

Галина Димитрова Йорданова

**БИОДЕГРАДАЦИЯ НА ФЕНОЛ И ФЕНОЛНИ ПРОИЗВОДНИ
С ИМОБИЛИЗИРАНИ МИКРОБНИ КЛЕТКИ**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд, представен за присъждане на
образователна и научна степен „Доктор”**

**Научна специалност : Технология на биологично активни вещества
(вкл. ензими, хормони, белтъчини)**

Шифър:02.11.11.

Научен ръководител: проф. д-тн Цонка Иванова Годжевъргова

Рецензенти:

Проф. д-р Любов Константинова Йотова

Доц. д-р Красимир Георгиев Василев

Дисертационният труд е обсъден и насрочен за защита от катедрен съвет на катедра „Биотехнология” в Университет „Проф. д-р Асен Златаров” – Бургас.

Дисертантката е свободен докторант в катедра „Биотехнология” на Университет „Проф. д-р Асен Златаров” – Бургас.

Експерименталната работа е извършена в катедра „Биотехнология” на Университет „Проф. д-р Асен Златаров” – Бургас.

Дисертацията съдържа 123 страници, 13 таблици, 22 фигури. В библиографията са включени 168 заглавия.

Защитата на дисертационния труд ще се състои наотчаса в зала №.....

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ПАН - полиакрилонитрил

ПА - полиамид

YNB (Yeast Nitrogen Base) – хранителна среда

СЕМ – сканираща електронна микроскопия

OD – оптическа плътност

ГА – глутаров алдеhid

2-ХФ - 2-хлорофенол

3-ХФ - 3-хлорофенол

4-ХФ - 4-хлорофенол

2,4-ДХФ - 2,4-дихлорофенол

4-НФ - 4-нонилфенол

3-МФ - 3-метоксифенол

ХК - 4-хлоро-3,5-диметилфенол (хлороксиленол)

ХлФ - 2-бензил-4-хлорофенол (хлорофен)

ДХФ - дихлорофенол

ТХФ - трихлорофенол

ТТХФ - тетрахлорофенол

ПХФ - пентахлорофенол

ТХЕ - трихлороетен

PVA - поливинил алкохол

ВЪВЕДЕНИЕ

Един от най-проучваните проблеми в съвременната екологична наука е свързан с биодegradацията на ксенобиотици. Типични представители на тази група замърсители са фенолът и неговите производни. Химическата и нефтопреработваща промишленост освобождават разнообразни органични отпадъци, включително фенол и фенолни производни. Практиката показва, че прилагането на физико-химичните технологии за отстраняване на тези съединения е доста скъпо и не е достатъчно ефективно. Един от основните недостатъци в тези процеси е формирането на вторични токсични междинни съединения. Счита се, че биологичните подходи за третиране и премахване на подобни замърсявания са благоприятна алтернатива поради възможността за пълно разграждане на ароматните съединения до нетоксични продукти и по-ниската цена за осъществяването им.

Филаментозните гъби *Aspergillus awamori* NRRL3112 са интересен обект на изследване в тази насока поради техните забележителни способности да разграждат сложни по структура химични съединения. Те се адаптират по-лесно от бактериите и дрождите към неблагоприятни природни условия като ниска влажност и рН. Освен това гъбите могат да оцеляват в присъствие на голям брой ксенобиотици, токсични за други микроорганизми чрез образуване на устойчиви спори.

Филаментозни дрожди *Trichosporon cutaneum* R57 са способни да усвояват широк спектър въглеродни източници по пътя на ензимни окислителни механизми, даващи възможност за метаболизиране на фенол, фенолни производни и др. Тези техни качества ги превръщат в ценен обект за изследване с цел създаване на технологии за почистване на индустриално замърсени води.

Интересът към дефинираните смесени култури непрекъснато нараства поради значимите ефекти, които се получават в резултат на съвместната метаболитна активност на културите. Особено важни са изследванията на възможността дефинирани смесени култури да разграждат фенол и негови деривати.

Имобилизираните микроорганизми имат редица предимства пред свободните клетки - стабилност, многократно използване, осъществяване на непрекъснат процес и др. Създаването на имобилизирани системи на базата на дефинирани единични и смесени култури на шам *Trichosporon cutaneum* R57 и *Aspergillus awamori* NRRL3112 и изучаването на техните потенциални възможности за разграждане на фенол и фенолни производни е важен проблем, заслужаващ да бъде проучен.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертационна работа е създаване на имобилизирани системи на дефинирани единични и смесени култури на шам *Aspergillus awamori* NRRL3112 и *Trichosporon cutaneum* R57 и изследване на биодegradационните им възможности спрямо фенол и фенолни производни.

За постигане на целта бяха поставени следните конкретни задачи:

1. Ковалентна имобилизация на двата шам *Aspergillus awamori* NRRL3112 и *Trichosporon cutaneum* R57 поотделно върху модифицираните полимерни носители.
2. Изследване на degradationните способности на получените имобилизирани системи спрямо фенол.
3. Установяване на операционната стабилност на имобилизирани системи спрямо фенол.
4. Биодegradация на фенол в непрекъснат биореактор с имобилизирана система *Aspergillus awamori* NRRL3112 / спирално навита мембрана.
5. Изследване на комбинираното биодegradационно действие на две от имобилизираните системи получени на базата на двата шам *Aspergillus awamori* NRRL3112 и *Trichosporon cutaneum* R57 спрямо фенол и фенолни производни.
6. Определяне на скоростта и степента на усвояване на различните фенолни производни.

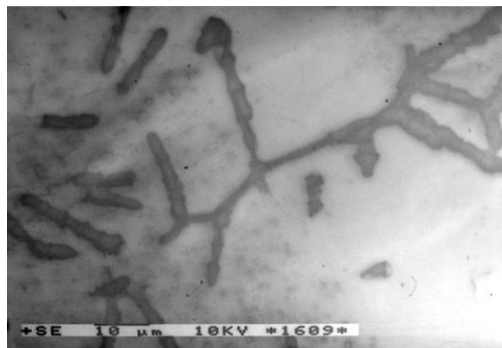
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

IV.1. Биодеградация на фенол с имобилизирани клетки на *Trichosporon cutaneum* R57 върху ПА и ПАН мембрана

Първата задача на настоящата дисертационна работа е създаване на ефективна имобилизирана система: клетки на щам *T. cutaneum* R57 - полимерна мембрана и изследване на нейните потенциални възможности за биоразграждане на фенол (Godjevargova, Burdelova-Yordanova et al., 2006). Имобилизацията на клетките на щам *T. cutaneum* R57 върху ПА и ПАН мембрани се провежда при оптимални условия, чрез съшиващ агент глутаров алдехид (Godjevargova et al., 2003). За да се осъществи ковалентното свързване на клетките чрез глутаров алдехид е необходимо носителите да притежават свободни аминогрупи. ПА мембрани съдържат малко количество крайни аминогрупи, а ПАН мембраните не притежават такива. За да бъдат въведени аминогрупи в носителите, те се модифицират с натриева основа с различна концентрация. При ПА мембрани концентрацията е 6 % NaOH, а при ПАН мембраните – 10 % NaOH. Условията за модификация са оптимални и са определени в предишни изследвания (Godjevargova et al., 2000). При тази хидролиза се получават amino и карбоксилни групи. За да се увеличи съдържанието на аминогрупите модифицираните полимерни носители се обработват повторно с 10 % разтвор на 1,2 -диаминоетан. Така карбоксилните групи се свързват с 1,2 -диаминоетан и се оформят допълнително аминогрупи.

Определено е количеството на аминогрупите на повърхността на двата вида носители. Резултатите показват, че при ПАН мембраните се постига по-висока степен на химическа модификация (количеството на аминогрупите за ПАН мембраните е 0.58 mgeq g⁻¹, а за ПА мембрани е 0.17 mgeq g⁻¹). Установяването на по-голямо количество активни групи при ПАН

мембраните не е гаранция, че на тяхната повърхност ще се свърже по-голямо количество микробни клетки и ще се осъществи по-висока степен на биодegradация на фенол. За да бъде направена по-точна преценка за тези два показателя, първо са имобилизирани клетки върху двата вида мембрани, а след това са изследвани техните биодegradационни възможности по отношение на фенол. За провеждане на имобилизацията се използват “растящи” клетки на *T. cutaneum* R57 в хранителна среда “YNB”, съдържаща глюкоза като въглероден източник. Култивирането се извършва при следните условия - рН 5.5; температура 30⁰ С, продължителност на култивиране 24 часа. Оптималните условия за имобилизация на клетките са определени в предишна разработка (Godjevargova et al., 2003). Счита се, че имобилизацията на растящи клетки води до по-здравото им свързване с повърхността на носителя, и че образуването на ковалентни връзки в ранните етапи на растеж на клетките са по-ефективни (Kowalska et al., 1998). Определено е количеството на свързаните клетки след приключване на имобилизационния процес: върху ПА мембрана – 1.4 mg cm⁻² и върху ПАН мембрана – 1.8 mg cm⁻² (суха биомаса).

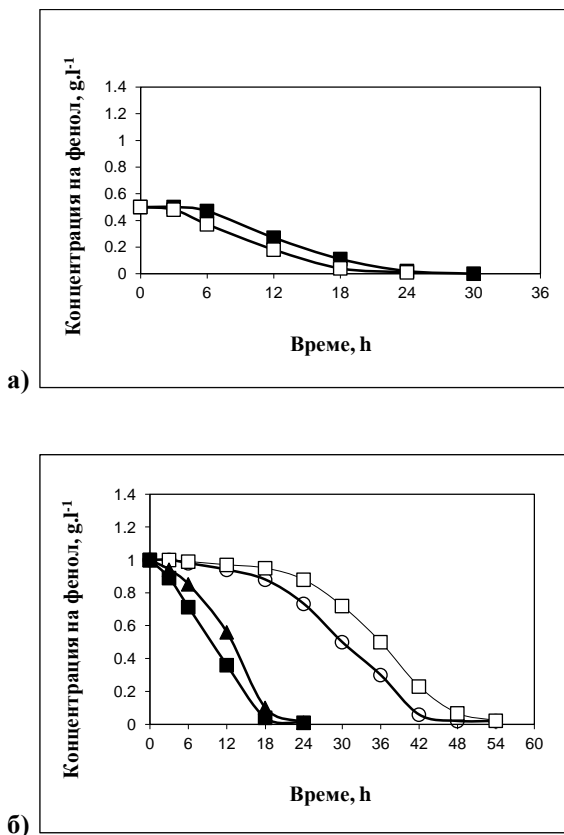


Фиг. 1. СЕМ на ПАН мембрана с имобилизирани клетки на *T. cutaneum* R57 (след имобилизационния процес)

Свързването на клетките към ПАН мембраната е визуализирано чрез електронно-микроскопска снимка, (фиг. 1).

Ефективността на двете имобилизирани системи е оценена въз основа на определяне степента на биодegradация на фенол с концентрация 0.5 g l^{-1} . Резултатите са представени на фиг. 2а. От фигурата се вижда, че при имобилизираната система с ПАН мембрана, биодegradацията започва след 3-ия час и за 21 часа се постига пълна биодegradация на фенола. При системата с ПА мембрана процесът на разграждане на фенол се забавя с три часа - започва след 6-ия час и приключва на 24-ия час. Получените резултати са сравнени с разграждането на 0.5 g l^{-1} фенол от свободни клетки с количество, еквивалентно на количеството имобилизирани клетки. Установено е, че пълно разграждане на фенол се постига почти за същото време, както ПАН имобилизираната система - 20 часа. Определено е, че относителната активност на имобилизираната система с ПАН мембрана е 95 %, а при имобилизираната система с ПА мембрана е 83 %. Количеството на имобилизираните клетки на мембраните накрая на първия биодegradационен цикъл с 0.5 g l^{-1} фенол съответно е: ПАН мембрана - 6 mg cm^{-2} , суха биомаса и ПА мембрана - 5 mg cm^{-2} , суха биомаса.

Подобни изследвания са проведени с двете имобилизирани системи, но с два пъти по-висока концентрация на фенол (1 g l^{-1}). Получените резултати са аналогични с тези, когато е използван фенол с концентрация 0.5 g l^{-1} . Отново при имобилизираната системата с ПАН се постига пълна биодegradация на фенол за по-кратко време (48 часа), отколкото при системата с ПА мембрана (51 часа), фиг. 2б.



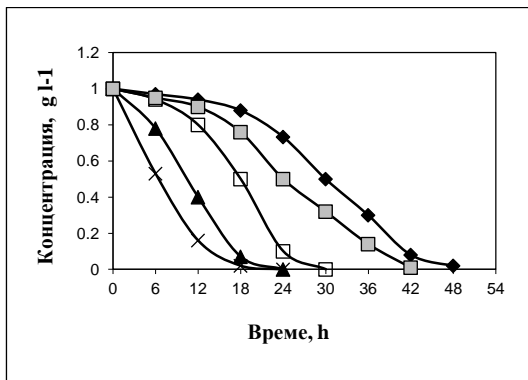
Фиг. 2. Биодegradация на фенол с имобилизирани клетки на *T. cutaneum* R57:
а) при 0.5 g l^{-1} фенол, върху ПАН мембрана (□) и ПА мембрана (■);
б) при 1.0 g l^{-1} фенол, върху ПАН мембрана (○), върху ПА мембрана (□).
след адаптация с 0.5 g l^{-1} фенол (първи цикъл на разграждане): 1.0 g l^{-1}
фенол, върху ПАН мембрана (■), върху ПА мембрана (▲).

Интересно бе да се отговори на въпроса, защо ПАН имобилизираната система приключва по-бързо с разграждането на фенола в сравнение с ПА имобилизирана система. За целта е направен паралелен анализ за количеството белтък в свързаните върху двата носители клетки след имобилизацията. Определено е, че количеството на белтъка в имобилизираните клетки върху ПАН мембрана е по-голямо – 0.095 mg cm^{-2} в

сравнение с резултатите за ПА мембрана – 0.060 mg cm^{-2} . Този резултат напълно корелира с определеното по-голямото количество аминогрупи на ПАН мембрана (0.58 mgeq g^{-1}), в сравнение с количество аминогрупи на ПА мембрана (0.17 mgeq g^{-1}).

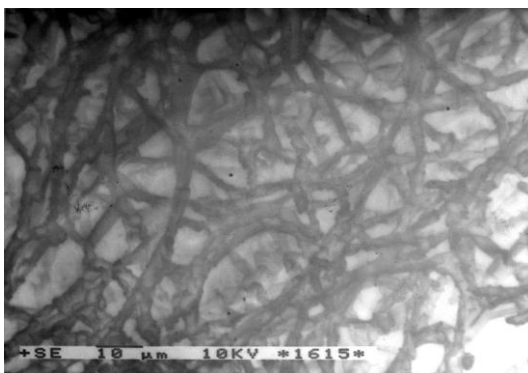
За да се редуцира времето за биодеградация на 1 g l^{-1} фенол са проведени два последователни цикъла. При първия цикъл имобилизираната система разгражда 0.5 g l^{-1} , а при втория - 1 g l^{-1} фенол. Резултатите са представени на фиг. 2б (кривите след адаптация). Установено е, че пълна биодеградация на 1 g l^{-1} фенол се постига за много по-кратко време (24 часа – за ПА имобилизирана система; 21 часа – за ПАН имобилизираната система), в сравнение с по-горе цитираното време (51 и 48 часа). По-бързото разграждане на фенол в този случай вероятно се дължи на адаптирането на имобилизираните клетки при по-ниска концентрация на фенол (0.5 g l^{-1}) по време на първия цикъл и допълнително натрупване на нови клетки върху мембранната повърхност.

Основно предимство на имобилизираните клетки е възможността за многократното им използване. Изследвана е операционната стабилност на химично имобилизирани клетки на щам *T. cutaneum* R57 върху ПАН мембрана. Избрана е тази система, тъй като тя бе определена като по-добра. За целта са използвани химично имобилизирани клетки и са проведени няколко цикъла на биодеградация на фенол с концентрация 1 g l^{-1} . След първия цикъл мембраната с имобилизираните клетки се промива със стерилна дестилирана вода и към имобилизираната система се добавя свежа хранителна среда, съдържаща фенол с концентрация 1 g l^{-1} . След това се провежда втори цикъл на биодеградация. Тази процедура се повтаря многократно (8 цикли). Резултатите за разграждането на фенол с химически имобилизирани клетки на *T. cutaneum* R57 върху ПАН мембрана до осмия цикъл са представени на фиг. 3.



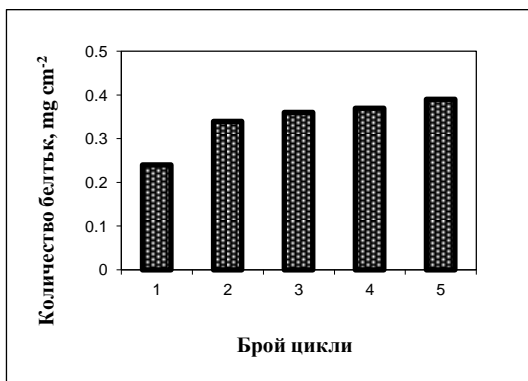
Фиг. 3. Осем цикли на разграждане на фенол (1.0 g l^{-1}) с имобилизирани клетки на *T. citaneum* R57 върху модифицирана ПАН мембрана. Първи цикъл (◆), трети цикъл (□), пети цикъл (▲), седми цикъл (x), осми цикъл (■).

От фиг. 3 се вижда, че при първия цикъл пълно разграждане на фенол настъпва на 48 часа. При следващите цикли (за III, V, VII цикъл) времето за пълна биодegradация на фенол е съответно 30, 24 и 18 часа. При 8-ми цикъл се наблюдава забавяне на биодegradацията (42 часа) в сравнение със 7-ми цикъл. Това вероятно се дължи на ограничение в субстратната дифузия до микробните клетки, натрупани на повърхността на мембраната, което съответно води до умъртвяване на клетките. Натрупването на микробни клетки върху мембранната повърхност се доказва чрез СЕМ на клетките върху ПАН мембрана, след осми цикъл на разграждане на фенол (1.0 g l^{-1}), фиг. 4. При сравнение на СЕМ снимките на имобилизирани микробни клетки върху ПАН мембрана преди първи цикъл (фиг. 1) и след осми цикъл (фиг. 4) може да се види, че по време на осемте цикли е натрупано значително количество клетки върху мембранната повърхност.



Фиг. 4. СЕМ на ПАН мембрана с имобилизирани микробни клетки на *T. cutaneum* R57 (след осми цикъл на биодеградация на фенол)

Определено е количеството белтък на имобилизираните клетки в края на всеки работен цикъл. Резултатите са представени на фиг. 5.



Фиг. 5. Количество белтък при химически имобилизирани клетки на *T. cutaneum* R57 върху ПАН мембрана в края на всеки биодеградационен цикъл. 1-след първи цикъл; 2-след втори цикъл; 3-след трети цикъл; 4-след пети цикъл; 5-след седми цикъл.

Наблюдава се значителна разлика в количеството белтък на свързаните към мембраната клетки в края на първи и втори цикъл – 0.24 mg cm^{-2} и 0.34 mg cm^{-2} . Новите клетки постепенно заемат цялото свободно

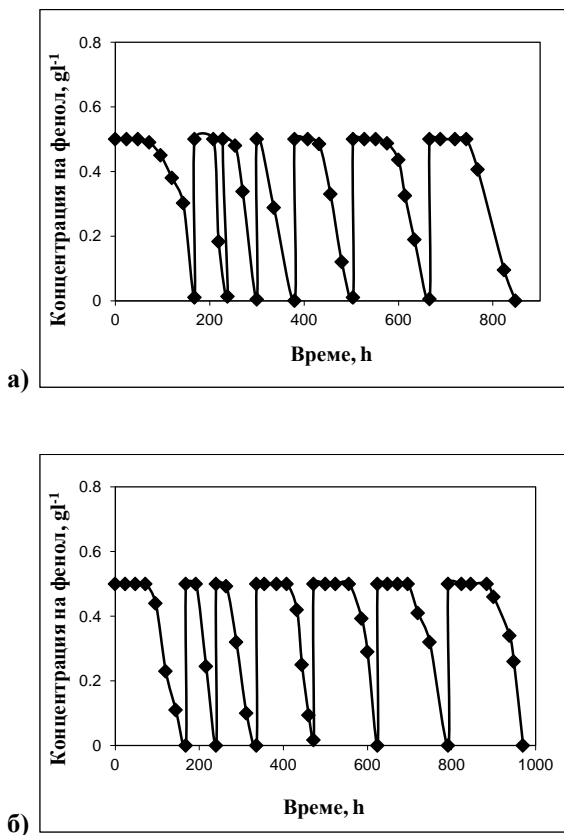
пространство върху мембранната повърхност. По време на останалите биодеградиционни цикли количеството белтък нараства равномерно, но бавно (фиг. 5).

На базата на направените експерименти с двата вида мембрани ясно се вижда предимството на ПАН мембраната като носител в имобилизираните системи. Предвид това по-нататъшните експерименти са проведени с носител ПАН мембрана и имобилизирани клетки на *Aspergillus awamori* NRRL3112.

IV.2. Биодеградация на фенол с имобилизирани клетки на *Aspergillus awamori* NRRL3112 върху ПАН мембрана

Тези изследвания са насочени към създаване на ефективна имобилизирана система *Aspergillus awamori* NRRL3112 - ПАН мембрана за биоразграждане на фенол (Yordanova et al., 2009). Определена е оптималната концентрация на съшиващия агент за ковалентна имобилизация на *Aspergillus awamori* NRRL3112. За целта е варирана концентрацията на свързващия агент (глутаров алдехид - ГА) от 0.1 % до 5.0 %. Най-добри резултати са получени при 0.5 % ГА (резултатите не са представени). Носителят се потапя в 0.5 % разтвор на глутаров алдехид за 1 час при стайна температура, след това се отмива излишъка на глутаров алдехид. За провеждане на имобилизацията е използвана спорова суспензия с концентрация – $3.33 \cdot 10^7$ спори ml^{-1} . Направени са изследвания за да се определи кой метод на имобилизация е по-добър – в присъствие или в отсъствие на фенол (0.2 g l^{-1}) в хранителната среда на Чапек, съдържаща споровата суспензия. Определено е, че количеството свързани клетки към мембраната, при двата метода на имобилизация - 1.7 mg cm^{-2} , сухо тегло (0.158 g cm^{-2} , мокро тегло). След това имобилизираните клетки по двата начина върху полимерна мембрана се култивират в хранителна среда на Чапек съдържаща 0.5 g l^{-1} фенол.

Проведени са седем поредни цикли за биодegradация на фенол. Резултатите са представени на фигура ба, б.



Фиг. 6. Биодegradация на фенол (0.5 g l^{-1}), седем последователни цикли, от имобилизирана система *Aspergillus awamori* NRRL3112 / модифицирана ПАН мембрана: имобилизация в присъствие на 0.2 g l^{-1} фенол (а), имобилизация без фенол (б)

Очевидно е, че и при двете системи времето за биодegradация при 2, 3 и 4-тия цикъл е по-кратко в сравнение с първия цикъл. При останалите три цикъли се забелязва постепенно забавяне на процеса. Освен това ясно се вижда, че с имобилизираните в присъствие на фенол клетки се получават по-

добри резултати. В този случай времето за протичането на 7-те цикли е 840 часа, а при другата имобилизирана система 1000 часа.

Изчислена е скоростта на разграждане на фенол за всеки цикъл и за двете имобилизирани системи (табл. 1). Тя представлява отношението на количеството разграден субстрат за определен интервал от време. Както се вижда от таблицата при първи цикъл е налице ниска скорост на разграждане, след това скоростта нараства три пъти във втория и третия цикъл и от четвърти до седми цикъл скоростта постепенно намалява. Тази тенденция на скоростта на разграждане се наблюдава и при двете имобилизирани системи. Намаляването на скоростта на фенолното разграждане може да се обясни с натрупването на биомаса върху мембранната повърхност, което след четвъртия цикъл се увеличава все повече.

Таблица 1.

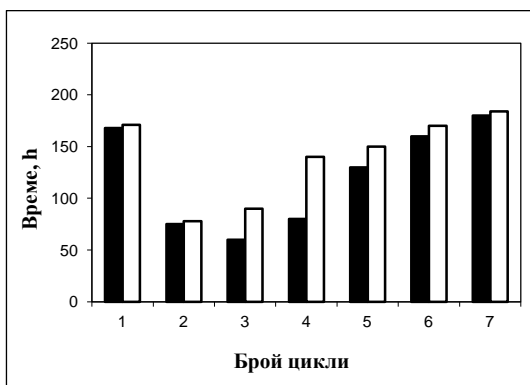
Скорост (mg h^{-1}) на разграждане на фенол (0.5 g l^{-1}) от свободни и имобилизирани клетки на *A. awamori* NRRL3112 върху ПАН мембрана

Брой цикли	Свободни клетки	Имобилизирани клетки без фенол	Имобилизирани клетки в присъствие на фенол (0.2 g l^{-1})
1	2.97	3.00	3.00
2	2.01	6.94	7.14
3	1.49	5.43	8.06
4	1.16	3.67	6.25
5	-	3.29	4.03
6	-	3.00	3.08
7	-	2.70	2.75

Това очевидно възпрепятства дифузията на субстрата до клетките и води до инхибиране на биодеградационните процеси при последните цикли. При сравняване на резултатите, представени на фиг. 6а и б и табл. 1 става

ясно, че скоростта на фенолно разграждане е по-висока за имобилизираната система, получена в присъствие на фенол.

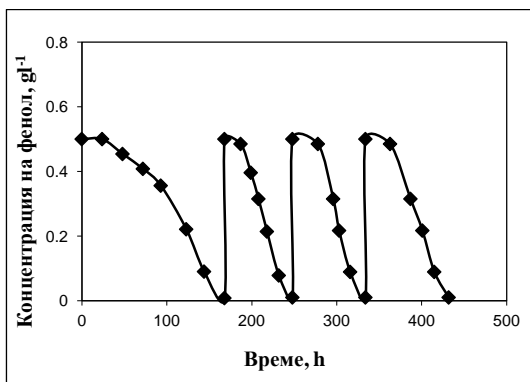
За по-добро сравнение на двете имобилизирани системи, получените резултати за биодegradационните времена на всеки цикъл са представени чрез диаграма на фиг. 7. От диаграмата ясно се вижда, че по-добри деградационни времена се получават при имобилизираната система получена в присъствие на фенол. Следователно още при самата имобилизация се осъществява адаптиране на клетки и по-нататъшните биодegradационни цикли се ускоряват значително в сравнение със имобилизираната система получена без добавянето на 0.2 g l^{-1} фенол в средата на Чапек. Всички останали експерименти са проведени с имобилизирана система получена в присъствие на фенол.



Фиг. 7. Продължителност на циклите на фенолна биодegradация (0.5 g l^{-1}) при двете имобилизирани системи: *Aspergillus awamori* NRRL3112 / модифицирана ПАН мембрана. Иммобилизация в присъствие на 0.2 g l^{-1} фенол (■) и иммобилизация без фенол (□)

Резултатите получени с избраната имобилизирана система са сравнени с тези на свободния щам, чийто първоначално количество е еквивалентно на количеството на имобилизираните клетки. Установено е, че

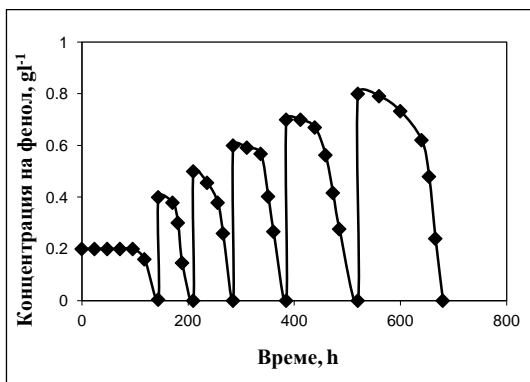
относителната активност на имобилизираната система *Aspergillus awamori* NRRL3112 / ПАН мембрана е 100 %. Проведено е неколккратно култивиране на щама в хранителна среда на Чапек, съдържаща фенол с концентрация 0.5 g l^{-1} (Фиг. 8).



Фиг. 8. Разграждане на фенол с концентрация 0.5 g l^{-1} от щам *Aspergillus awamori* NRRL3112, четири последователни цикли.

Четирите цикли на биодegradация се извършват при едни и същи условия. Количеството на неимобилизираните (свободни) клетки в първия цикъл на култивиране е еквивалентно на количеството на имобилизираните клетки върху ПАН мембраната с повърхност 40 cm^2 (6.32 g cm^{-2} , мокро тегло). От фигурата се вижда, че времето за разграждане на фенол със свободни клетки е значително по-голямо при 2, 3 и 4 цикъл в сравнение с резултатите получени при имобилизираните клетки. Това се потвърждава и от изчислената скорост на биодegradация на фенол (табл. 1). Очевидно, свободните клетки се инхибират при многократно използване (скорост на биодegradация на 0.5 g l^{-1} фенол при 4-ти цикъл – 1.16 mg h^{-1}) в сравнение с имобилизираните клетки (скорост на биодegradация при 4-ти цикъл – 6.25 mg h^{-1} за имобилизираната система адаптирана с фенол и 3.67 mg h^{-1} за системата без фенол).

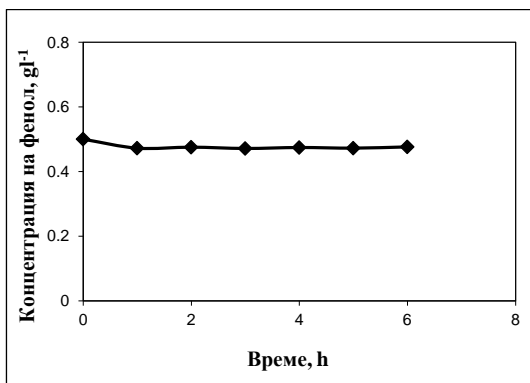
Изследвани са биодеградационните възможности на имобилизираната система с носител полимерна мембрана спрямо фенол с нарастваща концентрация от 0.2 до 0.8 g l⁻¹. От фиг. 9 се вижда, че с увеличаване концентрацията на фенол се увеличава и времето за биодеградация. Така например при концентрация 0.4 g l⁻¹ биодеградационният цикъл е около 66 часа, а при концентрация на фенол 0.7 g l⁻¹ биодеградационният цикъл достига около 135 часа.



Фиг. 9. Разграждане на фенол (от 0.2 g l⁻¹ до 0.8 g l⁻¹), шест последователни цикли, чрез имобилизирана система: *Aspergillus awamori* NRRL3112 / модифицирана ПАН мембрана

Интересно бе да се изследва дали намаляването на концентрацията на фенол се дължи само на имобилизираните клетки или носителът също има дял, вследствие на адсорбция на фенол върху мембраната. За целта е направен експеримент за адсорбция на фенол върху мембранната повърхност. Чиста мембрана (40 cm²) се инкубира в разтвор на фенол (0.5 g l⁻¹) в продължение на 6 часа. Резултатите са представени на фиг. 10. Оказва се, че концентрацията на фенол се променя незначително така, че причината за намаляване на фенолното съдържание се дължи единствено на активността

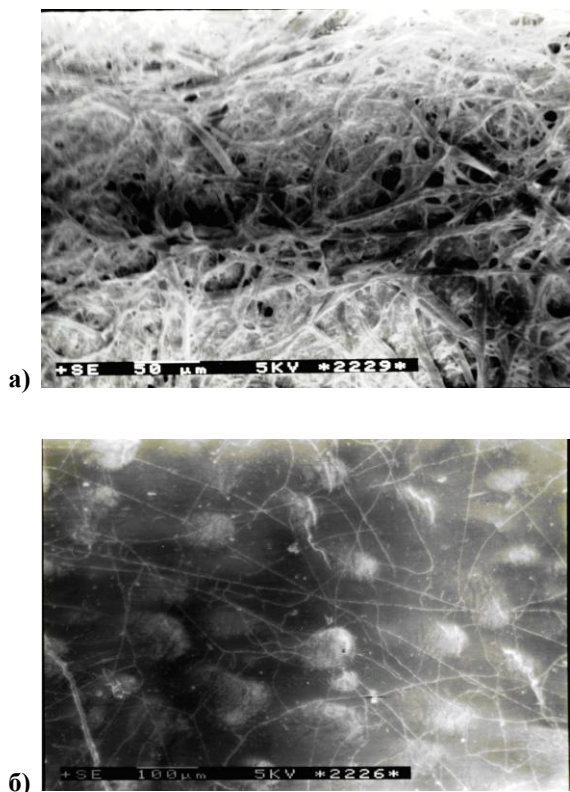
на имобилизираните клетки. Това опростява изучаването на кинетиката на разграждане на фенол, тъй като се елиминира влиянието на носителя.



Фиг. 10. Концентрация на фенол в разтвора при инкубиране на ПАН мембрана в 0.5 g l^{-1} фенол за 6 часа

Определено е количеството биомаса (1.104 g cm^{-2} , мокро тегло) върху мембраната (40 cm^2) след шести цикъл на биодеградация на фенол с нарастваща концентрация от 0.2 до 0.8 g l^{-1} . Установено е седем пъти увеличение на биомасата с нарастване броя на циклите (количество биомаса след имобилизацията - 0.158 g cm^{-2} , мокро тегло).

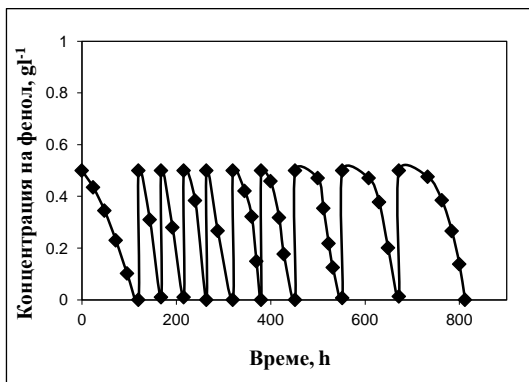
Натрупването на биомаса на повърхността на мембраната е потвърдено и от електронните микроскопски снимки на имобилизираната система *Aspergillus awamori* NRRL3112 / ПАН мембрана, след седмия цикъл (фиг. 11а) и в началото на култивирането (фиг. 11б). Забелязва се почти пълно покриване на повърхността на мембраната с клетки след седми цикъл на култивиране (фиг. 11а). Вероятно, това значително нарастване на биомасата и образуването на мицел върху мембранната повърхност след седми цикъл на култивиране води до намаляване скоростта на фенолно разграждане.



Фиг. 11. СЕМ на имобилизираната система: *Aspergillus awamori* NRRL3112 / модифицирана ПАН мембрана след 7-ми цикъл (а) и преди 1-ви цикъл (б) на биодegradация на 0.5 g l^{-1} фенол

На следващият етап са проведени експерименти в биореактор със спирално навита мембрана в режим на рецикулация. Имобилизацията на клетките върху мембраната се извършва директно в системата както е описано в т.ІІІ. „Експериментална част”. Биодegradацията на фенола се извършва в аеробни условия. Операционните условия на биореактора са представени в табл. 2. За всеки цикъл се зарежда свежа хранителна среда и съответното количество фенол (0.5 g l^{-1}). Следи се пълното изчерпване концентрацията на фенол. След това системата се промива със стерилна

дестилирана вода и отново се зарежда с нова хранителна среда и фенол (0.5 g l^{-1}) за следващия цикъл. Проведени са десет последователни цикли на биодegradация на 0.5 g l^{-1} фенол и е определено деградационното време за всеки цикъл, фиг. 12. Не се забелязва значителна разлика между деградационното време от втори до седми цикъл (около 50 часа) и между скоростта на биодegradация (средно 10.0 mg h^{-1}). След седми цикъл скоростта на биодegradация започва да намалява значително и в десетия цикъл е 4.0 mg h^{-1} . Тези резултати убедително потвърждават предимствата на рециркулиращия реактор със спирално навита мембрана. Установено е, че тази конструкция биореактор е много подходяща, тъй като тя осигурява голяма мембранна повърхност за свързване на щама. Освен това фенолният поток се движи тангенциално, вследствие на което няма опасност от намаляване на скоростта на потока през системата.



Фиг. 12. Концентрационен профил на биодegradацията на фенол (0.5 g l^{-1}) в рециркулиращ биореактор съдържащ имобилизирана система *Aspergillus awamori* NRRL3112 / модифицирана ПАН мембрана

Таблица 2**Операционни условия на биореактора**

Параметър	Стойност
Скорост на потока	1.5 ml min ⁻¹
Обем	300 ml
Начална фенолна концентрация	0.5 g l ⁻¹
Размери на мембраната	100 cm ²
Количество на имобилизираните клетки	0.174 g cm ⁻² (мокро тегло)

Получените резултати от изследванията в т. IV.1 с химически имобилизираните клетки на щам *T. cutaneum* R57 и щам *A. awamori* NRRL3112 в т. IV.2 върху полимерни мембрани ясно показват добрите перспективи на ПАН мембраните като носител, както и потенциалните възможности на създадените имобилизирани системи за биодegradация на фенол.

IV.3. Биодegradация на фенол с имобилизирани клетки на *Trichosporon cutaneum* R57 и *Aspergillus awamori* NRRL3112 върху полиамидни гранули

Известно е, че носителите под формата на гранули осигуряват много добри масообменни характеристики и могат да се използват в колонни непрекъснати биореактори. Проведени са експерименти за получаване на имобилизирани системи на базата на полиамидни (ПА) гранули. Гранулите са получени по фазово-инверсионния метод (Godjevargova et al., 1998)

Условията за имобилизация на двата щама върху модифицирани ПА гранули са идентични на тези при имобилизацията върху полимерните мембрани, като се вземат 0.5 g модифицирани ПА гранули и вместо среда на Чапек се използва пивна мъст. Имобилизацията на двата щама е ковалентна и се постига чрез глутаров алдехид. Модификацията на ПА гранули се извършва с натриева основа и последваща обработка с 1,2-диаминоетан, при

което се въвеждат аминокрупи на повърхността им. Колбата се поставя на клатачен апарат при температура 30⁰ С за 24 и 48 часа, съответно за *Trichosporon cutaneum* R57 и *Aspergillus awamori* NRRL3112 и рН 5.5. След това се отдекантира течната среда и имобилизиращият носител се промива с определено количество стерилна вода за отстраняване на свободните клетки. Количеството на имобилизираните клетки върху повърхността на ПА гранули е 0.4834 g g⁻¹ носител и 0.3442 g g⁻¹ носител (сухо тегло) , съответно за щам *Trichosporon cutaneum* R57 и щам *Aspergillus awamori* NRRL3112. Тези количества са по-големи от количеството на клетките получени при имобилизацията на същите щамове върху полимерни мембрани. Причината за това е по-голямата специфична повърхност на ПА гранули, позволяваща постигането на по-висока степен на имобилизация. Иmobилизираните щамове се адаптират с 0.3 g l⁻¹ фенол.

Изследвана е биодegradационната способност на двете имобилизирани системи *Aspergillus awamori* NRRL 3112 / ПА гранули и *Trichosporon cutaneum* R57 / ПА гранули спрямо фенол. Получените резултати са представени в табл. 3.

Направено е сравнение на времето за пълната биодegradация на фенол с неадаптирани и предварително адаптирани имобилизирани клетки с 0.3 g l⁻¹ фенол, за 48 часа, табл. 3.

Таблица 3

Сравнение на времето (h) за пълно разграждане на фенол чрез неадаптирани и адаптирани имобилизирани клетки на *T. cutaneum* R57 и *A. awamori* NRRL3112

Концентрация на фенол, g l ⁻¹	Без адаптация		С адаптация	
	<i>T. cutaneum</i> R57	<i>A. awamori</i> NRRL3112	<i>T. cutaneum</i> R57	<i>A. awamori</i> NRRL3112
0.5	24	48	24	48
1.0	48	-	36	-
1.2	-	-	48	-

Установено е, че биодegradацията на фенол с адаптирани имобилизирани клетки е по-ефективна при по-високи концентрации фенол. Освен това предварително адаптираната система *T. cutaneum* R57 / ПА гранули за разлика от неадаптираните клетки усвоява фенол с концентрация 1.2 g l⁻¹ за 48 часа. Следователно това се дължи на по-голямата активност на адаптираната имобилизирана система в сравнение с неадаптираната.

Получените биодegradационни времена на двата вида имобилизирани микроорганизми, предварително адаптирани, са сравнени с тези на съответните свободни клетки (табл. 4).

Таблица 4

Сравнение на времето (h) за пълно разграждане на фенол чрез свободни и имобилизирани адаптирани клетки на *T. cutaneum* R57 и *A. awamori* NRRL3112 върху ПА гранули

Концентрация на фенол, g l ⁻¹	Имобилизирани клетки		Свободни клетки	
	<i>T. cutaneum</i> R57	<i>A. awamori</i> NRRL3112	<i>T. cutaneum</i> R57	<i>A. awamori</i> NRRL3112
0.5	24	48	20	48
1.0	36	-	24	-
1.2	48	-	-	-

Очевидно е предимството на имобилизираните клетки на *T. cutaneum* R57 пред свободните за разграждане на по-високи концентрации от фенол, поради тяхната по-голяма стабилност. От табл. 4 се вижда, че относителната активност на двете имобилизирани системи е 100 %.

Паралелно с направените биодegradационни изследвания е проследено и количеството на натрупаната биомаса в края на пълното разграждане при различните концентрации на фенол. Паралелно са направени експерименти и с еквивалентно количество свободни клетки. При по-ниските концентрации на фенол, количеството на имобилизираните и

свободни клетки е по-малко, аналогично при по-високите то се увеличава, (табл. 5).

Таблица 5

Количество биомаса (g g^{-1} носител, сухо тегло) в края на биодеграционния процес на фенол с различна концентрация

Концентрация на фенол, g l^{-1}	Имобилизирани клетки		Свободни клетки	
	<i>T. cutaneum</i> R57	<i>A. awamori</i> NRRL3112	<i>T. cutaneum</i> R57	<i>A. awamori</i> NRRL3112
0.5	0.5166	0.6208	0.8549	0.7791
1.0	0.7148	-	1.3960	-
1.2	1.0761	-	1.8951	-

При имобилизираните клетки се забелязва по-малко количество биомаса натрупано върху носителя в сравнение с биомасата на свободните клетки, което най-вероятно се дължи на известно откъсване на клетки от носителя при култивирането и преминаването им в разтвора.

IV. 4. Сравнение на биодеграционните капацитети спрямо фенол на получените имобилизирани системи на базата на шам *Aspergillus awamori* NRRL3112 и *Trichosporon cutaneum* R57 и различни полимерни носители.

Направено е сравнение на биодеграционните възможности на всички разработени имобилизирани системи, получени с различни носители. Целта е да се установи кой е най-подходящият носител, осигуряващ ефективни имобилизирани системи с двата щама за биодеграция на фенол, за да се използва комбинирана биодеграция от двата щама.

Таблица 6

Сравнение на времето за пълно разграждане (h) на фенол с имобилизираните системи, получени с различни полимерни носители

Носители	Концентрация на фенол, g l ⁻¹			
	<i>T. cutaneum</i> R57			<i>A. awamori</i> NRRL3112
	0.5	1.0	1.2	0.5
ПА мембрана	24	51	-	-
ПАН мембрана	21	48	-	170 (I ц-л); 60 (II ц-л)
ПА гранули	24	36	48	48

От таблица 6 се вижда, че според времето за пълното разграждане на фенол при концентрациите (1.0 g l⁻¹ и 1.2 g l⁻¹) двата щама най-бързо разграждат фенол, когато са имобилизирани на модифицирани ПА гранули. Най-голяма е разликата във биодegradационните времена при имобилизираните клетки на *A. awamori* NRRL3112 върху ПА гранули и ПАН мембрани. Причината за това е по-голямата специфична повърхност на ПА гранули, което води съответно до по-високата степен на имобилизация на клетките в сравнение с използването на ПАН мембраната като носител. Биодegradацията директно на 1 g l⁻¹ фенол от имобилизираните клетки на *A. awamori* NRRL3112 върху ПА гранули е много бавна. В този случай е по-подходящо да се провежда биодegradация на 0.5 g l⁻¹ фенол няколко последователни цикли (над 10) и по този начин се достига до разграждане на по-голямо количество фенол.

Интересно бе да се изследва дали чистите ПА гранули адсорбират фенол. За целта в две колби се поставят по 0.5 g и 1.0 g модифицирани ПА гранули (стерилни), към тях се добавят хранителна среда и фенол и се разбъркват на клатачен апарат до 24 часа. Резултатите са представени в таблица 7. Анализите показват, че е налице незначителна адсорбция на фенол на повърхността на ПА гранули (табл. 7).

Таблица 7

Концентрация на фенол в разтвора при инкубиране на ПА гранули в 0.5 g l⁻¹ фенол в продължение на 24 часа

Време, h	Концентрация на фенол, g l ⁻¹	
	При 0.5 g ПА	При 1.0 g ПА
0	0.500	0.500
3	0.507	0.411
6	0.497	0.405
9	0.420	0.381
24	0.420	0.381

От направените изследвания става ясно, че модифицираните ПА гранули са най-подходящият носител за имобилизация на двата щама. От редица литературни източници е известно, че при комбинирането на няколко дефинирани щама се постига по-висока степен на биодеградация на някои токсични съединения (Romero et al., 2002). Във връзка с това следващите експерименти са насочени в посока на изследване на комбинираното действие на двата имобилизирани щама върху модифицирани ПА гранули за биодеградация на фенол и фенолни производни.

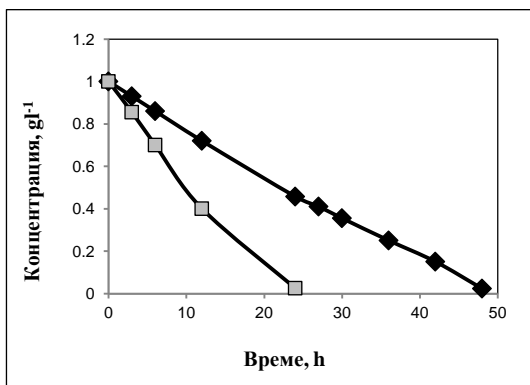
IV.5. Усвояване на фенол чрез съвместното действие на имобилизирани клетки на *Aspergillus awamori* NRRL3112 и *Trichosporon cutaneum* R57 върху ПА гранули

Проведена е ковалентната имобилизация на двата щама *Aspergillus awamori* NRRL3112 и *Trichosporon cutaneum* R57 по два начина (Yordanova et al., 2013):

1. Имобилизация на двата щама върху един и същ носител.
2. Имобилизация на двата щама поотделно върху ПА гранули, в отделни колби с хранителна среда и след това комбиниране на имобилизираните системи в определено съотношение.

И при двата вида имобилизации количеството на носителя, на хранителната среда и на изходната концентрация на културите са идентични. В първия случай в началото се добавя 5 ml смив на щам *Aspergillus awamori* NRRL3112 към 45 ml хранителна среда и 1 g ПА гранули. След 24 часа се добавят клетки на щам *Trichosporon cutaneum* R57. При втория случай двата щама се имобилизират поотделно, като първо се стартира с имобилизацията на *Aspergillus awamori* NRRL3112, а след 24 часа се зарежда имобилизацията на другия щам в друга колба с хранителна среда. Имобилизираните клетки, получени по двата начина са адаптирани с 0.3 g Γ^{-1} фенол. Изследвана е степента на биодegradация на 1 g Γ^{-1} фенол с имобилизираните клетки по двата начина. Резултатите са представени на фиг. 13.

Както се вижда от фигурата, при имобилизираните отделно клетки по метод 2, пълното разграждане на фенол (1 g Γ^{-1}) протича по-бързо (24 часа), в сравнение с имобилизираните съвместно клетки по метод 1 (48 часа).



Фиг. 13. Биодegradация на фенол (1 g Γ^{-1}) чрез съвместното действие на *T. cutaneum* R57 и *A. awamori* NRRL3112 имобилизирани върху ПА гранули: имобилизирани върху един и същ носител (■), имобилизирани поотделно (▣)

Направено е сравнение на степента на биодegradация на фенол от комбинираното действие на двата имобилизирани щама, свързани по метод 2

(при съотношение 1:1) и от самостоятелното действие на имобилизираните клетки на *T. cutaneum* R57 и *A. awamori* NRRL3112 (табл. 8).

Паралелно са направени експерименти и със свободни комбинирани и самостоятелно действащи клетки (в среда на Чапек). При всички експерименти е спазено количеството на клетките да бъде едно и също както при имобилизираните така и при свободните клетки.

Таблица 8

Сравнение на времето (h) за пълно разграждане на фенол чрез поотделно и съвместно действие на *T. cutaneum* R57 и *A. awamori* NRRL3112, свободни и адаптирани имобилизирани клетки върху ПА гранули

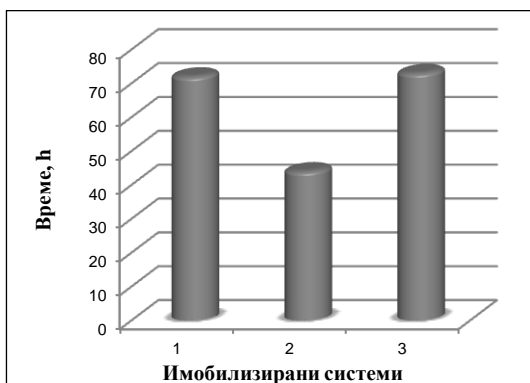
Концентрация на фенол, g l ⁻¹	Имобилизирани клетки			Свободни клетки		
	<i>T. cutaneum</i> R57	<i>A. awamori</i> NRRL3112	<i>T. cutaneum</i> R57 + <i>A. awamori</i> NRRL3112 (1:1)	<i>T. cutaneum</i> R57	<i>A. awamori</i> NRRL3112	<i>T. cutaneum</i> R57 + <i>A. awamori</i> NRRL3112 (1:1)
0.5	24	48	24	20	48	24
1.0	36	-	24	24	-	72
1.2	48	-	56	-	-	-
1.3	-	-	72	-	-	-
1.5	-	-	80	-	-	-

При концентрация 0.5 g l⁻¹ фенол свободните и имобилизирани клетки от двата щама го усвояват за еднакво време, но с повишаване на концентрацията на фенол по-добри са възможностите на комбинацията от двата имобилизирани щама и тяхното съвместно действие. Така съвместно действащите имобилизирани клетки разграждат 1.2, 1.3 и 1.5 g l⁻¹ фенол, докато самостоятелно имобилизираните клетки и свободните нямат тези възможности.

Получените резултати убедително показват големите потенциални възможности на комбинираната имобилизирана система за разграждане на

високи концентрации на фенол. Вероятно е налице синергично действие на двата щама, което води до увеличаване на тяхния биодegradационен капацитет спрямо фенол. При концентрации на фенол до 1.2 g l^{-1} , очевиден е по-големия биодegradационен капацитет на свободните и имобилизирани клетки на *T. cutaneum* R57, пред тези на другия шам.

Интересно бе да се установи, при съвместното разграждане на високите концентрации на фенол, кой от двата щама играе по-голяма роля. За целта са изследвани биодegradационните способности за разграждане на 1.3 g l^{-1} фенол от три различни комбинирани имобилизирани системи, получени при следните съотношения - *T. cutaneum* R57 : *A. awamori* NRRL3112 = 1:1; 1:4 и 4:1 (фиг. 14).



Фиг. 14. Биодegradация на 1.3 g l^{-1} фенол от три различни комбинирани имобилизирани системи при съотношение на клетките на *T. cutaneum* R57: *A. awamori* NRRL3112 = 1 - 1:1; 2 - 1:4 и 3 - 4:1

Резултатите показват, че при съотношение на смесените имобилизирани култури *T. cutaneum* R57: *A. awamori* NRRL3112 - 1:4, биодegradацията протича по-бързо. Следователно при биодegradацията на по-високи концентрации на фенол, по-голям дял в имобилизираната комбинирана система имат имобилизираните клетки на *A. awamori*

NRRL3112. Вероятно в началния стадий фенолът се усвоява по-бързо от клетките на *T. cutaneum* R57, но по-късно се засилва действието на втория шам и комбинираната система действа синергично. По този начин тази комбинирана система осигурява по-бърза биодеградация на фенол. Всички по-нататъшни експерименти са проведени с имобилизирана система при съотношение на *T. cutaneum* R57 : *A. awamori* NRRL3112 - 1:4.

Подобно синергично действие е публикувано от други автори. Стоилова и колектив разграждат фенол до 1 g l^{-1} , 2,4-дихлорофенол до 2 g l^{-1} , и 2,6-диметоксифенол до 2 g l^{-1} със смесена култура от свободни *A. awamori* NRRL3112 и *T. cutaneum* R57 (Стоилова и др., 2006). Lu и сътрудници (Lu et al., 2009) разграждат 4-хлорофенол чрез комплекс от бактерии и демонстрират потенциала им върху метаболизма на смесените замърсители, както и синергичните ефекти на комплекса от бактерии (*Mycopiana*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* и *Flavobacterium*). Steiman и колектив (Steiman et al., 1993) разграждат пентахлорофенол чрез голям брой гъбни щамове (*Micromycetes*).

Едно от най-важните предимства на имобилизираните системи е тяхното многократно използване. За да проверим възможностите за многократно приложение на създадената комбинирана система по метод 2 са проведени осем цикли с последователно нарастване на концентрацията на фенол от 0.5 до 2 g l^{-1} . След пълно разграждане на фенола при всеки цикъл, имобилизираните клетки се промиват със стерилна дестилирана вода и към тях се прибавя свежа хранителна среда с по-висока концентрация на въглероден източник (табл. 9).

Таблица 9

Биодеградационни цикли на фенол чрез съвместното действие на *T. cutaneum* R57 и *A. awamori* NRRL3112 имобилизирани върху ПА гранули и адаптирани с 0.3 g l⁻¹ фенол

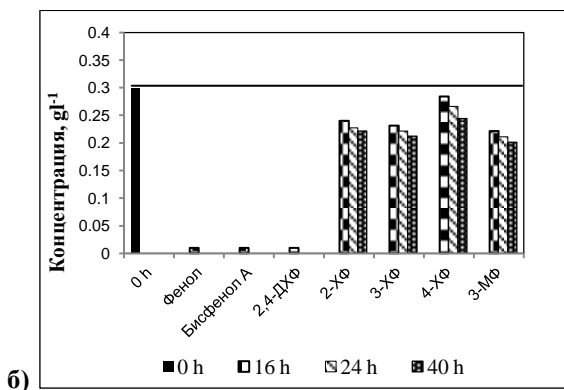
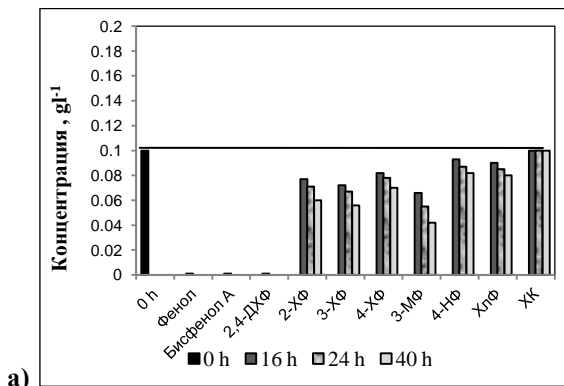
Брой цикли	Концентрация на фенол, g l ⁻¹	Брой дни за пълно разграждане
I	0.5	1
II	1.2	2.5
III	1.3	3
IV	1.4	4
V	1.5	5
VI	1.7	7
VII	1.9	8
VIII	2.0	-

Таблица 9 показва, че с повишаването на концентрацията на фенола се увеличава биодеградационното време. Очевиден е високият биодеградационен капацитет на комбинираната имобилизирана система. При провеждането на 7 цикли, в продължение на 31 дни се разграждат общо 9.5 g l⁻¹ фенол. Така при постепено увеличаване на концентрацията на фенол и адаптиране на двата имобилизирани щама се постига много добър биодеградационен капацитет.

IV.6. Усвояване на фенолни производни чрез съвместното действие на имобилизирани клетки на *Aspergillus awamori* NRRL3112 и *Trichosporon cutaneum* R57 върху ПА гранули

Проведени са експерименти за изследване на съвместните възможности на двата щама *Aspergillus awamori* NRRL3112 и *Trichosporon cutaneum* R57, имобилизирани върху ПА гранули, да разграждат девет фенолни производни: 2-хлорофенол (2-ХФ), 3-хлорофенол (3-ХФ), 4-

хлорофенол (4-ХФ), 2,4-дихлорофенол (2,4-ДХФ), 4-нонилфенол (4-НФ), 3-метоксифенол (3-МФ), бисфенол А, 4-хлоро-3,5-диметилфенол (хлороксиленол - ХК) и 2-бензил-4-хлорофенол (хлорофен - ХлФ). За тези производни първо е избрана концентрация 0.1 g l^{-1} според литературни данни (Lu et al., 2009; Torres et al., 1998). Резултатите са представени на фиг. 15а.



Фиг. 15. Усвояване на фенолни производни с концентрация: а) 0.1 g l^{-1} ; б) 0.3 g l^{-1} чрез комбиниран и мобилизиран клетки на *T. cutaneum* R57 и *A. awamori* NRRL3112

Фенолът, бисфенол А и 2,4-ДХФ се усвояват най-бързо – за 16 часа. За 40 часа се усвояват частично 2-ХФ, 3-ХФ, 4-ХФ и 3-МФ (съответно от 44 % до 72 %). Следващите две фенолни производни 4-НФ, ХлФ много бавно се усвояват, а концентрацията на ХК остава непроменена в продължение на 40 часа.

Проведени са експерименти с по-бързо усвояващите се фенолни производни при концентрация 0.3 g l^{-1} - фенол, бисфенол А, 2,4-ДХФ, 2-ХФ, 3-ХФ, 4-ХФ и 3-МФ (фиг. 156). При тази концентрация се наблюдава забавяне на разграждането при 2-ХФ, 3-ХФ, 4-ХФ и 3-МФ. За 40 часа концентрацията на тези съединения се понижава от 0.3 до 0.2 g l^{-1} .

Вероятният механизъм на биотрансформация на редица фенолни производни е изследван от много автори (Gianfreda et al., 1999; Tsutsumi et al., 2001). Окислението на тези съединения се повлиява от наличието на -ОН група и нейната позиция в ароматния пръстен, както и от вида и мястото на заместителите в ароматния пръстен. Наличието на хидроксилни групи при фенола, бисфенола водят до ускоряване на окислението на ароматните съединения. Електронно-донорните заместители (-CH₃) по-лесно отдават електрони, намаляват окислителния потенциал и увеличават скоростта на окисление. Електронно-акцепторните заместители (-Cl) трудно отдават електрони, повишават окислителния потенциал и намаляват скоростта на окисление. При окислението се разкъсва ароматния пръстен на съединението, отделя се хлорния атом и въглеродният скелет се трансформира в продукти (пируват, сукцинат, ацетилCoA), които се асимилират чрез централния метаболизъм на клетката. Доказано е, че различни плесенни гъби биотрансформират феноли, като ефективността им е в строга зависимост от химическата структура на фенолите, както и от вида и броя на заместителите на ароматния пръстен (Bollag and Leonowicz, 2003). Dec и сътрудници (Dec et al., 2001) използват като субстрати 2,4-ДХФ, 3-ХФ, 4-ХФ, 2-ХФ, а като

биокатализатор *Trametes villosa*. Доказват, че при окислителното дехалогениране става отделяне на хлорни атоми от молекулата на хлорофенолите. При 2,4-ДХФ е постигната най-висока степен на усвояване.

Трябва да се отбележи също, че заместените фенолни производни с хлорни атоми на *ortho*-позиция са по-податливи на окисление, а тези на *para*- и *meta*- позиция показват ниска реактивоспособност (Georgieva et al., 2010). Други автори посочват, че някои микроорганизми предпочитат първо да разграждат еднозаместените хлорни производни на *meta*- позиция, пред *para*- и *ortho*- позицията (Bae et al., 1996b; Farrell and Quilty, 1999; Gaofeng et al., 2004).

На базата на получените резултати, изследваните фенолни производни се подреждат в следния ред, в зависимост от степента им на усвояване от смес на имобилизираните щамове *Aspergillus awamori* NRRL3112 и *Trichosporon cutaneum* R57:

Фенол > Бисфенол А > 2,4-ДХФ > 3-МФ > 3-ХФ > 2-ХФ > 4-ХФ > ХлФ >
4-НФ > ХК

Очевидно е, че фенолът и бисфенол А се усвояват най-бързо. Производните на фенола, които съдържат -CH₃ групи (3-МФ), както и съединенията, които съдържат повече от един Cl атом (2,4-ДХФ) също се разграждат бързо. Видимо е, че еднозаместените хлорни фенолни производни се разграждат в следния ред *m*- > *o*- > *p*- позиция (3-ХФ > 2-ХФ > 4-ХФ). Установено е, че фенолните производни с по-голям брой различни заместители много трудно се разграждат (ХлФ > 4-НФ > ХК).

Yan и колектив описват, че разграждането на фенола от *Candida tropicalis* е по-бързо от това на 4-ХФ (Yan et al., 2005). Burton и Moreno-Andre използват смес от микроорганизми и подреждат усвояваните производни в

следния ред: 2,4-ДХФ, 4-ХФ, фенол (Burton and Moreno-Andre, 2011). Очевидно е, че редът се влияе от положението на реактивните групи в структурата на съединенията и от вида на микроорганизмите.

Определена е скоростта на усвояване на фенола и фенолните производни с концентрация 0.1 g l^{-1} и 0.3 g l^{-1} , както и степента на разграждане на 16-тия и 40-тия час от началото на процеса, (табл. 10).

Таблица 10

Скорост и степен на усвояване на фенол и фенолни производни

Субстрат	Концентрация, g l^{-1}	Скорост на усвояване, mg h^{-1}	Степен на усвояване, % на 16 h	Степен на усвояване, % на 40 h
Фенол	0.1	6.2	100	-
	0.3	18.1	100	-
Бисфенол А	0.1	6.0	100	-
	0.3	17.9	100	-
2,4-ДХФ	0.1	5.9	100	-
	0.3	17.7	100	-
3-МФ	0.1	2.1	34	72
	0.3	4.9	26.3	33
3-ХФ	0.1	1.8	28	54
	0.3	4.3	23	29.3
2-ХФ	0.1	1.4	23	50
	0.3	3.8	20	26.3
4-ХФ	0.1	1.1	18	44
	0.3	1	5.3	18.6
ХлФ	0.1	0.5	1	30
	0.3	0	0	-
4-НФ	0.1	0.4	7	27
	0.3	0	0	-
ХК	0.1	0	0	-
	0.3	0	0	-

Скоростта на разграждане на всяко изследвано вещество при висока концентрация - 0.3 g l^{-1} е по-голяма от тази при по-ниска

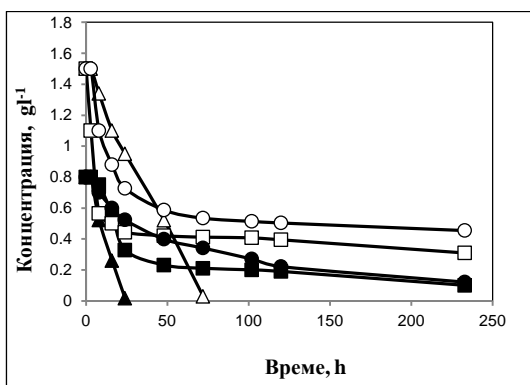
концентрация - 0.1 g l^{-1} . Забелязва се много добра корелация между резултатите за скоростта на разграждане на различните съединения и установения ред на усвояване на тези съединения.

Най-висока скорост на разграждане е изчислена при фенола. Веднага след това се нареждат бисфенол А и 2,4-ДХФ. Най-ниска скорост на усвояване е установена при ХлФ и 4-НФ. Първите три съединения в табл. 10 имат 15 пъти по-голяма скорост на усвояване в сравнение със скоростта на разграждане на нонилфенола, намиращ се на предпоследно място в установения ред. Съединението 4-хлоро-3,5-диметилфенол (хлороксиленол) не се усвоява от двата щама и скоростта на разграждане е 0.

Определена е и степента на усвояване на изследваните съединения на 16-тия и 40-тия час от началото на процеса (табл. 10). Тя също напълно корелира на установения ред и скоростта на усвояване на съединенията. Фенолът, бисфенол А и 2,4-ДХФ се усвояват напълно още на 16 час и при двете концентрации. При останалите съединения степента на усвояване се движи от 72 до 27 %.

Направени са експерименти с най-лесно усвояемите съединения (фенол, бисфенол А и 2,4-дихлорофенол), при по-висока концентрации (0.8 g l^{-1} и 1.5 g l^{-1}), фиг. 16.

От фигура 16 се вижда че, комбинацията от двата щама е способна да разгражда тези съединения с концентрация 0.8 g l^{-1} . За 23 часа от началото на процеса фенолът се усвоява 100 %, бисфенол А - 60 %, а 2,4-дихлорофенолът - 35 %. При повишаване на концентрацията на изследваните съединения до 1.5 g l^{-1} фенолът се усвоява напълно за 72 часа, а 72 % от бисфенолът се усвоява за 120 часа. За същото време 66 % от 2,4-ДХФ се разгражда.



Фиг. 16. Усвояване на фенол, бисфенол А, 2,4-ДХФ с концентрация 0.8 g l^{-1} (съответно ▲, ■, ●) и 1.5 g l^{-1} (съответно △, □, ○) чрез комбинирани имобилизирани клетки на *T. cutaneum* R57 и *A. awamori* NRRL3112

Изчислена е скоростта на разграждане на тези три съединения и степента на усвояване: 24, 72 и 233 часа (табл. 11).

Таблица 11

Скорост и степен на усвояване на фенол, бисфенол А и 2,4-ДХФ чрез комбинирани имобилизирани клетки на *T. cutaneum* R57 и *A. awamori* NRRL3112

Субстрат	Концентрация, g l^{-1}	Скорост на усвояване, mg h^{-1}		Степен на усвояване, % (на 24 h)	Степен на усвояване, % (на 72 h)	Степен на усвояване, % (на 233 h)
		0-24 h	24-233 h			
Фенол	0.8	32.5	-	97.8	-	-
	1.5	19.8	19.8	38.6	100	-
Бисфенол А	0.8	20.1	0.9	60.2	71.1	87.5
	1.5	44	0.6	70.4	71	79.3
2,4-ДХФ	0.8	11.5	1.8	34.5	54.7	84.7
	1.5	36.4	0.8	58.2	64.3	69.6

Прави впечатление, че при високите концентрации редът на тези три съединения се променя. Например при концентрация 1.5 g l^{-1} в началото на

процеса скоростта на усвояване е най-голяма при бисфенол А, след това при 2,4-ДХФ и фенол. След 24 часа усвояването на бисфенол А и 2,4-ДХФ се забавя, докато фенолът продължава да се разгражда със същата скорост.

Едновременно е проследена и промяната на количеството на биомасата в началото и края на всеки процес, табл. 12.

Таблица 12

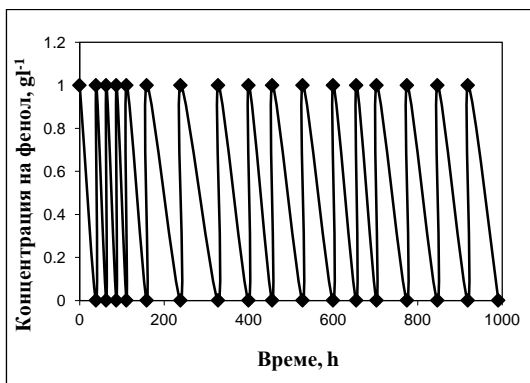
Количество на комбинирани имобилизирани клетки (g g^{-1} носител, сухо тегло) в началото и в края на култивирането.

Концентрация, g l^{-1}	Начално количество имобилизирани клетки	Крайно количество имобилизирани клетки		
		фенол	бисфенол А	2,4-дихлорофенол
0.8	0.354	0.3802	0.3715	0.3671
1.5	0.354	0.7886	0.7522	0.7395

Резултатите показват, че въпреки високите концентрации (0.8 g l^{-1} и 1.5 g l^{-1}) на фенолните производни, налице е растеж на биомаса. Това е убедително доказателство на потенциалните възможности за съвместното действие на двата имобилизирани щама за усвояване на фенол и фенолни производни.

Извършено е и изследване на операционната стабилност на комбинираната имобилизирана система. В рамките на 1000 часа (42 дни) са проведени 17 биодеградационни цикли на 1 g l^{-1} фенол.

Времето за биодеградация в първите 5 цикли е по-кратко (около 40 часа), а след това времето на отделните цикли се удължава до 72 часа (до 17 цикъл). Резултатите убедително показват, че комбинираната имобилизирана система е много стабилна (фиг. 17).



Фиг. 17. Операционална стабилност на комбинирана имобилизирана система от *T. cutaneum* R57 / ПА гранули и *A. awamori* NRRL3112 / ПА гранули при 1 g l⁻¹ фенол

Това още веднъж доказва високия биодеградативен капацитет на комбинираната имобилизирана система *T. cutaneum* R57 / ПА гранули и *A. awamori* NRRL3112 / ПА гранули и потенциалните и възможности за приложение при пречистване на отпадни води.

ИЗВОДИ

1. Проведена е химична имобилизация на клетки на щам *T. cutaneum* R57 върху ПА и ПАН мембрани и е определено, че количеството на свързаните клетки е: върху ПА мембрана – 1.4 mg cm^{-2} и върху ПАН мембрана – 1.8 mg cm^{-2} (суха биомаса).

2. Установено е, че имобилизираната система *T. cutaneum* R57 / ПАН мембрана усвоява до 1.0 g l^{-1} фенол за 48 часа, докато системата *T. cutaneum* R57 / ПА мембрана за 51 часа.

3. Определена е операционна стабилност на имобилизираната система *T. cutaneum* R57 / ПАН мембрана при биодegradация на 1 g l^{-1} фенол - ефективността на системата се запазва до 8-ми цикъл.

4. Проведена е химична имобилизация на клетки на щам *A. awamori* NRRL3112 върху ПАН мембрана и е определено, че количеството на свързаните клетки е 1.7 mg cm^{-2} , сухо тегло.

5. Установени са потенциалните възможности на имобилизираните клетки на *A. awamori* NRRL3112 върху ПАН мембрана да разграждат фенол с концентрация до 0.5 g l^{-1} за 60 часа (втори цикъл).

6. Постигната е висока операционна стабилност на имобилизираната система от щам *A. awamori* NRRL3112 върху ПАН мембрана при използване на биореактор със спирално навита мембрана - десет последователни цикли на биодegradация на 0.5 g l^{-1} фенол (5 g l^{-1} общо количество разграден субстрат за 33 дни).

7. Създадени са имобилизирани системи *T. cutaneum* R57 / ПА гранули и *A. awamori* NRRL3112 / ПА гранули и е определено, че количеството на свързаните клетки е - съответно 0.4834 g g^{-1} носител, и 0.3442 g g^{-1} носител (сухо тегло), а биодegradационното време за 0.5 g l^{-1} фенол - съответно 24 часа и 48 часа.

8. Доказано е, че смес от имобилизирани клетки на *T. cutaneum* R57 / ПА гранули и *A. awamori* NRRL3112 / ПА гранули притежава много по-голям биодegradационен капацитет спрямо фенол (до 1.5 g l⁻¹) в сравнение със самостоятелно действащите имобилизирани системи – до 1.2 g l⁻¹ при *T. cutaneum* R57 и до 0.5 g l⁻¹ при *A. awamori* NRRL3112.

9. При смесване на имобилизираните култури *T. cutaneum* R57 и *A. awamori* NRRL3112 в съотношение 1:4, биодegradацията протича по-бързо (44 часа) в сравнение с останалите изследвани съотношения 1:1 (72 часа) и 4:1 (73 часа).

10. Определено е, че общото количество биоразграден фенол е 9.5 g l⁻¹ за 31 дни при провеждане на 8 непрекъснати цикли за биодegradация на фенол с последователно нарастваща концентрация от 0.5 до 2 g l⁻¹ със смесени имобилизирани култури *T. cutaneum* R57 и *A. awamori* NRRL3112 в съотношение 1:4.

11. Установено е, че изследваните фенол и фенолни производни се подреждат в следния ред, в зависимост от степента им на усвояване от смес на имобилизираните щамове *Trichosporon cutaneum* R57 и *Aspergillus awamori* NRRL3112 в съотношение 1:4: Фенол > Бисфенол А > 2,4-ДХФ > 3-МФ > 3-ХФ > 2-ХФ > 4-ХФ > ХлФ > 4-НФ > ХК.

12. Изследвана е операционната стабилност на комбинираната имобилизирана система и е установено, че в рамките на 1000 часа (42 дни) са проведени 17 биодegradационни цикли на 1 g l⁻¹ фенол.

ОСНОВНИ ПРИНОСИ

1. Получени са пет нови имобилизирани системи: *T. cutaneum* R57 / ПА мембрана; *T. cutaneum* R57 / ПАН мембрана; *A. awamori* NRRL3112 / ПАН мембрана; *T. cutaneum* R57 / ПА гранули и *A. awamori* NRRL3112 / ПА гранули и са изследвани техните биодеградационни възможности спрямо фенол.

2. Доказано е, че смес от имобилизирани клетки на *T. cutaneum* R57 / ПА гранули и *A. awamori* NRRL3112 / ПА гранули притежава много по-голям биодеградационен капацитет спрямо фенол в сравнение със самостоятелно действащите имобилизирани системи.

3. Смесената система *T. cutaneum* R57 / ПА гранули и *A. awamori* NRRL3112 / ПА гранули е по-ефективна за разграждане на фенол при по-голямо съдържание на имобилизирани клетки на *A. awamori* NRRL3112 спрямо другия тип клетки.

4. Определен е следния ред на фенолни съединения, в зависимост от степента им на усвояване от смес на имобилизираните шамове *Trichosporon cutaneum* R57 и *Aspergillus awamori* NRRL3112 в съотношение 1:4:

Фенол > Бисфенол А > 2,4-ДХФ > 3-МФ > 3-ХФ > 2-ХФ > 4-ХФ > ХлФ > 4-НФ > ХК.

ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

Публикувани статии в реферирани журнали

1. Godjevargova T., Ivanova D., Aleksieva Z., **Burdelova G.** (2006) Biodegradation of phenol by immobilized *Trichosporon cutaneum* R57 on modified polymer membranes. *Process Biochemistry*. 41:(11), 2342–2346.
IF 2.008
2. **Yordanova G.**, Ivanova D., Godjevargova T., Krastanov A. (2009) Biodegradation of phenol by immobilized *Aspergillus awamori* NRRL 3112 on modified polyacrylonitrile membrane. *Biodegradation*. 20:(5), 717-726.
IF 1.873
3. **Yordanova G.**, Godjevargova T., Nenkova R., Ivanova D. (2013) Biodegradation of phenol and phenol derivatives by mixture of immobilized cells of *Aspergillus awamori* and *Trichosporon cutaneum*. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 27:(2), 3681-3688.
IF 0.76

Брой цитати – 14

Доклади на международни конференции с пълен текст в сборници

1. **Галина Йорданова**, Цонка Годжевъргова, Данка Иванова. (2011) Биодеградация на фенол и фенолни производни с имобилизирани клетки на *Aspergillus awamori* и *Trichosporon cutaneum* върху полиамидни гранули, Научни трудове на русенския университет. Том 50, серия 9,2.