на съдържанието на COP в микробни клетки не се среща често в литературата. Преходният метал – мед е един от най-реактивните елементи, катализиращи реакцията на Fenton.

Таблица 1. Нарастване продукцията на COP в цели клетки на щам R57 в присъствие на нарастващи концентрации на Cu^{2+} , Cr^{6+} и Cd^{2+} йони

Варианти	Cu		Cr		Cd	
	nmol $\bullet O_2^-$	$\mu M H_2O_2$	nmol $\bullet O_2^-$	$\mu M H_2O_2$	nmol $\bullet O_2^-$	$\mu M H_2O_2$
Контрола	0.63	13.1	0.60	15.20	0.69	14.00
0.5 mM	0.65	13.1	не са определяни			
1 mM	0.89	22.4	0.90	33.9	0.86	20.80
3 mM	1.15	21.6	не са определяни			
5 mM	не са определяни		1.58	37.5	1.20	22.00
10 mM			1.80	28.6	2.41	25.6

Третирането с медни йони индуцира образуването на COP в дрожди *S.cerevisiae* [Kumar et al., 2011], гъби *Podospora anserine*, [Osiewacz & Stumpferl, 2001] и *Humicola*

lutea [Krumova et al., 2009], водни хифомицети *Varicosporium elodeae* и *Heliscus submersus* [Azevedo, M. M. et al., 2007]. Подобни резултати са докладвани и за някои растения [Lubaina et al., 20013] и човешки клетки [Liu, P. et al., 2012; Pogue et al., 2012]. Третирането с хроматни йони също индуцира образуването на COP в дрожди, гъби [Poljsak et al., 2011] и растения [Wang et al., 2013]. Редокс-неактивният метал кадмий води до образуването на COP в изследвания щам *Tr. cutaneum* R57. Кадмий не образува COP чрез Fenton-реакция както е в случая на мед и хром [Stohs & Bagchi, 1995]. Въпреки това, този метал инхибира предимно комплекси II и III от електронно-транспортната верига и това инхибиране води до индуцирането на COP в митохондриите. Според получените от нас резултати, кадмий води до увеличение на $\cdot\text{O}_2^-$ и H_2O_2 с 3.5- и 1.9-пъти съответно, в сравнение с контролната проба. Това потвърждава публикувани предишни изследвания, които предполагат възможната роля на завишената продукция на COP в индуцирането на Cd-зависима токсичност при бактерии [Wang et al., 2009], дрожди [Nargund et al., 2008] и растения [Lin et al., 2013].

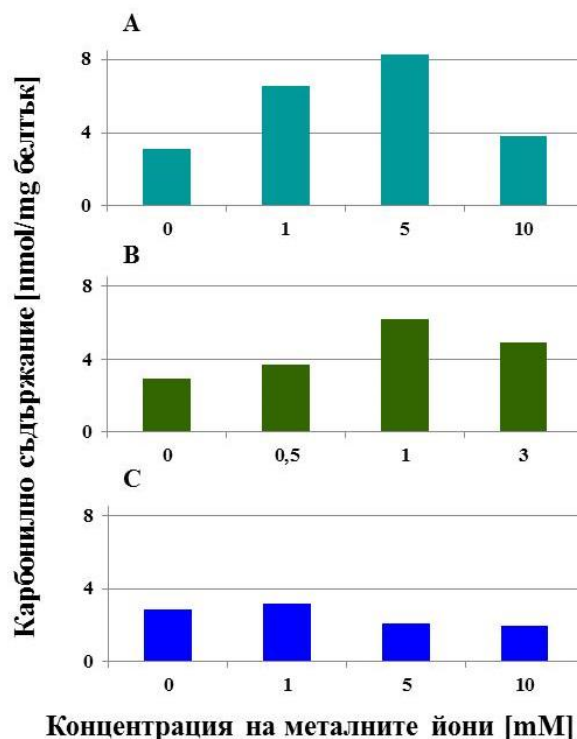
Окисление на белтъците вследствие експозиция с йони на тежки метали

Вследствие на високите нива на образуване на COP, в клетките настъпват окислителни увреждания на белтъците [Cabisco et al., 2000]. Белтъчното карбонилиране, една от най-опасните, необратими окислителни модификации на белтъците се използва като биомаркер за наличие на метало-индуциран оксидативен стрес. При култивиране в присъствието на повишени нива на медни йони не се забелязват значителни промени в карбонилното съдържание с изключение на 1 mM CuSO_4 , където карбонилирания белтък показва 42% по-високо ниво в сравнение с контролната проба (Фиг. 11B).

За разлика от пробите с медни йони, третирането с увеличаващи концентрации на хроматни йони до 5 mM води до значително увеличение на съдържанието на карбонилни групи (около 2.3-пъти в сравнение с контролата). Трябва да се спомене, че следващата концентрация (10 mM) води до рязко намаляване на количеството на окислено увредения белтък (Фиг. 11A). При третиране на клетките на *Tr. cutaneum* R57 с кадмиеви йони, тенденцията в концентрацията на карбонилирания белтък показва сходен профил като този вследствие третирането с медни йони. Най-високо ниво на увреден белтък се открива при проба с концентрация на кадмиев разтвор от 1 mM (Фиг. 11C).

Резултатите показват, че третирането на изследвания щам *Tr. cutaneum* R57 със завишени нива на медни, хроматни и кадмиеви йони води до увеличаване количеството на окислително увредените вътреклетъчни белтъци. Трябва да се отбележи, че йоните на

редокс-активните метали (мед и хром) водят до по-драстични промени в съдържанието на окислени белтъци. Повечето белтъци, които са окислени в процеса на експеримента показват увеличение в нивата си при третиране с 1 mM CuSO₄·5H₂O, 5 mM K₂Cr₂O₇ и 1 mM CdSO₄.



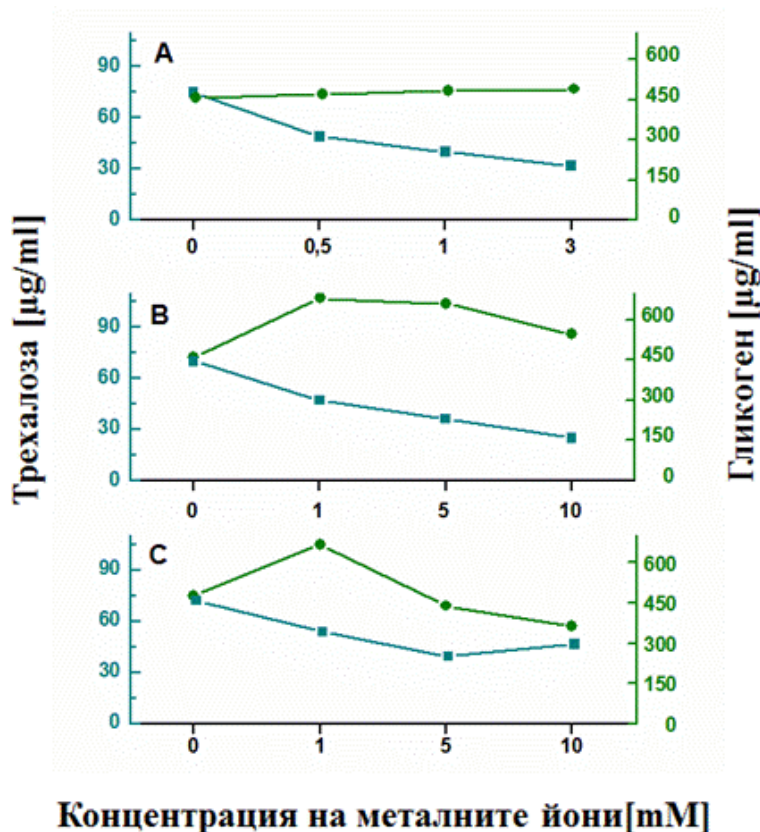
Фигура 11. Карбонилно съдържание в щам R57 в присъствие на нарастващи концентрации на (A) Cr⁶⁺, (B) Cu²⁺ и (C) Cd²⁺ йони

Последващото намаление в нивата на този биомаркер при по-високи концентрации на металните йони може да се обясни с едновременното разграждане на белтъците от протеази или образуването на агрегати от увредени белтъци [Krumova et al., 2009]. Съотношението между нарастващи нива на СОР и количеството на увредените белтъци е публикувано за различни микробни клетки [Krumova et al., 2009].

Ефект от стреса върху съдържанието на гликоген и трехалоза

Култивирането на клетките на *Tr. cutaneum* R57 в присъствие на трите изследвани метални йони е съпроводено и с количествени промени в резервните въглехидрати като трехалоза и гликоген. Нивото на резервните въглехидрати се повлиява и от трите метала. Както се вижда от Фиг. 12, след 6 часа инкубиране с металите се наблюдава редукция в концентрацията на трехалоза. Тя е най-значима при добавяне на 10 mM K₂Cr₂O₇ – 65 % по-ниско количество от измереното за контролната проба (Фиг. 12B).

Вторият въглехидрат – гликогенът показва друга тенденция. Количеството на гликоген в *Tr. cutaneum* R57 не се повлиява след 6 часов престой с медни йони (Фиг. 12A). При пробите с добавени хроматни и кадмиеви йони се установява увеличение в нивото на гликогена. В присъствието на хроматни йони се очертава тенденция на увеличение в съдържанието на този въглехидрат (над 45%) за варианти с 1 и 5 mM и последващо леко понижаване близо до нивото на контролната проба (Фиг. 12B). Подобна е тенденцията и при вариантите с добавени кадмиеви йони. След увеличение с 40% в нивото на гликогена следва рязък спад при проба с добавен 10 mM CdSO₄ (Фиг. 12C).



Фигура 12. Нива на гликоген (●) и трехалоза (■) в щам R57 в присъствие на нарастващи концентрации на (A) Cu²⁺, (B) Cr²⁺ и (C) Cd²⁺ йони

Както се вижда от получените резултати, двата въглехидрата имат различен физиологичен ефект и начин на действие: трехалозата е по-основен стрес протектор и подпомага шапероните в контрола на белтъчната денатурация и ренатурация, а гликогенът е резервен въглехидрат [François & Parrou, 2001; Westwater et al., 2005]. Третирането с хроматни и кадмиеви йони води до значително повишение в съдържанието на гликоген, което е в подкрепа на предишни изследвания върху микробния отговор към стреса индуциран от йоните на хром и кадмий [Sharma & Dietz, 2009]. За разлика от тази ситуация, не се отчита промяна в количеството гликоген в клетки, третирани с медни йони. Gasch (2003) съобщава подобни резултати за дрожди. В състояние на стрес,

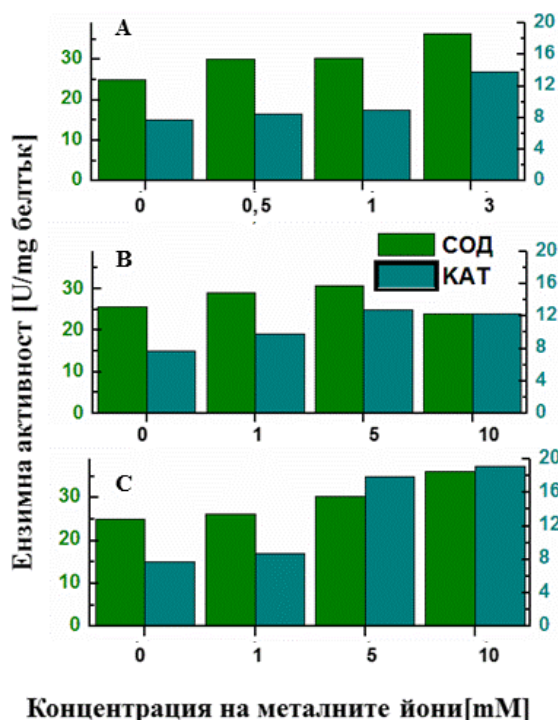
индуциран от йоните на тежки метали, хищни риби *Arapaima gigas* и шаран показват пониски нива на гликоген [Gomes, 2007; Reddy et al., 2008]. Вероятно обяснение е ускорената гликогенолиза (разпадане на гликоген(n) до глюкозо-1-фосфат и гликоген(n-1) в клетките) [Abou El-Naga et al., 2005]. Освен това, количеството на трехалозата постепенно намалява с нарастване концентрацията на металните йони. Тези резултати може да се дължат на активния метаболизъм на трехалозата, нейното едновременно синтезиране и разграждане по време на стреса [Oсón et al., 2007]. Вероятно след 6 часова третиране с металните йони, неутралната трехалаза (ензим отговорен за разграждането на трехалоза) проявява по-висока активност в сравнение с трехалозо 6-фосфат фосфатаза (ензим отговорен за нейното синтезиране).

Ефект на металните йони върху активността на СОД и КАТ

Гъбите, както всички други аеробни организми имат набор от защитни механизми за справяне с оксидативния стрес [Bai et al., 2003]. Механизмът на индуцирано генериране на СОР е силно зависим от действието на клетъчните антиоксиданти. Наличието на метални йони стимулира ензимната антиоксидантна защита в клетките на *Tr. cutaneum* R57. От резултатите показани на Фиг. 13 може да се забележи постепенно увеличение в активността на СОД след добавяне на нарастващи концентрации на медни йони. Максимална активност се наблюдава при третирането с концентрация от 3 mM CuSO₄ (Фиг. 13А). В този случай се достига до 1.5-пъти по-висока ензимна активност. Докато третирането на дрождевите клетки с 1 mM и 5 mM хромен разтвор води до незначително увеличени в нивото на СОД (19% в сравнение с контролата), следващата концентрация (10 mM) предизвиква намаляване с 22% в сравнение с изследваната най-висока ензимна активност (Фиг. 13В). В случая на проби с добавени кадмиеви йони се отчита повишено ниво на СОД в зависимост от концентрацията на добавения метал. Най-високата ензимна активност се наблюдава при концентрации от 10 mM (Фиг. 13С). Както се вижда от Фиг. 13, ефектът от третирането с металите е по-ясно изразено за ензима КАТ в сравнение със СОД. Всички изследвани метални концентрации показват увеличение в активността на КАТ в зависимост от концентрацията на добавения метал. Максималната ензимна активност е 1.8-, 2.5- и 1.6-пъти по-висока съответно за медни, кадмиеви и хроматни йони в сравнение с контролната проба.

Ензими като СОД и КАТ са открити от редица учени при изследване на завишени нива СОР в различни организми под влияние на стрес, индуциран от йоните на тежки метали [Romandini et al., 1992.; Krumova et al., 2009]. Тези ензими са изключително важни

за клетъчната детоксикация поради способността да контролират нивата на супероксидния анионен радикал и водородния пероксид [Bai et al., 2003].



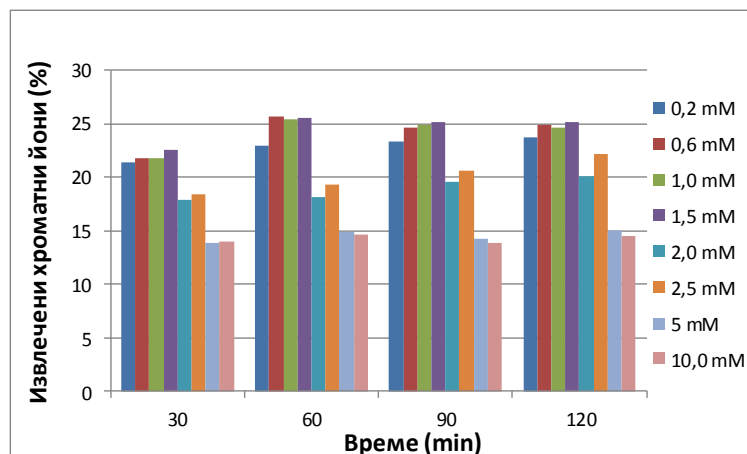
Фигура 13. Нива на ензимната активност на СОД и КАТ в щам R57 в присъствие на нарастващи концентрации на (А) Cu^{2+} , (В) Cr^{6+} и (С) Cd^{2+} йони

По-високите активности на СОД и КАТ се асоциират с индуцираната резистентност на мицети спрямо различни стрес фактори [Belozerskaya et al., 2010; Chattopadhyay et al., 2011]. Нашите резултати показват, че всички изследвани йони на тежки метали индуцират синтезата на двата ензима, включени в антиоксидантната защита. Третирането на дрождеви клетки с медни, хроматни и кадмиеви йони показват ясна тенденция на концентрационно-зависимо стимулирана активност на СОД и КАТ.

4. Изследване на сорбционната способност и равновесието при сорбция на свободни и имобилизирани клетки *Tr. cutaneum* R57

Основният въпрос при изследване на резистентността към тежките метали е дали съществува корелация между растежа на микробната култура и акумулирането на токсичните йони в клетките. Акумулирането на хроматни йони се определя след 2 часа периодично култивиране, където концентрацията на $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ е както следва: 0,2; 0,6; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 5,0 и 10,0 mM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Фиг. 14). Растежната крива на щама показва, че повечето клетки се намират в края на експоненциалната и началото на стационарната фаза. Вземайки това предвид, може да се каже, че акумулирането на хроматни йони е сума

от количеството в живите и в мъртвите клетки. Най-висока е сорбцията на първи час от добавянето на йоните в концентрации 1.5 mM – 25,57 %. Пробите с добавени 0.2; 0.6; 1.0 и 1.5 mM концентрации на хромния разтвор имат сходен процент на извличане на металните йони, което корелира с растежа на културата. При добавянето на сравнително по-високите концентрации от 5 и 10 mM Cr⁶⁺ йони може да се забележи сравнително намаляване на процента на извличане.



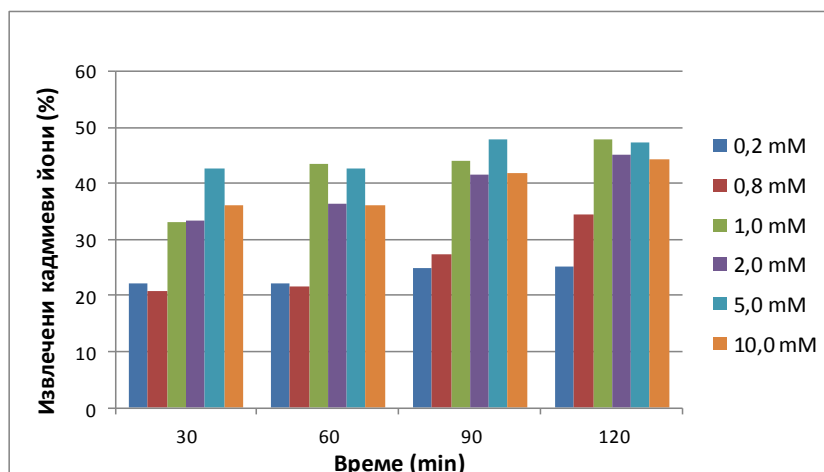
Фигура 14. Ефективност при отстраняване на хроматни йони от щам R57 в присъствие на нарастващи концентрации 0.2 – 10 mM Cr⁶⁺ йони

Това може да се дължи както на инхибирания клетъчен растеж, така и на увеличаване броя на мъртвите клетки. От всичко по-горе следва, че степента на растеж на културата може да се разглежда като основен фактор, контролиращ акумулацията на хроматни йони. Подобна тенденция изследват и при анализиране сорбцията на Грам-отрицателните бактерии *Serratia proteamaculans* където над 200 mg/L Cr⁶⁺ има понижение в способността на щама да сорбира йоните на метала [Joutey et al., 2014]. Подобни резултати получават и други изследователи при изследване на бактериални видове. Някои от тях докладват, че причината за това най-вероятно е редукция, която се осъществява чрез ензимна реакция [Thacker et al., 2006; Thacker et al., 2007; Lee et al., 2008]. Според други изследователи, които анализират сорбцията на Cr⁶⁺ с гъби *Paecilomyces sp.*, многократното увеличение на концентрацията на йоните води до по-нисък процент на извличане поради по-големият брой йони, които се конкурират за същия брой функционални групи по повърхността на биомасата [Cárdenas-González & Acosta-Rodríguez, 2011].

При същите условия е изследвано и акумулирането на кадмиеви йони от разтвор с концентрации: 0.2; 0.8; 1.0; 1.5; 2.0; 5.0 и 10.0 mM CdSO₄ (Фиг. 15). Процентът извлечени йони е най-нисък при най-ниската изследвана концентрация от 0.2 mM и най-висока на 90^{та} минута при концентрация от 5.0 mM – 47,89 %. Прави впечатление, че с изключение на

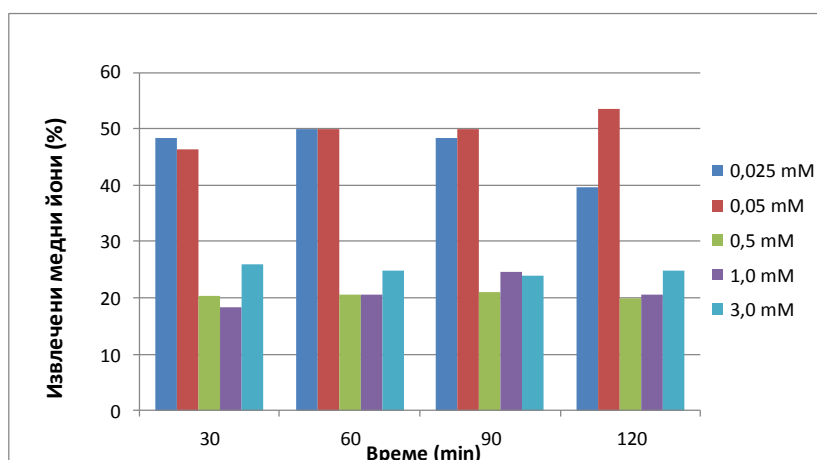
последните, крайни концентрации от 5 и 10 mM, извличането на металните йони е максимално на 120^{-та} минута след добавяне на металите, докато при хроматните йони, максимум сорбция се наблюдава около 60^{-та} минута.

Както оптическата плътност, така и клетъчната концентрация за проба с концентрация от 0.2 mM са по-високи в сравнение с тези на проба с концентрация 2.0 mM. Процентът на извличане в мъртвите клетки се основава единствено на дифузията (или пасивно извличане), докато извличането от витални клетки представлява сума от поне два механизма – активен и пасивен [Gadd & White, 1993].



Фигура 15. Ефективност при отстраняване на кадмиеви йони от щам R57 в присъствие на нарастващи концентрации 0.2 – 10 mM Cd²⁺ йони

Концентрацията на медни йони също е анализирана до 2^{-ия} час след добавянето на йоните към културалната течност (Фиг. 16). Тенденцията при процента на извлечените йони на този тежък метал следва съвсем различен ход в сравнение с предходните.



Фигура 16. Ефективност при отстраняване на медни йони от щам R57 в присъствие на нарастващи концентрации 0.025 – 3.0 mM Cu²⁺ йони

Тук се вижда рязка разлика между сорбцията при сравнително ниските концентрации от 0.025 и 0.05 mM и относително високите – 0.5; 1.0 и 3.0 mM CuSO₄. Най-висока сорбция се отчита на 120^{-та} минута при добавена концентрация от 0.05 mM – 53.57 %. При по-високите концентрации на медния разтвор, сорбцията намалява с повече от 50 % (в диапазона от 18.41 до 24.94 %) [Georgieva, 2008]. При концентрациите 0.025 и 0.05 mM жизнеността на клетките, а така също оптичестката плътност и микроскопското наблюдение показват резултати сходни на контролната, което може да е причина и за високите нива на сорбция. При концентрацията от 0.5 mM има рязко намаляване на сорбцията, което може да се дължи на съсредоточаване на енергията към клетъчен растеж като в това време механизмите на активно извличане (акумулация) са забавени/спрени. Следващите концентрации от 1.0 и 3.0 mM, освен ниска биосорбция, показват и инхибиран растеж, което е причина тези концентрации да се приемат и за летални за изследвания микроорганизъм. Рязкото понижаване в сорбцията при двете крайни концентрации предполага, че сорбцията на медни йони от изследвания щам е по-скоро проведена чрез активен, метаболитен път и в по-малка степен чрез адсорбиране върху клетъчната повърхност. Anand et al. (2006) също докладват активен (енергийно) зависим процес на сорбиране на медни йони от гъбата *Trichoderma viride*.

Причина за относително по-високите нива на извличане на медни йони може да се дължи на сравнително ниските концентрации на последните в сравнение с хроматните и кадмиевите йони, където се наблюдава по-бързо насищане на сорбционните места в клетъчната биомаса.

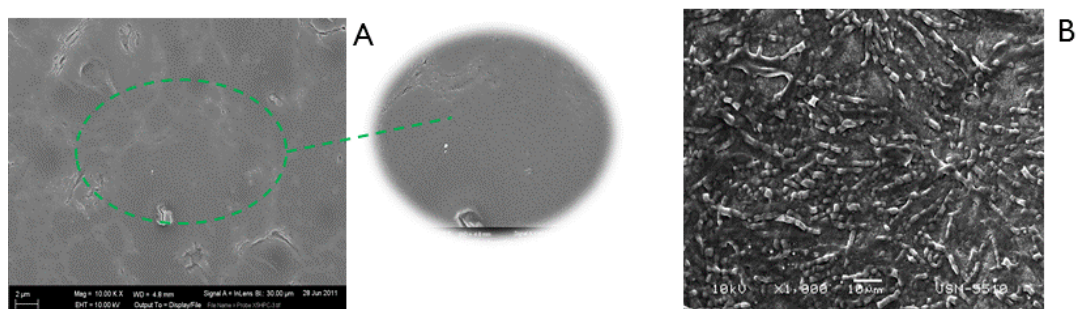
Приложение на хибридни материали на основата на хидроксипропил целулоза при формиране на биофилми от *Tr.cutaneum* R57

Синтезираните хибридни материали на основата на хидроксипропил целулоза и TEOS са използвани като матрици за имобилизиране на изследвания щам. Имобилизирването на клетки върху хибридната матрицата се дължи на тяхната адхезия към носителя в резултат на възникването на водородни връзки между хидроксилните групи (-OH) от хибридните материали и аминоксидни (-NH₂), тиолови (SH-), карбоксилни (-COOH) и хидроксилни групи (-OH) произтичащи от клетъчната стена на дрождите [Рангелова, 2011].

Морфологията на получените HPC/SiO₂ хибридни материали е изследвана с помощта на сканираща електронна микроскопия (Фиг. 17А). От СЕМ-изображението се вижда, че хибридният материал притежава гладка повърхност с вълнообразен характер и

хетерогенни включения, неравномерно разпределени в основната матрица. Образувалите се микрохетерегености са със среден размер $\sim 0.5 \mu\text{m}$.

Имобилизирането на клетките е визуализирано също с помощта на СЕМ. Фигура 17В показва клетки на изследвания щам, имобилизирани върху НРС/TEOS хибриден материал. Микроскопската снимка показва равномерно разпределение на дрождите и тяхната адхезия върху използваните матрици.



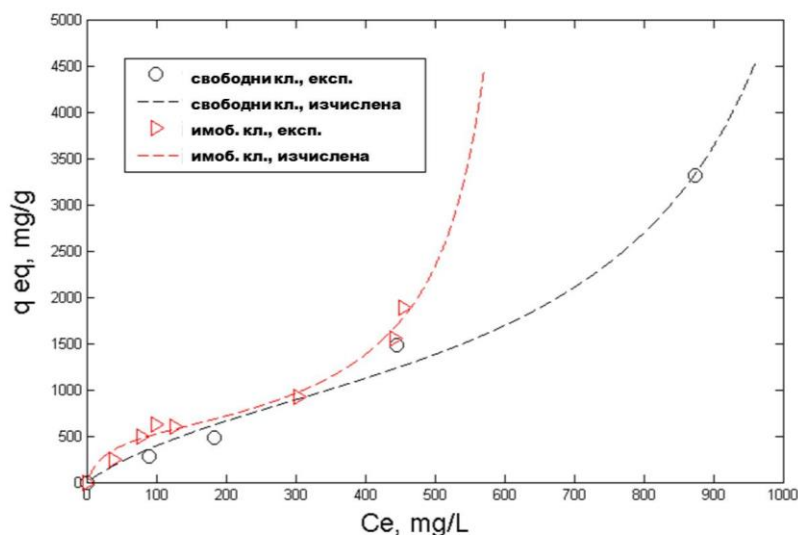
Фигура 17. СЕМ –изображения. (А) - хибриден материал, съдържащ 5 тегл. % НРС и TEOS. (В) - имобилизирани клетки на *Tr. cutaneum* R57 върху НРС/TEOS хибриден материал

Описание на равновесието на биосорбция

Следващите експерименти са проведени с цел сравнение сорбцията на клетки от изследвания щам – *Tr. cutaneum* R57 в свободно и имобилизирано състояние. Проведени са изследвания с концентрации на металните йони, аналогични на тези при свободни клетки. За всички построени изотерми, R^2 е по-висок или равен на 0.9.

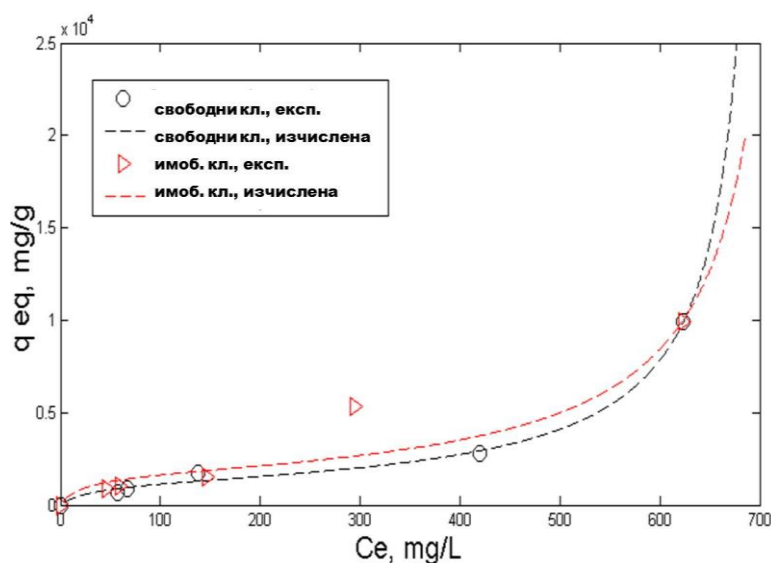
На Фиг. 18 е направена съпоставка между изотермата на свободни и имобилизирани клетки при добавяне на различни концентрации от стандартния разтвор на хроматни йони. Може да се отбележи, че адсорбционния капацитет при дадена концентрация на йоните в течната фаза е по-висок при имобилизираните клетки, тази тенденция се забелязва и при сорбцията на кадмиеви йони. Причина за това може да е от една страна наличието на допълнителни функционални групи по повърхността на хибридните материали и тяхната *порьозност* [Angelova et al., 2012], а от друга стабилността, която придобиват клетките във формирания се биофилм [Sutherland, 2001]. Тенденция за по-висок сорбционен капацитет на имобилизирани клетки в сравнение със свободни е наблюдавана и при сорбцията на Cu, Cd и Pb съответно от *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. и *Micrococcus* sp. Авторите обясняват това явление с по-голямата стабилност, която имат имобилизираните клетки, спрямо свободната биомаса [Rani et al., 2010]. По-висок сорбционен капацитет за имобилизираните клетки в сравнение със

свободна биомаса е докладван и от редица други изследователи [Nemambika et al., 2011; Liu, Y. et al., 2012; Ahemad & Kibret., 2013]. Други учени наблюдават по-високи нива на q_{eq} за свободни клетки, такива резултати са получени при изследване сорбцията на йони на никел с използването на гъби *Rhizopus arrhizus*. Изследователският екип обяснява резултатите си с неподходящ избор на материал за имобилизиране [Gurel et al., 2010].



Фигура 18. Изотерми на свободни и имобилизирани клетки на щам R57 в присъствие на нарастващи концентрации 0.2 – 10 mM Cr^{6+} (20.8 – 1000 mg/L)

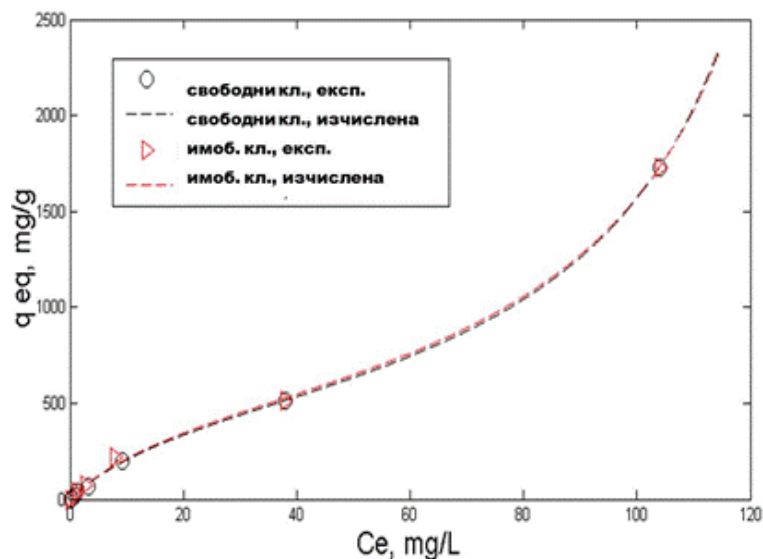
На Фиг. 19 са представени равновесните изотерми, построени при сорбция на кадмиеви йони. Тендецията и тук е за по-висок сорбционен капацитет при имобилизираните клетки в сравнение със свободните.



Фигура 19. Изотерми на свободни и имобилизирани клетки на щам R57 в присъствие на нарастващи концентрации 0.2 – 6.0 mM Cd^{2+} йони (22.4 – 700.0 mg/L)

Разликата при съпоставката на тези две изотерми не е така ясно изразена както е при изследване равновесието при хроматни йони (Фиг. 18).

На Фиг. 20 са представени изотермите при адсорбция на медни йони за свободни и имобилизирани клетки.



Фигура 20. Изотерми на свободни и имобилизирани клетки на щам R57 в присъствие на нарастващи концентрации 0.025 – 2.0 mM Cu^{2+} йони (1.59 – 120.0 mg/L)

Може да се забележи, че за разлика от изотермите при добавяне на хроматни и кадмиеви йони, тук двете изотерми съвпадат. Обяснение за това могат да бъдат отново от една страна по-ниските концентрации медни йони в сравнение с хроматните и кадмиевите, а от друга по-висок афинитет на биомасата спрямо медните йони в сравнение с този между хибридният носител и йоните на медта.

В Табл. 2 са обобщени стойностите за q_{eq} и параметрите в равновесните модели за имобилизирани клетки *Tr. cutaneum* R57 върху матрици с органичен компонент НРС и свободни клетки. От представените резултати в Табл. 2 се вижда, че при ниска начална концентрация на Cr^{6+} (0.2 mM) адсорбционния капацитет q_{eq} на биосорбента е приблизително три пъти по-висок при имобилизираните клетки в сравнение с тези в свободно състояние. Обяснението на това явление би могло да бъде въвеждането на допълнителни адсорбционни центрове в матрицата чрез функционални групи на НРС. В допълнение е и вероятността, че имобилизирането намалява инхибиращия ефект на Cr^{6+} . Имобилизацията към $\text{SiO}_2/\text{НРС}$ хибридни материали води до по-висок адсорбционен капацитет q_{eq} . С увеличение на концентрацията на хроматните йони се забелязва, че разликата в адсорбционния капацитет намалява пропорционално с увеличение на

концентрацията на йоните на тежкия метал. Вероятно, адсорбционните центрове от матрицата се насищат при ниски концентрации на метала, след което извличането се дължи изцяло на биосорбцията. С увеличаване на концентрацията, респективно абсолютното количество на адсорбираните йони, относителния дял на адсорбцията върху матрицата намалява. Трябва да се отбележи, че и в двете опитни постановки има нарастване на адсорбционния капацитет с увеличение концентрацията на йоните на тежкия метал.

Таблица 2. Стойности за адсорбционния капацитет на Cr^{6+} , Cd^{2+} и Cu^{2+} при имобилизирани и свободни клетки и за параметрите в равновесните модели

C _e , mg/L	Имобилизирани клетки		Свободни клетки	
	q _{eq} , mg/g	Коефициенти	q _{eq} , mg/g	Коефициенти
Cr ⁶⁺				
20.8	243.7	a = 542.6 b = 0.03661 c = 0.001541	81.83	a = 1000 b = 0.005152 c = 0.0008218
62.4	430.9		235.0	
104	529.4		371.9	
156	630.6		528.1	
520	2.7028x10 ³		1529.0	
Cd ²⁺				
22.4	878.8	a = 1681 b = 0.04374 c = 0.001336	531.6	a = 1242 b = 0.03016 c = 0.001404
89.6	1559.0		1073.0	
112	1687.0		1181.0	
560	6619.0		5748.0	
Cu ²⁺				
1.588	42.16	a = 530.5 b = 0.05449 c = 0.00681	40.82	a = 515.6 b = 0.05449 c = 0.006884
3.176	83.22		80.24	
30.176	451.2		435.7	
63.5	804.2		783.0	

От данните в Табл. 2 за сорбцията на кадмиеви йони може да се забележи сходна тенденция на тази при хроматни йони. Отново адсорбционният коефициент при имобилизирани клетки е по-висок и с повишаване на концентрацията на кадмиеви йони тази разлика намалява. Тук обаче няма толкова ясна изразена разлика при най-ниската стойност от 22,4 mg/L с последващите стойности както е в случая при извличането на хроматни йони. При сорбцията на йоните на тежкия метал кадмий отново се забелязва повишение в стойностите на q_{eq} пропорционално на повишението на концентрацията на металните йони както за свободни, така и за имобилизирани клетки.

Данните описваща сорбцията на медни йони (Табл. 2) се отличават от тези на хроматни и кадмиеви йони. Разликата в сорбционния капацитет на имобилизирани и свободни клетки е незначителна. Няма особена разлика и при повишение на концентрацията на медните йони. Разликата при различните концентрации е в сходен диапазон. Сходство с предходните данни за хром и кадмий има в тенденцията за увеличение на q_{eq} с повишение на концентрацията на добавените медни йони.

При сравнение на q_{eq} както на имобилизирани, така и на свободни клетки при концентрация на йоните на тежките метали в интервала 20-30 mg/L може да се направи извода, че шамът има най-висок сорбционен капацитет спрямо йоните на тежкия метал кадмий, следван от медните и хроматните йони.

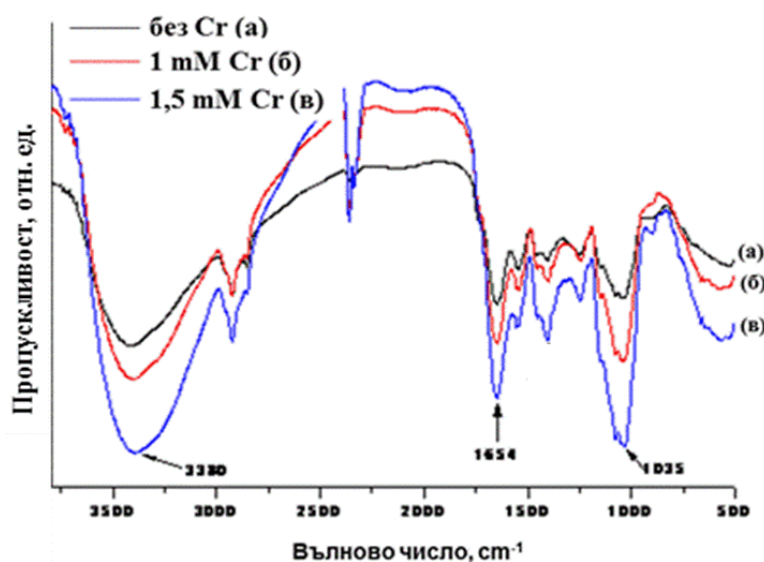
Очевидно имобилизирането на клетките чрез прикрепване към повърхността на използваните хибридни материали предотвратява инхибирането им под въздействието на металните йони и следователно увеличава техния потенциал за приложение при пречистване на води, замърсени с Cr^{6+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} . Този ефект е по-добре изразен при по-високи концентрации на металните йони в средата.

Функционални групи на *Tr. cutaneum* R57, участващи в сорбционните процеси

Клетките, абсорбиращи метални йони променят значително техния инфрачервен спектър [Cabuk et al., 2007]. Клетките на изследвания шам са култивирани в присъствие на 1mM и 1.5mM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ и впоследствие биомасата е охарактеризирана с инфрачервена спектроскопия (ИЧ) (Фиг. 21). Известно е, че клетъчната стена съдържа различни функционални групи, които осигуряват места за свързване за металните йони. Тези функционални групи са карбоксилни ($-\text{COOH}$), фосфатни (PO_4^{3-}), аминоксидни ($-\text{NH}_2$), хидроксилни ($-\text{OH}$) или тиолови ($-\text{SH}$) [Yahaya et al., 2009].

ИЧ спектър на контролния вариант (биомаса без хром) показва наличието на всички изброени функционални групи (Фиг. 21a). В първата област около 3400 cm^{-1} се

наблюдава силно интензивна, широка вибрационна ивица дължаща се на валентните трептения на хидроксилните (O–H) и amino (N–H) групите в биомасата, поради наличието на полизахариди и белтъци [Breierova et al., 2002; Garip et al., 2009]. Интензивната ивица при $\sim 2940\text{ cm}^{-1}$ може да бъде отнесена към валентни асиметрични, симетрични или деформационни трептения на C–H връзките от CH, CH₂ или CH₃ групи, основно от наличието на липиди и полизахариди [Garip et al., 2009; Sivam et al., 2013]. Абсорбционната ивица позиционирана при около 1650 cm^{-1} от една страна може да бъде отнесена към наличието на валентните асиметрични колебания на карбоксилатния йон (COO⁻) или свободните COOH групи (от полизахариди), а от друга страна се припокрива с трептенията на амид I (–NH₂) групите [Yahaya et al., 2009; Garip et al., 2009; Sivam et al., 2013].

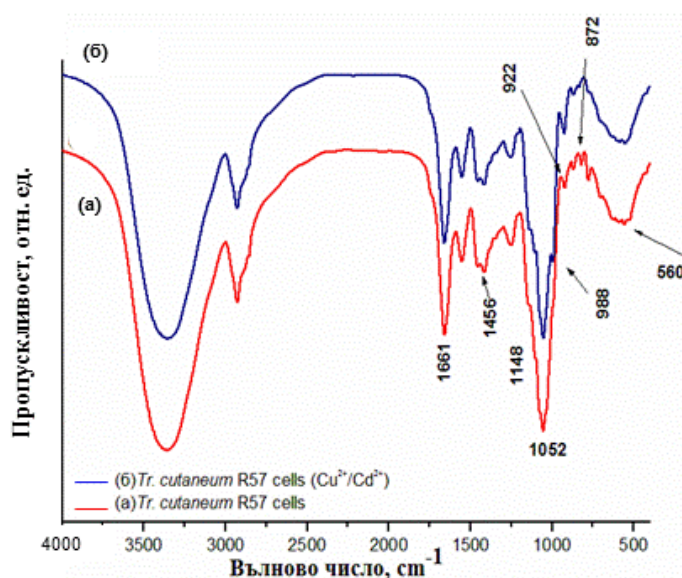


Фигура 21. ИЧ спектри на биомаса *Tr. cutaneum* R57 в отсъствие и присъствие на Cr⁶⁺

Интензивните ивици в областта $1120\text{--}1030\text{ cm}^{-1}$ могат да бъдат отнесени към присъствието в биомасата на вибрационните трептения на скелетните (C–O–C) гликозидни връзки, а също така и на наличието на асиметрични и симетрични трептения на фосфатните групи (P=O, P–O–C и P–OH) [Garip et al., 2009; Sivam et al., 2013]. В присъствие на хром (Фиг. 21б и в) ивиците при около 3400 и 1650 cm^{-1} се отместват, което показва, че тези функционални групи (–OH и –NH₂) участват най-активно при свързването на металните йони, вследствие на биосорбцията.

На Фиг. 22 е представена инфрачервена спектроскопия на биомаса от изследвания щам, преди биосорбция (а) и след биосорбция на медни и кадмиеви йони (б) с концентрация 0.8 mM CdSO_4 и $0.05\text{ mM CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. От спектъра на биомасата (Фиг. 22а)

се наблюдават характеристичните пикове при 1661, 1456 и 1052 cm^{-1} , отнасящи се за C=O и COOH групи и разкъсване на връзката C-N-C [Bai & Abraham, 2002; Ho, 2005; Akar et al., 2009]. Тези пикове се отместват до 1659, 1455 и 1051 cm^{-1} , след биосорбцията на металните йони от биомасата (Фиг. 22б), с което се показва участието на функционалните групи в процеса на биосорбция от изследвания щам. От спектъра на свободните клетки (Фиг. 22а) се наблюдава абсорбционната ивица при $\sim 1105 \text{ cm}^{-1}$, дължаща се на P=O-групите [Cabuk et al., 2007]. При сравнение с ИЧ спектъра (Фиг. 22б) на клетките в присъствие на мед и кадмий се забелязва отместването й до 1148 cm^{-1} , вероятно дължащо се на настъпващата биосорбция.



Фигура 22. ИЧ спектри на биомаса *Tr. cutaneum* R57 в отсъствие и присъствие на $\text{Cu}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$

Пикът при 560 cm^{-1} е свързан с деформационните трептения на S-O връзките, дължащи се на сулфатните аниони (SO_4^{2-}) [Bayarri et al., 1999]. Основното доказателство за взаимодействието между медните и кадмиеви йони и функционалните групи на биосорбента е новият пик, наблюдаван при $\sim 988 \text{ cm}^{-1}$ (след металната биосорбция). Този пик се дължи на взаимодействието на Cd^{2+} и Cu^{2+} с -C-SH групите [Akar et al., 2009]. Формирането на нови пикове при ~ 922 и 872 cm^{-1} в ИЧ спектъра на биомасата в присъствие на металните йони, могат да бъдат отнесени към взаимодействието между сярата и металите.

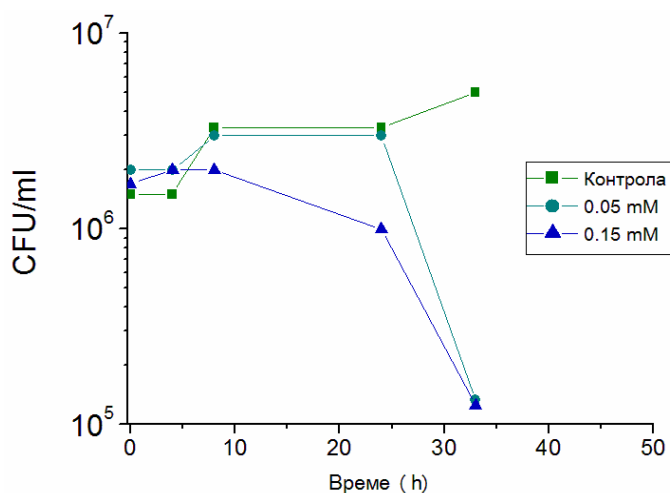
В допълнение, дрождевата клетъчна стена има свойства на добър йонообменник. Това се дължи на наличието на значително количество полярни групи в клетъчната стена, способни да координират метални йони. Тези групи са SH-, -OH-, COO-, -OCH₃ и др., част от полизахаридните молекули като глюкан и манан и някои протеини, включени в клетъчната стена на дрождите [Vieira & Volesky, 2010].

5. Способност на щам *Tr. cutaneum* R57 за едновременно разграждане на фенол (като единствен C-източник) и сорбция на медни йони

Много рядко индустриалните отпадъчни води съдържат само един химичен замърсител. Наличието на смеси от химични съединения въздейства върху естествените или придобити възможности на микроорганизмите да разграждат и усвояват определени вещества [Satchanska et al., 2005; Манасиев, 2008; Wasi et al., 2008]. В тази връзка в следващата серия от експерименти е използвана способността на изследвания щам да се развива на хранителна среда с единствен въглероден източник фенол и в присъствието на медни йони.

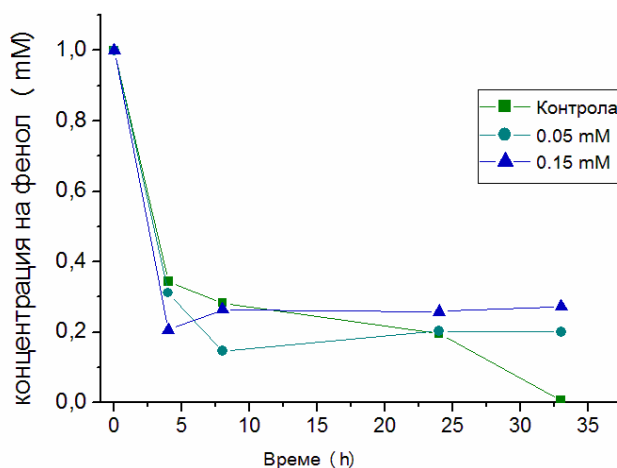
Колониите на *Tr. cutaneum* R57 върху агарова среда с единствен въглероден източник фенол се отличават от тези, които са развити на въглероден източник глюкоза. При растеж на фенол, колониите са бледи, кремообразни и значително по-малки по размер. Растежната крива на щама показва лек спад в жизнеността на клетките в първите 20 часа, което не е характерно за щама, култивиран в глюкозна среда. Тук лаг-фазата е и по-продължителна, до 20^{-я} час. След 20^{-я} час започва експоненциалното развитие на клетките, което се наблюдава до 55^{-я} час, след което културата навлиза в стационарна фаза на развитие и след 100^{-я} час се наблюдава и леко занижаване в клетъчната концентрация, което се свързва с последната фаза на развитие (отмиране).

На Фиг. 23 е представена растежната крива на щама при единствен източник фенол и добавяне на две концентрации медни йони – 0.05 mM и 0.15 mM разтвор на CuSO₄. Броят на жизнените клетки за пробите с добавени медни йони намалява във времето, като в 33-ти час броят на жизнените клетки е минимален.



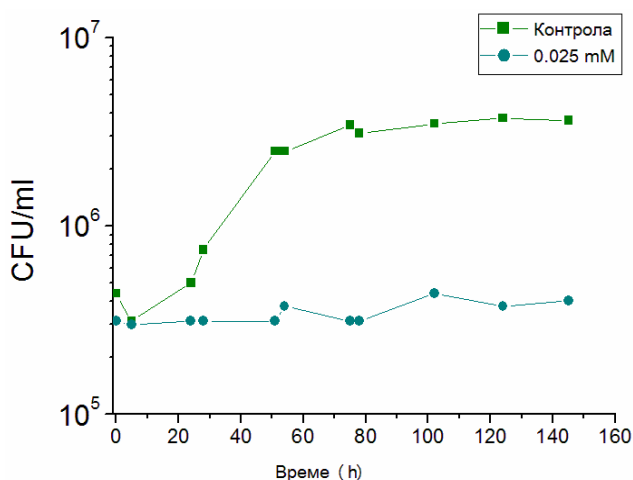
Фигура 23. Растежна крива на *Tr. cutaneum* R57 при въглероден източник фенол в присъствието на 0.05 mM и 0.15 mM CuSO₄·5H₂O

Резултатите от изследването на концентрацията на фенол за дадените проби е представено на следващата Фиг. 24. Забелязва се, че в пробите с добавен меден разтвор фенолът не се изчерпва напълно. В контролната проба фенолът е изчерпан до 35-я час. Инхибиране на биоразграждането на орто- нитрофенол при шам на *P. aeruginosa* при добавени Cu^{2+} йони е наблюдавано и от други автори [Topalova & Petrova, 1995]. С цел да се изясни влиянието на концентрацията медни йони, в последващи експерименти е използвана неколkokратно по-ниска концентрация на мед.



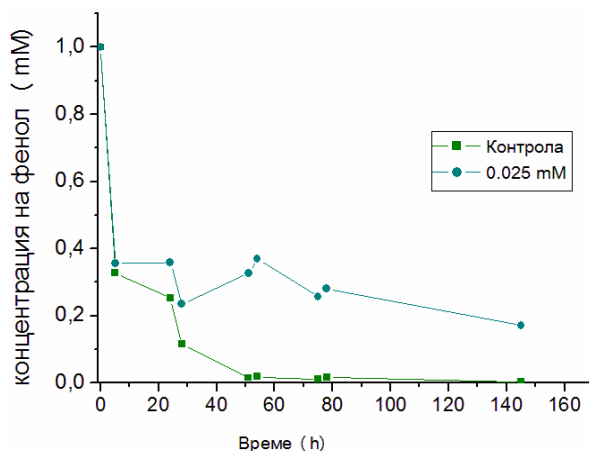
Фигура 24. Разграждане на фенол от *Tr. citanеит* R57 в присъствието на 0.05 mM и 0.15 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

На следващата фигура (Фиг. 25) е представена растежната крива при по-ниската стойност на добавения медния разтвор от 0.025 mM. Контролата и в тази серия от експерименти показва нормален ход на растеж, наподобяващ този на растежната крива. При пробата с добавени медни йони има минимален, нестабилен и силно инхибиран растеж.



Фигура 25. Растежна крива на *Tr. citanеит* R57 при въглероден източник фенол в присъствието на 0.025 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

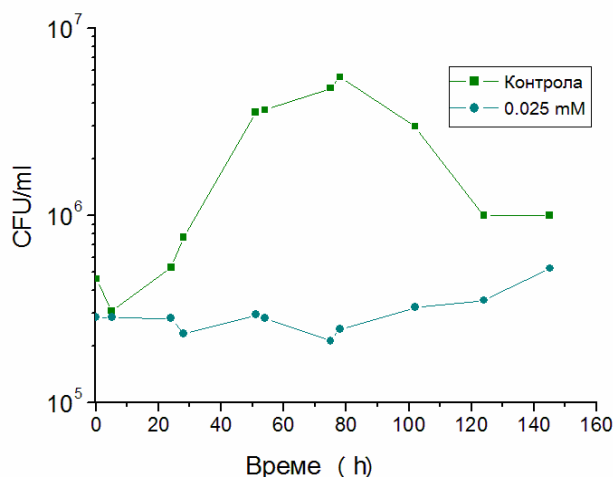
На Фиг. 26 е представена концентрацията на фенол за дадените проби. Отново се наблюдава пълно разграждане само в случая на контролната проба. При пробата с добавен меден разтвор не се осъществява напълно разграждане на въглеродния източник.



Фигура 26. Разграждане на фенол от *Tr. citanum* R57 в присъствието на 0.025 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

При неколнократно по-ниската концентрация на медни йони не се наблюдава промяна в тенденцията както на растеж, така и на фенолно разграждане. В тази връзка, следващата серия от експерименти изследва влиянието на металните йони за дадената система при забавено добавяне, по-конкретно в експоненциалната фаза на развитие на дрождевата култура. Това е направено с цел изясняване влиянието концентрацията на клетките в културалната течност за процеса на разграждане в среда с йони на тежкия метал.

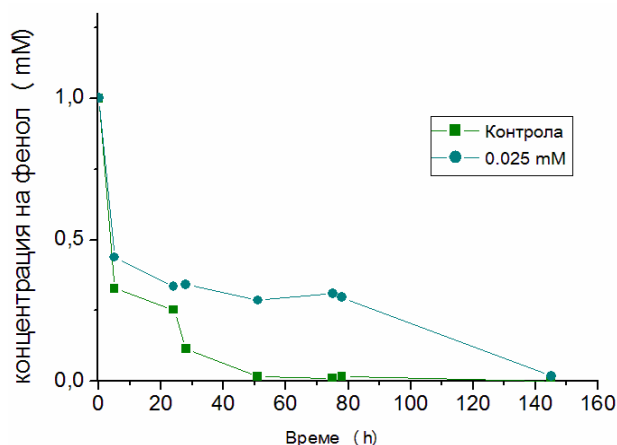
На Фиг. 27 са представени растежните криви на контролна проба и проба със забавено добавяне на медни йони с концентрация 0.025 mM на 24^{-я} час от развитието на щама.



Фигура 27. Растежна крива на *Tr. citanum* R57 при въглероден източник фенол с отложено добавяне на 0.025 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

В този случай се наблюдава растеж както за контролната проба, така и за тази с добавени медни йони. Трябва да се отбележи, че растежът на клетките при този вариант е със сравнително по-ниски стойности от тези на контролата.

Отново са изследвани и стойностите за концентрацията на фенол за двете проби (Фиг. 28). В този случай, съответно и на растежната крива, разграждане има и в двете проби. В контролната проба това се осъществява на 51^{-я} час, а в случая на проба с добавени медни йони на по-късен етап – 145^{-я} час.



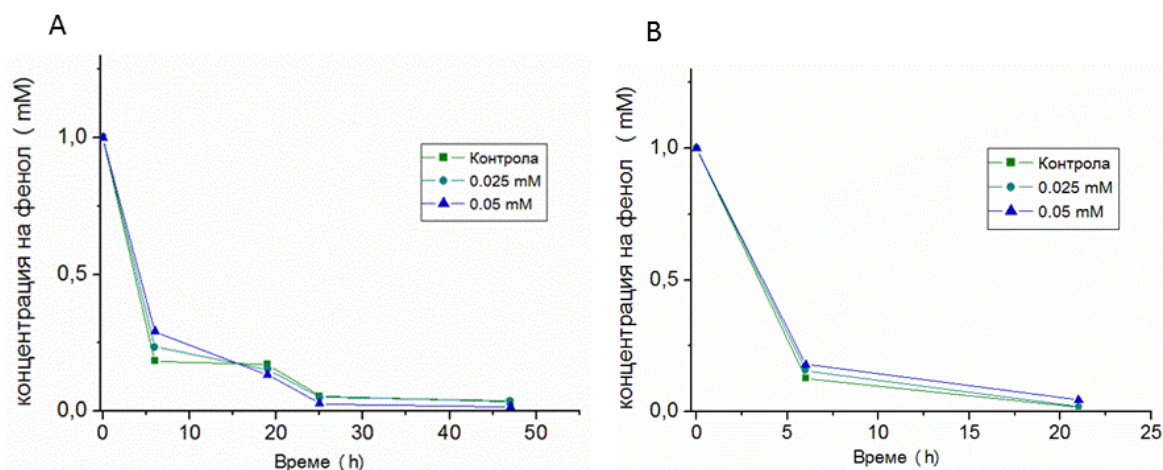
Фигура 28. Разграждане на фенол от *Tr. cutaneum* R57 при отложено добавяне на 0.025 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Забавеното добавяне на медните йони води до разграждане на фенола въпреки тяхното инхибиращо присъствие. Това прави концентрацията на биомасата основен фактор за едновременното разграждане на фенол в присъствието на йоните на тежки метали (по-конкретно медни). За да се изясни до каква степен има съотношение между процесите на разграждане с последователна сорбция и биомасата са проведени експерименти с повишена клетъчна концентрация (нерастящи клетки). Ходът на експериментите е описан в методичната част. Вземайки предвид, че експериментите са проведени с т. нар. ‘resting cells’ тяхната концентрация е изследвана единствено в началото на експеримента. В хода на експериментите е проследено единствено времето за разграждане на фенол.

На Фиг. 29А е представена концентрацията на въглеродния източник при експеримент с начална концентрация на клетките $9.08E + 06 \text{ CFU/mL}$. Може да се забележи, че ходът на разграждане на фенола следва еднаква тенденция както за контролата, така и за пробите с добавен меден разтвор. В 47^{-я} час и трите проби показват напълно разграждане на фенола. При последващи експерименти е достигната по-висока концентрация на жизнените клетки, а именно $2.50E + 07 \text{ CFU/mL}$. Забелязва се, че в този

случай има пълно фенолно разграждане до 21^{-я} час и в трите анализирани проби (Фиг. 29В).

От проведените експерименти с “resting cells” може да се направи извода, че основен фактор за разграждане на фенол в присъствието на медни йони от изследвания щам не е концентрацията на медни йони, а концентрацията на използваната биомаса.



Фигура 29. Разграждане на фенол от *Tr. cutaneum* R57 в присъствието на 0.025 mM и 0.05 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. (A) – клетъчна концентрация - $9.08E + 06 \text{ CFU/mL}$; (B) - клетъчна концентрация - $2.50E + 07 \text{ CFU/mL}$

В отделен експеримент е изследвана и сорбционната способност на щама при въглероден източник фенол. Експериментът е аналогичен на проведените сорбционни експерименти при въглероден източник глюкоза. Медният разтвор е добавен в различни концентрации на 24^{-ия} час от развитие на клетките, като пробите са анализирани на 120^{-та} минута след добавянето на медните йони. Резултатите показват сорбция в диапазон от 20 до 43 % за медни концентрации от 0.025 до 3.0 mM. Тези начални резултати, както и предходни изследвания с имобилизиране на щама за фенолно разграждане [Yotova et al., 2009], показват перспектива за използване на изследвания щам *Tr. cutaneum* R57 за едновременно разграждане на фенолни съединения и сорбция на йони на тежки метали (медни йони).

V. ОБОБЩЕНИЕ

Получените резултати дават детайлна характеристика на способността за резистентност и биосорбция на щам *Tr. cutaneum* R57, представител на филаментозните дрожди, спрямо нарастващи концентрации на медни, хроматни и кадмиеви йони. Наблюдават се морфологичните и физиологични промени, съпътстващи култивирането на

Tr. cutaneum R57 при добавяне на йоните на трите тежки метала, сред които издължени и непъпкуващи клетки, както и издувания в клетките. Щамът проявява значително по-висока толерантност към йоните на хром и кадмий. Изследваните крайни концентрации и на трите вида йони водят до силно инхибиране на растежа и ускоряване на лизисните процеси.

Изследвана е и връзката между метал-индуцираната токсичност и реализирането на оксидативен стрес, както и ефектът на медни, хроматни и кадмиеви йони спрямо основните биомаркери на оксидативния стрес. Направено е сравнение между действието на редокс-активните метали хром и мед и редокс-неактивният кадмий. Изследването на СОР ($\text{O}_2^\bullet$ и H_2O_2), количеството на оксидативно увредените белтъци и концентрациите на резервните въглехидрати гликоген и трехалоза, водят до заключението, че оксидативният стрес в изследвания щам е в пряка зависимост от концентрацията на йоните на тежките метали. Тази теория се подкрепя и от резултатите получени за нивата на ензимите СОД и КАТ, които играят главна роля в процеса на ензимна защита в еукариоти, в състояние на оксидативен стрес. В подкрепа на предходните анализи върху физиологията и морфологията на дрождите *Tr. cutaneum* R57, високите концентрации на добавени метални йони водят до претоварване на антиоксидантната им защита и летален край.

При анализ на сорбционните способности на щама е изчислен най-висок процент на извличане при медни йони, на втория час от добавянето им. Това може да се обясни с използването на относително по-ниски медни концентрации в сравнение с другите два метала, при които се наблюдава бързо насищане на сорбционните места в клетъчната биомаса.

Проведени са повторни сорбционни анализи с имобилизирани клетки. Въз основа на експериментални резултати са създадени равновесни модели с цел сравнение между свободни и имобилизирани клетки. От тях, а така също и с помощта на СЕМ, може да се направи заключението за успешно приложение на хибридните материали на основа на хидроксипропил целулоза (SiO_2/HPC). При изследване сорбцията на хроматни и кадмиеви йони са изчислени по-високи стойности за сорбционния капацитет (q_{eq}) на имобилизираните клетки в сравнение със свободните. В случая на медни йони разлика в капацитета на сорбция не се забелязва. Сравнен е и сорбционния капацитет на дрождевия щам спрямо трите вида изследвани йони. Стойностите за q_{eq} в интервал от 20.0 до 30.0 mg/L метални йони демонстрират нарастване в следната последователност: хроматни, медни, кадмиеви. С инфрачервена спектроскопия, преди и след добавяне на йоните на трите метала се установява участието на следните функционални групи от клетъчната биомаса в процеса на биосорбция: $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{C-SH}$, C=O , COOH и C-N- .

В серия от експерименти е изследвана способността на *Tr. cutaneum* R57 за едновременно разграждане на фенол и сорбция на медни йони. Щамът показва добра способност за използване на фенола като единствен въглероден източник, но при добавяне на разтвор на медни йони настъпва инхибиране на растежа. С цел да се изследва ефектът на клетъчната биомаса при паралелното протичане на двата процеса, металните йони са добавени при нарастващи концентрации на жизнените клетки. При по-високи количества на биомасата не се наблюдава инхибиране дори след увеличение на концентрацията на медни йони. Тези резултати, заедно с изследване процента на извличане на медни йони, предполагат успешното използване на щама за пречистването на комплексни отпадъчни води, съдържащи както метални йони, така и органични фенолни замърсители.

VI. ИЗВОДИ

1. Щам *Tr. cutaneum* R57 притежава значителна резистентност към йоните на редокс-активни (мед и хром) и редокс-неактивни (кадмий) метали. Установени са минималната и максималната инхибиторни концентрации, както и леталната концентрация на изследваните йони за развитието на дрождевата култура: Cr^{6+} – 0.2, 0.6 и 1.5 mM; Cu^{2+} – 0.025, 0.05, и 1.0 mM; Cd^{2+} – 0.025, 0.05 и 1.0 mM.
2. Метал-индуцираната токсичност предизвиква забавяне на растежа, понижаване на образуваната биомаса, морфологични промени в клетките и ускоряване на лизисните процеси.
3. Високите концентрации от Cr^{6+} , Cu^{2+} и Cd^{2+} предизвикват оксидативен стрес в клетките на *Tr. cutaneum* R57 като един от механизмите на метал-индуцираната токсичност. Степента на стреса не зависи от принадлежността на йоните към семейството на редокс-активните или редокс-неактивните метали, а от тяхната концентрация. Доказани са промени в нивото на биомаркерите на стреса:
 - ускорено генериране на СОР ($\text{O}_2^\bullet$ и H_2O_2);
 - повишаване количеството на оксидативно увредените белтъци;
 - ускорена синтеза и консумация на резервните въглехидрати гликоген и трехалоза;
4. Клетъчният отговор на щам *Tr. cutaneum* R57 срещу метал-индуцирания оксидативен стрес включва активиране на ензимната антиоксидантна защита. В присъствие на покачващи се концентрации на Cr^{6+} , Cu^{2+} и Cd^{2+} се наблюдава повишаване нивото на ензимите СОД и КАТ.
5. Въпреки повишената активност на антиоксидантните ензими, в клетките се наблюдават вредни последици от токсичното действие на металите, което вероятно е резултат от претоварване на антиоксидантната защита.
6. Щам *Tr. cutaneum* R57 притежава висок потенциал за извличане на метални йони от водни разтвори. Установено е, че най-активно в биосорбцията участват следните функционални групи $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{C}-\text{SH}$, $\text{C}=\text{O}$, COOH и $\text{C}-\text{N}-$.
7. Създадените равновесни модели за сорбция на йоните на трите тежки метала от свободни и имобилизирани клетки и получените коефициенти в ВЕТ изотермата (a , b и c) могат да бъдат използвани за целите на проектирането при биосорбция на метални йони.

8. Въз основа на създадените изотерми е определен сорбционният капацитет (q_{eq}) на свободни и имобилизирани клетки. При сравнение на q_{eq} при концентрации в интервала от 20 до 30 mg/L йони на съответните метали може да се направи извода, че шамът има сорбционен капацитет, нарастващ в следния ред: Cr^{6+} – Cu^{2+} – Cd^{2+} .
9. Изследваният шам показва способност за едновременно разграждане на фенол (като единствен C-източник) и сорбция на медни йони от 0.025 до 3.0 mM (процентът извлечени йони е в диапазона от 20 до 43 %).

VII. ПРИНОСИ

1. Получена е нова информация за високата резистентност на шам *Tr. cutaneum* R57, представител на филаментозните дрожди към редокс-активни и редокс-неактивни тежки метали – Cu, Cd и Cr. Направена е детайлна характеристика на промените в развитието и морфологията на моделния шам като отговор на покачващите се концентрации метални йони.
2. Получени са нови данни за участието на оксидативния стрес в механизма на индуцираната токсичност от редокс-активни и редокс-неактивни метали. Детайлно са охарактеризирани промените в нивото на биомаркерите на стреса и активността на антиоксидантната ензимна защита.
3. Получени са коефициентите в BET изотерми за сорбция на трите вида метални йони от свободни и имобилизирани клетки на шам *Tr. cutaneum* R57.
4. Установен е сорбционният капацитет q_{eq} на свободни и имобилизирани клетки по отношение на изследваните метални йони.
5. Установената способност на шам *Tr. cutaneum* R57 за едновременно разграждане на фенол и сорбция на медни йони може да бъде използвана в практиката при пречистване на отпадъчни води.

Публикации във връзка с дисертацията

1. N. Georgieva, D. Peshev, N. Rangelova, **N. Lazarova**. Effect of hexavalent chromium on growth of *Trichosporon cutaneum* R 57. J. Univ.Chem.Technol.and Met., 46, 3, 2011, 293-298.
2. **N. Lazarova**, E. Krumova, Ts. Stefanova, N. Georgieva, M. Angelova. The oxidative stress response of the filamentous yeast *Trichosporon cutaneum* R 57 to copper, cadmium and chromium exposure. J. Biotechnol and Biotechnol. Equipment, 28, 5, 855-862, 2014, **IF 0.760**.
3. **N. Lazarova**, A. Valladares, N. Georgieva, R. Müller. Phenol degradation by *Trichosporon cutaneum* R57 in the presence of copper ions. Univ.Chem.Technol.and Met., 50, 5, 2015.

Участия в международни и национални научни форуми

1. **N. Lazarova**, M. Kalapsazova, N. Rangelova, N. Georgieva, S. Nenкова. *Trichosporon cutaneum* R57 cells immobilised onto hybrid matrices obtained by sol-gel method. VI-та Научна постерна сесия за млади учени, 05.2009, ХТМУ-София.
2. N. Rangelova, D. Peshev, **N. Lazarova**, N. Georgieva, S. Nenкова. Characterization and application of silica-hydroxypropyl cellulose hybrids. Vth Balkan Conference on glass science and technology, 25-29.09., 2011, Nesebar.
3. **N. Lazarova**, N. Rangelova, D. Peshev, N. Georgieva. Biosorption of chromium and manganese ions from *Tr. cutaneum* R 57 immobilized onto SiO₂/HPC hybrid materials. IX-та Научна постерна сесия за млади учени, 05.2012, ХТМУ-София.
4. Ts. Angelova, N. Rangelova, **N. Lazarova**, N. Georgieva, R. Yuryev, R. Müller. Antibacterial activity of SiO₂/Carboxymethyl cellulose hybrid materials containing silver nanoparticles. IX -та Научна постерна сесия за млади учени, 05.2012, ХТМУ-София.
5. **N. Lazarova**, N. Georgieva, N. Rangelova, D. Peshev. Entrapment of yeast cells in pectin-silica hybrids and removal of cadmium and copper ions from waste. Inter. X -та Научна постерна сесия за млади учени, 05.2013, ХТМУ-София.
6. Ts. Angelova, **N. Lazarova**, N. Georgieva, R. Bryaskova, D. Peshev, R. Tzoneva. Application of PVA-based hybrid materials in biomedicine and in waste water treatment.. X -та Научна постерна сесия за млади учени, 05.2013, ХТМУ-София.
7. K. Kamenova, R. Bryaskova, **N. Lazarova**, N. Georgieva. Synthesis and application of PVA/TEOS/MPTEOS hybrid materials for removal of heavy metals. X -та Научна постерна сесия за млади учени, 05.2013, ХТМУ-София.

8. R. Bryaskova, **N. Lazarova**, N. Georgieva, R. Tzoneva. Cell adhesive behavior of PVA based hybrid materials with embeded silver nanoparticles and removal of heavy metals from waste water. Anniversary Sci Conference with international participation, 60 years UCTM, Sofia, June, 4-6, 2013.
9. R. Bryaskova, Z. Todorova, **N. Lazarova**, N. Georgieva, R. Tzoneva. Cell adhesive behavior of PVA based hybrid materials with silver nanoparticles and removal of chromium ions from water. IV-та Постерна сесия „Младите учени в света на полимерите”. 06. Юни, И-т по полимери, БАН, София, 2013 г.
10. **N. Lazarova**, V. Nemaska, D. Peshev, N. Georgieva. Equilibrium studies of biosorption of cromium and cadmium ions using filamentous yeast *Tr. cutaneum* R57. Юбилейна научна конференция 50 Години Катедра „Инженерна химия”, 8 Ноември 2013 г.
11. **N. Lazarova**, E. Krumova, Ts. Stefanova, N. Georgieva, M. Angelova. Oxidative stress in *Tr. cutaneum* R57 induced by heavy metal ions. XI^{та} Научна постерна сесия за млади учени, 05.2014, ХТМУ-София.
12. N. Rangelova, S. Nenkov, **N. Lazarova**, N. Georgieva. Copper-based nanostructured lignocellulose materials with antibacterial activity. 8th Nation. Conference on Chemistry, 26-27 June, UCTM, Sofia, 2014.
13. **N. Lazarova**, N. Rangelova, N. Georgieva. Immobilization of *Trichosporon cutaneum* R57 onto SiO₂/HPC/Ag hybrid materials. XXII Internat. Confer. on Bioencapsulation – Bratislava, Slovac, Sept. 17-19, 2014, p 156-157.
14. **N. Lazarova**, E. Krumova, Ts. Stefanova, N. Georgieva, M. Angelova. Effect of copper, cadmium and chromium ions on *Tr. cutaneum* R57 cells. 13th Congress of Microbiologists in Bulgaria with Intern Participation, 7-10 Oct. Trjavna 2014 – **plenary lecture**.
15. **N. Lazarova**, A. Valladares, N. Georgieva, R. Müller. Phenol degradation in the presence of copper ions by *Trichosporon cutaneum* R57. XII^{та} Научна постерна сесия за млади учени, 05.2015, ХТМУ-София.