

»Mladi za napredek Maribora 2016«

33. srečanje

Bioremediacija s kromom (VI) onesnaženih odpadnih vod s pomočjo kvasovk

Raziskovalno področje: **Varstvo okolja**

Raziskovalna naloga

Avtor: JERNEJ IMPERL

Mentor: KATJA HOLNTHANER ZOREC, ROK TKAVC

Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

Maribor, februar 2016

»Mladi za napredek Maribora 2016«

33. srečanje

Bioremediacija s kromom (VI) onesnaženih odpadnih vod s pomočjo kvasovk

Raziskovalno področje: **Varstvo okolja**

Raziskovalna naloga

Maribor, februar 2016

Kazalo vsebine

Kazalo vsebine	2
Kazalo slik.....	3
Kazalo grafov	4
Kazalo tabel.....	4
Povzetek	5
Zahvala	6
1 Uvod.....	7
1.1 Raziskovalno vprašanje	8
1.2 Hipoteze.....	8
2 Teoretično ozadje	9
2.1 Krom.....	9
2.3.1 Onesnaženost s kromom	9
2.3.1.1 Primeri onesnaženja po svetu	10
2.3.2 $K_2Cr_2O_7$	11
2.2 Bioremediacija kroma.....	12
2.2.1 Odziv vrste <i>Candida intermedia</i> na krom.....	12
2.3 Glive iz rodu <i>Candida</i>	13
2.1.1 <i>Candida intermedia</i>	14
2.1.2 <i>Candida parapsilosis</i>	15
2.1.3 <i>Candida tropicalis</i>	16
2.4 Klorometrična metoda za določanje kroma	16
3 Materiali in metoda dela.....	17
3.1 Materiali.....	17
3.1.1 Delovni mikroorganizmi	17
3.1.2 Zaščitna oprema	18

3.1.3 Kemikalije.....	18
3.1.4 Laboratorijski pribor	18
3.1.5 Laboratorijske aparature	19
3.2 Metoda dela	19
3.2.1 Priprava umeritvene krivulje.....	19
3.2.2 Priprava gojišč	20
3.2.2.1 Tekoče YEPD gojišče in priprava prekonočne kulture kvasovk.....	22
3.2.2.2 Bushnell Haas (BH) gojišče z dodano glukozo (BH + GLU).....	22
3.2.2.3 Priprava pH in koncentracije kroma.....	22
3.2.3 Nastavitev poskusa.....	23
3.2.4 Filtriranje gojišč in meritve količine kroma v mediju	24
3.2.5 Obdelava podatkov	25
4 Rezultati	26
4.1 Umeritvena krivulja.....	26
4.2 Rezultati eksperimenta	27
5 Razprava	30
5.1 Ocene in izboljšave metode.....	32
6 Zaključek.....	34
7 Družbena odgovornost	36
8 Viri in literatura.....	37
9 Priloge	41
9.1 Priloga 1: Dodatni eksperiment za spontano zmanjšanje kroma pri pH 7.....	41
9.2. Priloga 2: Grobi rezultati	43

Kazalo slik

Slika 1: Kalijev dikromat (wikipedia, 2007)	11
Slika 2: Kolonije kvasovk na trdnem YEPD gojišču (lasten vir).....	14

Slika 3: <i>Candida intermedia</i> pod elektronskim mikroskopom (Paš, <i>et al.</i> , 2004).....	15
Slika 4: <i>Candida parapsilosis</i> (Silva, <i>et al.</i> , 2011)	15
Slika 5: <i>Candida tropicalis</i> pod mikroskopom (lastni vir)	16
Slika 6: Prikaz delovanja spektrofotometra (shema prirejena po Vernier http://www.vernier.com/products)	17
Slika 7: Vzorci raztopin kroma po dodajanju difenilkarbazida in H_3PO_4 (lastni vir)	20
Slika 8: shema priprave vzorcev (lastni vir).....	23
Slika 9: Oprema pred začetkom cepljenja (lastni vir)	24
Slika 10: Oprema pred začetkom filtriranja (lastni vir)	25
Slika 11: Predlog modela čiščenja onesnažene vode s pomočjo biofilma (Shema prirejena po Center for biofilm Engineering, www.biofilm.montana.edu).....	34

Kazalo grafov

Graf 1: Umeritvena krivulja: absorbanca v odvisnosti od koncentracije $K_2Cr_2O_7$	26
Graf 2: Povprečne razlike v koncentraciji Cr (VI) med kontrolo in vzorci s kvasovkami pri različnem pH pri vrsti <i>Candida intermedia</i> (+/- 1 SD).....	28
Graf 3: Povprečne razlike v koncentraciji Cr (VI) med kontrolo in vzorci s kvasovkami pri različnem pH pri vrsti <i>Candida parapsilosis</i> (+/- 1 SD).....	28
Graf 4: Povprečne razlike v koncentraciji Cr (VI) med kontrolo in vzorci s kvasovkami pri različnem pH pri vrsti <i>Candida tropicalis</i> (+/- 1 SD).....	29
Graf 5: Povprečne razlike v koncentraciji Cr (VI) med kontrolo in vzorci s kvasovkami pri različnem pH: <i>Candida intermedia</i> , <i>Candida parapsilosis</i> in <i>Candida tropicalis</i> (+/- 1 SD)....	29
Graf 6: Primerjava koncentracij Cr (VI) z in brez avtoklaviranja medija.....	42

Kazalo tabel

Tabela 1: Sestava BH medija v prahu	22
Tabela 2: Umeritvena krivulja: absorbanca v odvisnosti od koncentracije $K_2Cr_2O_7$	26
Tabela 3: Vrednosti kontrole in povprečne razlike v koncentraciji Cr (VI) med kontrolo in vzorci s kvasovkami pri različnem pH	27
Tabela 4: Primerjava koncentracij CrV(VI) z in brez avtoklaviranja medija	41
Tabela 5: Grobi podatki za absorbanco in koncentracije Cr (VI) v mediju	43

Povzetek

Krom velja za enega najnevarnejših onesnaževalcev okolja. Predvsem v oksidativnem stanju Cr (VI) je bil že večkrat dokazan kot resna grožnja za naravo in tudi neposredno za človeka. Ker imajo dosedanje metode čiščenja Cr (VI) le delno uspešnost, se zanimanje usmerja predvsem k metodam čiščenja s pomočjo mikroorganizmov – bioremediaciji. V tej nalogi smo preučevali uspešnost kvasovk vrst *Candida intermedia*, *Candida parapsilosis* in *Candida tropicalis* pri odstranjevanju kroma iz odpadne vode pri različnih pH rednostih.

Po štirih dneh inkubiranja v tekočem mineralnem gojišču smo odkrili, da so bile vse tri vrste pri odstranjevanju podobno uspešne, predvsem v območju od pH 4 do pH 6, kjer so uspele odstraniti večino kroma, njihova učinkovitost pa je padla pri pH vrednosti 3 in 7. Izmed izbranih vrst se je najbolj izkazala *Candida tropicalis*, kar kaže na možnost njene uporabe pri reševanju okoljskih problemov.

Zahvala

Predvsem bi se rad zahvalil svojima mentorjema za podporo in vodstvo na teoretičnem in praktičnem področju in vse ure porabljene za ukvarjanje s to raziskovalno nalogo. Nalogo brez njune pomoči sam ne bi mogel privedi do konca.

Zahvaljujem se tudi laborantki, ki je pomagala pri izvedbi določenih delov eksperimentov. Poleg nje gre zahvala tudi profesorici kemije, ki je prispevala svoje teoretično znanje pri težavnejših kemijskih področjih.

Zahvalil bi se tudi rad šoli, ki je odstopila prostore, opremo in kemikalije, ki so bile potrebne za izvedbo naloge.

Na koncu gre zahvala tudi družini za stalno podporo.

Hvala!

1 Uvod

Onesnaženost vode in prsti s težkimi kovinami je aktualna okoljska problematika in ima resen vpliv na celoten ekosistem in posredno ter neposredno tudi na človeka. Ena izmed težkih kovin je tudi krom,, ki ga v ionski obliki (Cr (VI)) najdemo v odpadkih metalurške in kemične industrije ter pri strojenju, elektroplatanju in proizvodnji baterij (Bajgai, *et al.*, 2012). Zaradi njegovih številnih negativnih vplivov na okolje, in tudi neposredno na človeka, je bil leta 2000 na ameriški lestvici UESPA uvrščen kot druga najnevarnejša težka kovina (takoj za svincem), ki onesnažuje okolje (Horvat, 2009).

Krom se v naravi pojavlja v več oksidacijskih stanjih (0 -+6). Cr (VI) je znan je po svoji rakotvornosti. Močno poveča tveganje raka pljuč, ledvic in prebavil, ob direktnem stiku s kožo pa povzroči alergijske reakcije (Salnikow & Zhitkovich, 2007). Njegova toksičnost je primerljiva s cianidi, in naj bi bil stokrat bolj strupen kot Cr (III) (Bajgai, *et al.*, 2012). Za odstranjevanja Cr (VI) iz odpadnih voda in prsti se najpogosteje uporabljajo kemijske metode in fitoremediacija (s pomočjo rastlin). Zaradi učinkovitosti, cene in hitrosti pa je vse večje zanimanje tudi za bioremediacijo s pomočjo določenih vrst in združb mikroorganizmov (Devetak, *et al.*, 2011).

Raziskave so pokazale, da so določene vrste kvasovk odporne na visoke koncentracije Cr (VI) in so ga s pomočjo biokemijskih procesov zmožne pretvoriti v manj toksično obliko (Cr (III)), adsorbirati na celični steni ali kopičiti znotraj same celice (Ksheminska, *et al.*, 2002). Cr (III), je zaradi slabše topnosti tudi mnogo lažje odstraniti iz vode (Bajgai, *et al.*, 2012). *Candida intermedia* je eden izmed bolj raziskanih mikroorganizmov s področja odpornosti na Cr(VI) in bioremediacije s Cr (VI) onesnaženih okolij (Paš, *et al.*, 2004; Jamik & Raspor, 2003). Nekateri raziskovalci so dokazali, da je ta sposobnost prisotna tudi pri drugih vrstah rodu *Candida*, na primer pri vrstah *Candida tropicalis* in *Candida albicans* (Ho, *et al.*, 2012; Pepi & Baldi, 1992).

Namen te raziskovalne naloge je bil ovrednotiti uspešnost odstranjevanja Cr (VI) iz odpadnih vod v odvisnosti od pH vrednosti s pomočjo treh kvasovk iz rodu *Candida*: *C. tropicalis*, *C. intermedia* in *C. Parapsilosis*.. S to nalogo smo želeli prispevati k boljšemu razumevanju in iskanju učinkovitih načinov zmanjšanja onesnaženosti okolja s težkimi kovinami.

1.1 Raziskovalno vprašanje

Kakšno količino Cr (VI) zmorejo kvasovke vrst *Candida tropicalis*, *Candida intermedia* in *Candida parapsilosis* odstraniti iz tekočega medija v štirih dneh v odvisnosti od pH vrednosti?

1.2 Hipoteze

1. Vse tri vrste v poskusu uporabljenih kvasovk bodo uspešno zmanjšale koncentracijo Cr (VI) v tekočem mediju.

Na podlagi raziskav Paša (2004) in Jamnikove (2003) predvidevamo, da bo *Candida intermedia* odporna na Cr (VI) in bo uspešno znižala njegovo koncentracijo. Glede na to, da so podobne zmožnosti raziskovali tudi pri drugih vrstah rodu *Candida* (Ho, et al., 2012; Pepi & Baldi, 1992) pa predvidevamo, da bodo rezultati podobni tudi pri *C. tropicalis* in *C. parapsilosis*.

2. pH medija bo pomembno vplival na učinkovitost zniževanja koncentracije Cr (VI). Vse tri vrste kvasovk bodo najbolj učinkovito odstranjevale krom (VI) pri pH vrednostih nižjih od 7.

Glive iz rodu *Candida* lahko uspevajo v zelo širokem razponu pH vrednosti. *Candida tropicalis* uspešno raste med pH 3,5 in 6,6 (California, 2014), Paš (2004) in Jamnikova (2003) sta kot optimalno pH vrednost gojišča navedla pH 4.

2 Teoretično ozadje

2.1 Krom

Krom (Cr) je element, ki se v periodnem sistemu nahaja v šesti skupini in četrty periodi. Čisti krom je sijoče srebrna, a krhka kovina, vendar so njegove spojine pogosto zelo živih barv – od tod tudi ime (gr. Chromos – barva).

Najpogosteje se pojavlja v oksidacijskih stanjih od 0 do +6, vendar sta predvsem na področju onesnaženosti največ pozornosti pritegnila Cr (VI) in Cr (III). Cr (III) je eden od »elementov v sledeh« potrebnih za metabolizem določenih organizmov. Čeprav je bil dokazan za neesencialnega pri sesalcih, igra vlogo v metabolizmu glukoze in lipidov pri človeku, ki pa žal še ni bila podrobno raziskana (Bona, *et al.*, 2011; Jamik & Raspor, 2003; Stearns, 2008). Pri prekomernem zaužitju Cr (III) je možno opaziti njegov negativen vpliv na DNK, kar je pri normalnih pogojih skrajno neverjetno, in pri zmernem uživanju njegove koristi kot hranilo pretehtajo teoretično tveganje (Eastmond, *et al.*, 2008; Paš, *et al.*, 2004). Znano je, da so nekateri mikroorganizmi zmožni Cr (VI) iz okolja reducirati v manj toksično obliko Cr (III) (Volesky, 1990).

Cr (VI), ki je močan oksidant, velja za kancerogenega in splošno nevarnega. Močno poveča tveganje pljučnega raka, kadar vstopi v telo preko vdihanega zraka, poleg pljuč pa so ranljive tudi ledvice in prebavila. Topne spojine so sicer manj kancerogene, a so še vedno nevarne. Ob direktnem stiku s kožo povzroči tudi alergijske reakcije (Salnikow & Zhitkovich, 2007). Zaradi podobnosti sulfatov in kromatov v naboju in elektronski strukturi Cr (VI) celico vstopi preko transportnega sistema za žveplo (Shi, *et al.*, 1994). Zaradi oksidativnih lastnosti lahko prodre skozi celično membrano in povzroča poškodbe tkiva (Jamik & Raspor, 2003). Njegova škodljivost je bila ocenjena na nivoju cianidov in je tisočkrat bolj mutagen od Cr (III) in se od slednjega zaradi boljše topnosti v vodi tudi lažje premika (Bajgai, *et al.*, 2012).

2.3.1 Onesnaženost s kromom

Viri Cr (III) v tleh so navadno umetna gnojila, apnenec in živalski gnoj, viri Cr (VI) pa insekticidi in fungicidi. Krom iz odplak se običajno nabira v blatu. Cr (III) je iz blata (in

drugih vzorcev) možno razmeroma lahko v celoti odstraniti, Cr (VI) pa zgolj 26-48%. Ostala prizadeta območja so med drugim okolica izgorevanja premoga (pepel vsebuje veliko količino Cr), cestišča (iz avtomobilskih zavornih sistemov), ter pa tudi podtalnica (spiranje prsti) (Horvat, 2009). Količina Cr (VI) v površinski vodi je sicer odvisna od različnih dejavnikov (na primer pH) tja pa pride preko odplak jeklarske, usnjarske, lesne in tekstilne industrije. Onesnaženje s kromom velja za enega najnevarnejših in ga je leta 2000 ameriška organizacija za zaščito okolja (UESPA) razglasila za drugo najpogostejšo onesnaževalno težko kovino, takoj za svincem (Horvat, 2009).

2.3.1.1 Primeri onesnaženja po svetu

V Sloveniji je edino resneje s kromom onesnaženo območje na Jesenicah, vzrok pa je najverjetneje povezan z bližnjim odlagališčem odpadkov in železarsko industrijo. Nasplošno veljajo Jesenice za eno izmed najbolj s težkimi kovinami onesnaženih slovenskih mest (Oprčkal, 2013; Gorišek, 2011). Kritična količina Cr (VI) v tleh v Sloveniji, ki sledi evropskim smernicam, znaša 25 mg/kg suhe prsti, medtem ko je mejna koncentracija v odpadnih vodah za celotni krom 0,5 mg/L in 0,1 mg/L za Cr (VI) (uradni list republike Slovenije).

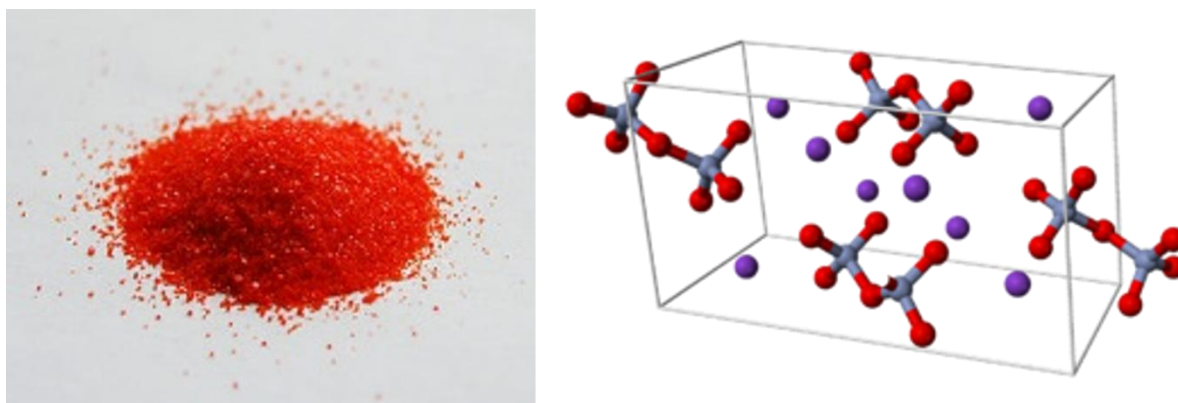
Poznani pa so tudi veliko bolj drastični primeri onesnaženosti s kromom. Leta 2011 je v Avstraliji v tovarni eksplozivov Orica v Newcastlu prišlo do nenadzorovanega izpusta kroma - naenkrat je bilo izpostavljenih 20 tamkajšnjih delavcev in bližnje naselje s 70 stanovanjskimi skupnostmi (Tovey, 2011). Podoben dogodek beležijo tudi v Iraku, kjer so bili leta 2003 v obratu za prečiščevanje vode Qarmat Ali številni delavci in pa tudi tuji obiskovalci izpostavljeni Cr (VI) (Gonzales, 2008).

V ZDA je leta 2010 potekala raziskava, ki je proučevala čistost vodovodne vode v 35 mestih različnih zveznih držav izmed katerih je bila pri 31 odkrita izmerljiva raven Cr (VI). 25 mest, z mestom Norman v Oklahomi na čelu, je celo presevalo takratno predlagano mejno vrednost. Na podlagi nadaljnjih raziskav načrtujejo uvedbo natančnih omejitev za posamezne oblike kroma.

V grški podtalnici, predvsem na območjih Evboje in na jugovzhodu Peloponeza, je bila odkrita visoka raven Cr (VI) v podtalnici, ki je ponekod celo presegala grške in evropske omejitve (do 80 $\mu\text{g/L}$ Cr (VI)). Onesnaženost s kromom je na teh območjih povezana z močno industrijsko dejavnostjo v zadnjih 40 letih (Vasilatos, *et al.*, 2008).

2.3.2 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Kalijev dikromat (Slika 1) je pogost vodotopen anorganski kemijski reagent, najpogosteje rabljen kot oksidant, čeprav je zaradi vsebnosti Cr (VI) akutno in kronično škodljiv zdravju. Pri sobni temperaturi je svetlo rdeče barve, sipek, kristali so najpogosteje drobni. Zaradi higroskopnosti, zmožnosti vezave vlage, je še uporaben pri določenih kemijskih reakcijah (Anger, in drugi, 2000)



Slika 1: Kalijev dikromat: (levo) pri sobnih pogojih; (desno) model zgradbe (wikipedia, 2007)

Običajno ga pridobivajo se ga z reakcijo med kalijevim kloridom (KCl) in natrijevim dikromatom ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), kjer poleg njega nastane še natrijev klorid (NaCl).

2.2 Bioremediacija kroma

Mikroorganizmi igrajo pomembno vlogo pri bioremediaciji kroma. Razne vrste gliv, bakterij in alg so znane po odpornosti na visoke koncentracije kroma in so sposobne redukcije, adsorbcije in/ali akumulacije, s čimer ga naredijo manj toksičnega. Natančno delovanje teh mehanizmov je zaenkrat manj raziskano (Bajgai, *et al.*, 2012; Jamik & Raspor, 2003). Ena od verjetnih možnosti zajema vmesno reduciranje Cr (VI) v Cr (V) s pomočjo raznih reducentov, kot na primer NAD(P)H, FADH₂ in glutationa, ki pa se nato dalje reducira v zaenkrat še neznanah reakcijah (Jamik & Raspor, 2003).

Med glavnimi procesi, ki postavljajo omenjene mikroorganizme na mesto kandidatov za bioremediacijo, sta bioadsorbcija (pasivno absorbiranje določene snovi iz okoliškega medija in vezanje le-tega na celične strukture) in adsorbcija (vezanje snovi na strukture na zunanosti celice) (Jamik & Raspor, 2003; Paš, *et al.*, 2004; Volesky, 1990). Cr (VI) absorbiran ali adsorbiran v mikroorganizmih je torej imobiliziran in verjetnost neposrednega stika z drugimi organizmi je manjša. Tak krom lahko z odstranitvijo mikroorganizmov, v katerih se nahaja, s pomočjo filtrov ali drugih metod popolnoma odstranimo iz narave.

2.2.1 Odziv vrste *Candida intermedia* na krom

Jamnikova (2003) je v svoji raziskavi glivo *Candida intermedia* izpostavila različnim koncentracijam kroma (0.05, 0.1, 0.3 in 0.5 mM) iz kalijevega dikromata in opazila večjo intenziteto metabolizma, kar je povezano s stresnim odzivom celice. Predvsem pri koncentraciji 0,1 mM je opazila povečevanje količine glutationa, ki je očitno igral pomembno vlogo pri obrambi. Povečana sinteza glutationa, pomembnega antioksidanta v glivah in drugih organizmih, predvsem pri obrambi pred težkimi kovinami, se ujema z dejstvom, da je Cr (VI) močan oksidant (Pompella, *et al.*, 2003).

Paš pa je s sodelavci (2004) predstavil vpliv Cr (VI) in Cr (III) na morfologijo posameznih celic glive *Candida intermedia*. Cr (VI) ni imel opaznega vpliva na morfologijo celic. Dokazali so tudi, da celica Cr (VI) bistveno hitreje in intenzivneje absorbira, s kot Cr (III). Najverjetneje je to posledica pogostoti pojavljanja Cr (VI) v biološko ugodnejših spojinah. Cr (VI) lahko skozi celično membrano preide v notranjost celice v obliki kromatov (CrO₄²⁻) ali

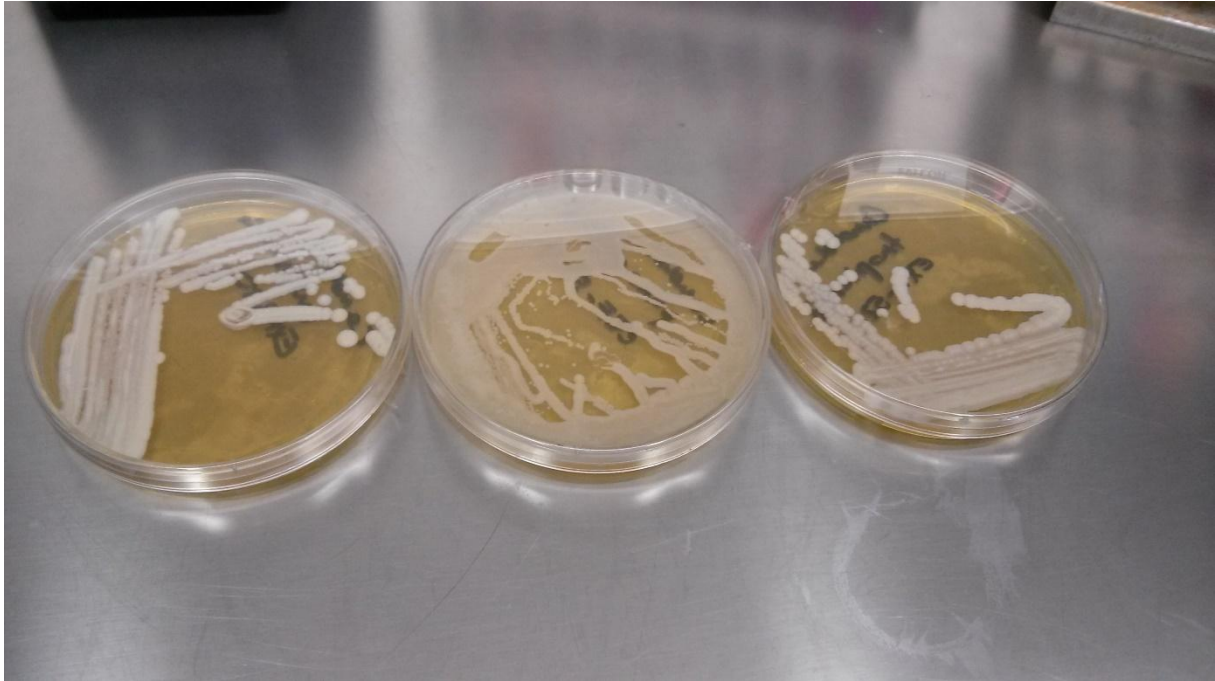
bikromatov (CrO_7^{2-}) in sicer skozi mehanizme, namenjene podobno zgrajenim anionom (SO_4^{2-} , PO_4^{3-}), čeprav tudi ta proces še ni temeljito preučen.

Rezultati te raziskave so pokazali, da se krom v veliki večini (70%) nabere v protoplastih celice, preostanek (21%) pa je vezan na celično steno, ali pa je šibkeje pritrjen in se je pri centrifugiranju vzorcev spral s celice (9%).

2.3 Glive iz rodu *Candida*

Candida je rod kvasovk, ki zajema približno 283 raznovrstnih vrst. Celice se, kot je značilno za glive, povezujejo v hife oziroma pseudohife (Slika 4, 5), lahko pa jih najdemo tudi v obliki kvasovk (Slika 3). Tvorba hif oziroma pseudohif je odvisna od vrste (Silva, Negri, Henriques, Oliveira, Williams, & Azeredo, 2011). Pogostejše pseudohife nastajajo s celično-delitvijo, kjer hčerinske celice ostanejo pritrjene na matično celico brez vmesnih celičnih sten (septe), medtem ko prave hife nastajajo z jasnim deljenjem razvejane hife v posamezne celice. Večina jih je zmožna metabolizma glukoze in maltoze.

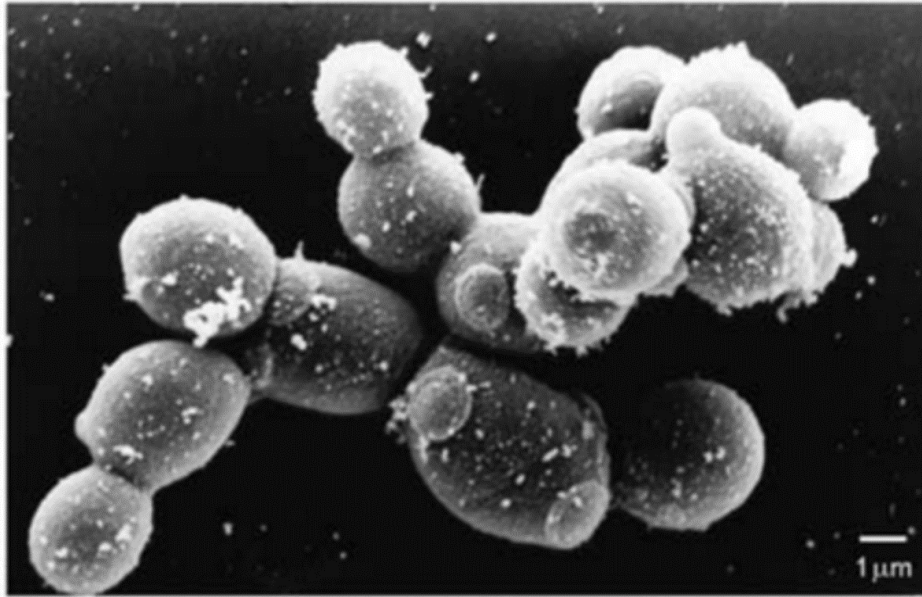
Vrste iz rodu *Candida* so znane predvsem kot povzročiteljice kandidoz, čeprav je le manjšina v resnici nevarna (Silva, *et al.*, 2011). Mnoge vrste so človeški in živalski simbionti. Kandidoza je glivična bolezen (mikoza), ki jo povzročajo glive rodu *Candida* in se pojavi le v primeru oslabiljenega imunskega sistema osebe. Povzročitelj 80% vseh kandidoz je *Candida albicans*, ki povzroča bolezenske spremembe na območju sluznice različnih organov, najpogosteje v ustni votlini, žrelu, požiralniku, popku, črevesju, sečniku ali nožnici, kjer je sicer del običajne mikrobiote (Ryan & Ray, 2014; EOL, 2012). Z izjemo vrste *Candida albicans* je rod *Candida* slabo raziskan, vendar se zaradi naraščanja števila bolnikov z AIDS-om raziskave usmerjajo tudi na druge vrste (Silva, *et al.*, 2011). Približno 65% gliv rodu *Candida* se ni sposobna razmnoževati in rasti pri temperaturah višjih od 37 °C, kar jim med drugim preprečuje, da bi bile resnejša grožnja človeku (Silva, *et al.*, 2011).



Slika 2: Kolonije kvasovk (z leve proti desni) *Candida intermedia*, *Candida parapsilosis* in *Candida tropicalis* na trdnem YEPD gojišču (lasten vir)

2.1.1 *Candida intermedia*

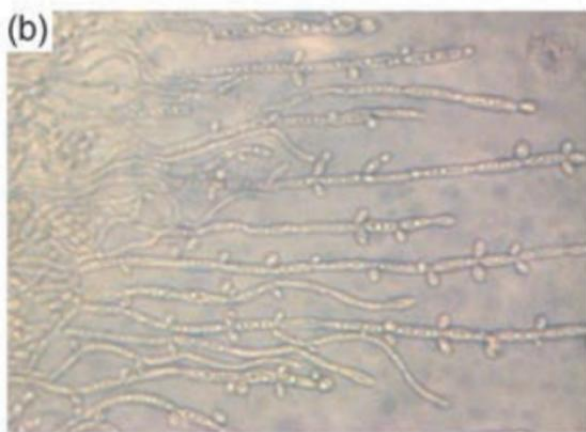
Candida intermedia se najpogosteje oblikuje v pare ali manjše skupinice celic. Celice so lahko okrogle ali rahlo podolgovate, v povprečju velike od 3 do 5 μm (Slika 3). Izmed kvasovk uporabljenih v tej nalogi, je bila na vrsti *Candida intermedia* izvedena podrobna raziskava (Jamik & Raspor, 2003) vpliva Cr (VI) in Cr (III) v različnih spojinah na morfologijo in biokemijsko aktivnost celice.



Slika 3: *Candida intermedia* pod elektronskim mikroskopom (Paš, et al., 2004)

2.1.2 *Candida parapsilosis*

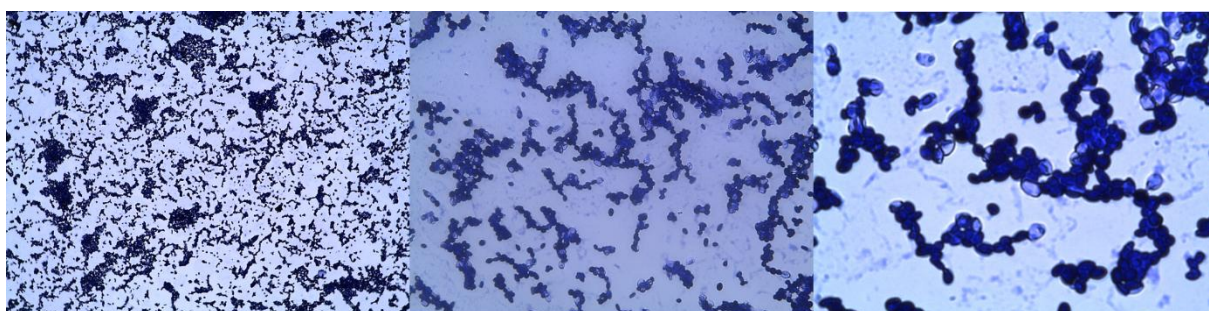
Candida parapsilosis je nezmožna tvoriti prave hife, ampak so njene pseudohife lahko nenavadno velike in so si s tem prislužile vzdevek »orjaške celice« (ang. giant cells) po mnenju Silve in sodelavcev (2011). Posamezne celice so drugače rahlo podolgovate oblike, od 2,5 do 4 μm v ožjem in do 9 μm v širšem delu (Slika 4). *Candida parapsilosis* je v zadnjem času postala pogost povzročitelj sepse in infekcij pri osebkih z oslabljenim imunskim sistemom. V naravi jo lahko najdemo tudi v mikrobioti hišnih živali in žuželkah ter v prsti (Segal, et al., 1996).



Slika 4: *Candida parapsilosis* (Silva, et al., 2011)

2.1.3 *Candida tropicalis*

Candida tropicalis se je v določenih raziskavah pojavljala kot prave hife v drugih pa kot pseudohife. Velika je navadno 4–8 x 9–11 μm v podolgovati ali okrogli obliki (Slika 5). Njena posebna značilnost je, da je za razliko od večine kandid zmožna tudi metabolizma saharoze. Poleg vrste *Candida albicans* je pogosta tudi v človeškem krvnem obtoku, drugače pa uspeva tudi v prsti, vodi in na listih rastlin. Najbolje uspeva pri temperaturi 37 °C (nekateri sevi tudi pri 40 °C ali 42 °C) in pri pH-ju 3,5-6,6 (California, 2014).



Slika 5: *Candida tropicalis* pod mikroskopom: (z leve proti desni) 100 x povečava, 400 x povečava, 1000 x povečava (lastni vir)

2.4 Klorometrična metoda

Za merjenje koncentracije kroma v vzorcih smo uporabljali klorometrično (spektrofotometrično) metodo. Metodo smo povzeli po seznamu metod za pregledovanje vod ameriške zveze za javno zdravje (American-Public-Health-Association, 2015). Temelji na pojavu, kjer molekule ali ioni določene snovi absorbirajo za njih značilne valovne dolžine vidne ali ultravijolične svetlobe. Ob prehodu svetlobe skozi kiveto z vzorcem se določeni deli spektra absorbirajo v obarvani snovi, kar pa naprava zazna kot razliko v oddani začetni in prejeti končni svetlobi (Slika 6). Na podlagi dobljenega podatka lahko nato izračunamo transmitanco (prepustnost) - torej koliko svetlobe je prešlo skozi vzorec - oz. absorbanco - koliko svetlobe je vzorec vsrkal. Snov, ki jo želimo izmeriti, prelijemo v kivete najprej pa je

spektrofotometer potrebno kalibrirati z vzorcem, ki vsebuje vse razen določene snovi, ki jo želimo meriti.



Slika 6: Prikaz delovanja spektrofotometra (shema prirejena po Vernier <http://www.vernier.com/products>)

Da lahko na podlagi absorbance izračunamo koncentracijo naše snovi, potrebujemo umeritveno krivuljo. Umeritvena krivulja je graf absorbance v odvisnosti od koncentracije snovi, dobimo pa ga tako, da v naprej pripravimo niz koncentracij, ki jim izmerimo absorbanco. Ko bomo želeli izmeriti neznano koncentracijo snovi v vzorcu, bomo po obratni poti iz grafa umeritvene krivulje odčitali, kateri koncentraciji pripada izmerjena absorbanca.

3 Materiali in metoda dela

3.1 Materiali

3.1.1 Delovni mikroorganizmi

Pri delu smo uporabili sledeče mikroorganizme, ki smo jih prejeli iz Uniformed Services University of the Health Sciences:

- *Candida intermedia* (sev MD1152)
- *Candida parapsilosis* (sev MD1154)

- *Candida tropicalis* (sev MD 1316)

Vsi sevi so nepatogeni (Biosafety level 1).

3.1.2 Zaščitna oprema

- Zaščitna halja (Lauffenmühle)
- Zaščitne rokavice za enkratno uporabo (Sogeva)
- Zaščitna očala (3M)

3.1.3 Kemikalije

- $K_2Cr_2O_7$ v prahu (Merck)
- Destilirana voda
- Pepton (Difico)
- Glukoza (Fluka Analytical)
- Bushnell Haas Broth (Sigma Aldrich)
- Kvasni ekstrakt (Fluka Analytical)
- Difenilkarbazid (raztopina 10 g/L v acetonu)
- H_3PO_4 (Merck)
- HCl (1 M)
- NaOH (4%)

3.1.4 Laboratorijski pribor

- Epruvete (16X160 mm)
- Majhne epruvete (12X100 mm)
- Kovinski pokrovčki za epruvete
- Erlenmajerice (50 mL, 100 mL, 200 mL)
- Merilne bučke (50 mL, 200 mL)
- Čaše (80 mL, 200 mL, 1000m mL)
- Steklene palčke

- Merilni valj (50 mL)
- Plastične pipete
- Avtomatske pipete (Transferpipette, 10 – 100 μ L, 100 – 1000 μ L, 1 – 100 mL) in sterilni nastavki
- Stojala za epruvete
- Injekcijska brizgalka (20 mL)
- Filtrirni nastavki za brizgalke (Xtra PTFE - 20/13, premer por 0,2 μ m)
- Kivete (Semi mikro, Ratiolab)
- Mikrobiološka zanka

3.1.5 Laboratorijske aparature

- Vibracijski mešalnik (RS-VA10, Phoenix Instrument)
- Prenosni računalnik s programsko opremo Logger Pro
- Inkubator (Binder; nastavljen na 30°C)
- Avtoklav (CertoClav CVEL 12 LGS (LGA, Nurnberg))
- Prenosni gorilnik (Campaingaz)
- Elektronska tehtnica (Kern, z natančnostjo 0,001 g)
- Spektrofotometer (Vernier)
- Merilec pH (Vernier)
- Mikrobiološka zaščitna komora - laminarij (MC-NC, Iskra PIO)

3.2 Metoda dela

3.2.1 Priprava umeritvene krivulje

Pred začetkom dela s kvasovkami smo pripravili umeritveno krivuljo za Cr (VI), ki smo jo kasneje uporabljali pri izračunu koncentracije kroma v končnih vzorcih. Za umeritveno krivuljo smo izbrali raztopine Cr (VI) koncentracij 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM, 0,8 mM, in 1,0 mM. Pripravili smo 20 mM začetne raztopine $K_2Cr_2O_7$, iz katere smo nato z redčenjem z BH + GLU (recept zapisan pri poglavju »3.2.2 priprava gojišč«) gojiščem v 50 mL bučkah pridobili niz koncentracij, od katerih smo odmerili po 9 mL. Odmerkom izbranih

koncentracij smo nato dodali 0,7 mL raztopine difenilkarbazida (DPC) (10 g/L v acetonu) in raztopino H_3PO_4 (25%) in pustili 20 minut, da je potekla reakcija med reaktanti in Cr (VI) ioni in se je tvoril obarvan kompleks, potreben za merjenje absorbance Cr (VI). Za kalibracijo spektrofotometra smo uporabili BH + GLU gojišče z ustrežno količino difenilkarbazida in H_3PO_4 .

Absorbanco obarvanega kompleksa med difenilkarbazidom in Cr (VI) smo merili pri 540 nm (Reyes–Gutiérrez, *et al.*, 2009). Podatek pri posameznih koncentracijah smo vrisali v graf in s pomočjo programa Excel izračunali enačbo krivulje: $y = 0,5829 \cdot \ln(x) + 2,0086$, s katero smo pri obdelavi podatkov pretvarjali iz absorbance v koncentracijo.



Slika 7: Vzorci raztopin kroma po dodajanju difenilkarbazida in H_3PO_4 (lastni vir)

3.2.2 Priprava gojišč

Pri tej raziskovalni nalogi smo uporabljali dve vrsti gojišč: tekoče YEPD gojišče in tekoči BH medij z dodatkom glukoze (BH + GLU). YEPD gojišče smo uporabili kot hranljiv medij za prekonočno kulturo, ki omogoča ugodne razmere za hitro razmnoževanje kvasovk. BH + GLU medij pa smo izbrali zaradi njegove natančno definirane kemijske strukture, ki omogoča boljšo ponovljivost poskusa, ~~kot pa~~ in tudi večjo predvidljivost kar se tiče morebitnih

kemijskih reakcij. Poleg tega je to gojišče dokaj revno in, če odštejemo glukozo, še najbolj spominja na naravne razmere.

3.2.2.1 Tekoče YEPD gojišče in priprava prekončne kulture kvasovk

YEPD gojišče smo pripravili po standardnem receptu, ki ga je opisal Atlas (1993, povzeto po Pohar (2006)):

- Kvasni ekstrakt: 2,5 g
- Glukoza: 5 g
- Pepton: 5 g
- Destilirana voda: do 250 mL

Sestavine smo v čaši med mešanjem segrevali, dokler se niso raztopile. Tekoče gojišče smo nato razdelili v erlenmajerice, pokrili s folijo in sterilizirali v avtoklavu (15 minut pri 121 °C). V aseptičnih pogojih (laminarij) smo v ohlajena sterilna tekoča gojišča iz osnovnih kultur na trdni podlagi prenesli vse tri kulture kvasovk, dobro premešali in za 48 ur inkubirali pri 30°C.

3.2.2.2 Bushnell Haas (BH) gojišče z dodano glukozo (BH + GLU)

Bushnell Haas Broth (BH) medij z dodatkom glukozе smo pripravili po naslednjem receptu:

- Gojišče v prahu BH: 3,25 g
- Glukoza: 10,0 g
- Destilirana voda: do 1000 mL

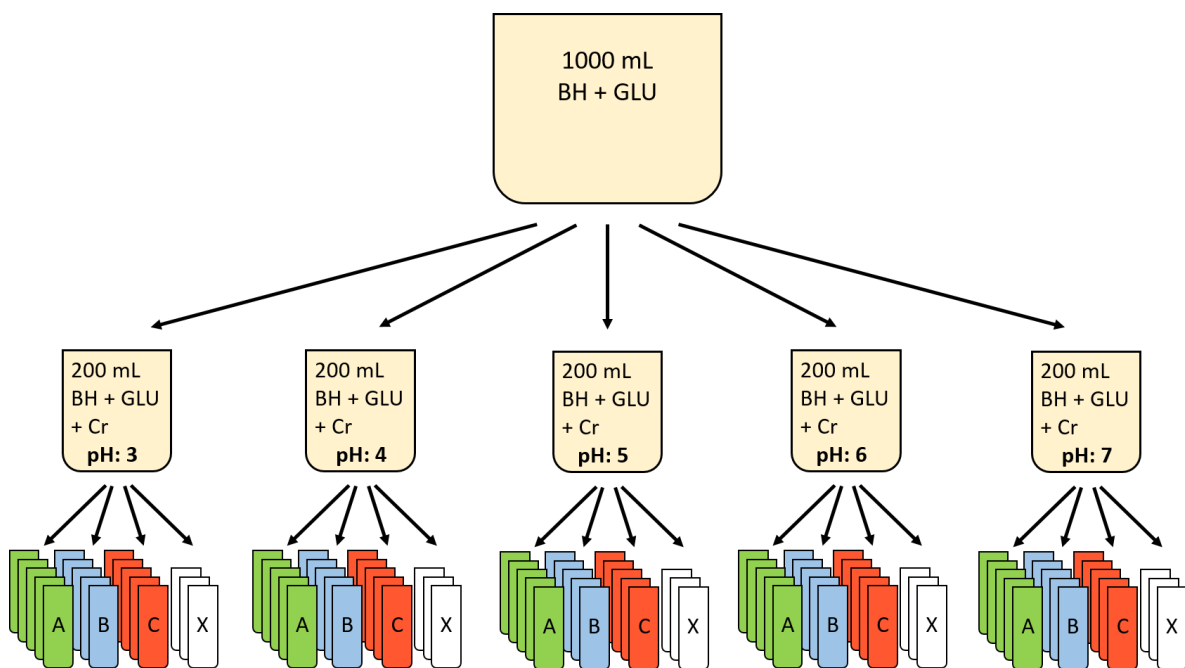
Tabela 1: Sestava BH medija v prahu

Sestavina	g/L
Magnezijev sulfat	0,20
Kalcijev klorid	0,02
Kalijev fosfat	1,00
Dikalijev fosfat	1,00
Amonijev nitrat	1,00

Naštete sestavine smo v čaši dobro premešali, dokler se niso raztopile.

3.2.2.3 Priprava pH in koncentracije kroma

Pripravljeno BH + GLU gojišče smo razdelili v pet 200 mL čaš. V vsaki čaši smo nato z dodajanjem 1 M raztopine HCl, 4% NaOH in sprotnim merjenjem pH nastavili želen pH vrednosti od 3 do 7. Po odmerjanju pH smo v vsako čašo s kapalko dodali 5,13 mL 20 mM raztopine $K_2Cr_2O_7$ ter tako v vsaki čaši dobili 0,5 mM koncentracijo kalijevega dikromata oz. 1,00 mM koncentracijo Cr (VI) ionov. Pri tem smo predpostavili aditivnost volumnov, ki bi naj bila pri tako majhnih koncentracijah zanemarljiva. To koncentracijo smo izbrali na podlagi objavljenih raziskav (Jamik & Raspor, 2003; Paš, *et al.*, 2004; Bajgai, *et al.*, 2012). Vsebino posamezne čaše smo razdelili med 18 epruвет, v vsako po 8 mL. Vseh 90 epruвет smo nato pokrili s pokrovčki in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

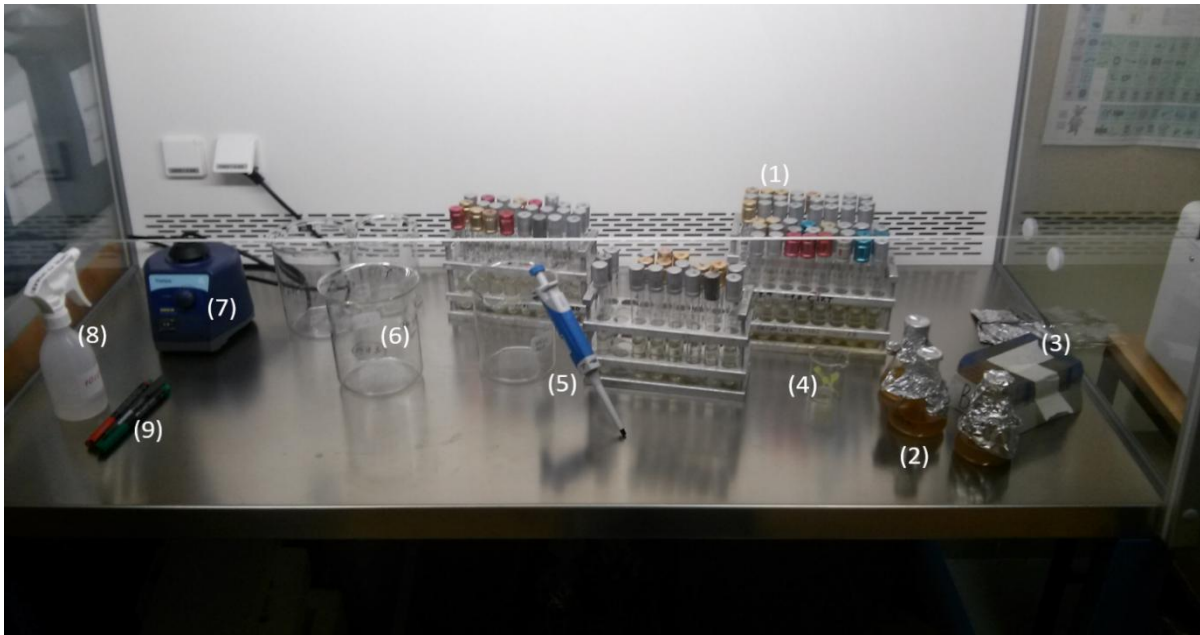


Slika 8: Shema priprave vzorcev: A = *Candida intermedia*; B = *Candida parapsilosis*; C = *Candida tropicalis*; X = kontrola (lastni vir)

3.2.3 Nastavitev poskusa

Prekonočne kulture kvasovk smo dobro premešali, da so se celice enakomerno razporedile po gojišču. V vsako epruветo s sterilnim BH + GLU medijem smo s pomočjo avtomatske pipete prenesli po 0,1 mL kulture kvasovk in vsako premešali z vibracijskim mešalnikom. Po tri epruветe posamezne pH vrednosti smo pustili brez kvasovk (kontrola) (Slika 9). Vse epruветe

smo nato za štiri dni dali v inkubator na 30 °C, vsak dan smo vsebino epruвет premešali z vibracijskim mešalnikom.



Slika 9: Oprema pred začetkom cepljenja: (1) = pripravljena BH + GLU gojišča s kromom in nastavljenim pH; (2) = prekonočne kulture s kvasovkami; (3) = pripravljeno sterilni nastavki za avtomatsko pipeto; (4) = čaša za zbiranje odpadnih nastavkov; (5) = avtomatska pipeta; (6) = čaše za shranjevanje epruвет med avtoklaviranjem in inkubacijo; (7) = vibracijski mešalnik; (8) = etanol za razkuževanje; (9) = alkoholni flomastri za označevanje epruвет (lastni vir)

3.2.4 Filtriranje gojišč in meritve količine kroma v mediju

Po štirih dneh smo vsebino epruвет ponovno dobro premešali in jo nato z brizgami s filtrirnimi nastavki prefiltrirali v plastične kozarčke (s tem smo odstranili glivne celice), od koder smo nato z avtomatsko pipeto odmerili 3 mL, ki smo jih prelili v manjše epruветe.



Slika 10: Oprema pred začetkom filtriranja: (1) = epruvete z vzorci po štirih dneh; (2) = pripravljenih 90 manjših epruvel; (3) = posoda s filtrirnimi nastavki in injekcijske brizge; (4) = plastični kozarci za prečrpavanje filtrata (lastni vir)

Filtratom v v posamezni epruveti smo dodali po 0,23 mL difenilkarbazida in 1,33 mL raztopine H_3PO_4 ter po 20 minutah dosegli vijolično obarvanje. Vsebino vsake epruvete smo nato prelili v kivete in s pomočjo spektrofotometra, kalibriranega z čistim gojiščem, izmerili absorbanco vsakega vzorca. Vzorce, preostanek raztopin kroma in odpadne filtre smo obravnavali kot okolju nevarne odpadke in jih odložili na ustrezno mesto.

3.2.5 Obdelava podatkov

Na podlagi izmerjenih absorbanco pri umeritveni krivulji smo s programom Excel, s katerim smo obdelovali naše podatke, izračunali enačbo logaritemske krivulje: $y = 0,5829 \cdot \ln(x) + 2,0086$. S to enačbo smo kasneje preračunavali absorbanco filtratov v koncentracije kromovih ionov. Če enačbo obrnemo, tako da bomo z njo lahko pretvarjali podatke absorbanco v koncentracijo dobimo: $x = e^{((y-2,0086)/0,5829)}$.

Po pretvorbi podatkov iz absorbanco v koncentracijo smo posamezne vrednosti odšteli od povprečja kontrole pri ustreznem pH. Dobljenim razlikam smo izračunali povprečje in standardni odklon (SD).

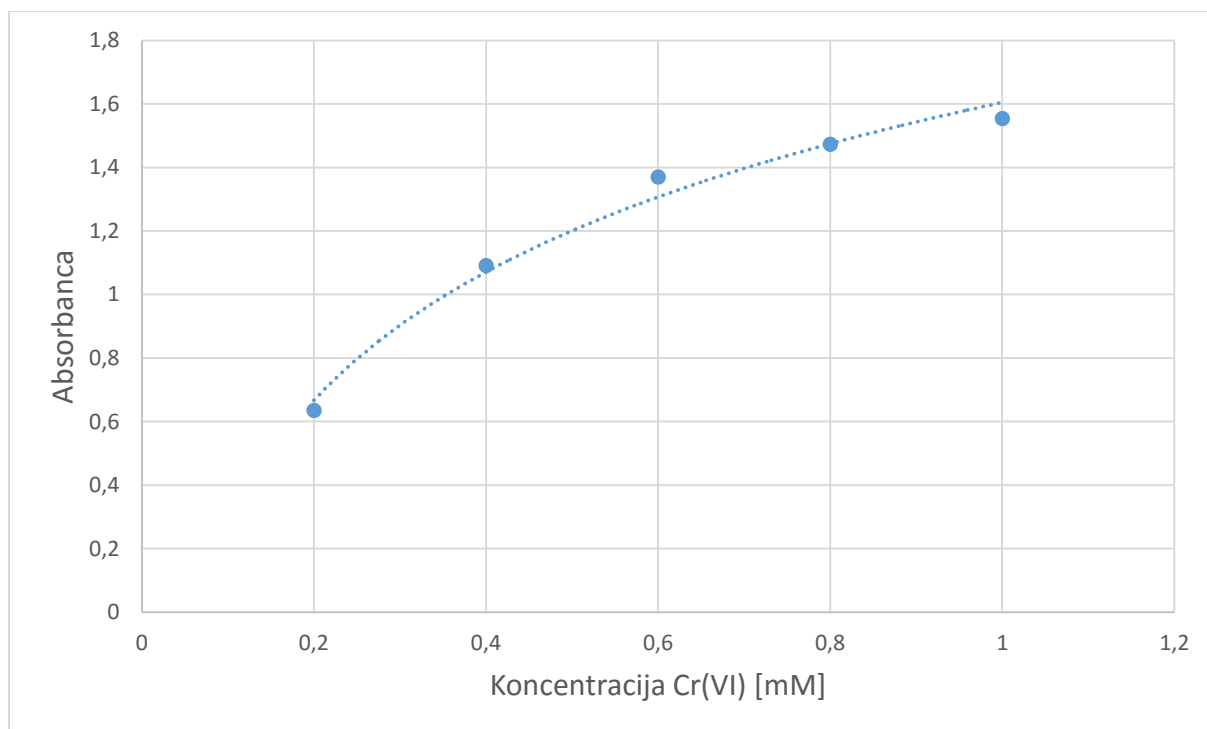
4 Rezultati

4.1 Umeritvena krivulja

Pri merjenju absorbance pri vzorcih 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 in 0,5 mM raztopine $K_2Cr_2O_7$ smo dobili naslednje rezultate (Tabela 2, Graf 1):

Tabela 2: Umeritvena krivulja: absorbanca v odvisnosti od koncentracije $K_2Cr_2O_7$

Koncentracija $K_2Cr_2O_7$ [mM]	Absorbanca
0,1	0,635
0,2	1,091
0,3	1,370
0,4	1,473
0,5	1,554



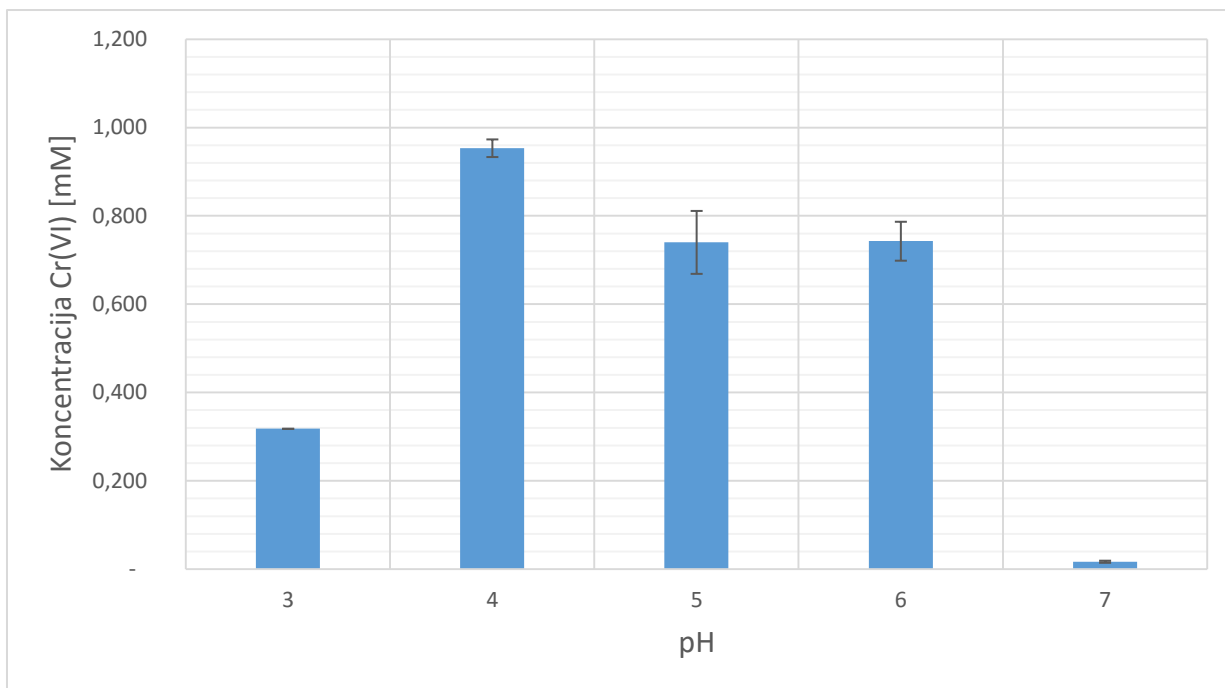
Graf 1: Umeritvena krivulja: absorbanca v odvisnosti od koncentracije $K_2Cr_2O_7$

4.2 Rezultati eksperimenta

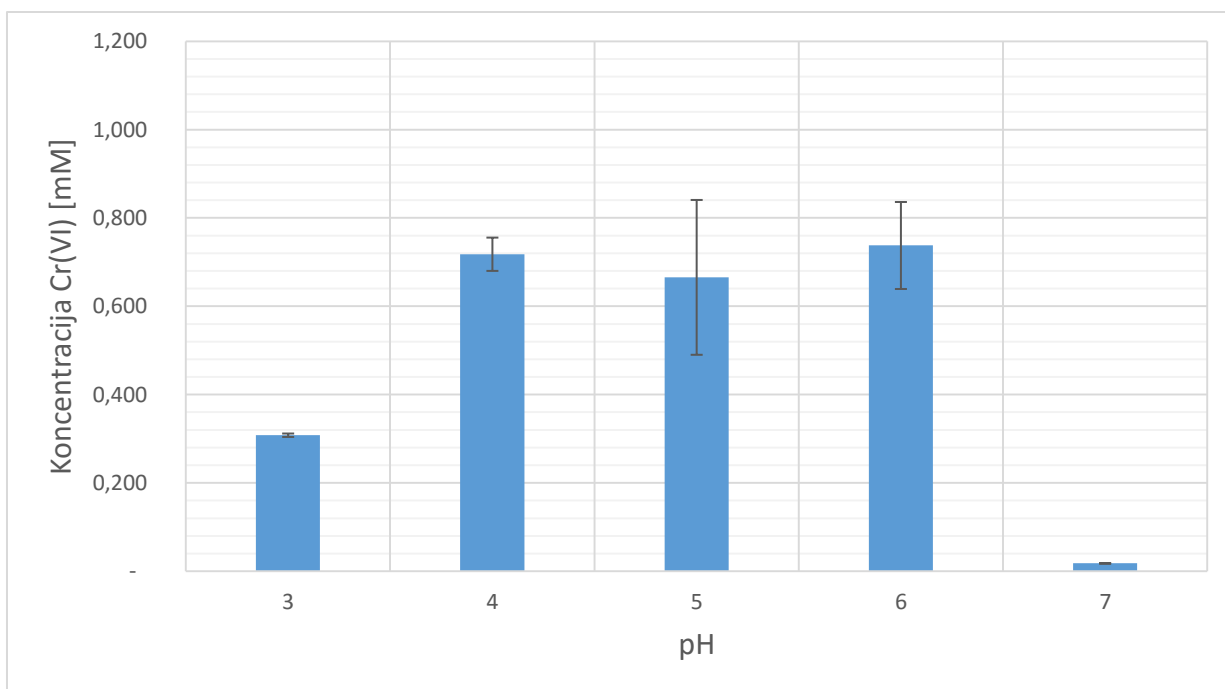
Po meritvah, opisanih pri metodi dela, smo izmerjene vrednosti absorbance preračunali v koncentracijo Cr (VI) v enotah mM. Nato smo od koncentracij v kontrolnem mediju (brez kvasovk) odšteli koncentracije iz medija s kvasovkami in tako dobili podatek koliko kroma so kvasovke odstranile iz gojišča pri posameznih pH (Tabela 3, Graf 2, 3, 4).

Tabela 3: Vrednosti kontrole in povprečne razlike v koncentraciji Cr (VI) med kontrolo in vzorci s kvasovkami pri različnem pH

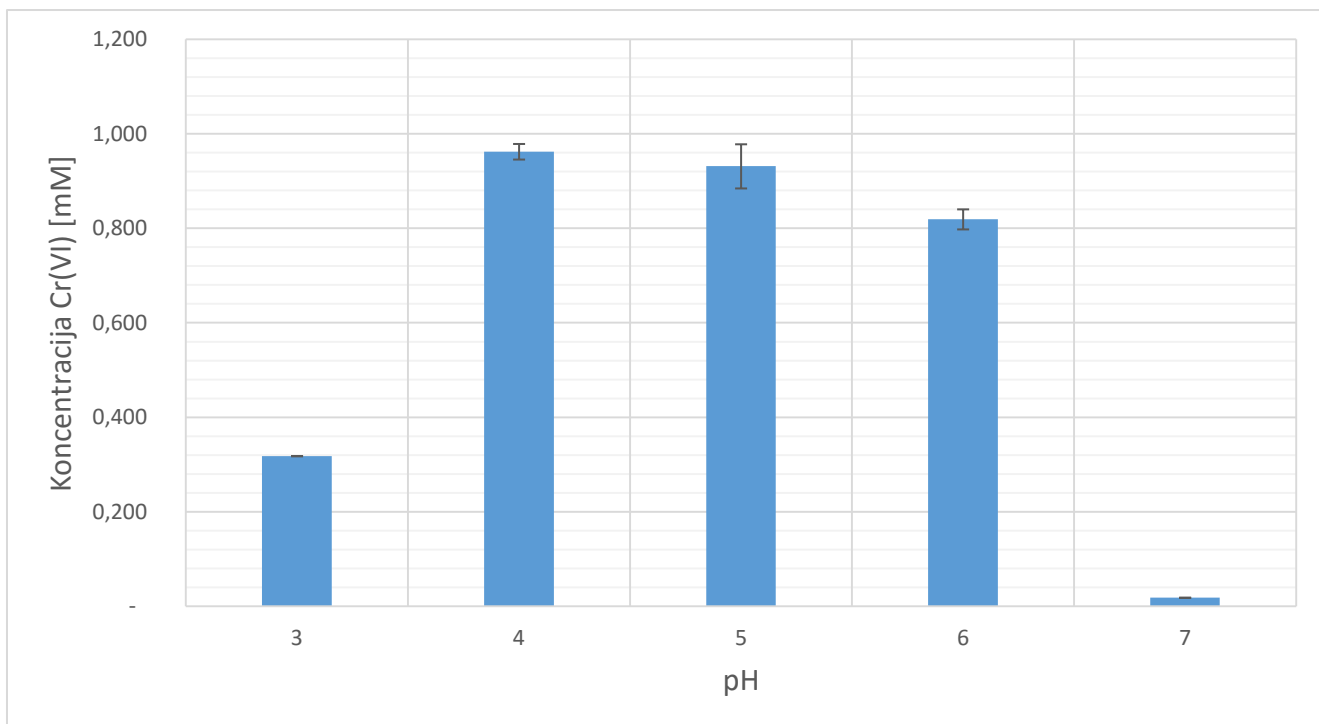
Vrsta kvasovke	Koncentracija Cr (VI) v mediju [mM] po končanem eksperimentu					
		pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
Kontrola (brez kvasovk)	Povprečje	0,350	1,025	1,052	0,947	0,051
	Standardna deviacija	0,032	0,012	0,043	0,011	0,004
Razlika pri <i>Candida intermedia</i>	Povprečje	0,318	0,953	0,740	0,743	0,017
	SD	0,000	0,020	0,071	0,044	0,002
Razlika pri <i>Candida parapsilosis</i>	Povprečje	0,308	0,718	0,666	0,738	0,018
	SD	0,004	0,038	0,175	0,098	0,001
Razlika pri <i>Candida tropicalis</i>	Povprečje	0,318	0,962	0,931	0,819	0,018
	SD	0,000	0,016	0,047	0,021	0,000



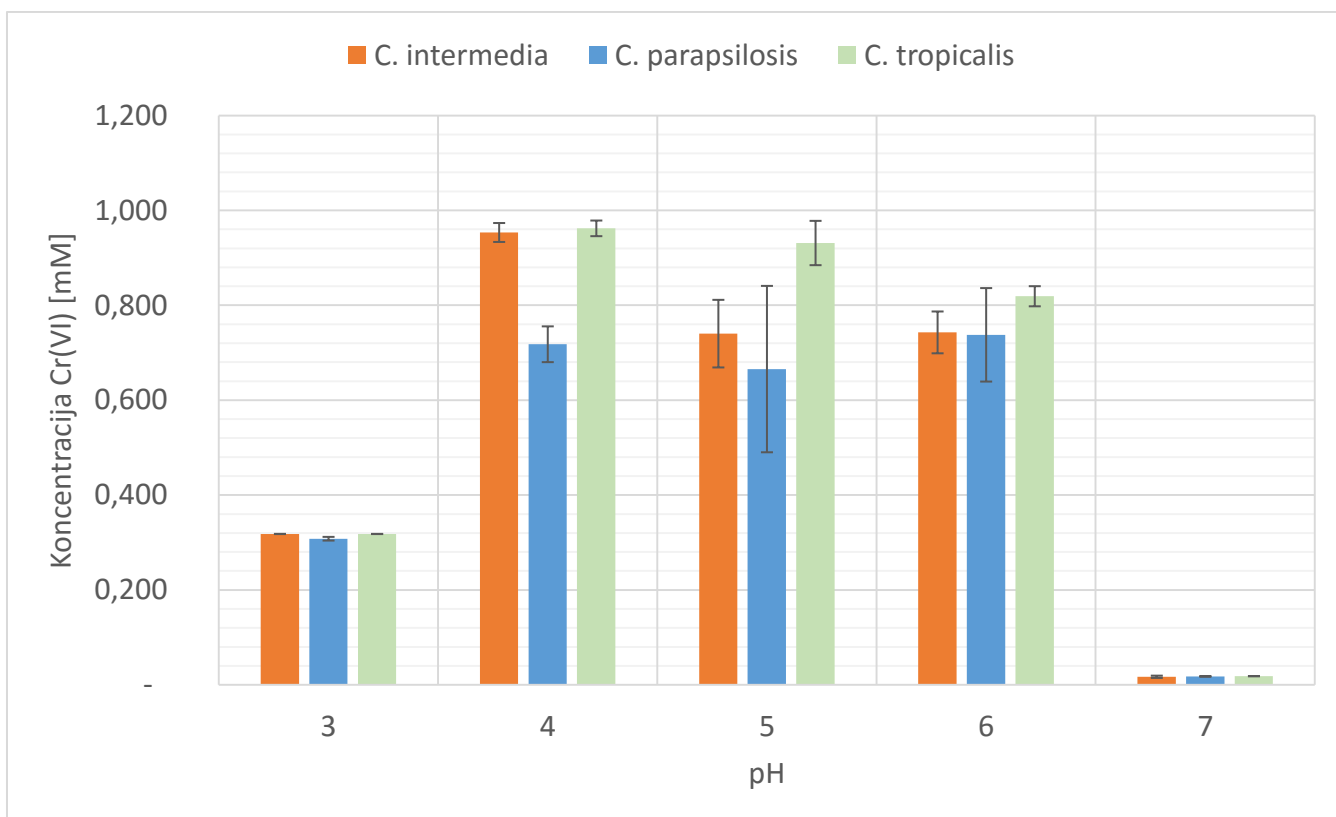
Graf 2: Povprečne razlike v koncentraciji Cr (VI) med kontrolo in vzorci s kvasovkami pri različnem pH pri vrsti *Candida intermedia* (+/- 1 SD)



Graf 3: Povprečne razlike v koncentraciji Cr (VI) med kontrolo in vzorci s kvasovkami pri različnem pH pri vrsti *Candida parapsilosis* (+/- 1 SD)



Graf 4: Povprečne razlike v koncentraciji Cr (VI) med kontrolo in vzorci s kvasovkami pri različnem pH pri vrsti *Candida tropicalis* (+/- 1 SD)



Graf 5: Povprečne razlike v koncentraciji Cr (VI) med kontrolo in vzorci s kvasovkami pri različnem pH: *Candida intermedia*, *Candida parapsilosis* in *Candida tropicalis* (+/- 1 SD)

5 Razprava

V raziskovalni nalogi smo preučevali uspešnost gliv *Candida intermedia*, *Candida parapsilosis* in *Candida tropicalis* pri odstranjevanju Cr (VI) iz tekočega BH + GLU medija pri pH vrednostih 3-7. Vse tri izbrane kvasovke so v gojitvenem mediju znižale koncentracijo Cr (VI), kot lahko vidimo na grafih 3-5. Najučinkovitejše so bile predvsem v območju od pH 4 do pH 6, kjer je *Candida tropicalis* pri pH 4 odstranila do 0,96 mM od začetne 1,00 mM koncentracije Cr (VI), medtem ko je pri pH 3 in pH 7 učinkovitost odstranjevanja kroma iz medija pri vseh treh manjša.

Prvo hipotezo, kjer smo predvidevali, da bodo vse v poskusu uporabljene vrste kvasovk sposobne odstranjevati krom, lahko potrdimo. Med kontrolo in medijem so opazne razlike pri vseh treh kvasovkah. Izkazalo se je celo, da so bile v nekaterih primerih izjemno uspešne – *Candida tropicalis* je pri pH 4 zmanjšala začetno 1 mM koncentracijo Cr (VI) kar za 0,96 mM. Zaradi relativno majhnega števila ponovitev težko govorimo o zanesljivih razlikah med posameznimi vrstami kvasovk. Pri pH 4 je kljub temu jasno razvidno, da sta bili vrsti *Candida intermedia* in *Candida tropicalis* učinkovitejši od vrste *Candida parapsilosis* (Graf 5). Ti rezultati se tudi skladajo z ugotovitvam Paša in sodelavcev (2004), ki so v svoji raziskavi navedli, da *Candida intermedia* velja za zelo učinkovito pri adsorpciji kroma. Izstopanje lahko razberemo tudi pri pH 5, kjer vidimo, da je *Candida tropicalis* uspešnejša pri odstranjevanju Cr (VI) iz medija kot drugi dve vrsti (Graf 5), drugje pa so vrednosti preveč podobne, da bi lahko govorili o zanesljivih razlikah med njimi.

Na podlagi raziskav (Jamik & Raspor, 2003; Paš, *et al.*, 2004) lahko predvidimo možne razloge za zmanjšanje kroma v gojitvenem mediju. Vezava kroma na zunanost celice (adsorpcija) je bila zagotovo prisotna, saj so to v primeru vrste *Candida intermedia* pri enakih pogojih kot v našem eksperimentu (pH 4 in 1 mM koncentracija Cr (VI)), dokazali Paš in sodelavci (2004). Predvidevamo, da so podobni procesi potekali tudi pri vrsti *Candida tropicalis*, saj predvidevamo, da je zgradba celične stene, na katero se vežejo Cr (VI) ioni, pri vseh treh vrstah Candide podobna. Pri adsorpciji gre za pasivno vezavo kromovih ionov na strukturo na zunanosti celice, vendar pa s kemijskega vidika ti procesi še niso dobro poznani. V svoji raziskavi je Paš s sodelavci (2004) odkril, da je vezan Cr (VI) na celici razporejen večinoma v protoplastih in v celični steni. Po poskusu so kvasovke tudi izpirali ter pokazali,

da je krom vezan na omenjen način ostal pritrjen na celico, kar potrjuje, da je adsorbcija poglavitnega pomena pri bioremediaciji kroma.

Ob adsorbciji lahko pride tudi do absorbcije, torej spuščanje kroma v notranjost celice in vezanje na notranje celične strukture. Paš v svoji raziskavi, ki je sicer pozornost posvečala predvsem adsorbciji kroma, omenja tudi možnost prehoda Cr (VI) skozi membrano celice. Negativno nabite spojine Cr (VI) lahko izkoristijo transportne mehanizme, sicer namenjene žveplovim in fosforjevim anionom, saj zaradi podobne zunanje zgradbe lahko »pretentajo« beljakovine, ki nadzorujejo prehod snovi (Muter, *et al.*, 2001; Paš, *et al.*, 2004). Ob prisotnosti kroma znotraj celice se zaradi za celico nevarne oksidativnosti Cr (VI) sproži vrsta obrambnih mehanizmov, ki s sproščanjem antioksidantov, kot na primer glutationa, poskušajo zmanjšati škodljivost oksidanta samega in prostih radikalov, katerih nastanek povzroči (Jamik & Raspor, 2003). Uspešnost teh mehanizmov nato določa odpornost organizma na Cr (VI).

Naslednji možen razlog za zmanjšanje Cr (VI) v celici je tudi redukcija. Znano je, da so določeni organizmi zmožni reducirati krom, vendar pa konkretni mehanizmi še niso bili pojasnjeni, predvideva se le, da se v določenem koraku v reduciranju nastane Cr (V), ki se bi naj nato dalje reduciral (Muter, *et al.*, 2001; Jamik & Raspor, 2003; Volesky, 1990). Končna stopnja redukcije je Cr (III), ki je za delovanje celice bistveno manj škodljiv. Reduciranje Cr (VI) v Cr (III) je tudi zelo uporaben pristop pri bioremediaciji kroma, saj je Cr (III) manj nevaren okolju in ga je zaradi slabše topnosti s standardnimi metodami lažje odstraniti (Volesky, 1990; Horvat, 2009).

Našo drugo hipotezo lahko deloma potrdimo. Pričakovali smo, da bodo kvasovke višek učinkovitosti pri odstranjevanju kroma iz okolja dosegle pri pH 4, vendar to drži le za vrsto *Candida intermedia* (Graf 2), ki je pri tem pH medija pri odstranjevanju kroma precej bolj učinkovita kot pri ostalih vrednostih. Za vrsto *Candida parapsilosis* lahko ugotovimo, da med pH 4, pH 5 in pH 6 ni pomembnih razlik v učinkovitosti pri odstranjevanju Cr (VI), pri vrsti *Candida tropicalis* pa sta pH 4 in pH 5 nekoliko ugodnejša kot pH 6.

Naše ugotovitve se ujemajo s podatki iz literature (Paš, 2004), kjer so glivo *Candida intermedia* gojili v mediju s pH vrednostjo 4, da bi dosegli njeno najvišjo učinkovitost. Za drugi dve vrsti kvasovk žal nismo zasledili podobnih raziskav. Optimalno območje delovanja

kvasovk iz rodu *Candida* je pri pH vrednostih med 3,5 in 6,6 (California, 2014), kar se sklada z območjem, kjer so bile kvasovke v našem poskusu najuspešnejše pri odstranjevanju Cr (VI) iz medija.

Pri obravnavanju rezultatov smo opazili, da je že v kontroli (seriji brez kvasovk) viden drastičen padec koncentracije Cr (VI) pri pH 7. Zato pri tem pH tudi razlike med začetno in končno koncentracijo kroma pri vzorcih s kvasovkami toliko manjše in sklepi o dejanski učinkovitosti kvasovk manj zanesljivi. Za razjasnitev možnega vzroka za takšno razliko smo po končanem delu naredili še dodaten eksperiment, kjer smo ponovili kontrolo pri pH 7, le da smo gojišče namesto avtoklaviranja sterilizirali s filtriranjem. Predvidevali smo, da je najverjetnejši vzrok za zmanjšanje Cr (VI) spontana redukcija, povzročena zaradi visokih temperatur in tlakov prisotnih pri avtoklaviranju. Rezultati dodatnega eksperimenta (Priloga 1) so pokazali, da ima avtoklaviranje očitno močan vpliv na stabilnost Cr (VI) in bi bilo morda bolj smiselno vzorce v glavnem eksperimentu samo filtrirati.

5.1 Ocene in izboljšave metode

Večjo zanesljivost rezultatov bi dosegli, če bi izvedli več ponovitev pri vsakem pogoju, kar pa je povezano v veliko večjo porabo materiala in bi bilo tudi zaradi zamudni postopkov zelo dolgotrajno. Prostorske, materialne in časovne možnosti nam tega žal niso dopuščale.

Izboljšali bi lahko tudi gojitvene pogoje za kvasovke s tem, da bi poskus izvajali v posodah večjih volumnov (erlenmajerice), z dovajanjem kisika in s stalnim stresanjem, ki omogoča mešanje gojišča in večja dostop kvasovk do hranil in preprečuje usedanje kvasovk na dno posode.

Rezultati dodatnega eksperimenta (Priloga 1) so pokazali, da bi bila filtracija gojišča boljši način sterilizacije kot avtoklaviranje, saj bi s tem preprečili spontano redukcijo kroma in ohranili izhodiščno oziroma željeno koncentracijo kroma v gojitvenem mediju. Iz tega razloga bi bilo smiselno ponoviti predvsem del poskusa pri pH 3 in pH 7, kjer je prišlo do največjega zmanjšanja koncentracije kromovih ionov že pri kontroli. Preizkusili bi lahko tudi delovanje kvasovk pri ostalih pH vrednostih (pH 1, 2 in v območju nad 7).

Tekom pripravljanja BH + GLU medija smo $K_2Cr_2O_7$ dodali šele po razporeditvi gojišča v manjše čaše namenjene določanju pH. Večkratno merjenje je možen vir napak in mogoče bi se jim bilo izogniti, če bi raztopino kroma dodali gojišču pred deljenjem v čaše. Poleg tega smo $K_2Cr_2O_7$ dodali že pripravljenemu gojišču, saj smo predpostavljali aditivnost volumnov. Napaka povzročena zaradi tega je teoretično zanemarljiva, saj gre za majhne koncentracije, bilo pa se ji bi tudi težko izogniti, saj smo pripravljali v glavnem velike količine gojišča, kjer je sicer natančnejši način pripravljanja raztopin - z dopolnjevanjem topila do želene količine, potem ko je topljenec oziroma začetna raztopina že dodana – manj natančen in težko izvedljiv.

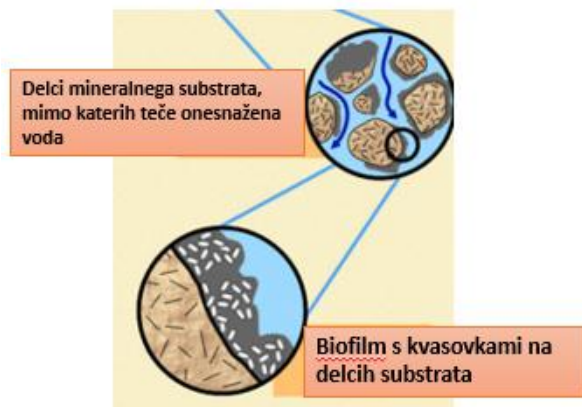
V raziskovalni nalogi nas je zanimala predvsem uspešnost izbranih kvasovk pri odstranjevanju kroma iz okolja in temu primerno smo nastavili kontrolo za vsak pH brez kvasovk, da lahko ugotovimo točno koliko so vplivale kvasovke. Glede na to, da nismo pri kontrolah v koncentraciji kroma pričakovali nobenih sprememb ali nihanj, smo zaradi pomanjkanja materiala nastavili za vsak pH le tri ponovitve, medtem ko smo za vsako kvasovko imeli pet ponovitev za vsak pH. Večjo natančnost predvsem pa zanesljivost bi dosegli, če bi imeli tudi pri kontrolah več ponovitev.

Nalogo bi lahko nadgradili s preizkušanjem tudi višjih koncentracij Cr (VI) in večjega razpona pH vrednosti ter podrobnega raziskovanja kaj se zgodi s kromom (ali gre za redukcijo, absorbcijo ali adsorbcijo).

Čeprav načeloma ni popolnoma povezano z našim raziskovalnim vprašanjem, bi bilo morda smiselno v eksperiment vključiti še kakšno vrsto mikroorganizma, za katerega bi vedeli, da na krom ni odporen. Tako bi lahko konkretno primerjali uspešnost izbranih kvasovk z alternativami in bi lahko bolje sklepali o njihovih dejanskih prednostih.

Sklenemo lahko, da imajo kvasovke iz rodu *Candida* dober potencial pri reševanju problema onesnaženosti s Cr (VI), ki bi ga bilo vredno dodatno raziskati in preizkusiti v naravnem okolju. Pozornosti raziskovalcev bi se morala usmeriti tudi k raziskavam biofilmov, znanih po svoji odpornosti na ekstremne razmere. Harrison in sodelavci (2006) so z in vitro poskusi dokazali, da so biofilmi glive *Candida tropicalis* tudi do 65 krat bolj odporni na škodljive vplive težkih kovin, kot planktonske populacije iste vrste. V taki obliki bi lahko glive delovale

pri mnogo višjih koncentracijah kromovih ionov, hkrati pa bi bile pritrjene na delce substrata in jih ne bi odplavilo ter tako ne bi predstavljale potencialne grožnje za okolje (Harrison, *et al.*, 2006).



Slika 11: Predlog modela čiščenja onesnažene vode s pomočjo biofilma (Shema prirejena po Center for biofilm Engineering, www.biofilm.montana.edu)

6 Zaključek

V tej nalogi je bil naš cilj raziskati učinkovitost kvasovk vrst *Candida intermedia*, *Candida parapsilosis* in *Candida tropicalis* pri odstranjevanju Cr (VI) iz okolja pri različnih pH. V ta namen smo izbrane glive izpostavili Cr (VI) v obliki $K_2Cr_2O_7$ in po štiridnevni inkubaciji v BH + GLU gojišču izračunali razliko v kontrolni in končni koncentraciji. V danem času so kvasovke uspele odstraniti precejšen delež kroma iz gojitvenega medija in se pokazale kot učinkovito bioremediacijsko sredstvo predvsem v območju med pH 4 – 6.

Vse vrste kvasovk pri posameznem pH enako učinkovite, a če bi opazovali le povprečne vrednosti, bi bila *Candida tropicalis* izmed vseh najučinkovitejša, saj je pri pH 4 je v povprečju odstranila kar 0,96 mM Cr (VI) iz začetne 1,00 mM raztopine..

V tem območju so v povprečju uspele odstraniti od 0,66 do 0,96 mM kroma kar potrjuje njihov potencial kot učinkovit način čiščenja Cr (VI) iz vode. Sicer se njihova učinkovitost začne zmanjševati pri pH 3 in pH 7, kar pa predstavlja oviro pri praktični uporabnosti, saj bi to zelo omejilo pogoje, v katerih bi jih lahko izkoristili do njihovega polnega učinka.

Drug faktor, ki jih naredi nekoliko manj privlačne za širšo uporabo je njihova potencialna patogenost. Nadaljnjo raziskovanje uporabnosti rodu *Candia* bi bilo smiselno usmeriti v iskanje kvasovke, ki bi bila učinkovita pri odstranjevanju kroma ter tudi čim manj človeku nevarna. *Candida tropicalis* in *Candida parapsilosis*, ki sta bili v eksperimentu uspešni na žalost sodita med ene najnevarnejših gliv rodu *Candida*.

Čeprav je morda rod *Candida* neprimeren za bioremediacijo, je raziskovanje tega področja vseeno dragoceno za razumevanje procesov, ki mikroorganizmom omogočajo odpornost na krom in odkrivanje novih načinov za čiščenje Cr (VI) iz narave.

7 Družbena odgovornost

Tema naše raziskovalne naloge in pridobljeni rezultati se navezujejo na osnovna načela družbene odgovornosti. Naloge smo se lotili družbeno odgovorno, saj se zavedamo problematike obremenjevanja narave in človekovega okolja z različnimi onesnažili in tudi splošne nevarnosti Cr (VI) za človeka in ostala živa bitja.

Eno izmed načel družbene odgovornosti je tudi etično obnašanje, kjer se mora družba in posameznik zavzemati za druge ljudi, živali in okolje. Številni primeri brezobzirnega industrijskega napredka pa kažejo veliko brezbržnost do sočloveka in narave in ne mine dan, da ne bi mediji poročali o različnih okoljskih katastrofah. Tudi pri iskanju virov smo se srečali z opisi številnih primerov grobih posegov v naše okolje. Z našo raziskovalno nalogo smo želeli —ustvariti majhen prispevek k razvijanju skupne odgovornosti za naše okolje, prispevek za izboljšanju stanja na tem področju in širitvi znanja s področja bioremediacije kroma, ki zadnje čase dobiva vse več pozornosti.

8 Viri in literatura

1. American-Public-Health-Association, 1999. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. [Elektronski]
Available at: http://www.mwa.co.th/download/file_upload/SMWW_1000-3000.pdf
[Poskus dostopa 16 1 2016].
2. American-Public-Health-Association, 2015. *Bioaccumulation*. [Elektronski]
Available at: <http://toxics.usgs.gov/definitions/bioaccumulation.html>
[Poskus dostopa 14 12 2015].
3. Anger, G. in drugi, 2000. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. s.l.:Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
4. Bajgai, R. C., Georgieva, N. & Lazarova, N., 2012. Bioremediation of chromium ions with filamentous. *Journal of Biology*, pp. 70-75.
5. Bona, K. R. in drugi, 2011. Chromium is not an essential trace element for mammals: effects of a "low-chromium diet. *ournal Biological Inorganic Chemistry*.
6. California, T. R. o. t. U. o., 2014. *Viticulture & Enology: Yeast and Mold*. [Elektronski]
Available at: <http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/>
7. Devetak, B. in drugi, 2011. *BIOLOGIJA V GIMNAZIJI - IZBIRNI DEL*. prva ured. Ljubljana: DZS.
8. Eastmond, D. A., MacGregorb, J. T. & Slesinskic, R. S., 2008. Trivalent Chromium: Assessing the Genotoxic Risk of an Essential Trace Element and Widely Used Human and Animal Nutritional Supplement. *Critical Reviews in Toxicology*, pp. 173-190.
9. EOL, 2012. *Encyclopedia of Life: Candida*. [Elektronski]
Available at: <http://www.eol.org/pages/32103/details>
10. Gonzales, J., 2008. *Indiana Guardsmen Sue KBR Over Chemical Exposure in Iraq*. [Elektronski]
Available at:
http://www.democracynow.org/2008/12/4/indiana_guardsmen_sue_kbr_over_chemical
1
[Poskus dostopa 21 1 2016].
11. Gorišek, V., 2011. *Strokovno mnenje glede nevarnosti za zdravje otrok, ki se igrajo na igriših*. Jesenice: s.n.

12. Harrison, J. J. in drugi, 2007. Metal Ions May Suppress or Enhance Cellular Differentiation in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 4940-4949.
13. Harrison, J. J. in drugi, 2006. Metal resistance in *Candida* biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, pp. 479-491.
14. Horvat, A., 2009. *Vsebnost kroma v poljščinah in tleh onesnaženih z usnjarskimi odpadki*, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za živilstvo.
15. Ho, Y. C. in drugi, 2012. *InTech: Industrial Discharge and Their Effect to the Environment*. [Elektronski]
Available at: <http://www.intechopen.com/books/industrial-waste/industrial-emissions-and-theireffect-on-the-environment>
16. Jamik, P. & Raspor, P., 2003. Stress Response of Yeast *Candida intermedia* to Cr(VI). *J BIOCHEM MOLECULAR TOXICOLOGY*, pp. 316-322.
17. Koch, W., 2010. *Study: Tap water in U.S. cities has probable carcinogen*. [Elektronski]
Available at: http://content.usatoday.com/communities/greenhouse/post/2010/12/tap-water-of-many-us-cities-has-probable-carcinogen-study/1#.VrPMa_nhCM8
[Poskus dostopa 21 1 2016].
18. Ksheminska, H. in drugi, 2002. Bioremediation of chromium by the yeast *Pichia guilliermondii*. *Microbiological research*, pp. 59-67.
19. Lidell, H. G. & Scott, R., brez datuma *An intermediate Greek-English lexicon*. [Elektronski]
Available at:
http://www.perseus.tufts.edu/hopper/text?doc=Perseus%3Atext%3A1999.04.0058%3Aalphabetic+letter%3D*a%3Aentry+group%3D1
[Poskus dostopa 24 11 2015].
20. Muter, O., Patmalnieks, A. & Rapoport, A., 2001. Interrelations of the yeast *Candida utilis* and Cr (VI): metal reduction and its distribution in the cell and medium. *Process Biochemistry*, pp. 963-970.
21. Oprčkal, B., 2013. *Najbolj onesnaženi kraji v Sloveniji*. [Elektronski]
Available at:
http://www.siol.net/novice/znanost_in_okolje/2013/11/najbolj_onesnazeni_kraji_v_sl

[oveniji.aspx](#)

[Poskus dostopa 21 1 2016].

22. Osmosis, 2015. *Free radical injury*, Wikipedia: s.n.
23. Paš, M. in drugi, 2004. Uptake of chromium(III) and chromium(VI) compounds in the yeast cell structure. *BioMetals*, pp. 25-33.
24. Pepi, M. & Baldi, F., 1992. Modulation of chromium(VI) toxicity by organic and inorganic sulfur species in yeasts from industrial wastes. *BioMetals*, pp. 178-185.
25. Pohar, B., 2006. *Primerjava spremljanja rasti kvasovk z metodo merjenja optične gostote in z metodo določanja suhe biomase*, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, enota medoddelčnega študija mikrobiologije.
26. Pompella, A. in drugi, 2003. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology*, p. 1499–1503.
27. Reyes–Gutiérrez, L. R., Romero–Guzmán, E. T., Olmos–Salinas, M. G. & Rodríguez–Castillo, R., 2009. Chemical species of chromate of an industrial landfill in the León valley, Guanajuato, Mexico. *SciELO*.
28. Ryan, K. J. & Ray, C. G., 2014. *SHERRIS MEDICAL MICROBIOLOGY*. s.l.:McGraw-Hill Education.
29. Salnikow, K. & Zhitkovich, A., 2007. Genetic and Epigenetic Mechanisms in Metal Carcinogenesis and Cocarcinogenesis: Nickel, Arsenic and Chromium. *Chem Res Toxicol*, pp. 24-44.
30. Segal, R. in drugi, 1996. Treatment of Candida nail infection with terbinafine. *Journal of the American Academy of Dermatology*, p. 958–961.
31. Shi, X. in drugi, 1994. Reaction of Cr(VI) with ascorbate and hydrogen peroxide generates hydroxyl radicals and causes DNA damage: role of a Cr(IV)-mediated Fenton-like reaction. *Carcinogenesis*, pp. 2475-2478.
32. Silva, S. in drugi, 2011. *Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis*. *FEMS Microbiology Reviews*, pp. 288-305.
33. Stearns, D. M., 2008. Is chromium a trace essential metal?. *BioFactors*, pp. 149-162.
34. Tovey, J., 2011. *Patches of carcinogen seen after Orica leak*. [Elektronski] Available at: <http://www.smh.com.au/environment/patches-of-carcinogen-seen-after-origa-leak-20111216-1oyo5.html>
[Poskus dostopa 21 1 2016].

35. Uradni_list, 2007. *UREDBA o emisiji snovi in toplote pri odvajanju odpadne vode iz naprav za proizvodnjo kovinskih izdelkov*. [Elektronski]
[Poskus dostopa 14 1 2016].
36. Vasilatos, C., Megremi, I., Economou-Eliopoulos, M. & Mitsis, I., 2008. Hexavalent chromium and other toxic elements in natural waters. *Hellenic Journal of Geosciences*, pp. 57-66.
37. Vernier, brez datuma *SpectroVis® Plus Spectrophotometer*. [Elektronski]
Available at: <http://www.vernier.com/products/sensors/spectrometers/visible-range/svis-pl/>
[Poskus dostopa 16 1 2016].
38. Volesky, B., 1990. *Biosorption of Heavy Metals*. s.l.:CRC Press.

9 Priloge

9.1 Priloga 1: Dodatni eksperiment za spontano zmanjšanje kroma pri pH 7

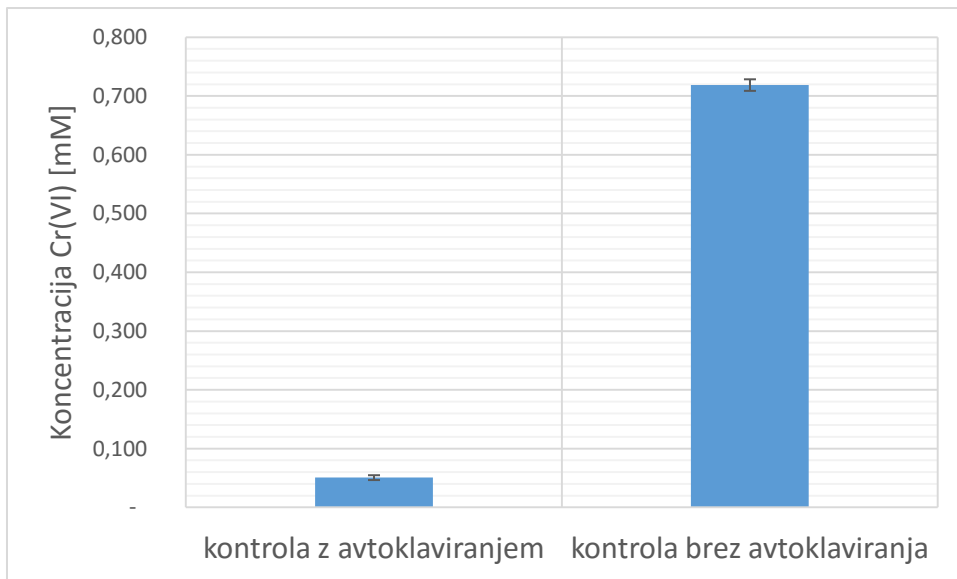
Na podlagi dobljenih rezultatov v glavnem eksperimentu smo se odločili, da preverimo ali je nenadno zmanjšanje količine kroma v kontroli povezano z avtoklaviranjem.

Pripravili smo BH + GLU gojišče ter z dodajanjem 1 M HCl oz. 4% NaOH uravnali pH do 7. Gojišče smo nato s pomočjo filtrirnih nastavkov za injekcijske brizge filtriral in zamašili ter pustili v inkubatorju za štiri dni.

Merjenje in obdelovanje podatkov je potekalo po enakem postopku kot pri glavnem eksperimentu opisanem pri poglavju »3.2.4 Merjenje« oziroma »3.2.5 Obdelava podatkov«. Naše dobljene rezultate smo uredili v spodnjo tabelo in graf (Tabela 4, Graf 6).

Tabela 4: Primerjava koncentracij CrV(VI) z in brez avtoklaviranja medija

	Kontrola pH 7 z avtoklavom	Kontrola pH 7 brez avtoklava
Povprečje	0,051	0,719
SD	0,004	0,010



Graf 6: Primerjava koncentracij Cr (VI) z in brez avtoklaviranja medija

9.2. Priloga 2: Grobi rezultati

V spodnji tabeli (Tabela 5) so podane vrednosti za absorbanco Cr (VI) v mediju ter pretvorbe v koncentracijo. Največje oziroma najmanjše vrednosti, ki so preveč odstopale, smo zanemarili.

Tabela 5: Grobi podatki za absorbanco in koncentracije Cr (VI) v mediju

Vrsta kvasovke	Absorbanca					Koncentracija [mM]				
	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
Kontrola	1,455	2,019	2,034	1,971	0,304	0,387	1,018	1,045	0,938	0,054
	1,357	2,031	2,063	1,976	0,237	0,327	1,039	1,098	0,946	0,048
	1,375	2,019	2,016	1,984	/	0,337	1,018	1,013	0,959	/
<i>Candida intermedia</i>	0,004	0,276	1,507	1,256	0,102	0,032	0,051	0,423	0,275	0,038
	0,008	0,612	1,204	0,984	0,015	0,032	0,091	0,251	0,172	0,033
	0,005	0,480	1,272	0,951	0,019	0,032	0,073	0,283	0,163	0,033
	0,007	/	1,380	1,101	0,008	0,032	/	0,340	0,211	0,032
	0,014	/	1,224	1,073	0,013	0,033	/	0,260	0,201	0,033
<i>Candida parapsilosis</i>	0,192	1,230	1,159	0,727	/	0,044	0,263	0,233	0,111	/
	0,103	1,321	1,711	1,058	0,042	0,038	0,307	0,600	0,196	0,034
	0,212	1,378	1,799	1,312	0,013	0,046	0,339	0,698	0,303	0,033
	0,104	1,396	1,208	1,343	0,009	0,038	0,350	0,253	0,319	0,032
	0,203	1,260	1,554	0,768	0,012	0,045	0,277	0,458	0,119	0,033
	0,192	1,230	1,159	0,727	/	0,044	0,263	0,233	0,111	/
<i>Candida tropicalis</i>	0,011	0,327	/	0,773	/	0,032	0,056	/	0,120	/
	/	/	0,563	0,635	0,016	/	/	0,084	0,095	0,033

	0,011	0,282	0,969	0,878	0,008	0,032	0,052	0,168	0,144	0,032
	0,004	0,588	0,515	0,884	0,009	0,032	0,087	0,077	0,145	0,032
	0,007	0,336	0,914	0,851	0,006	0,032	0,057	0,153	0,137	0,032