

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tea MORČIČ

**UPORABA KVASNE BIOMASE S POVEČANIM
ANTIOKSIDATIVNIM POTENCIALOM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tea MORČIČ

**UPORABA KVASNE BIOMASE S POVEČANIM
ANTIOKSIDATIVNIM POTENCIALOM**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**USE OF YEAST BIOMASS WITH INCREASED ANTIOXIDATIVE
POTENTIAL**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

POPRAVKI

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Delo je bilo opravljeno v laboratoriju na Katedri za biotehnologijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega dodipomskega študija živilske tehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Petra Rasporja, za somentorico dr. Polono Jamnik in za recenzentko doc. dr. Milico Kač.

Mentor: prof. dr. Peter Raspor

Somentorica: asist. dr. Polona Jamnik

Recenzentka: doc. dr. Milica Kač

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član: prof. dr. Peter RASPOR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: asist. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: doc. dr. Milica KAČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tea MORČIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 579.26+577.66:582.282.23:546.76(043)=863
KG kvasovke/krom/stres/antioksidanti/glutation/askorbinska kislina /biomasa/
akumulacija kroma/metabolna aktivnost
AV MORČIČ, Tea
SA RASPOR, Peter (mentor)/JAMNIK, Polona (somentorica)/KAČ, Milica
(recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2006
IN UPORABA KVASNE BIOMASE S POVEČANIM ANTIOKSIDATIVNIM
POTENCIALOM
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XII, 51 str., 5 pregl., 10 sl., 10 pril., 69 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Namen naloge je bil primerjati razliko v akumulaciji Cr(VI) in v metabolni aktivnosti celic tretirane in netretirane kvasne biomase. Celice kvasovke *S. cerevisiae* smo pred izpostavitvijo Cr(VI) ločeno tretirali z NaCl ali askorbinsko kislino in jim tako povečali antioksidativni potencial. Predpostavili smo, da ima tretirana biomasa večjo sposobnost akumulacije Cr(VI) od netretirane. Izvedli smo aerobno submerzno kultivacijo kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 v tekočem YEPD gojišču na magnetni mešalni plošči v inkubatorju pri 25 °C in 240 obr./min. Na sredini eksponentne faze rasti ($OD_{650} = 1,2$) smo v brozgo dodali ali NaCl do koncentracije 8 % (w/v) ali izhodno raztopino askorbinske kisline do koncentracije 1 mM in inkubirali 1 uro. Sledila je priprava kvasne suspenzije v pufru Tris HCl s pH = 4,0 in dodatek izhodne raztopine Cr(VI) do različnih začetnih koncentracij: 25, 50 in 100 μ M Cr(VI). Za določanje koncentracije Cr(VI) smo vzorčili takoj po dodatku Cr(VI) v kvasno suspenzijo ($t = 0$), po eni uri in po dveh urah inkubacije pri 25 °C in 240 obr./min. Vzorce smo centrifugirali in v supernatantih s plamensko atomsko absorpcijsko spektroskopijo določali koncentracijo Cr(VI). Značilne razlike v akumulaciji Cr(VI) med posameznimi biomasami smo opazili le v primeru 25 μ M raztopine Cr(VI). Največjo stopnjo akumulacije (približno 10 % večjo kot pri netretirani biomas) smo opazili pri biomas tretirani z NaCl. Največ Cr(VI) se je akumuliralo takoj po dodatku v kvasno suspenzijo ($t = 0$). V primeru 50 in 100 μ M raztopine Cr(VI) nismo opazili razlik v akumulaciji Cr(VI) med netretirano biomaso in tretiranima biomasama. Za določanje metabolne aktivnosti celic smo vzorčili ob istih časih ter tudi pred dodatkom Cr(VI). Metabolno aktivnost smo določali z uporabo barvila resazurin in merjenjem fluorescence. Metabolna aktivnost celic se je najbolj zmanjšala pri obeh tretiranih biomasah v primeru izpostavitve 100 μ M raztopini Cr(VI) (približno za 20 % glede na netretirano biomaso) takoj po dodatku Cr(VI) v kvasno suspenzijo ($t = 0$). Po enourni inkubaciji je metabolna aktivnost tretiranih biomas narasla in dosegla vrednosti kot pri netretirani biomas.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.26+577.66:582.282.23:546.76(043)=863
CX yeasts/chromium/stress/antioxidants/glutathione/ascorbic acid/biomass/chromium accumulation/metabolic activity
AU MORČIČ, Tea
AA RASPOR, Peter (supervisor)/JAMNIK, Polona (co-supervisor)/KAČ, Milica (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2006
TI USE OF YEAST BIOMASS WITH INCREASED ANTIOXIDATIVE POTENTIAL
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XII, 51 p., 5 tab., 10 fig., 10 ann., 69 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The aim of our study was to compare the accumulation of Cr(VI) and metabolic activity of treated and non-treated yeast biomass. Yeast cells were treated with NaCl or ascorbic acid, which resulted in increased antioxidative potential. We supposed that treated biomass has a greater ability to accumulate Cr(VI) than non-treated biomass. Cells of *S. cerevisiae* – ZIM 2155 were cultivated in YEPD medium at 25 °C and 240 rpm. In the mid-exponential phase ($OD_{650} = 1,2$) NaCl was added to give a concentration of 8 % (w/v) or stock solution of ascorbic acid to give a concentration of 1 mM. After 1 hour incubation yeast suspension in Tris HCl buffer (pH = 4,0) was prepared. Then Cr(VI) was added into the suspension to give Cr(VI) concentration of 25, 50 and 100 μ M. At $t = 0$, after 1-hour and 2-hour incubation at 25 °C and 240 rpm cell suspensions were centrifuged and concentration of Cr(VI) in supernatants was measured using flame atomic absorbic spectroscopy. At 25 μ M Cr(VI) solution there was significant difference between treated and non-treated biomass. There was increased Cr(VI) accumulation (about 10 % increase compared to non-treated biomass) in cells treated with NaCl. The accumulation mostly occurred immediately after Cr(VI) addition into yeast suspension. At 50 and 100 μ M Cr(VI) solution there was no difference between treated and non-treated biomass. Samples for measuring cell metabolic activity were taken at the same times and also before Cr(VI) addition. Metabolic activity was estimated by using resazurin as a dye and determined fluorimetrically. The major decrease of metabolic activity occurred immediately after Cr(VI) addition ($t = 0$), specifically in the case of treated biomasses (about 20 % decrease compared to non-treated biomass). Then after 1-hour incubation metabolic activity increased and reached the values of non-treated biomass.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
SLOVARČEK	XII

1 UVOD.....	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KROM	3
2.1.1 Lastnosti in uporaba kroma	3
2.1.2 Toksičnost Cr(VI).....	3
2.1.3 Transport Cr(VI) v celico	4
2.1.3.1 Biosorpcija.....	4
2.1.3.2 Bioakumulacija.....	4
2.1.4 Metabolizem Cr (VI) v celici.....	5
2.1.5 Odpornost mikroorganizmov na Cr(VI).....	5
2.1.6 Odstranjevanje Cr(VI) iz odpadnih vod	6
2.1.6.1 Konvencionalne metode čiščenja odpadnih vod	6
2.1.6.2 Uporabnost biosorpcije/bioakumulacije.....	7
2.2 OKSIDATIVNI STRES	7
2.2.1 Definicija stresa	7
2.2.2 Oksidativni stres	8
2.2.3 Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)	8
2.2.4 Vloga Cr(VI) pri oksidativnem stresu	8
2.3 ANTIOKSIDATIVNI OBRAMBNI SISTEMI	9
2.3.1 Endogeni antioksidativni obrambni sistem – glutation	9
2.3.1.1 Glutation – splošno.....	9
2.3.1.2 Sinteza glutaciona	10
2.3.1.3 Razgradnja glutaciona	10
2.3.1.4 Regeneracija glutaciona	11
2.3.1.5 Vloga glutaciona pri detoksifikaciji težkih kovin	11
2.3.1.6 Vloga glutaciona pri oksidativnem stresu	11
2.3.2 Eksogeni antioksidativni obrambni sistem – askorbinska kislina (vitamin C)	12
2.3.2.1 Askorbinska kislina – splošno	12
2.3.2.2 Sinteza askorbinske kisline.....	12
2.3.2.3 Razgradnja askorbinske kisline	12
2.3.2.4 Regeneracija askorbinske kisline.....	12

2.3.2.5	Transport askorbinske kisline v celico	13
2.3.2.6	Vloga askorbinske kisline pri detoksifikaciji težkih kovin	13
2.3.2.7	Vloga askorbinske kisline pri oksidativnem stresu	13
2.4	CILJI NALOGE IN DELOVNA HIPOTEZA	14
3	METODE IN MATERIAL	15
3.1	POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA	15
3.2	METODE	16
3.2.1	Priprava inokuluma	16
3.2.2	Predposkus glavnega bioprocesa	16
3.2.3	Glavni bioproc	16
3.2.3.1	Kultivacija kvasne biomase	16
3.2.3.2	Centrifugiranje bioprocesne brozge in spiranje biomase	17
3.2.3.3	Priprava kvasne suspenzije v pufru Tris HCl	17
3.2.3.4	Dodatek izhodne raztopine Cr(VI) v kvasno suspenzijo	17
3.2.4	Atomska absorpcijska spektroskopija	17
3.2.5	Določanje metabolne aktivnosti celic kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	18
3.2.6	Obdelava rezultatov	20
3.2.7	Izračuni	21
3.2.7.1	Določanje koncentracije Cr(VI) v supernatantih	21
3.2.7.2	Določanje metabolne aktivnosti celic kvasovke <i>S. cerevisiae</i>	22
3.2.8	Statistična analiza	23
3.3	MATERIAL	24
3.3.1	Mikroorganizem	24
3.3.2	Gojišče	24
3.3.2.1	Trdno YEPD gojišče	24
3.3.2.2	Tekoče YEPD gojišče	24
3.3.3	Reagenti in raztopine	25
3.3.3.1	Merjenje koncentracije Cr(VI) v supernatantih	25
3.3.3.2	Tretiranje celic kvasovke	25
3.3.3.3	Določanje števila celic v izhodni suspenziji	26
3.3.3.4	Določanje metabolne aktivnosti celic	26
3.3.4	Pribor in oprema	26
3.3.4.1	Priprava gojišča	26
3.3.4.2	Priprava inokuluma	26
3.3.4.3	Centrifugiranje bioprocesne brozge in spiranje biomase	27
3.3.4.4	Določanje števila celic v suspenziji	27
3.3.4.5	Priprava pufru Tris HCl	27
3.3.4.6	Določanje koncentracije Cr(VI) v supernatantih	27
3.3.4.7	Določanje metabolne aktivnosti celic	27
3.3.4.8	Shranjevanje kultur, reagentov, raztopin in vzorcev	28
4	REZULTATI	29
4.1	RASTNE KRIVULJE ZA KVASOVKO <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
4.1.1	Rastna krivulja za inokulum (Predposkus 1)	29

4.1.2	Rastna krivulja za glavni bioprocen (Predposkus 2)	30
4.2	DOLOČANJE KONCENTRACIJE Cr(VI) V SUPERNATANTIH	31
4.2.1	Rezultati statistične analize za koncentracijo Cr(VI) v supernatantih	35
4.3	DOLOČANJE METABOLNE AKTIVNOSTI CELIC KVASOVKE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
4.3.1	Rezultati statistične analize za metabolno aktivnost celic	40
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	41
5.1	RAZPRAVA	41
5.2	SKLEPI	44
6	POVZETEK	45
7	VIRI	46

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Konvencionalne metode za odstranjevanje kovin iz odpadnih vod (Volesky, 2001).....	6
Preglednica 2: Sestava tekočega YEPD gojišča (Atlas, 1993).....	24
Preglednica 3: Sestava trdnega YEPD gojišča (Atlas, 1993)	24
Preglednica 4: Vpliv biomase in časa delovanja Cr(VI) na razlike v koncentraciji Cr(VI) v supernatantih (LSM) pri različnih dodatkih Cr(VI)	36
Preglednica 5: Vpliv biomase in časa delovanja Cr(VI) na razlike v metabolni aktivnosti (LSM) pri različnih dodatkih Cr(VI).....	41

KAZALO SLIK

Slika 1: Hodogram poteka celotnega poskusa	16
Slika 2: Hodogram poteka določanja metabolne aktivnosti celic kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
Slika 3: Aerobna submerzna kultivacija kvasovke <i>S. cerevisiae</i> – ZIM 2155 v inkubatorju na magnetni mešalni plošči (T = 25 °C, 240 obr./min) (namnoževanje inokuluma)	30
Slika 4: Aerobna submerzna kultivacija kvasovke <i>S. cerevisiae</i> – ZIM 2155 v inkubatorju na magnetni mešalni plošči (T = 25 °C, 240 obr./min) (glavni bioproces)	31
Slika 5: Vpliv različnih načinov tretiranja kvasne biomase na akumulacijo Cr(VI) po izpostavitvi 25 µM koncentraciji Cr(VI).....	33
Slika 6: Vpliv različnih načinov tretiranja kvasne biomase na akumulacijo Cr(VI) po izpostavitvi 50 µM koncentraciji Cr(VI).....	34
Slika 7: Vpliv različnih načinov tretiranja kvasne biomase na akumulacijo Cr(VI) po izpostavitvi 25 µM koncentraciji Cr(VI).....	35
Slika 8: Vpliv različnih načinov tretiranja kvasne biomase na metabolno aktivnost celic po izpostavitvi 25 µM koncentraciji Cr(VI).....	38
Slika 9: Vpliv različnih načinov tretiranja kvasne biomase na metabolno aktivnost celic po izpostavitvi 50 µM koncentraciji Cr(VI).....	39
Slika 10: Vpliv različnih načinov tretiranja kvasne biomase na metabolno aktivnost celic po izpostavitvi 25 µM koncentraciji Cr(VI).....	40

KAZALO PRILOG

- Priloga A1: Meritve optične gostote (OD₆₅₀) med aerobno submerzno kultivacijo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* – ZIM 2155 na magnetni mešalni plošči v inkubatorju (priprava inkuluma)
- Priloga A2: Meritve optične gostote (OD₆₅₀) med aerobno submerzno kultivacijo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* – ZIM 2155 na magnetni mešalni plošči v inkubatorju (predposkus glavnega bioprocesa)
- Priloga B1: Teoretične in izmerjene vrednosti kontrole (pufer Tris HCl + različne konc. Cr(VI)) pri določanju koncentracije Cr(VI) v supernatantih
- Priloga B2: Koncentracija Cr(VI) v supernatantih (F_B) po izpostavitvi posamezne kvasne biomase 25 μM koncentraciji Cr(VI) za določen čas, izračunana na podlagi povprečne koncentracije Cr(VI) v supernatantih [mg/l] in dobljenih faktorjev
- Priloga B3: Koncentracija Cr(VI) v supernatantih (F_B) po izpostavitvi posamezne kvasne biomase 50 μM koncentraciji Cr(VI) za določen čas, izračunana na podlagi povprečne koncentracije Cr(VI) v supernatantih [mg/l] in dobljenih faktorjev
- Priloga B4: Koncentracija Cr(VI) v supernatantih (F_B) po izpostavitvi posamezne kvasne biomase 100 μM koncentraciji Cr(VI) za določen čas, izračunana na podlagi povprečne koncentracije Cr(VI) v supernatantih [mg/l] in dobljenih faktorjev
- Priloga C1: Metabolna aktivnost posamezne kvasne biomase ob t = 0, po 1 h in 2 h inkubacije v pufri brez dodanega Cr(VI), izračunana na podlagi povprečne fluorescence in dobljenih faktorjev
- Priloga C2: Metabolna aktivnost posamezne kvasne biomase ob t = 0, po 1 h in 2 h inkubacije v pufri ob izpostavitvi 25 μM koncentraciji Cr(VI), izračunana na podlagi povprečne fluorescence in dobljenih faktorjev
- Priloga C3: Metabolna aktivnost posamezne kvasne biomase ob t = 0, po 1 h in 2 h inkubacije v pufri ob izpostavitvi 50 μM koncentraciji Cr(VI), izračunana na podlagi povprečne fluorescence in dobljenih faktorjev
- Priloga C4: Metabolna aktivnost posamezne kvasne biomase ob t = 0, po 1 h in 2 h inkubacije v pufri ob izpostavitvi 100 μM koncentraciji Cr(VI), izračunana na podlagi povprečne fluorescence in dobljenih faktorjev

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP	adenozin-trifosfat
B _N	netretirana biomasa
B _{NaCl}	biomasa tretirana z NaCl
B _{AK}	biomasa tretirana z askorbinsko kislino
Cr(III)	kromove spojine oz. ioni, v katerih se krom nahaja v oksidacijskem stanju +3
Cr(VI)	kromove spojine oz. ioni, v katerih se krom nahaja v oksidacijskem stanju +6
dH ₂ O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
F	fluorescenca
GSH	reducirana oblika glutationa
GSSG	oksidirana oblika glutationa
konc.	koncentracija
KV	koeficient variacije
LSM	ocenjena povprečna vrednost (least square mean)
M	mol/l
NADH	reducirana oblika nikotinamid dinukleotida
NADP ⁺	oksidirana oblika nikotinamid dinukleotid fosfata
NADPH	reducirana oblika nikotinamid dinukleotid fosfata
obr./min	obrati na minuto
OD ₆₅₀	optična gostota, merjena pri 650 nm
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
s	standardna deviacija
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SE	standardna napaka ocene
t	čas
T	temperatura
V	volumen
vol. %	volumski odstotek
YEPD	kemijsko definirano gojišče: kvasni ekstrakt pepton glukoza
ZIM	Zbirka industrijskih mikroorganizmov, Biotehniška fakulteta, Ljubljana

SLOVARČEK

- antioksidant** - vsaka snov, ki je sposobna že v majhni koncentraciji opazno zmanjšati ali zavreti oksidacijo substrata
- antioksidativni obrambni sistemi** - sistemi, ki pri normalnih pogojih rasti učinkovito vzdržujejo reaktivne kisikove zvrsti (ROS) na osnovni, neškodljivi ravni in popravljajo celične poškodbe
- glutation** - ubikvitaren nizkomolekularen tiol, eden najpomembnejših neencimskih antioksidativnih obrambnih sistemov
- metabolna aktivnost** - sposobnost celice, da vrši reakcije, s katerimi si zagotavlja energijo in redukcijsko moč
- oksidativni stres** - posledica izpostavitve celic specifičnim stresnim razmeram, ko nivo reaktivnih kisikovih zvrsti preseže antioksidativno sposobnost celice
- reaktivne kisikove zvrsti (ROS)** - molekule kisika v različnih reduciranih in/ali vzbujenih stanjih (stanjih z visoko energijo) in spojine kisika z vodikom, klorom in dušikom, ki delujejo kot oksidanti

1 UVOD

Krom je kovina in zaradi svoje široke industrijske uporabe eden največjih onesnaževalcev okolja. V industrijskih odpadkih se nahaja predvsem v šestvalentni obliki, kot kromat ali dikromat, za katerega so številne *in vitro* in *in vivo* raziskave so pokazale, da je kancerogen in potencialno genotoksičen (Shi in sod., 1994). Vzrok za njegovo toksičnost je v enostavnem prehajanju skozi celično membrano in v močnih oksidacijskih lastnostih (Losi in sod., 1994).

Zaradi toksičnosti je Cr(VI) nujno potrebno odstraniti iz industrijskih odpadk. Mnoge konvencionalne metode za odstranjevanje kroma iz odpadnih vod so drage, dolgotrajne in nezadostne, upoštevajoč ogromne količine odpadk, zato se njihova uporaba omejuje. Alternativa za čiščenje odpadnih vod predstavlja naravni proces akumuliranja kroma v biomaso. Alge, bakterije, nitaste glive in kvasovke so se izkazale kot odlični biosorbenti kovin (Volesky, 2001). Velike koncentracije kromovih ionov, ki so stalno prisotne v okolju, spodbudijo razvoj mehanizmov rezistence oz. tolerance pri mikroorganizmih. Glavni mehanizem je bioredukcija toksičnega Cr(VI) iona do relativno netoksičnega Cr(III) iona (Losi in sod., 1994). Naslednji možni mehanizem rezistence je zmanjšana akumulacija Cr(VI) v kvasovko (Baldi in sod., 1990). Mikroorganizmi pa se lahko zavarujejo pred toksičnimi učinki kroma tudi tako, da ga akumulirajo in vežejo v inkluzijska telesa ter ga tako odstranijo iz medija (Coleman in Paran, 1983).

Kvasovke se kot aerobni mikroorganizmi stalno soočajo s toksičnimi stranskimi učinki molekularnega kisika in sicer preko tvorbe reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) med normalnim celičnim metabolizmom. Cr(VI) kot izrazit oksidant še dodatno prispeva k tvorbi ROS v celici. Pomembno zaščito pred ROS predstavljajo antioksidanti, ki vežejo kovinske ione, encimsko odstranjujejo oksidante ali pa sami neposredno reagirajo z ROS (Sigler in sod., 1999). Antioksidativne obrambne sisteme delimo na primarne in sekundarne. Primarni antioksidativni obrambni sistemi preprečujejo iniciacijske in/ali propagacijske reakcije radikalov/oksidantov s celičnimi komponentami, medtem ko sekundarni antioksidativni obrambni sistemi prevzamejo vlogo, ko primarni niso več zadostni, kar pomeni, da je oksidativni stres že povzročil poškodbe celičnih komponent. Oksidativni stres nastopi kot posledica porušenega ravnotežja med ROS in antioksidanti v celici, do česar lahko pride zaradi izrabe znotrajceličnih antioksidantov in/ali povečane tvorbe ROS (npr. izpostavitve celic Cr(VI)) (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

Enega glavnih primarnih neencimskih antioksidativnih obrambnih sistemov predstavlja glutation, saj ima sposobnost lovljenja prostih radikalov in redukcije disulfidnih mostičkov v proteinih. Do indukcije glutationa oz. do povečane znotrajcelične vsebnosti glutationa v reducirani obliki pride pri izpostavitvi celic različnim stresnim dejavnikom. Glutation se lahko v celici nahaja v oksidirani in reducirani obliki, pomembno pa je, da se vzpostavi ravnotežje v korist reducirane oblike, saj le-ta lahko reagira z ROS in tako prepreči njihovo škodljivo delovanje. Glutation je vključen tudi v zaščito celice pred težkimi kovinami, saj je eden primarnih celičnih reductentov kovinskih ionov in na ta način vzdržuje redoks stanje v celici (Penninckx, 2000).

Tudi askorbinska kislina (vitamin C) ima kot reducent/antioksidant pomembno vlogo pri detoksifikaciji različnih organskih radikalov. Poleg tega ima tudi sposobnost lovljenja prostih radikalov in tako pomembno prispeva k zaščiti celic pred ROS. Vendar pa le nekaj poročil omenja, da so našli askorbinsko kislino v *Saccharomyces cerevisiae* in še to v majhnih koncentracijah (Jamieson, 1998). Povprečna koncentracija askorbinske kisline v celici je 1 mM (Meister, 1994).

Uporaba mikroorganizmov kot biosorbentov se je pokazala za uspešno alternativo konvencionalnim metodam čiščenja odpadnih vod. Pri našem poskusu pa smo skušali ugotoviti ali ima kvasna biomasa s povečano vsebnostjo glutationa oz. s povečano vsebnostjo askorbinske kisline, kar ima za posledico povečan antioksidativni potencial, večjo sposobnost akumulacije Cr(VI) od običajne kvasne biomase. Obogatena biomasa je nadgradnja alternativnega čiščenja odpadnih vod, ki vsebujejo velike koncentracije ionov težkih kovin. S svojo konkurenčnostjo, učinkovitostjo in ekonomičnostjo bi zlahka nadomestila konvencionalne metode čiščenja.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KROM

2.1.1 Lastnosti in uporaba kroma

Krom je jekleno-siva, svetleča, trdna in na korozijo odporna kovina (Losi in sod., 1994). Je kemijski element VI. skupine periodnega sistema, z atomsko maso 51,996 g/mol. Oksidacijska stanja kroma so v območju od -2 do $+6$, v naravi pa se krom nahaja predvsem v trivalentni (Cr(III)) in šestvalentni (Cr(VI)) obliki (Squibb in Snow, 1993).

Cr(III) je najstabilnejša oblika kroma. Ker ima ta ion relativno majhno afiniteto do kisika in je tako v obliki oksidov, hidroksidov ali sulfatov slabo mobilan, tvori številne komplekse z anorganskimi in organskimi ligandi v okolju. Trivalentne kromove spojine so večinoma topne v vodi le pri nizkih pH vrednostih, v bližini nevtralne pH vrednosti pa večinoma tvorijo relativno inertne oborine (Losi in sod., 1994).

Cr(VI) velja za najbolj toksično obliko kroma in je večinoma povezan s kisikom kot kromatni (CrO_4^{2-}) ali dikromatni ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) ion. Šestvalentne kromove spojine so močni oksidanti in se v prisotnosti organskih snovi reducirajo do trivalentnih kromovih spojin. Ta pretvorba poteka hitreje v kislih okoljih (Losi in sod., 1994). Šestvalentne kromove soli so zelo različno topne v vodi. Natrijeve in kalijeve soli šestvalentnega kroma so zelo dobro topne v vodi, medtem ko so svinčeve in cinkove soli slabo topne (Squibb in Snow, 1993).

Krom in njegove spojine imajo široko industrijsko uporabo: strojenje usnja, izdelovanje barv in pigmentov, tekstilna industrija, industrija gnojil, proizvodnja jekla, impregniranje lesa, preprečevanje korozije, za izdelavo pri višjih temperaturah stabilnih zlitin, za galvanske prevleke kovin, kot zaščitna sredstva v industriji nafte (Losi in sod., 1994; Rapoport in Muter, 1995).

2.1.2 Toksičnost Cr(VI)

Številne *in vitro* in *in vivo* raziskave so pokazale, da je Cr(VI) kancerogen in potencialno genotoksičen (Shi in sod., 1994). Vzrok za njegovo toksičnost je v enostavnem prehajanju skozi celično membrano in v močnih oksidacijskih lastnostih (Losi in sod. 1994). Cr(VI) ne reagira z DNA v *in vitro* pogojih (Tsapakos in Wetterhahn, 1983). Šele redukcija Cr(VI) z znotrajceličnimi reducenti do nižjih oksidacijskih stanj predstavlja pomemben korak v pojasnitvi kancerogenosti Cr(VI) (Connett in Wetterhahn, 1983; Wetterhahn in Hamilton, 1989). Pri redukciji Cr(VI) z glutationom nastanejo Cr(V) kompleksi, ki reagirajo z vodikovim peroksidom in tako nastane hidroksilni radikal. Pri tem se tvori tudi glutationilni radikal. Vsi ti intermedijati (Cr(V), hidroksilni in glutationilni radikal) so vključeni v mehanizem s Cr(VI) inducirane toksičnosti in kancerogeneze (Shi in Dalal, 1990).

Toksični učinki Cr(VI) se pri mikroorganizmih kažejo v spremenjenem genetskem materialu in spremenjenih metabolnih in fizioloških funkcijah (Losi in sod. 1994).

2.1.3 Transport Cr(VI) v celico

Cr(VI) se v vodnih raztopinah nahaja kot anion in kot tak lahko z difuzijo prehaja skozi celične membrane s pomočjo nespecifičnega transportnega sistema anionov (PO_4^{3-} in SO_4^{2-}) (Squibb in Snow, 1993). Transport kromata v celice večine mikroorganizmov poteka preko sulfatnega transportnega sistema, kajti Cr(VI) v obliki tetraedričnega kromatnega aniona je strukturno analogen sulfatnemu anionu (Arslan in sod., 1987). Ko so kovinski ioni enkrat v celici, se lahko locirajo v citosolu, celičnih membranah, specifičnih organelah in/ali se spremenijo v manj toksično obliko (Gadd, 1990; Williams in Fraústo da Silva, 1996).

Akumulacija kovinskih ionov v celici poteka v dveh fazah: kot biosorpcija in kot bioakumulacija.

2.1.3.1 Biosorpcija

Biosorpcija je hitra, le nekaj minut trajajoča začetna faza vezave kovinskih ionov, ki je neodvisna od temperature in metabolizma kvasne celice. Ker je proces metabolno neodvisen, lahko poteka tudi pri mrtvi biomasi (Blackwell in sod., 1995; Tobin in sod., 1994). V večini primerov gre za vezavo na celične stene kvasovk, pri čemer so pomembni dejavniki sestava, struktura in naboj celične stene. Redkeje se kovinski ioni vežejo na zunajcelične polimere (Blackwell in sod., 1995).

Glavne kemijske skupine na površini celice, kamor se lahko veže Cr(VI), so karboksilne, hidroksilne, sulfhidrilne, fosfatne in amino skupine, ki so sestavni deli proteinov, peptidoglikanov, fosfolipidov in lipopolisaharidov celične stene. Pri tem gre za fizikalno adsorpcijo, ionsko izmenjavo in kompleksacijo. Ti procesi potečejo zelo hitro in so reverzibilni. V primeru fizikalne adsorpcije imamo opraviti z van der Waalsovimi in elektrostatskimi silami, pri ionski izmenjavi sodelujejo polisaharidi celične stene, pri kompleksaciji pa gre za tvorbo kompleksov ob interakcijah med kromovimi ioni in aktivnimi skupinami na celični površini (Veglio in Beolchini, 1997).

2.1.3.2 Bioakumulacija

Bioakumulacija predstavlja prehod kroma s površine celične stene preko membrane v celico. Ta proces je počasnejši in glede na potrebno energijo je metabolno odvisen. Nanj vplivajo številni faktorji, kot so temperatura, prisotnost vira energije oz. inhibitorji metabolizma (Blackwell in sod., 1995). Akumulacija kroma se ob dodatku glukoze kot viru energije poveča, iz česar je razvidna odvisnost med sprejemom kroma in metabolno aktivnostjo kvasovke. Krom se najhitreje akumulira v kvasovki med logaritemsko fazo rasti in na začetku stacionarne faze rasti (Kumpulainen in Koivistoinen, 1978).

2.1.4 Metabolizem Cr (VI) v celici

Z vstopom Cr(VI) v celico pride do redukcije Cr(VI) v Cr(III) ob reakcijah z različnimi celičnimi reducenti kot so: tioli (glutation, cistein), askorbat, vodikov peroksid, aldehid oksidaza in drugi. Nekateri od teh povzročijo med procesom redukcije tvorbo reaktivnih intermediatov, ki vključujejo Cr(V) in Cr(IV) spojine ter proste radikale (hidroksil $\bullet\text{OH}$ in glutationil $\text{GS}\bullet$). Hidroksil ($\bullet\text{OH}$) se tvori v reakciji Cr(VI) z vodikovim peroksidom, glutationil ($\text{GS}\bullet$) pa v reakciji Cr(VI) z glutationom (Wetterhahn in Hamilton, 1989). Tudi Cr(V) spojine lahko povzročijo tvorbo hidroksilnih radikalov, in sicer v reakciji z vodikovim peroksidom (Shi in sod., 1994).

Znotrajcelična redukcija Cr(VI) povzroči zmanjšanje koncentracije znotrajceličnega Cr(VI) kar omogoči zunajceličnemu Cr(VI), da zaradi koncentracijskega gradienta difundira iz gojišča v celico. V celici se skoraj ves krom nahaja kot Cr(III), zaznani so bili le sledovi Cr(VI) (Arslan in sod., 1987).

Do redukcije Cr(VI) pride navadno že v citoplazmi, lahko pa kromatni(VI) ion preide jedrno membrano in se reducira z intranuklearnimi redukcijskimi sistemi. V jedru je delovanje nastalega Cr(III) lahko kritično, saj se kot kation lahko ireverzibilno veže s fosfatnimi skupinami DNA ali s prostimi nukleotidi, kar tudi prizadene genske funkcije. Cr(III), kot končni produkt procesa redukcije v citoplazmi, pa tvori stabilne komplekse z organskimi spojinami (aminokislina, proteini, oksalati) in se v obliki le-teh kopiči v določenih delih celice (npr. jedro), iz katerih se počasi sprošča (Nieboer in Shaw, 1988).

2.1.5 Odpornost mikroorganizmov na Cr(VI)

Velike koncentracije kromovih ionov, ki so stalno prisotne v okolju, spodbudijo razvoj mehanizmov rezistence oz. tolerance pri mikroorganizmih. Glavni mehanizem je bioredukcija toksičnega Cr(VI) iona do relativno netoksičnega Cr(III) iona. Le-ta lahko poteka neposredno na celični membrani s pomočjo encimov in posredno s pomočjo H_2S , ki deluje kot reducent in ga sintetizirajo mikroorganizmi (Losi in sod., 1994). Naslednji možni mehanizem rezistence je zmanjšana akumulacija Cr(VI) v kvasovko (Baldi in sod., 1990). Mikroorganizmi pa se lahko zavarujejo pred toksičnimi učinki kroma tudi tako, da ga akumulirajo in vežejo v inkluzijska telesca ter ga tako odstranijo iz medija (Coleman in Paran, 1983).

Rast mikroorganizmov v prisotnosti velikih koncentracij kovin v okolju pa ni mogoča le zaradi razvoja specifičnih mehanizmov rezistence – fiziološke in/ali genetske prilagoditve, temveč tudi zaradi faktorjev okolja (pH, prisotnost določenih anionov, kationov, organskih snovi, kar vodi do precipitacije ali kompleksiranja kovin izven celice) ter intrinzičnih biokemijskih in strukturnih lastnosti mikroorganizma (nepermeabilna celična stena, produkcija ekstracelularnih polisaharidov, odsotnost specifičnih transportnih sistemov za določeno kovino) (Blackwell in sod., 1995; Beveridge in sod., 1997; Nies, 1999).

2.1.6 Odstranjevanje Cr(VI) iz odpadnih vod

2.1.6.1 Konvencionalne metode čiščenja odpadnih vod

Dandanes predstavlja onesnaževanje okolja s težkimi kovinami resen problem. Koncentracije kromovih ionov v industrijskih odplakah so 200-500 mg/L, medtem ko je največja dovoljena vsebnost kroma 0,05 mg/L (Sag in sod., 1998). Zato je nujno potrebno, da industrije pred iztokom obdelajo svoje odplake in zmanjšajo vsebnost kroma na sprejemljivo vrednost.

Med konvencionalne metode za odstranjevanje kroma iz odpadnih vod sodijo: kemijska redukcija, elektrokemijska obdelava, ionska izmenjava, evaporacija, precipitacija, adsorpcija, reverzna osmoza. Te metode so drage, dolgotrajne in relativno neuspešne pri koncentracijah 10-100 g/m³, zato se njihova uporaba omejuje (Nourbakhsh in sod., 1994). Pri nekaterih kot produkt čiščenja nastaja blato, ki vsebuje toksične kovine, kar zahteva še dodatno obdelavo, odstranjevalne metode in odlagališča (Volesky, 2001).

Preglednica 1: Konvencionalne metode za odstranjevanje kovin iz odpadnih vod (Volesky, 2001):

Metoda	Slabosti	Prednosti
Kemijska precipitacija in filtracija	<ul style="list-style-type: none">- primerna le za večje koncentracije- težko ločevanje- neučinkovitost- sekundarni produkt: blato	<ul style="list-style-type: none">- enostavno- poceni
Kemijska oksidacija ali redukcija	<ul style="list-style-type: none">- potreba po kemikalijah (ni vsestranska)- biološki sistem (počasna)- temperaturno občutljiva	<ul style="list-style-type: none">- mineralizacija
Elektrokemijska obdelava	<ul style="list-style-type: none">- primerna le za velike koncentracije- draga metoda	<ul style="list-style-type: none">- odstranitev kovin
Reverzna osmoza	<ul style="list-style-type: none">- visoki tlaki- poškodbe membrane- draga metoda	<ul style="list-style-type: none">- čist iztok
Ionska izmenjava	<ul style="list-style-type: none">- občutljiva na delce- draga metoda	<ul style="list-style-type: none">- učinkovita- čist iztok
Adsorpcija	<ul style="list-style-type: none">- ni za kovine	<ul style="list-style-type: none">- običajni sorbenti (aktivni ogljik)
Evaporacija	<ul style="list-style-type: none">- intenzivna poraba energije- draga metoda- sekundarni produkt: blato	<ul style="list-style-type: none">- čist iztok

2.1.6.2 Uporabnost bisorpcije/bioakumulacije

Kot je bilo že omenjeno, je Cr(VI) toksičen za večino rastlin, živali in mikroorganizmov, ki naseljujejo vodno okolje. Zaradi tega je potrebno odstraniti topne Cr(VI) spojine iz industrijskih odplak. Mnogi mikroorganizmi imajo sposobnost odstranjevanja Cr(VI) iz odplak, za kar so razvili različne mehanizme: adsorpcija na celično površino, transport v celico, intracelularna akumulacija ali redukcija do netoksičnega Cr(III) (Dönmez in Koçberber, 2005).

Proces bioakumulacije Cr(VI) bi lahko učinkovito uporabili pri obdelavi odplak kot način za detoksifikacijo in odstranjevanje topnega Cr(VI). Učinkovito odstranjevanje Cr(VI) pa ni odvisno le od mikroorganizmov temveč tudi od nekaterih drugih dejavnikov, kot so prisotnost ionov soli, pH in temperatura odplak. Najbolj pomemben dejavnik, ki zmanjšuje mikrobovno aktivnost, so ravno velike koncentracije soli v odplakah. Zato je za uspešno odstranjevanje Cr(VI) nujno potrebna izolacija mikrobnih kultur, ki so odporne na velike koncentracije Cr(VI) in hkrati na soli (Dönmez in Koçberber, 2005).

Kvasovke so za detoksifikacijo težkih kovin iz kontaminiranega okolja doslej uporabljali le v manjši meri. Razlog naj bi bil v njihovi relativno počasni rasti in manjši učinkovitosti v primerjavi z bakterijami. Poleg tega se je za kvasovke odporne na Cr(VI) izkazalo, da ne reducirajo Cr(VI) do Cr(III) ter da akumulirajo zelo malo Cr(VI) (Baldi in sod., 1990). Dar in Shakoori (1999) pa sta v svoji raziskavi iz industrijskih odplak izolirala več rodov kvasovk, ki niso samo odporne na večje koncentracije kroma, temveč da tudi odstranjujejo Cr(VI) iz okolja. Ti izolati predstavljajo potencialno alternativo običajnim metodam za detoksifikacijo toksičnih kovin.

Biosorpcija se je izkazala kot uspešna alternativa konvencionalnim metodam čiščenja odpadnih vod, saj je metoda konkurenčna, učinkovita in poceni (Volesky, 2001). V prihodnosti bi lahko za čiščenje odpadnih vod, ki vsebujejo kovine in radionuklide uporabili poleg fizikalno kemijskih metod tudi biomaso, ki nastaja kot stranski (odpadni) produkt pri industrijskih fermentacijskih procesih in bi tako rešili problematiko odpadne biomase (Kapoor in Viraraghavan, 1995).

2.2 OKSIDATIVNI STRES

2.2.1 Definicija stresa

Za celice predstavlja stres vsak odmik od optimalnih pogojev rasti (Ruis, 1997). Pri enoceličnih mikroorganizmih lahko stres definiramo kot nekaj, kar ima negativen vpliv na rast oz. zmanjša hitrost rasti celic (Ruis in Schüller, 1995; Piper, 1997).

Vsi živeči organizmi so v okolju podvrženi različnim fizikalnim ali kemijskim stresnim dejavnikom kot so: sprememba temperature, pH vrednost, težke kovine, razpoložljivost hranil, osmotski stres, toplotni šok, toksičnost produktov bioprocesa (Siderius in Mager, 1997).

2.2.2 Oksidativni stres

Oksidativni stres nastopi, ko nivo reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) preseže antioksidativno sposobnost celice (Moradas-Ferreira in sod., 1996; Jamieson, 1998).

Molekularni kisik je za aerobne organizme esencionalen, hkrati pa predstavlja tudi nevarnost (Santoro in Thiele, 1997), saj so ti organizmi stalno izpostavljeni toksičnim stranskim učinkom molekularnega kisika in sicer preko tvorbe ROS. ROS se tvorijo med normalnim celičnim metabolizmom (mitohondrijska respiratorna veriga, številne reakcije katalizirane z oksidazami, kjer nastaja kot produkt vodikov peroksid). Pri normalnih pogojih rasti so celični endogeni antioksidativni obrambni sistemi dovolj učinkoviti, da obdržijo ROS na osnovni, neškodljivi ravni in popravijo celične poškodbe (Moradas-Ferreira in sod., 1996). Sem sodijo primarno obrambni sistemi, ki odstranjujejo ROS in sekundarni, ki popravijo poškodbe ali odstranijo oksidirane molekule (Moradas-Ferreira in sod., 1996). Različni stresni dejavniki (oksidanti, toplotni šok, etanol, težke kovine) povečajo njihovo količino in posledica je indukcija antioksidativnih obrambnih sistemov – oksidativni stresni odgovor (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

Do porušenega ravnotežja med ROS in antioksidanti v celici lahko pride zaradi izrabe znotrajceličnih antioksidantov in/ali povečane tvorbe ROS (izpostavitve celic snovem, ki proizvajajo ROS) (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

2.2.3 Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)

Reaktivne kisikove zvrsti so molekule kisika v različnih redukcijskih in/ali vzbujenih stanjih in spojine kisika z vodikom, klorom in dušikom (Sigler in sod., 1999). ROS so izredno nestabilne molekule z enim ali več neparnih elektronov (Santoro in Thiele, 1997). V celici nastanejo, če kisik ne sprejme vseh štirih elektronov (Manček in Pečar, 2001).

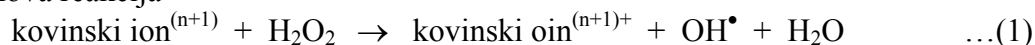
Primarne ROS so: superoksidni anion, vodikov peroksid, hidroksilni radikal in singletni kisik (Santoro in Thiele, 1997). Njihove glavne tarče so DNA, lipidi in proteini, pri čemer nastanejo sekundarne ROS (hidroperoksidi, alkoksilni in peroksilni radikali, epoksidi ali aldehidi), ki povzročijo še dodatne poškodbe celičnih organelov (mitohondriji, jedro), celičnih membran in encimov (Sigler in sod., 1999). Kopičenje oksidiranih molekul vodi do celične smrti (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

2.2.4 Vloga Cr(VI) pri oksidativnem stresu

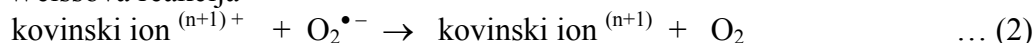
Redoks aktivne kovine, mednje sodi tudi Cr(VI), imajo pomembno vlogo pri tvorbi ROS v celici (Mager in Hohmann, 1997). Reducirane oblike redoks aktivnih kovin reagirajo z vodikovim peroksidom v Fentonovi reakciji, kjer prihaja do tvorbe hidroksilnih radikalov. Oksidirane oblike teh kovin pa skupaj s superoksidnim anionom reagirajo v Haber-Weissovi reakciji, pri čemer nastanejo reducirane oblike kovin, ki lahko ponovno sodelujejo v Fentonovi reakciji. Z omenjenimi kemijskimi mehanizmi vsako povečanje količine superoksidnega aniona, vodikovega peroksida ali redoks aktivnih kovin vodi do

tvorbe velikih količin hidroksilnih radikalov, ki so glavni vzrok za oksidativne poškodbe. Oksidacijsko stanje in biorazpoložljivost redoks aktivnih kovin sta ključnega pomena v njihovi sposobnosti sodelovanja pri tvorbi ROS (Santoro in Thiele, 1997).

Fentonova reakcija



Haber-Weissova reakcija



Obstaja močna povezava med homeostatsko regulacijo redoks aktivnih kovin in oksidativnim stresom (Mager in Hohmann, 1997). Pri kvasovkah se homeostaza kovinskih ionov težkih kovin uravnava z vezavo le-teh z glutationom, fitokelatini in metalotionini, ki služijo za odstranitev presežka prostih ionov in kot njihova rezerva (Sigler in sod., 1999).

2.3 ANTIOKSIDATIVNI OBRAMBNI SISTEMI

Antioksidant je vsaka snov, ki je sposobna že v majhni koncentraciji (v primerjavi s koncentracijo substrata, ki je tarča radikalov) opazno preprečiti ali zavreti oksidacijo substrata (Halliwell in Gutteridge, 2000).

Antioksidanti zaščitijo celico pred ROS tako, da vežejo kovinske ione, encimsko odstranijo oksidante ali pa sami neposredno reagirajo z ROS (Sigler in sod., 1999).

Antioksidativne obrambne sisteme delimo na primarne in sekundarne. Primarni antioksidativni obrambni sistemi so poleg zaščite celičnih komponent pred ROS zadolženi tudi za vzdrževanje celičnega redoks stanja. Sem sodijo tako encimski (katalaza, superoksid dismutaza, glutation peroksidaza) kot tudi neencimski (glutation, trehaloza, tioredoksini) obrambni sistemi (Moradas-Ferreira in sod., 1996; Jamieson, 1998).

Sekundarni oksidativni obrambni sistemi prevzamejo vlogo, ko primarni niso več zadostni, kar pomeni, da je oksidativni stres povzročil poškodbe celičnih komponent (Costa in Moradas-Ferreira, 2001). Njihova naloga je, da popravijo poškodbe ali odstranijo oksidirane molekule (Moradas-Ferreira in sod., 1996). Med sekundarne antioksidativne obrambne sisteme uvrščamo lipolitične encime, proteolitične sisteme in popravljalni sistem DNA (Davies, 1986).

2.3.1 Endogeni antioksidativni obrambni sistem – glutation

2.3.1.1 Glutation – splošno

Glutation predstavlja enega glavnih neencimskih obrambnih sistemov proti oksidativnemu stresu v kvasni celici (Walker, 1998). Je ubikvitaren nizkomolekularen tiol in sodeluje v številnih celičnih procesih vključno s transportom aminokislin, sintezo proteinov in nukleinskih kislin, modulacijo encimske aktivnosti (Meister, 1988; Grant in Dawes, 1996).

Pomembno vlogo pa ima tudi pri zaščiti celic pred različnimi vrstami stresa, kot so: prehranski stres (pomanjkanje žvepla in dušika, rast na metanolu in glicerolu), okoljski stres (prisotnost ksenobiotikov in težkih kovin) in oksidativni stres (Penninckx, 2000).

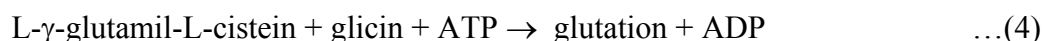
Glutation je prisoten v velikih koncentracijah (do 10 mM) v številnih živih celicah, od prokariontov do evkariontov (Meister in Anderson, 1983). V celicah kvasovke *S. cerevisiae* lahko predstavlja tudi 0,5 – 1 % suhe teže, odvisno od rastnih pogojev.

Glutation je pri kvasovkah, za razliko od bakterij, esencialen reducent med normalnimi celičnimi procesi (Grant in sod., 1996b). Dosedanje raziskave so namreč pokazale, da se je živost kvasovk *S. cerevisiae* pod kritično mejo, ki je 10 % normalne vrednosti celičnega glutaciona, močno zmanjšala (Mehdi in Penninckx, 1997).

Biološkega pomena pri glutationu je predvsem prosta sulfhidrilna (-SH) skupina cisteina, ki zagotavlja edinstvene reducirajoče in nukleofilne lastnosti (Penninckx, 2000). Zaradi zelo nizkega redoks potenciala in dejstva, da se reducirana oblika (GSH) vzdržuje z encimom glutation-reduktaza v odvisnosti od NADPH, ima glutation v celici vlogo reducirajočega pufra (Meister in Anderson, 1983).

2.3.1.2 Sinteza glutaciona

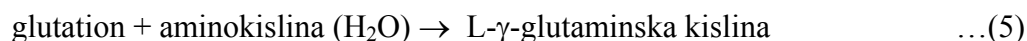
Glutation je tripeptid (γ -glutamilcisteinilglicin). Njegova sinteza je neodvisna od mRNA. Poteka v dveh stopnjah, kataliziranih z dvema različnima encimoma in s pomočjo energije v obliki ATP. Najprej encim γ -glutamilcistein-sintetaza katalizira nastanek γ -glutamilcisteina iz glutaminske kisline in cisteina, potem pa drugi encim glutation-sintetaza katalizira vezavo glicina z nastalim dipeptidom (Meister, 1988). Sintezo glutaciona prikazujeta spodnji dve enačbi:



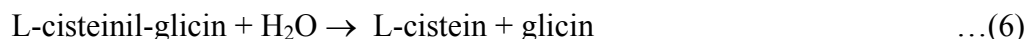
Opisani mehanizem sinteze glutaciona ima dve posebnosti; prva je neodvisnost od mRNA, ki je sicer vključena v sintezo ostalih proteinov. Posebna pa je tudi vezava glutaminske kisline preko γ -C-atoma na cistein, kar naj bi glutation zaščitilo pred proteolizo (Meister, 1988).

2.3.1.3 Razgradnja glutaciona

Edini splošno znani encim v celicah kvasovk, ki katalizira razgradnjo glutaciona, je γ -glutamil-transpeptidaza (Penninckx in sod., 1980; Mehdi in sod., 2001). Najprej se odcepi glutaminska kislina, kar prikazuje spodnja enačba:

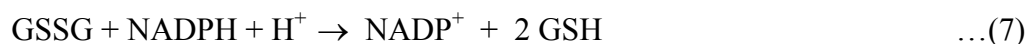


Encim L-cisteinil-glicin-dipeptidaza katalizira naslednjo stopnjo hidrolize glutationa, pri čemer se dipeptid v prisotnosti vode razcepi na preostali dve aminokislini, cistein in glicin (Jaspers in Penninckx, 1984). Reakcijo prikazuje spodnja enačba:



2.3.1.4 Regeneracija glutationa

Poraba glutationa v encimskih in neencimskih obrambnih sistemih temelji na oksidaciji, ko slednji preide iz reducirane (GSH) v disulfidno, oksidirano obliko (GSSG). Da pa ne pride do prekomernega znotrajceličnega kopičenja oksidirane oblike oz. da se vzdržuje veliko razmerje GSH/GSSG v celici, je nujno potrebna pretvorba v prvotno, reducirano (GSH) obliko. GSSG se regenerira v GSH z encimom glutation-reduktaza v prisotnosti NADPH, kar prikazuje spodnja enačba:



Pri tem nastali NADP^+ se ponovno reducira v NADPH z encimom glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza preko pentoza fosfatne poti (Grant in sod., 1996a).

2.3.1.5 Vloga glutationa pri detoksifikaciji težkih kovin

Glutation je vključen v zaščito celice pred težkimi kovinami, saj je eden primarnih celičnih reductentov kovinskih ionov, kot sta krom in arzen. Celični tioli imajo pomembno vlogo v biokemiji kovinskih ionov in za vzdrževanje redoks stanja. Mnoge kancerogene kovine (Cr, Cd, Ni) tvorijo s tioli ligande raje kot z drugimi funkcionalnimi skupinami (Klein in sod., 1998).

2.3.1.6 Vloga glutationa pri oksidativnem stresu

Glutation ima v celicah kvasovk pomembno vlogo, še posebno kot zaščita pred oksidativnim stresom. S prosto sulfhidrilno skupino (-SH) lahko reagira z oksidanti in tako deluje kot lovilec prostih radikalov (Jamieson, 1998).

Po izpostavitvi celic kvasovke *Candida intermedia* Cr(VI) se poveča raven oksidantov v celici, zlasti pri koncentraciji Cr(VI) 100 $\mu\text{mol/L}$. Kot odgovor na stres se poveča vsebnost glutationa v reducirani obliki, ki ima vlogo lovilca prostih radikalov (Jamnik, 2002).

Osmotski in toplotni stres sta povezana z oksidativnim stresom, saj je pri izpostavitvi celic kvasovke *S. cerevisiae* NaCl ali povišani temperaturi kot stresnima dejavnikoma prišlo do indukcije antioksidativnih neencimskih obrambnih sistemov oz. natančneje do povečane znotrajcelične vsebnosti glutationa v reducirani obliki. S povečanjem v vsebnosti GSH so se tako celice ubranile pred škodljivim delovanjem nastalih reaktivnih kisikovih zvrsti

(ROS). Povečana vsebnost GSH je lahko posledica sinteze kot tudi samo regeneracije glutationa (Medved, 2004).

2.3.2 Eksogeni antioksidativni obrambni sistem – askorbinska kislina (vitamin C)

2.3.2.1 Askorbinska kislina – splošno

Askorbinska kislina ima dve ionizirajoči –OH skupini. Pri fiziološkem pH obstaja predvsem v mono anionski obliki, zato bomo uporabljali ime askorbat. Askorbat ima *in vivo* pomembno vlogo kot kofaktor različnim encimom, med katerimi sta najbolj poznana prolin hidrosilaza in lizin hidrosilaza, ki sta vključena v biosintezo kolagena (Halliwell in Gutteridge, 1999).

Najpomembnejša kemijska lastnost askorbata je njegova vloga reducenta (Halliwell in Gutteridge, 1999). Askorbinska kislina velja za pomemben antioksidant v višjih evkariontih, posebno v rastlinah. Pri kvasovkah, zlasti pri *Saccharomyces cerevisiae*, je njena vloga manj znana. Le nekaj poročil omenja, da so našli askorbinsko kislino v *Saccharomyces cerevisiae* in še to v majhnih koncentracijah (Jamieson, 1998). Povprečje nivoja askorbinske kisline se omenja v koncentraciji 1 mM (Meister, 1994).

2.3.2.2 Sinteza askorbinske kisline

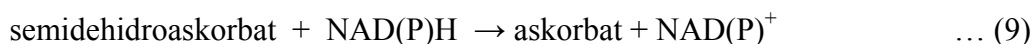
Rastline in mnoge živali so sposobne sintetizirati askorbinsko kislino iz glukoze, medtem ko je človek v evoluciji izgubil enega od potrebnih encimov za biosintezo. Zato mora biti askorbinska kislina v obliki vitamin C prisotna v prehrani ljudi (Halliwell in Gutteridge, 1999).

2.3.2.3 Razgradnja askorbinske kisline

Ko askorbat odda elektron, nastane semidehidroaskorbat (SDA) oz. askorbilni radikal, ki se lahko dalje oksidira do dehidroaskorbata (DHA). Askorbilni radikal ni posebno reaktiven, kar je tudi vzrok mnogih antioksidativnih učinkov askorbata. Kajti ko askorbat reagira z reaktivnim radikalom, pri tem nastane veliko manj reaktiven askorbilni radikal (Halliwell in Gutteridge, 1999). Dehidroaskorbat je nestabilen in se lahko razgradi na tartrat in oksalat (McKersie, 1996).

2.3.2.4 Regeneracija askorbinske kisline

Mnoge celice vsebujejo mehanizme za pretvarjanje oksidirane oblike askorbata nazaj v reducirano obliko. Za pretvorbo dehidroaskorbatnega ali askorbatnega radikala nazaj do askorbinske kisline sta odgovorna encima semidehidroaskorbat-reduktaza in dehidroaskorbat-reduktaza v prisotnosti reducirane oblike NAD(P)H ali glutationa (McKersie, 1996).



2.3.2.5 Transport askorbinske kisline v celico

Znotrajcelična akumulacija askorbinske kisline poteka po dveh različnih mehanizmih: od natrija neodvisen transport dehidroaskorbinske kisline in od natrija odvisen transport askorbinske kisline. Pri fizioloških pogojih se v celico akumulira pomemben delež askorbinske kisline (Park, 2001).

2.3.2.6 Vloga askorbinske kisline pri detoksifikaciji težkih kovin

Askorbat lahko *in vivo* pomaga pri detoksifikaciji različnih organskih radikalov s procesom redukcije (Halliwell in Gutteridge, 1999).

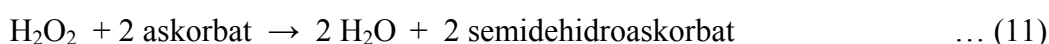
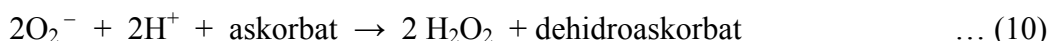
Številne študije so pokazale, da je askorbinska kislina pomemben reducent v metabolizmu Cr(VI) (Standeven in Wetterhahn, 1991; Standeven in Wetterhahn, 1992). Redukcija z askorbinsko kislino je hitrejša kot z glutationom ali cisteinom (Quievryn in sod., 2003), vendar pa je glutation zaradi večjih znotrajceličnih koncentracij še vedno pomemben v metabolizmu redukcije Cr(VI).

2.3.2.7 Vloga askorbinske kisline pri oksidativnem stresu

Askorbat izredno hitro reagira z O_2^- , HO_2^\bullet in OH^\bullet , pri čemer nastane semidehidroaskorbat. Je tudi lovilec singletnega kisika in se hitro poveže s hipoklorno kislino, ki je močan oksidant. Askorbat peroksidaza ima funkcijo odstranjevanja vodikovega peroksida. Zato lahko za askorbat rečemo, da uspešno pomaga pri zaščiti celice pred reaktivnimi kisikovimi zvrstmi (Halliwell in Gutteridge, 1999).

Askorbinska kislina lahko reagira s H_2O_2 v Fentonovi reakciji in s tem stimulira tvorbo OH^\bullet . Celoten učinek pa je odvisen od koncentracije prisotnega askorbata, ker je hkrati tudi lovilec OH^\bullet (Halliwell in Gutteridge, 1999).

Spodaj sta prikazani osnovni znotrajcelični reakciji, v kateri sta vključeni askorbinska kislina in ROS (McKersie, 1996):



2.4 CILJI NALOGE IN DELOVNA HIPOTEZA

Cilji naloge so naslednji:

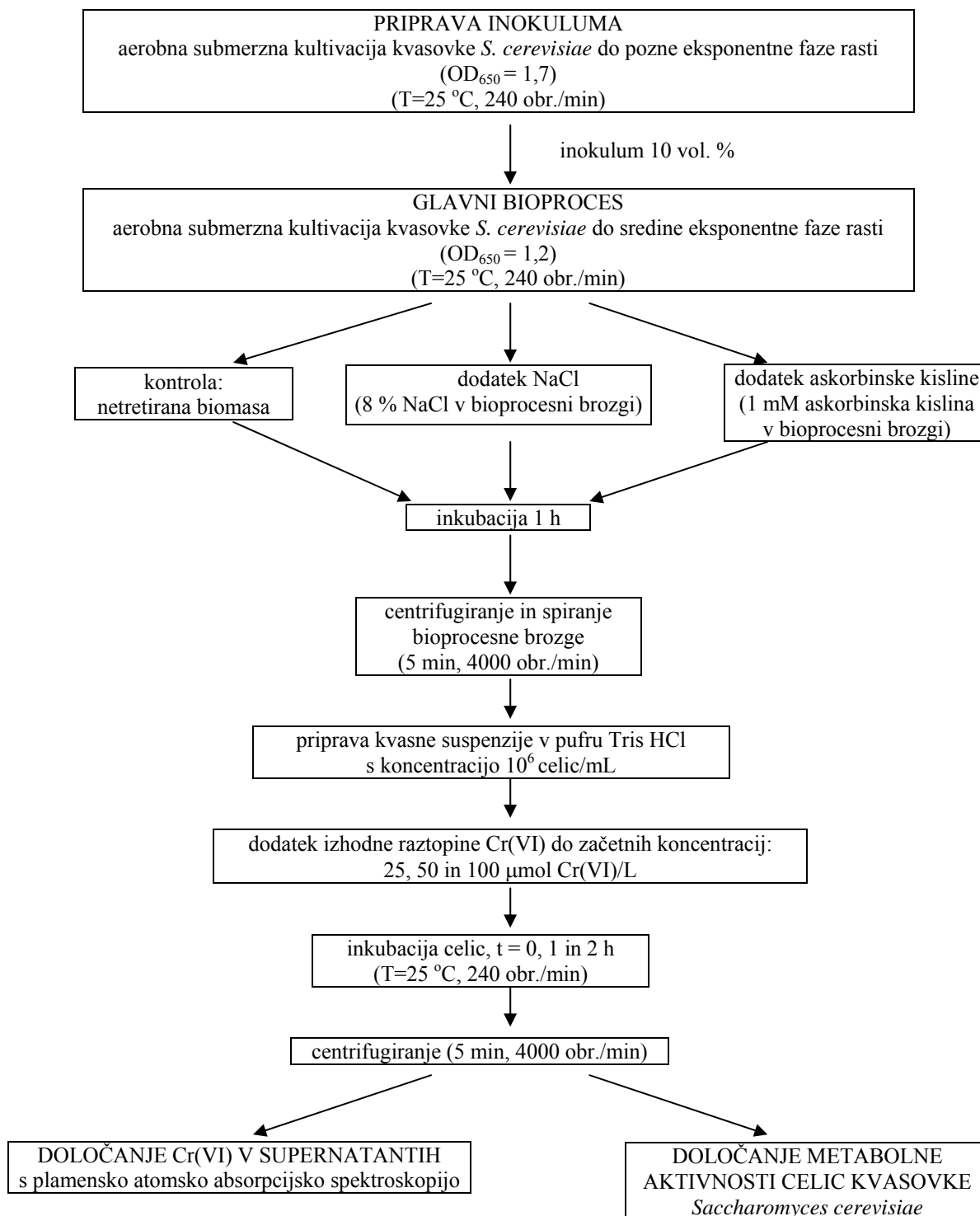
- kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* izpostaviti NaCl ali askorbinski kislini in primerjati razliko tretirane in netretirane kvasne biomase v sposobnosti odstranjevanja Cr(VI)
- določiti razliko v metabolni aktivnosti tretirane in netretirane kvasne biomase

Postavili smo naslednjo delovno hipotezo:

- kvasna biomasa, tretirana z NaCl ali askorbinsko kislino (s povečanim antioksidativnim potencialom), ima večjo sposobnost akumulacije Cr(VI) kot netretirana kvasna biomasa.

3 METODE IN MATERIAL

3.1 POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA



Slika 1: Hodogram poteka celotnega poskusa

3.2 METODE

3.2.1 Priprava inokuluma

Tri dni staro kulturo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* smo s cepilno zanko prenesli s petrijeve plošče v 100 mL tekočega YEPD gojišča, ki smo ga predhodno pripravili v 500 mL erlenmajericah s stransko kiveteto. Po umerjanju spektrofotometra z gojiščem je znašala začetna optična gostota suspenzije kvasovk v gojišču, izmerjena pri valovni dolžini 650 nm, približno 0,15. V erlenmajerice smo dali tudi sterilne magnetke, jih zamašili z vato, prekrili z aluminijasto folijo in namestili na magnetno mešalno ploščo v inkubator. Sledila je aerobna submerzna kultivacija kvasne biomase pri $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ in hitrosti mešanja 240 obr./min. Rast kvasovke smo spremljali z merjenjem optične gostote v dveh ponovitvah. Na podlagi rastle krivulje smo določili vrednost OD, ki je ustrezala pozni eksponentni fazi rasti ($OD = 1,7$).

3.2.2 Predposkus glavnega bioprocesa

Tudi tokrat smo spremljali rast kvasovke z merjenjem optične gostote pri valovni dolžini 650 nm. 40 mL predhodno pripravljenega inokuluma, ki smo ga namnožili do optične gostote 1,7, smo z merilnim valjem prenesli v 1000 mL erlenmajerico s stransko kiveteto s 360 mL tekočega YEPD gojišča. Inokulum je tako predstavljal 10 vol.% zmesi. V erlenmajerice smo dali še sterilne magnetke, jih zamašili z vato, prekrili z aluminijasto folijo in namestili na magnetno mešalno ploščo v inkubator. Sledila je aerobna submerzna kultivacija kvasovke *S. cerevisiae* pri $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 240 obr./min. S pomočjo rastle krivulje smo določili sredino eksponentne faze rasti kvasovke ($OD = 1,2$).

3.2.3 Glavni bioproces

3.2.3.1 Kultivacija kvasne biomase

Po inokulaciji smo kulturo kvasovk namnožili do sredine eksponentne faze rasti, kar je pomenilo do optične gostote 1,2 (pri valovni dolžini 650 nm).

Ob plamenskem gorilniku smo nato v erlenmajerice z brozgo dodali:

- 32 g NaCl in s tem dosegli, da je bila koncentracija NaCl v bioprocesni brozgi 8 % ali
- 2 mL 200 mM izhodne raztopine askorbinske kisline in s tem dosegli koncentracijo askorbinske kisline v bioprocesni brozgi 1 mM

Po dodatku NaCl/askorbinske kisline je sledila 1 ura inkubacije pri $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 240 obr./min. Kultivacijo smo za obe tretirani biomasi kot tudi za netretirano biomaso (kontrolno) izvedli v dveh ponovitvah.

3.2.3.2 Centrifugiranje bioprocene brozge in spiranje biomase

Po enourni inkubaciji je sledilo centrifugiranje bioprocene brozge (5 min pri 4000 obr./min). Netretirano biomaso in biomaso tretirano z NaCl smo nato spirali z destilirano vodo, medtem ko smo z askorbinsko kislino obogateno biomaso spirali dvakrat s pufrom Tris HCl. Supernatant smo odlili, sprano biomaso pa smo uporabili za pripravo izhodne suspenzije.

3.2.3.3 Priprava kvasne suspenzije v pufru Tris HCl

Za pripravo izhodne suspenzije smo sprano biomaso v centrifugirki prelili z 10 mL pufru Tris HCl, prekrili s folijo in premešali na vrtinčniku. Sledilo je štetje celic pod mikroskopom s hemacitometrom (potrebna predhodna dvakratna (10^{-2}) razredčitev po Kochu). Število prešteti celic nam je služilo za izračun volumna izhodne suspenzije, ki smo ga nato prenesli v 1000 mL erlemajerice s 500 mL pufru Tris HCl s pH = 4,00. V suspenziji smo želeli doseči koncentracijo 10^6 celic/mL.

3.2.3.4 Dodatek izhodne raztopine Cr(VI) v kvasno suspenzijo

V tako pripravljeno kvasno suspenzijo smo dodali določen volumen izhodne raztopine kalijevega dikromata ($K_2Cr_2O_7$) do doseženih začetnih koncentracij: 25, 50 in 100 $\mu\text{mol Cr(VI)/L}$. Pri vsaki posamezni koncentraciji smo vzorčili 5 krat po 6 mL brozge ob $t = 0$, po eni in dveh urah inkubacije v centrifugirki in centrifugirali 5 min pri 4000 obr./min. V 12-mL plastične centrifugirke smo odpipetirali po 4 mL supernatanta in vzorce shranili v zmrzovalniku do analiz z atomsko absorpcijsko spektroskopijo.

3.2.4 Atomska absorpcijska spektroskopija

Koncentracijo kroma v vzorcih smo določali z atomsko absorpcijsko spektroskopijo (AAS), ki je med najpogosteje uporabljenimi tehnikami za določanje kovin v sledovih. Začetna faza analize je atomizacija elementa. Pri tem dobimo aerosol atomov in mogoče ionov analiziranega elementa (plinska faza). Za atomizacijo je na razpolago več metod; pri naši analizi smo uporabili plamen oz. plamensko atomsko absorpcijsko spektroskopijo.

Bistvo atomske spektroskopije je, da elektron pri prehodu iz orbitale z večjo energijo v orbitalo z manjšo energijo, odda razliko v energiji kot sevanje točno določene valovne dolžine. Atomi v plamenu pridejo v vzbujeno stanje.

Votla katodna svetilka je izvor sevanja (fotonov) elementa, ki ga določamo. Žarek gre skozi plamen, v katerem se element atomizira. Vzorec prihaja v plamen, kjer se razprši, v plamenu hitro izpari ter preide v atome, ione in elektrone. Atomi, ki nastajajo, absorbirajo emitirano svetlobo izvora (žarnica z votlo katodo) s čimer se zmanjša energija žarka katodne žarnice proporcionalno s količino merjenih atomov v vzorcu. Fotopomnoževalka pa pretvori energijo sevanja (fotoni) v električni signal (Skoog in sod., 1996; Skoog in sod., 2000).

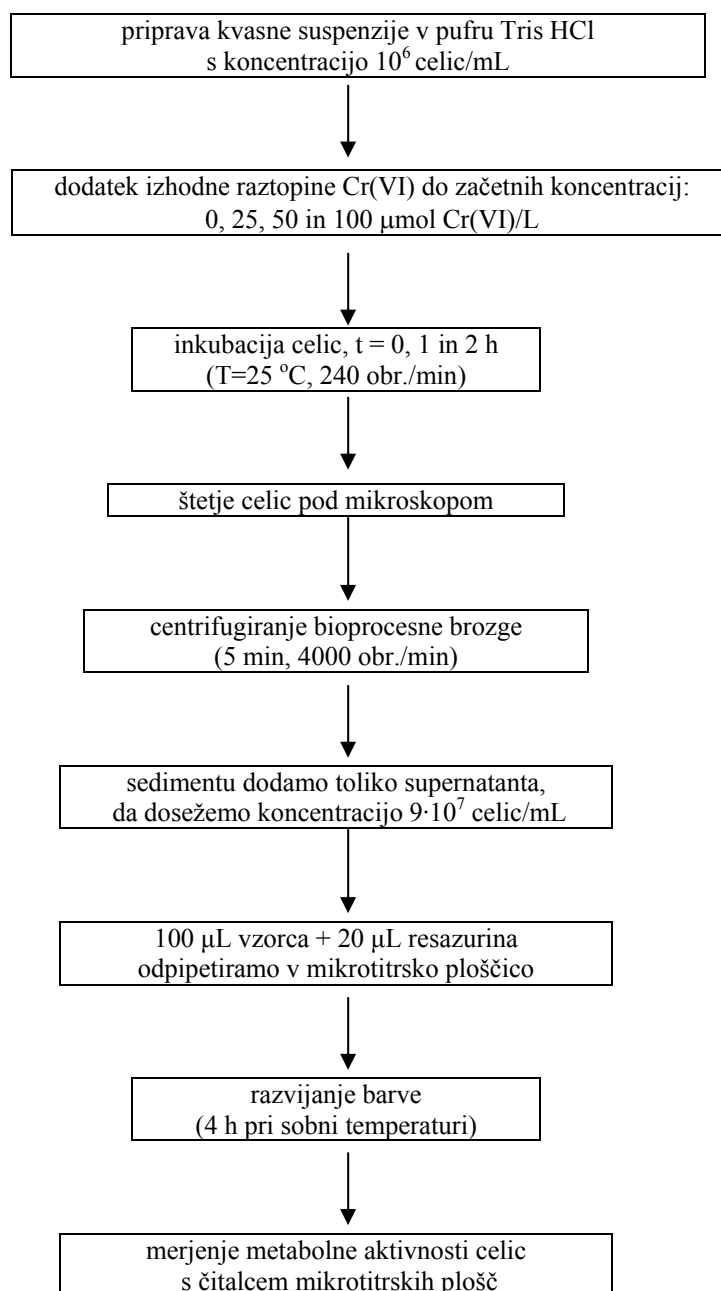
3.2.5 Določanje metabolne aktivnosti celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*

Metabolno aktivnost lahko določamo z merjenjem vsebnosti ATP in NADH v celici, uporabljajo pa se tudi redoks indikatorji. Novejše metode vključujejo uporabo barvil, ki jih žive celice pretvarjajo v produkte, ki jih je mogoče spremljati (Walker, 1998). Tudi v našem primeru smo metabolno aktivnost celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* določali z uporabo reagenta CellTiter-BlueTM (Promega) (Riss in Moravec, 2003).

CellTiter-BlueTM reagent je pufirska raztopina, ki vsebuje prečiščeno barvilo resazurin. Reagent se doda ob koncu izpostavitve celic preiskovani snovi. Metoda temelji na sposobnosti živih, metabolno aktivnih celic, da pretvarjajo redoks barvilo (resazurin) v fluorescentni končni produkt (resorufin), medtem ko nežive celice izgubijo metabolno kapaciteto in zato ne tvorijo fluorescentnega signala. Spektralne lastnosti reagenta se spremenijo ob redukciji resazurina v resorufin. Resazurin je temno modre barve in je zelo šibko fluorescenten, medtem ko je reduciran resorufin roza in močno fluorescenten. Resazurin ima absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 605 nm, resorufin pa pri 573 nm. Tako resazurin kot resorufin sta občutljiva na svetlobo. Daljša izpostavljenost resazurina svetlobi ima za posledico povečano fluorescenco ozadja in zmanjšano občutljivost. Za merjenje lahko uporabimo tako fluorescenco kot absorbanco, vendar je zaradi večje občutljivosti bolj primerna fluorescenca (Riss in Moravec, 2003).

Reagent dodamo neposredno v gojišče s celicami, sledi inkubacija ene do štirih ur. Na čas inkubacije vpliva število celic in njihova sposobnost redukcije resazurina, zato je potrebno določiti optimalno število celic in čas izpostavitve reagentu. Fluorescentni resorufin prehaja iz celic v gojišče. Večja ko je fluorescenca, več resazurina se je pretvorilo v resorufin, kar pomeni, da so celice bolj metabolno aktivne. CellTiter-BlueTM reagent je primeren za merjenje fluorescence v mikrotitrskih ploščicah, kjer v vsako jamico dodamo 100 μ L suspenzije celic in 20 μ L reagenta (Riss in Moravec, 2003).

Pri določanju metabolne aktivnosti celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* smo ponovili postopek do točke 3.2.3.3, kjer smo pripravili kvasno suspenzijo v pufru Tris HCl s koncentracijo 10^6 celic/mL. Sledila je razdelitev kvasne suspenzije po 100 mL v 300-mL erlenmajerice, ki smo jih nato izpostavili različnim koncentracijam izhodne raztopine Cr(VI): 0, 25, 50 in 100 μ mol Cr(VI)/L. Ob $t = 0$, $t = 1$ h in $t = 2$ h (inkubacija na magnetni mešalni plošči v inkubatorju) smo odvzeli po 1 mL brozge in določili število celic na mililiter. V 1,5-mL mikrocentrifugirkah smo pripravili suspenzijo celic s koncentracijo $9 \cdot 10^7$ celic/mL. To smo naredili tako, da smo centrifugirali 90 mL bioprocene brozge vsakega vzorca pri 4000 obr./min, 5 min. Supernatant smo shranili, zato da smo lahko celice v sedimentu primerno redčili s pripadajočimi supernatanti. Končna koncentracija celic je bila $9 \cdot 10^7$ celic/mL. Po dva paralelna vzorca (100 μ L) za vsako koncentracijo Cr(VI) smo prenesli na mikrotitrsko ploščico in dodali 20 μ L resazurina. Poleg vzorcev smo na mikrotitrsko ploščico, kot negativno kontrolo, nanесли še pufer Tris HCl in pufer Tris HCl z dodanim barvilom. Sledilo je štiriurno razvijanje barve. S čitalcem mikrotitrskih plošč smo merili fluorescenco pri valovni dolžini 595 nm, valovna dolžina vzbujanja pa je bila 550 nm.

Slika 2: Hodogram poteka določanja metabolne aktivnosti celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*

3.2.6 Obdelava rezultatov

Za vsako posamezno biomaso smo izvedli kultivacijo v dveh ponovitvah. Znotraj ene ponovitve smo določali koncentracijo Cr(VI) v supernatantih v petih paralelnih vzorcih, metabolno aktivnost celic kvasovke pa smo znotraj ene ponovitve izmerili v enem vzorcu.

Rezultate meritev smo podali kot povprečno vrednost (\bar{x}) (Košmelj, 2001):

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i \quad \dots (12)$$

n ... število vzorcev

x_i ... vrednost i-te meritve

Ponovljivost meritev smo statistično ocenili z izračunom standardne deviacije (s) po spodnji enačbi (Košmelj, 2001):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \dots (13)$$

Relativno variiranje meritev smo podali s koeficientom variacije (KV) (Košmelj, 2001):

$$KV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \dots (14)$$

Pri izračunavanju faktorjev (F_A, F_B, \dots - točka 3.2.7) smo pripadajoče standardne deviacije računali po naslednjih enačbah:

$$KV_1 = \frac{s_1}{\bar{x}_1} \quad \dots (15)$$

$$KV_2 = \frac{s_2}{\bar{x}_2} \quad \dots (16)$$

$$KV = \sqrt{KV_1^2 + KV_2^2} \quad \dots (17)$$

$$s = KV \cdot \frac{\bar{x}_1}{\bar{x}_2} \quad \dots (18)$$

3.2.7 Izračuni

Koncentracijo Cr(VI) v supernatantih in metabolno aktivnost celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* smo izrazili s faktorji (Raspor in sod., 1999). Izračuni zanje so prikazani pod točko 3.2.7.1 in 3.2.7.2.

3.2.7.1 Določanje koncentracije Cr(VI) v supernatantih

$$F_A = \frac{\overline{C_{Cr, t = 1, Cr = 25, B}}}{\overline{C_{Cr, K(Cr = 25)}}} \quad \dots (19)$$

$\overline{C_{Cr}}$	povprečna koncentracija Cr(VI) v supernatantih
t	0, 1, 2 h po dodatku Cr(VI)
Cr	25, 50, 100 μ M koncentracija Cr(VI)
B	B _N , B _{NaCl} , B _{AK}
B _N	netretirana biomasa
B _{NaCl}	biomasa tretirana z NaCl
B _{AK}	biomasa tretirana z askorbinsko kislino
K	izmerjena vrednost kontrole (pufer + Cr(VI))

Faktor F_A je izračunan za posamezno koncentracijo Cr(VI) glede na kontrolo (pufer Tris HCl + Cr(VI)).

$$F_B = \frac{F_{A, t = 1, Cr = 25, B}}{F_{A, t = 1, Cr = 25, B_N}} \quad \dots (20)$$

t	0, 1, 2 h po dodatku Cr(VI)
Cr	25, 50, 100 μ M koncentracija Cr(VI)
B	B _N , B _{NaCl} , B _{AK}
B _N	netretirana biomasa

Faktor F_B je izračunan za posamezno koncentracijo Cr(VI) glede na netretirano biomaso ob določenem času.

3.2.7.2 Določanje metabolne aktivnosti celic kvasovke *S. cerevisiae*

$$F_C = \frac{\overline{F}_{t=1, Cr=25, B_{AK}}}{\overline{F}_{t_K, B_{AK}}} \quad \dots (21)$$

\overline{F}	povprečna vrednost fluorescence
t	0, 1, 2 h po dodatku Cr(VI)
Cr	0, 25, 50, 100 μ M koncentracija Cr(VI)
B	B_N , B_{NaCl} , B_{AK}
t_K	t = 0, pred dodatkom Cr(VI)

Faktor F_C je izračunan za posamezno biomaso glede na t = 0, pred dodatkom Cr(VI).

$$F_D = \frac{F_{C, t=1, Cr=25, B_{NaCl}}}{F_{C, t=1, B_{NaCl}}} \quad \dots (22)$$

t	0, 1, 2 h po dodatku Cr(VI)
Cr	25, 50, 100 μ M koncentracija Cr(VI)
B_K	kontrolna biomasa: B_{NK} , B_{NaClK} , B_{AKK} , ki ni bila izpostavljena Cr(VI)

Faktor F_D je izračunan za posamezno biomaso, ki je bila izpostavljena različnim koncentracijam Cr(VI), ob določenem času glede na kontrolno biomaso.

$$F_E = \frac{F_{D, t=1, Cr=25, B}}{F_{D, t=1, Cr=25, B_N}} \quad \dots (23)$$

t	0, 1, 2 h po dodatku Cr(VI)
Cr	0, 25, 50, 100 μ M koncentracija Cr(VI)
B	B_N , B_{NaCl} , B_{AK}
B_N	netretirana biomasa

Faktor F_E je bil izračunan za različno tretirane biomase ob določenem času in določeni koncentraciji Cr(VI) glede na netretirano biomaso.

3.2.8 Statistična analiza

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programski paket SAS/STAT (SAS Software. Version 8.01, 1999). V poskusu zbrane podatke smo pripravili in uredili s programom EXCEL XP. Osnovne statistične parametre smo izračunali s proceduro MEANS, s proceduro UNIVARIATE pa smo podatke testirali na normalnost porazdelitve. Pri obdelavi podatkov s statističnim modelom smo uporabili proceduro GLM (General Linear Model).

Statistični model 1 smo uporabili za obdelavo podatkov merjenja koncentracije Cr(VI) v supernatantih in metabolne aktivnosti. V model smo vključili vpliv biomase, časa, koncentracije Cr(VI) ter vse dvojne in trojno interakcijo med omenjenimi vplivi. Vsi podatki so predstavljeni kot ocenjene povprečne vrednosti (LSM).

Statistični model 1:

$$y_{ijkl} = \mu + B_i + C_j + K_k + B*C_{ij} + B*K_{ik} + C*K_{jk} + B*C*T_{ijk} + e_{ijkl}$$

y_{ijkl} = opazovana vrednost

μ = povprečna vrednost

B_i = vpliv i-te biomase; $i = B_N, B_{NaCl}, B_{AK}$

C_j = vpliv j-tega časa merjenja; $j = \text{tako}$, 1 h, 2 h

K_k = vpliv j-te koncentracije Cr (VI); $k = 0, 25, 50, 100$ enote

$B*C_{ij}$ = vpliv interakcij med i-to biomaso in j-tim časom merjenja

$B*K_{ik}$ = vpliv interakcij med i-to biomaso in k-to koncentracijo Cr(VI)

$C*K_{jk}$ = vpliv interakcij med j-tim časom meritve in k-to koncentracijo Cr(VI)

$B*C*K_{ijk}$ = vpliv interakcij med i-to biomaso, j-tim časom merjenja in k-to koncentracijo Cr(VI)

e_{ijkl} = ostanek.

3.3 MATERIAL

3.3.1 Mikroorganizem

Uporabili smo kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* – ZIM 2155 iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov Biotehniške fakultete.

Kvasovko smo hranili na petrijevih ploščah s trdnim YEPD gojiščem v inkubatorju pri temperaturi 25 °C in jo vsake tri dni precepljali.

3.3.2 Gojišče

3.3.2.1 Trdno YEPD gojišče

Za precepljanje in hranjenje kulture kvasovke smo uporabili trdno YEPD gojišče.

Preglednica 2: Sestava trdnega YEPD gojišča (Atlas, 1993)

Sestavina	Masa (g)
kvasni ekstrakt (Biolife)	5,0
pepton (Oxoid)	5,0
brezvodna glukoza (Kemika)	10,0
agar (Biolife)	20,0
dH ₂ O	1000 mL

Po zatehti sestavin smo gojišče najprej zaklejili in nato sterilizirali 20 minut pri temperaturi 121°C in tlaku 1,1 bar. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45 °C in razlili v petrijeve plošče.

3.3.2.2 Tekoče YEPD gojišče

Tekoče YEPD gojišče smo uporabili za aerobno submerzno kultivacijo kvasne biomase, tako v primeru priprave inokuluma, kot tudi v primeru glavnega bioprocasa.

Preglednica 3: Sestava tekočega YEPD gojišča (Atlas, 1993)

Sestavina	Masa (g)
kvasni ekstrakt (Biolife)	5,0
pepton (Oxoid)	5,0
brezvodna glukoza (Kemika)	10,0
dH ₂ O	1000 mL

Po zatehti sestavin smo gojišče sterilizirali 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar. Pred dodatkom kulture smo gojišče ohladili na sobno temperaturo.

3.3.3 Reagenti in raztopine

3.3.3.1 Merjenje koncentracije Cr(VI) v supernatantih

- 5 mM pufer Tris HCl, pH = 4,0

Predhodno je potrebno pripraviti:

- 0,2 M Tris: 12,1 g Tris (Sigma)
dopolnimo z dH₂O do 500 mL
- 0,1 M HCl: 4,9 mL 32 % HCl (Merck)
dopolnimo z dH₂O do 500 mL

priprava 50 mM pufera Tris HCl (izhodna raztopina):

25 mL 0,2 M Tris

dodamo \cong 50 mL 0,1 M HCl oz. do zmanjšanja pH na 4,0

dopolnimo z dH₂O do 100 mL

priprava 5 mM pufera Tris HCl:

100 mL izhodnega 50 mM pufera Tris HCl

dodamo 900 mL dH₂O

5 mM pufer Tris HCl smo sterilizirali 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar. Uporabili smo ga za pripravo kvasne suspenzije in za spiranje biomase obogatene z askorbinsko kislino.

- 100 mM izhodna raztopina Cr(VI)
zatehtamo 1,4710 g K₂Cr₂O₇ (Sigma)
dopolnimo z dH₂O do 100 mL

3.3.3.2 Tretiranje celic kvasovke

- NaCl (Merck)

V stekleno čašo smo zatehtali 32 g soli in jo pred dodatkom v brozgo za 5 min izpostavili UV-svetlobi v brezprašni komori.

- 200 mM izhodna raztopina askorbinske kisline
zatehtamo 3,552 g askorbinske kisline (Sigma)
dodamo 100 mL sterilne dH₂O
steklenico ovijemo s folijo

3.3.3.3 Določanje števila celic v izhodni suspenziji

- 0,9 % fiziološka raztopina NaCl
zatehtamo 0,9 g NaCl (Merck)
dodamo 100 mL dH₂O

3.3.3.4 Določanje metabolne aktivnosti celic

- CellTiter-Blue™ reagent (Promega)

3.3.4 Pribor in oprema

3.3.4.1 Priprava gojišča

- tehtnica (Sartorius excellence)
- magnetno mešalo (Rotamix 550 MM, Tehnica Železniki)
- mikrovalovna pečica (Sanyo)
- brezprašna komora (PIO SMBC 122, Iskra)
- avtoklav (Sutjeska)
- vodna kopel (HETO)
- plastične petrijeve plošče
- 500-mL in 1000-mL erlenmajerice s stransko kiveto
- infuzijske steklenice za sterilizacijo gojišč, raztopin
- plastične čaše
- kovinska žlička
- merilni valj
- magnetki

3.3.4.2 Priprava inokuluma

- brezprašna komora (PIO SMBC 122, Iskra)
- spektrofotometer (Pharmacia Biotech Ultraspec 2000)
- magnetna mešalna plošča (IKAMAG® EOA 9 Electronic) z regulatorjem hitrosti mešanja (Ika-Werk ES5, Janke & Kunkel)
- inkubator (I-50 VPC, Kambič)
- 500-mL erlenmajerice s stransko kiveto
- cepilna zanka
- avtomatska pipeta (Gilson)
- kivete
- magnetki
- plutovinasti podstavki

3.3.4.3 Centrifugiranje bioprocenane brozge in spiranje biomase

- centrifuga (LC – 321, Tehnica Železniki)
- steklene centrifugirke
- steklene palčke
- tehnica (Sartorius excellence)

3.3.4.4 Določanje števila celic v suspenziji

- mikroskop (ATC 2000, Leica)
- števna ploščica Bürker-Türk (Brand)
- avtomatska pipeta (Gilson)
- vrtinčnik (EV 100, Tehnica Železniki)
- bakteriološke epruvete
- nastavki za pipeto

3.3.4.5 Priprava pufra Tris HCl

- tehnica (Sartorius analytic)
- pH meter (Mettler Toledo)
- avtoklav (Sutjeska)
- digestorij
- infuzijske steklenice za sterilizacijo raztopin
- 100-mL in 500-mL merilne bučke
- merilni valji
- avtomatske pipete (Gilson)
- steklene čaše
- magnetki

3.3.4.6 Določanje koncentracije Cr(VI) v supernatantih

- centrifuga (LC-321, Tehnica Železniki)
- 12-mL plastične centrifugirke (TPP)
- avtomatska pipeta (Gilson)
- plamenski atomski absorpcijski spektrometer (VARIAN SPECTRA AA-110)

3.3.4.7 Določanje metabolne aktivnosti celic

- 300-mL erlenmajerice
- centrifuga (LC-321, Tehnica Železniki)
- centrifuga (Eppendorf)
- mikroskop (ATC 2000, Leica)
- števna ploščica Bürker-Türk (Brand)

- avtomatske pipete (Gilson)
- 1,5-mL in 2-mL mikrocentrifugirke (Eppendorf)
- nastavki za pipete
- mikrotitrne plošče (NUNC F96 MicroWell™)
- čitalec mikrotitrskih plošč (Tecan Safire 2)
- računalnik, programski paket Magellan

3.3.4.8 Shranjevanje kultur, reagentov, raztopin in vzorcev

- inkubator (I-50 VPC, Kambič)
- hladilnik (LTH Škofja Loka)
- zmrzovalnik (LTH Škofja Loka)

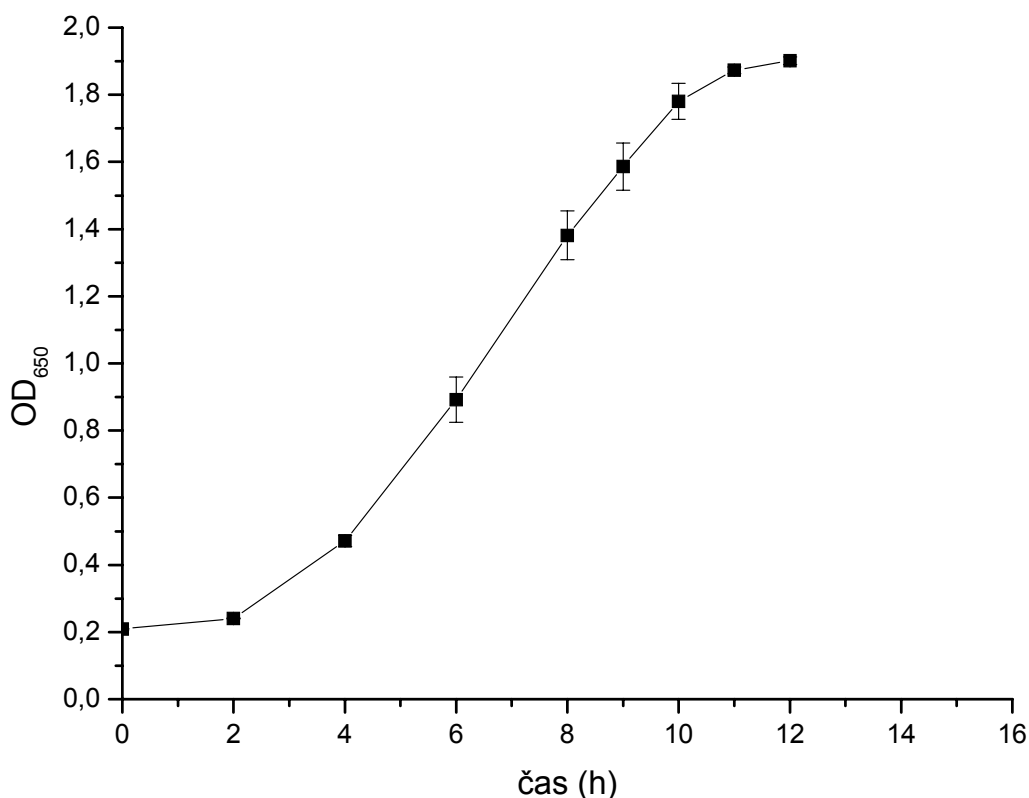
4 REZULTATI

Eksperimentalni del naloge je bil opravljen v času od oktobra 2004 do junija 2005. Izhajajoč iz delovne hipoteze in ciljev naloge smo izvedli dva predposkusa in ustrezno število ponovitev glavnega poskusa za posamezno kvasno biomaso. Rezultate predposkusov smo prikazali v obliki rastnih krivulj. Vpliv različnega načina tretiranja kvasne biomase na akumulacijo Cr(VI) smo določali s plamensko atomsko absorpcijsko spektroskopijo, vpliv različnega tretiranja kvasne biomase na metabolno aktivnost celic pa smo določali z merjenjem fluorescence. Rezultate smo podali v obliki histogramov.

4.1 RASTNE KRIVULJE ZA KVASOVKO *Saccharomyces cerevisiae*

4.1.1 Rastna krivulja za inokulum (Predposkus 1)

Na sliki 3 je prikazana rastna krivulja, ki smo jo dobili po 12-urnem namnoževanju inokuluma kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* med aerobno submerzno kultivacijo v inkubatorju pri $T = 25\text{ °C}$ in 240 obr./min. Rastno krivuljo za inokulum smo izvedli v dveh ponovitvah. Meritve OD_{650} obeh ponovitev ter izračuni povprečnih vrednosti so prikazani v prilogi A1.



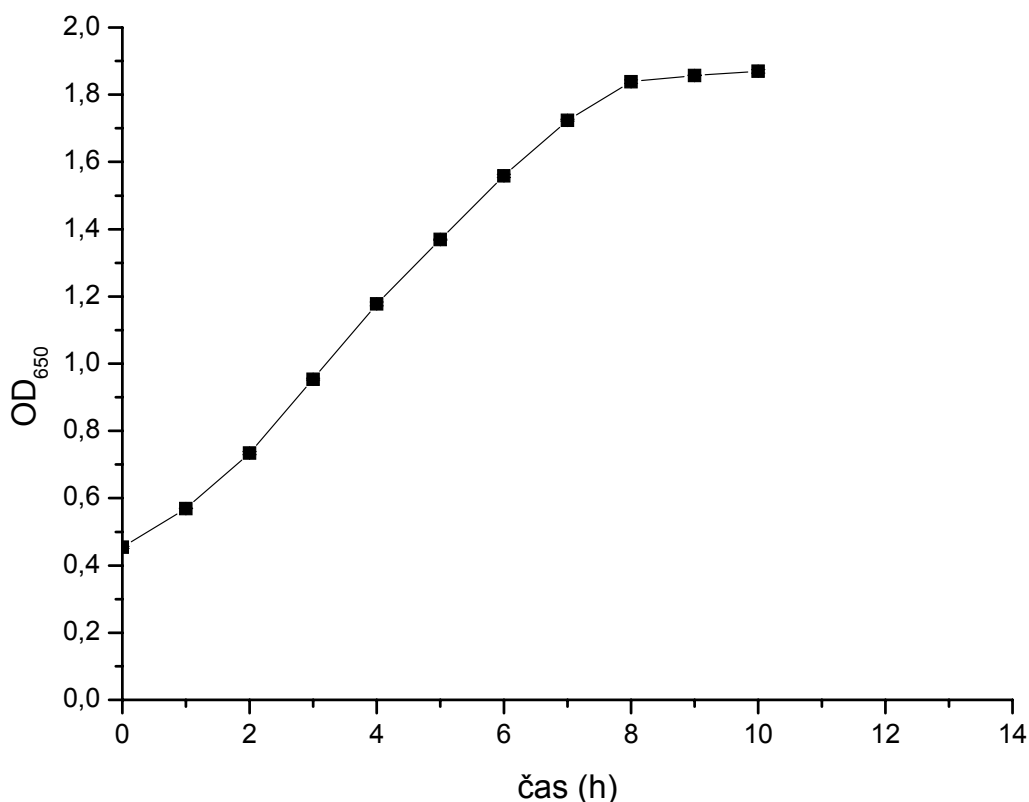
Slika 3: Aerobna submerzna kultivacija kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 v inkubatorju na magnetni mešalni plošči ($T = 25\text{ °C}$, 240 obr./min) (namnoževanje inokuluma)

Na podlagi rastne krivulje smo odčitali vrednost optične gostote, ki je ustrezala pozni eksponentni fazi rasti. Lahko rečemo, da je ta vrednost 1,7, kar je bilo doseženo po približno 10 urah. V tej fazi so bile celice v dobrem fiziološkem stanju in njihova koncentracija je bila velika.

Pri vseh nadaljnjih kultivacijah smo za inokulacijo uporabili celice, ki so bile v pozni eksponentni fazi rasti, pri čemer je bilo merilo $OD_{650} = 1,7$.

4.1.2 Rastna krivulja za glavni bioproces (Predposkus 2)

Tudi pri določanju rastne krivulje za glavni bioproces, ki je prikazana na sliki 4, smo izvedli aerobno submerzno kultivacijo kvasovke *S. cerevisiae* v inkubatorju na magnetni mešalni plošči pri $T = 25\text{ °C}$ in hitrosti mešanja 240 obr./min. Meritve so potekale v dveh neodvisnih ponovitvah, skupaj z izračuni povprečnih vrednosti optične gostote pa so prikazane v prilogi A2.



Slika 4: Aerobna submerzna kultivacija kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 v inkubatorju na magnetni mešalni plošči ($T = 25\text{ °C}$, 240 obr./min) (glavni bioproces)

Na podlagi omenjene rastne krivulje smo želeli določiti vrednost optične gostote, ki ustreza sredini eksponentne faze rasti. To fazo so celice dosegle približno 4 ure po inokulaciji, vrednost optične gostote pa je znašala 1,2. V tej fazi, ko so celice v polni kondiciji, smo jih za 1 uro izpostavili NaCl ali askorbinski kislini.

4.2 DOLOČANJE KONCENTRACIJE Cr(VI) V SUPERNATANTIH

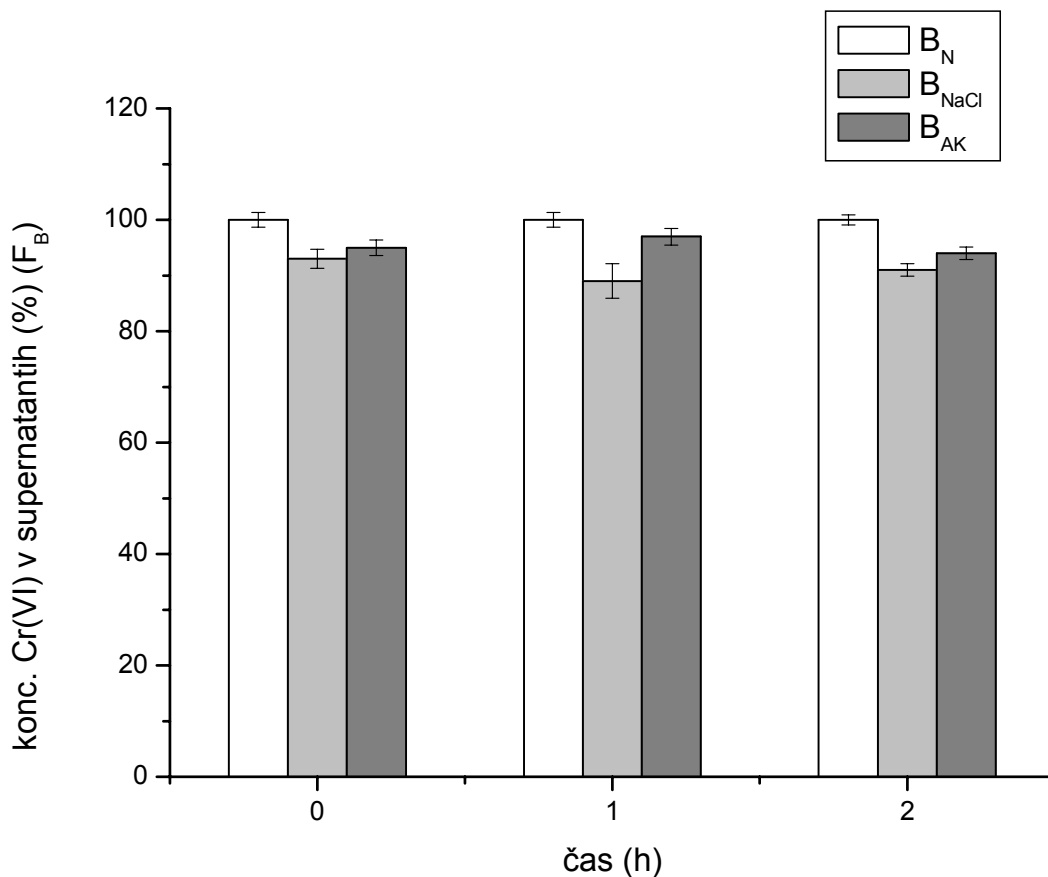
Z meritvami koncentracije Cr(VI) v supernatantih smo želeli določiti delež akumuliranega Cr(VI) za posamezno biomaso. Kvasno suspenzijo s koncentracijo 10^6 celic/mL v pufru Tris HCl s pH = 4,0 smo izpostavili različnim koncentracijam izhodne raztopine Cr(VI): 25, 50 in 100 μ M. Vzorčili smo takoj po dodatku Cr(VI) ($t = 0$), po 1 uri in 2 urah inkubacije. Vsebnost Cr(VI) smo po centrifugiranju vzorcev določili v supernatantih s plamensko atomsko absorpcijsko spektroskopijo. Kontrolo je predstavljal pufer Tris HCl z različnimi koncentracijami Cr(VI). Teoretične in izmerjene vrednosti kontrole so prikazane v prilogi B1.

Na slikah 5, 6 in 7 je prikazana koncentracija Cr(VI) v supernatantih (F_B) izražena glede na kontrolo (netretirana biomasa), ki predstavlja 100 %. Koncentracija Cr(VI) v supernatantih je prikazana za posamezno biomaso v odvisnosti od časa izpostavitve različnim koncentracijam Cr(VI):

- slika 5 prikazuje izpostavitve različno tretiranih kvasnih biomas 25 μ M raztopini Cr(VI)
- slika 6 prikazuje izpostavitve različno tretiranih kvasnih biomas 50 μ M raztopini Cr(VI)
- slika 7 prikazuje izpostavitve različno tretiranih kvasnih biomas 100 μ M raztopini Cr(VI)

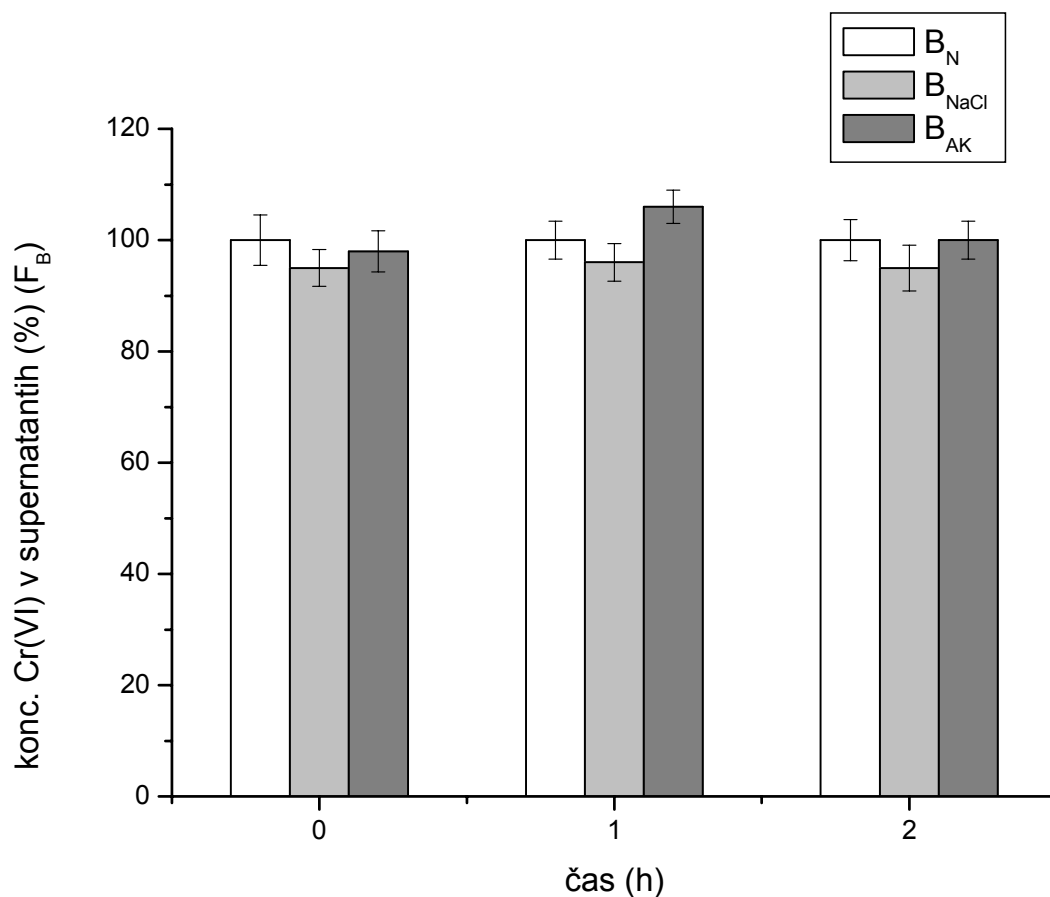
Koncentracija Cr(VI) v supernatantih je v obliki faktorjev, skupaj s povprečnimi koncentracijami Cr(VI) in koeficienti variacije podana v prilogah za vsako koncentracijo Cr(VI) posebej:

- v prilogi B2 za 25 μ M koncentracijo Cr(VI)
- v prilogi B3 za 50 μ M koncentracijo Cr(VI)
- v prilogi B4 za 100 μ M koncentracijo Cr(VI)



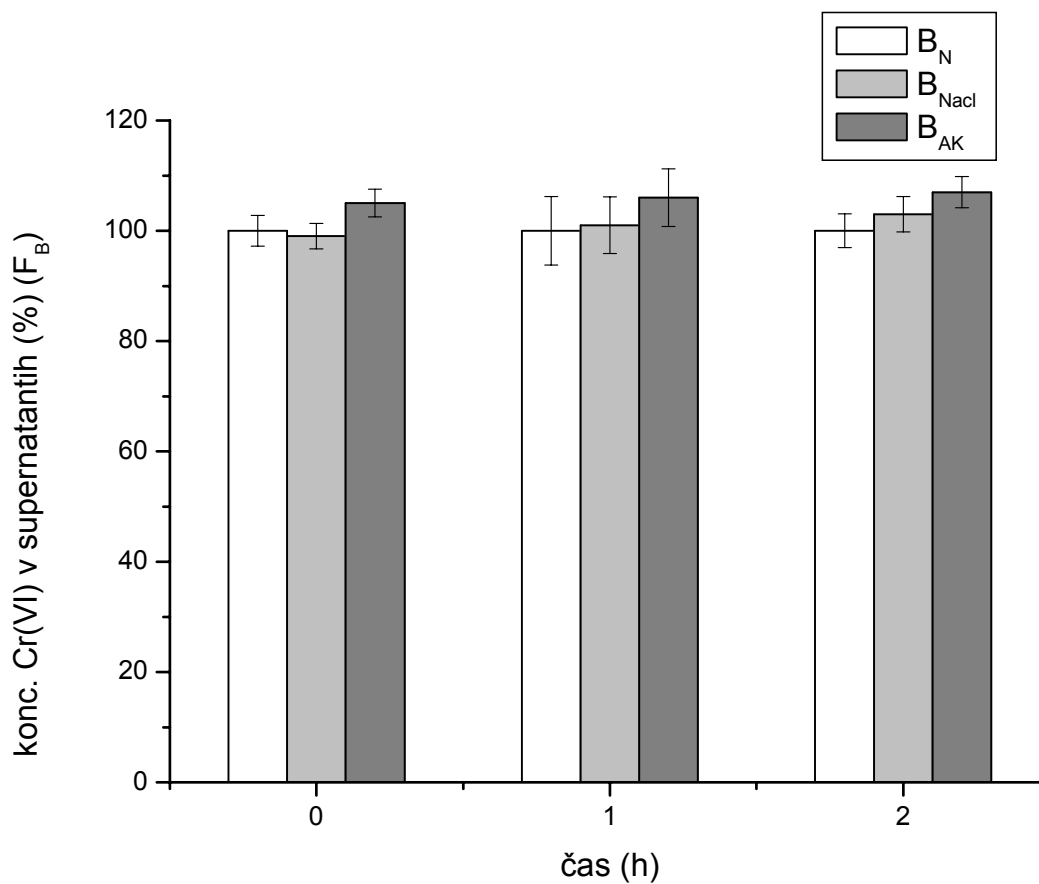
Slika 5: Vpliv različnih načinov tretiranja kvasne biomase na akumulacijo Cr(VI) po izpostavitvi 25 μ M koncentraciji Cr(VI). Legenda: B_N – netretirana biomasa, B_{NaCl} – biomasa tretirana z NaCl, B_{AK} – biomasa tretirana z askorbinsko kislino

S slike 5 je razvidno, da je akumulacija Cr(VI) največja v primeru biomase tretirane z NaCl (okoli 10 %). Največji privzem Cr(VI) se zgodi takoj po dodatku Cr(VI) v suspenzijo ($t = 0$). Tudi pri biomasi tretirani z askorbinsko kislino je ob $t = 0$ opaziti zmanjšanje koncentracije Cr(VI) v supernatantih. V nadaljevanju inkubacije pri nobeni od tretiranih biomas ni opaziti bistvenih razlik v akumulaciji Cr(VI) glede na $t = 0$, medtem ko glede na netretirano biomaso največ akumulira biomasa tretirana z NaCl.



Slika 6: Vpliv različnih načinov tretiranja kvasne biomase na akumulacijo Cr(VI) po izpostavitvi 50 μ M koncentraciji Cr(VI). Legenda: B_N – netretirana biomasa, B_{NaCl} – biomasa tretirana z NaCl, B_{AK} – biomasa tretirana z askorbinsko kislino

V primeru izpostavitve posamezne kvasne biomase 50 μ M raztopini Cr(VI) nismo opazili statistično značilnih razlik v akumulaciji Cr(VI) med netretirano biomaso in tretiranima biomasama.



Slika 7: Vpliv različnih načinov tretiranja kvasne biomase na akumulacijo Cr(VI) po izpostavitvi 100 μ M koncentraciji Cr(VI). Legenda: B_N – netretirana biomasa, B_{NaCl} – biomasa tretirana z NaCl, B_{AK} – biomasa tretirana z askorbinsko kislino

V primeru izpostavitve kvasnih celic 100 μ M raztopini Cr(VI) nismo opazili statistično značilnih razlik med različno tretiranimi biomasami v akumulaciji Cr(VI).

4.2.1 Rezultati statistične analize za koncentracijo Cr(VI) v supernatantih

Preglednica 4: Vpliv biomase in časa delovanja Cr(VI) na razlike v koncentraciji Cr(VI) v supernatantih (LSM) pri različnih dodatkih Cr(VI)

dodatek Cr(VI)	čas	biomasa			SE	P-vrednost
		B _N	B _{NaCl}	B _{AK}		
25 μM	0	100 ^a	93 ^{cd}	95 ^{bc}	0,92	P _B < 0,0001 P _C = 0,4191 P _{B*C} = 0,0354
	1 h	100 ^a	89 ^d	97 ^b	0,92	
	2 h	100 ^a	91 ^d	94 ^c	0,92	
50 μM	0	100 ^{ab}	95 ^b	98 ^b	2,09	P _B = 0,0063 P _C = 0,2101 P _{B*C} = 0,3571
	1 h	100 ^{ab}	96 ^b	106 ^a	2,09	
	2 h	100 ^{ab}	95 ^b	100 ^{ab}	2,09	
100 μM	0	100 ^{ab}	99 ^b	105 ^{ab}	1,62	P _B = 0,0089 P _C = 0,5594 P _{B*C} = 0,9351
	1 h	100 ^{ab}	101 ^{ab}	106 ^{ab}	1,62	
	2 h	100 ^{ab}	103 ^{ab}	107 ^a	1,62	

LSM- ocenjena povprečna vrednost, SE – standardna napaka ocene, ^{a,b,c,d,e,f} LSM v istem stolpcu, ki v oznaki nimajo enake nobene od črk, se statistično značilno razlikujejo (P < 0,05).

4.3 DOLOČANJE METABOLNE AKTIVNOSTI CELIC KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae*

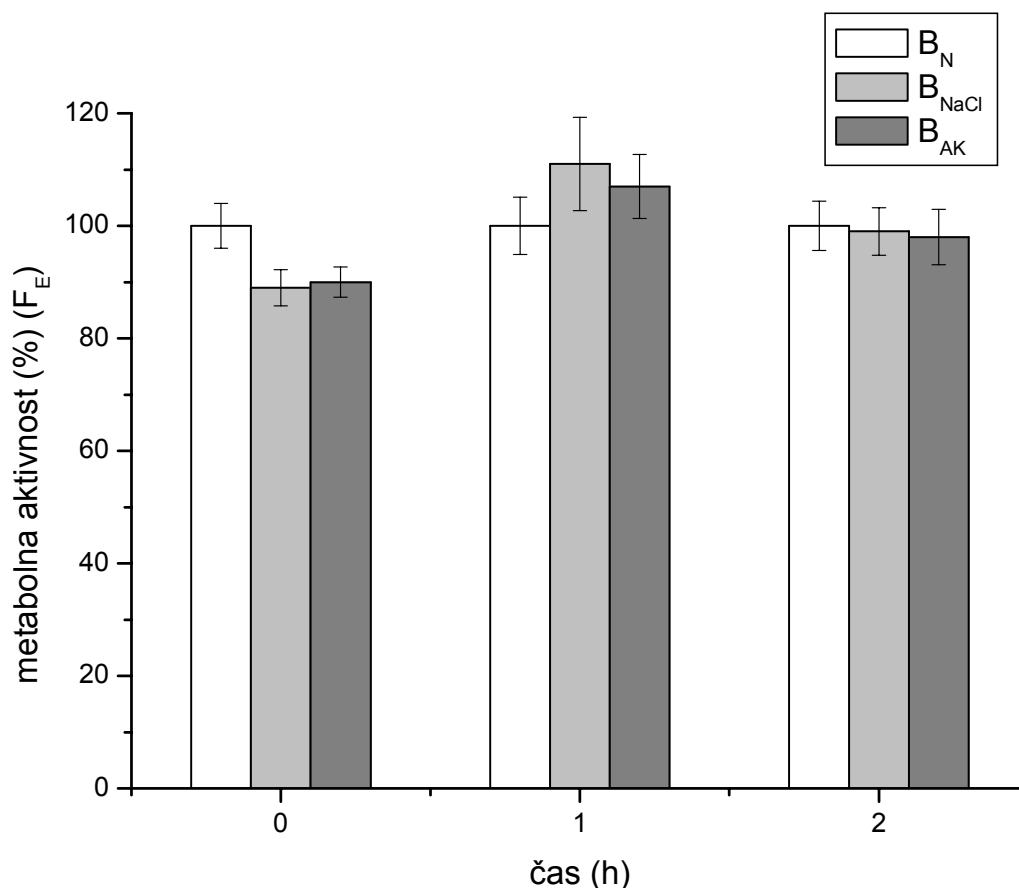
Tako kot pri določanju konc. Cr(VI) v supernatantih, smo tudi pri določanju metabolne aktivnosti celic kvasovke *S. cerevisiae* za vsako posamezno biomaso izvedli aerobno submerzno kultivacijo pri $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 240 obr./min. Metabolno aktivnost smo določali z uporabo barvila rezazurin in merjenjem fluorescence. Vzorčili smo pred dodatkom Cr(VI) v kvasno suspenzijo, takoj po dodatku Cr(VI) ($t = 0$), po 1 uri in po 2 urah inkubacije. Kontrolo je predstavljala netretirana kvasna biomasa, ki je nismo izpostavili Cr(VI). V prilogi C1 je v obliki faktorjev prikazana metabolna aktivnost netretirane biomase, skupaj s povprečnimi vrednostmi fluorescenčne intenzitete in koeficienti variacije.

Na slikah 8, 9 in 10 je prikazana metabolna aktivnost za posamezno kvasno biomaso v odvisnosti od časa izpostavitve različnim koncentracijam Cr(VI). Metabolna aktivnost je prikazana kot faktor F_E glede na kontrolo (netretirana biomasa), ki predstavlja 100 %.

- slika 8 prikazuje izpostavitve različno tretiranih kvasnih biomas 25 μM raztopini Cr(VI)
- slika 9 prikazuje izpostavitve različno tretiranih kvasnih biomas 50 μM raztopini Cr(VI)
- slika 10 prikazuje izpostavitve različno tretiranih kvasnih biomas 100 μM raztopini Cr(VI)

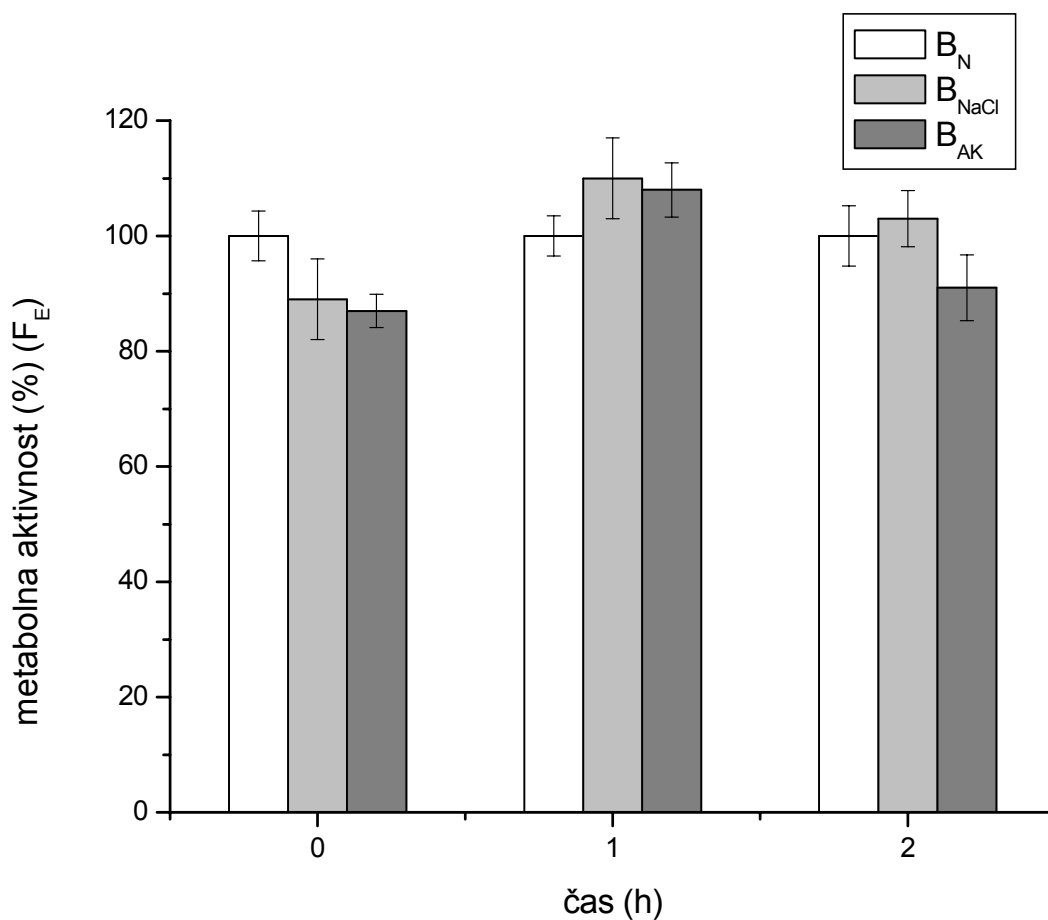
Metabolna aktivnost posamezne kvasne biomase je v obliki faktorjev (F_E), skupaj s povprečnimi vrednostmi fluorescence in koeficienti variacije, prikazana v prilogah glede na različne koncentracije Cr(VI):

- v prilogi C2 za 25 μM koncentracijo Cr(VI)
- v prilogi C3 za 50 μM koncentracijo Cr(VI)
- v prilogi C4 za 100 μM koncentracijo Cr(VI)



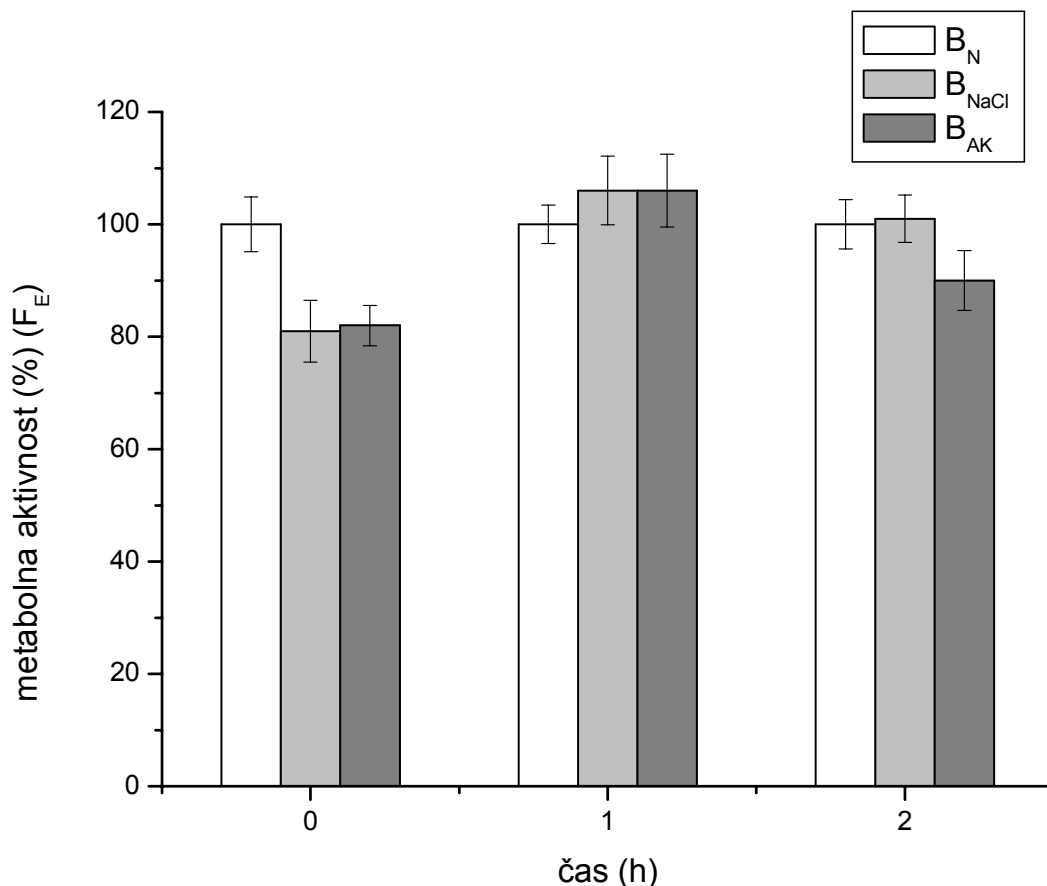
Slika 8: Vpliv različnih načinov tretiranja kvasne biomase na metabolno aktivnost celic po izpostavitvi 25 μ M koncentraciji Cr(VI). Legenda: B_N – netretirana biomasa, B_{NaCl} – biomasa tretirana z NaCl, B_{AK} – biomasa tretirana z askorbinsko kislino

Metabolna aktivnost celic se je takoj po dodatku Cr(VI) v kvasno suspenzijo zmanjšala za okoli 10 % glede na netretirano biomaso, tako v primeru biomase tretirane z NaCl, kot tudi pri biomasi tretirani z askorbinsko kislino. Po enourni inkubaciji se je metabolna aktivnost biomase tretirane z NaCl povečala v primerjavi s $t = 0$, medtem ko se je v primerjavi z netretirano biomaso le rahlo povečala. Metabolna aktivnost biomase tretirane z askorbinsko kislino pa se je po začetnem zmanjšanju po eni uri inkubacije približala vrednostim za netretirano biomaso. Po dveurni izpostavitvi celic 25 μ M koncentraciji Cr(VI) pa so vrednosti metabolne aktivnosti za obe tretirani biomasi enake vrednostim za netretirano biomaso.



Slika 9: Vpliv različnih načinov tretiranja kvasne biomase na metabolno aktivnost celic po izpostavitvi 50 μ M koncentraciji Cr(VI). Legenda: B_N – netretirana biomasa, B_{NaCl} – biomasa tretirana z NaCl, B_{AK} – biomasa tretirana z askorbinsko kislino

S slike 9 je razvidno, da se je metabolna aktivnost ob $t = 0$ oz. takoj po dodatku Cr(VI) v kvasno suspenzijo do koncentracije 50 μ M v primeru obeh tretiranih biomas zmanjšala. Po eni uri je metabolna aktivnost pri obeh biomasah v primerjavi s $t = 0$ narasla, glede na netretirano biomaso pa se je le malo povečala. Po dveh urah inkubacije pa smo opazili ponovno zmanjšanje metabolne aktivnosti, pri čemer so vrednosti biomase tretirane z NaCl enake vrednostim za netretirano biomaso, pri biomas tretirani z askorbinsko kislino pa je zmanjšanje večje.



Slika 10: Vpliv različnih načinov tretiranja kvasne biomase na metabolno aktivnost celic po izpostavitvi 100 μM koncentraciji Cr(VI). Legenda: B_N – netretirana biomasa, B_{NaCl} – biomasa tretirana z NaCl, B_{AK} – biomasa tretirana z askorbinsko kislino

Tudi v primeru 100 μM koncentracije Cr(VI) se je metabolna aktivnost za obe tretirani biomasi najbolj zmanjšala takoj po dodatku Cr(VI) v kvasno suspenzijo ($t = 0$). Pri tej koncentraciji Cr(VI) je opaziti največje zmanjšanje metabolne aktivnosti in sicer kar za 20 % glede na netretirano biomaso. Po prilagoditvi celic na stresni dejavnik se je metabolna aktivnost pri obeh tretiranih biomasah po enurni inkubaciji povečala in približala vrednostim za kontrolno biomaso. V primeru dveurne inkubacije celic, pa pri biomasi tretirani z NaCl ni opaziti bistvenih razlik, medtem ko je pri biomasi tretirani z askorbinsko kislino opazno zmanjšanje metabolne aktivnosti.

4.3.1 Rezultati statistične analize za metabolno aktivnost celic

Preglednica 5: Vpliv biomase in časa delovanja Cr(VI) na razlike v metabolni aktivnosti (LSM) pri različnih dodatkih Cr(VI)

dodatek Cr(VI)	čas	biomasa				P-vrednost
		B _N	B _{NaCl}	B _{AK}	SE	
0 μM	0	100 ^a	100 ^a	100 ^a	2,65	P _B = 1,0000 P _C = 1,0000 P _{B*C} = 1,0000
	1 h	100 ^a	100 ^a	100 ^a	2,65	
	2 h	100 ^a	100 ^a	100 ^a	2,65	
25 μM	0	100 ^b	89 ^d	90 ^{cd}	2,87	P _B = 0,7562 P _C = 0,0001 P _{B*C} = 0,0162
	1 h	100 ^b	111 ^a	107 ^{ab}	2,87	
	2 h	100 ^b	99 ^b	98 ^{bc}	2,87	
50 μM	0	100 ^{bc}	89 ^d	87 ^d	3,00	P _B = 0,0862 P _C < 0,0001 P _{B*C} = 0,0066
	1 h	100 ^{bc}	110 ^a	108 ^a	3,00	
	2 h	100 ^{bc}	103 ^{ab}	91 ^d	3,00	
100 μM	0	100 ^a	81 ^c	82 ^{bc}	2,89	P _B = 0,0201 P _C < 0,0001 P _{B*C} = 0,0010
	1 h	100 ^a	106 ^a	106 ^a	2,89	
	2 h	100 ^a	101 ^a	90 ^b	2,89	

LSM- ocenjena povprečna vrednost, SE – standardna napaka ocene, ^{a,b,c,d,e,f} LSM v istem stolpcu, ki v oznaki nimajo enake nobene od črk, se statistično značilno razlikujejo (P < 0,05).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Izhajajoč iz delovne hipoteze, v kateri trdimo, da ima kvasna biomasa s povečanim antioksidativnim potencialom večjo sposobnost akumulacije Cr(VI), smo kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* predhodno tretirali z NaCl oz. z askorbinsko kislino, da bi ji s tem povečali antioksidativni potencial. Dokazano je namreč, da izpostavitve celic kvasovke *S. cerevisiae* NaCl (osmotskemu stresu) povzroči povečano znotrajcelično vsebnost glutationa (Medved, 2004), ki velja za enega najpomembnejših neencimskih antioksidativnih obrambnih sistemov. S povečanjem v vsebnosti GSH so se tako celice ubranile pred škodljivim delovanjem nastalih reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS). Povečana vsebnost GSH je lahko posledica sinteze kot tudi samo regeneracije glutationa. Največjo vsebnost glutationa, in sicer 40 % povečanje v primerjavi s kontrolo, je bilo opaziti pri enourni izpostavitvi celic 8 % NaCl. Pri tem se je relativna kultivabilnost celic zmanjšala za približno 50 %, saj so se celice pri tej koncentraciji spopadle z zmerno močno obliko stresa, kar pomeni, da so večji del energije preusmerile v zaščito pred oksidativnimi poškodbami, ki jih povzročajo ROS, ne pa v rast in razmnoževanje (Medved, 2004). Tako kot glutation tudi askorbinska kislina v vlogi reducenta in lovilca prostih radikalov pomembno prispeva k zaščiti celice pred oksidativnimi poškodbami. Kvasne celice smo za eno uro izpostavili 1 mM askorbinski kislini. Poljšak (2004) je v svoji raziskavi ugotovil, da enourna izpostavitve celic 1 mM askorbinske kisline vodi do vsebnosti 0,03 milimol askorbinske kisline/100 µg proteinov. Večje koncentracije askorbinske kisline povečajo smrtnost celic, medtem ko 1 mM askorbinska kislina ne predstavlja resnega stresa za kvasne celice (Poljšak, 2004), če upoštevamo, da je po definiciji stres vse, kar ima negativen vpliv na celično rast (Mager in Hohmann, 1997).

Za dodatno pojasnitev vpliva različnih koncentracij Cr(VI) na celice smo preverjali metabolno aktivnost celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, ki smo jo spremljali z merjenjem fluorescence ob $t = 0$ ter po eni in dveh urah inkubacije. Uporabili smo reagent CellTiter-Blue™. Metabolno aktivne celice pretvarjajo resazurin v fluorescentni resorufin in določanje fluorescenčne intenzitete je merilo za metabolno aktivnost. Večja fluorescenčna intenziteta pomeni večjo metabolno aktivnost (Riss in Moravec, 2003).

Poskus smo izvedli tako, da smo celice kvasovke *S. cerevisiae* v sredini eksponentne faze rasti, ko so le-te v polni kondiciji in je razmnoževanje hitro, ločeno izpostavili NaCl ali askorbinski kislini za eno uro. Poleg tega je znano, da je akumulacija kroma najbolj učinkovita med eksponentno fazo rasti in na začetku stacionarne faze rasti (Kumpulainen in Koivistoinen, 1978). Sledila je priprava kvasne suspenzije v pufru Tris HCl s pH = 4 in s koncentracijo celic 10^6 celic/mL. Suspenzijo smo nato izpostavili različnim koncentracijam Cr(VI). S prenosom kvasnih celic v pufer, kjer ni virov energije, smo želeli preučiti učinkovitost antioksidativnega potenciala celic pri akumulaciji Cr(VI). Biomasa je namreč imela neko energijsko rezervo, razlika je le v tem, da imata tretirani biomasi večji antioksidativni potencial. Vendar pa že sam prenos celic v pufer, zaradi odsotnosti hranil, vodi v izkoriščanje celičnega glutationa, ki je endogeni vir žvepla (Penninckx, 2002).

Značilne razlike v akumulaciji Cr(VI) med netretirani biomaso in tretiranimi biomasama smo opazili le v primeru dodatka 25 μM raztopine Cr(VI) (preglednica 4). Največ Cr(VI) je akumulirala biomasa tretirana z NaCl. Gre za približno 10 % večjo akumulacijo kot pri kontroli (slika 5). Pomembno je poudariti, da se največ Cr(VI) akumulira takoj po dodatku v kvasno suspenzijo ($t = 0$). Tudi pri biomasah, tretiranih z askorbinsko kislino, smo opazili akumulacijo Cr(VI) le ob $t = 0$, v nadaljevanju inkubacije ni prišlo do bistvenih sprememb (slika 5). Znano je, da je proces akumulacije kovinskih ionov v celici poteka v dveh fazah: kot biosorpcija in kot bioakumulacija. Biosorpcija je hiter, metabolno neodvisen proces, medtem ko je bioakumulacija počasnejša in glede na potrebno energijo metabolno odvisna (Blackwell in sod., 1995; Tobin in sod., 1994). Glede na to, da smo kvasne celice pred izpostavitvijo Cr(VI) prenesli v pufer Tris HCl, kjer ni bilo potrebnih hranil, verjetno zaradi tega nadaljnja akumulacija ni bila več mogoča. Znano je, da se akumulacija Cr(VI) ob dodatku glukoze kot viru energije poveča (Kumpulainen in Koivistoinen, 1978). Ob $t = 0$ Cr(VI) vstopi v celice in posledično se zmanjša metabolna aktivnost, in sicer za 10 % v primerjavi s kontrolno biomaso (slika 8). Cr(VI) se v celici reducira, v našem primeru ali z glutationom ali z askorbinsko kislino, kar vodi do oksidirane oblike obeh reducentov. Potrebna je njuna regeneracija za nadaljnjo funkcijo. Oba imata tudi vlogo lovilca radikalov, ki nastajajo med redukcijo Cr(VI). Za reciklacijo glutationa je odgovoren encim glutation-reduktaza (Grant in sod., 1996a), ki v prisotnosti NADPH oksidirano obliko glutationa (GSSG) pretvarja v biološko aktivno reducirano obliko (Penninckx, 2000). Za pretvorbo dehidroaskorbatnega ali askorbatnega radikala nazaj do askorbinske kisline pa sta odgovorna encima monodehidroaskorbat-reduktaza in dehidroaskorbat-reduktaza v prisotnosti reducirane oblike NAD(P)H ali glutationa (McKersie, 1996). Glede na to, da smo opazovali kvasne celice v pufru, so prisotni antioksidativni obrambni sistemi zadostovali le krajši čas inkubacije, saj se v eni uri akumulacija Cr(VI) ni statistično značilno spremenila (slika 5), poleg tega pa je metabolna aktivnost pri tretiranih biomasah narasla v primerjavi s $t = 0$ (slika 8), kar kaže na povečano potrebo po energiji. Pri biomasah tretiranih z NaCl se je metabolna aktivnost rahlo povečala nad vrednosti pri kontrolni biomasah, medtem ko se je metabolna aktivnost biomase tretirane z askorbinsko kislino po vrednostih približala netretirani biomasah (slika 8). Glede na to, da so razlike v metabolni aktivnosti med posameznimi biomasami zelo majhne, smo tudi te potrdili s statistično analizo (preglednica 5). Po dveh urah inkubacije nismo opazili razlik v akumulaciji in tudi metabolna aktivnost tretiranih celic je bila primerljiva s kontrolno. Tudi Poljšak (2004) je v svoji raziskavi ugotovil, da imajo celice po enourni inkubaciji v pufru še dovolj rezerv za sintezo/regeneracijo glutationa, kasneje pa se pokaže zmanjšanje vsebnosti reduciranega glutationa, posebej še, ker so bile celice, tako kot pri nas, izpostavljene aerobnim pogojem, kar povzroča znotrajcelično tvorbo ROS.

Pri izpostavitvi posamezne kvasne biomase 50 μM raztopini Cr(VI) med njimi nismo opazili bistvenih razlik v akumulaciji Cr(VI) (slika 6), kar smo s statistično analizo tudi potrdili (preglednica 4). Je pa ob $t = 0$ prišlo do zmanjšanja metabolne aktivnosti za 10 % (slika 9), ki pa se je po eni uri inkubacije neznatno povečala nad vrednosti kontrolne biomase, kar kaže na poskus prilagoditve celic na novo nastale pogoje. Po dveh urah inkubacije se je metabolna aktivnost biomase tretirane z NaCl približala vrednostim za kontrolno biomaso, medtem ko smo pri biomasah tretiranih z askorbinsko kislino opazili večje zmanjšanje (slika 9). Učinkovitost eksogenih antioksidativnih obrambnih sistemov je očitno manjša od endogenih. Pomembno je tudi omeniti, da znotrajcelična akumulacija

askorbinske kisline poteka po dveh različnih mehanizmih: od natrija neodvisen transport dehidroaskorbinske kisline in od natrija odvisen transport askorbinske kisline (Park, 2001). Askorbinska kislina se torej lahko oksidira že zunaj celice, pri čemer nastane dehidroaskorbinska kislina, njena akumulacija v celico pa je dosti hitrejša od akumulacije askorbinske kisline (Park, 2001). Dehidroaskorbinska kislina se znotraj celice regenerira nazaj do askorbinske kisline s pomočjo reduciranega glutationa (Park, 2001), kar vodi do zmanjšane vsebnosti.

Pri biomasi tretirani z NaCl, kot tudi pri biomasi tretirani z askorbinsko kislino, po izpostavitvi 100 μM raztopini Cr(VI) nismo opazili značilnih razlik v akumulaciji Cr(VI) v primerjavi z netretirano biomaso (slika 7). S statistično analizo smo to tudi potrdili (preglednica 4). Ravno tako je bilo pri tretiranih biomasah takoj po dodatku Cr(VI) opaziti kar 20 % zmanjšanje v metabolni aktivnosti (slika 10), kar kaže na trenutni vpliv Cr(VI) na celice. Celice so verjetno energijo usmerjale bolj v samo preživetje in indukcijo obrambnih sistemov, kot pa da bi jo porabljale za akumulacijo. Po začetnem šoku je vidna povečana metabolna aktivnost, ki se je po vrednostih približala tisti za netretirano biomaso, kar kaže, da so celice odgovorile na novo nastalo situacijo s produkcijo energije, ki je služila za indukcijo obrambnih sistemov. Vendar pa so energijske zaloge zadoščale le za eno uro, saj je po dveh urah inkubacije že opaziti manjšanje metabolne aktivnosti, zlasti pri biomasi tretirani z askorbinsko kislino (slika 10).

Izkazalo se je, da je pri manjših koncentracijah Cr(VI) obstoječi antioksidativni potencial dalj časa učinkovit, medtem ko se pri večjih koncentracijah energijske rezerve hitreje porabijo in regeneracija antioksidativnih obrambnih sistemov tako ni več mogoča. To verjetno vodi v oksidativne poškodbe celičnih komponent, kar se je pokazalo v zmanjšanju metabolne aktivnosti po dveh urah inkubacije pri 100 μM koncentraciji Cr(VI).

Glede na to, da pri 50 μM in zlasti pri 100 μM koncentraciji Cr(VI) nismo opazili značilnih razlik v akumulaciji Cr(VI) v primerjavi z netretirano biomaso, obstaja tudi možnost, da se je po začetnem delovanju Cr(VI) na celice vklopil drug mehanizem tolerance Cr(VI), ki vključuje ali zmanjšano akumulacijo Cr(VI) v kvasovko (Baldi in sod., 1990; Cervantes in sod., 2001) ali povečan iznos iz celic, za kar je zopet potrebna energija (Cervantes in sod., 2001). Kajti visoke koncentracije kromovih ionov, ki so stalno prisotne v okolju, spodbudijo razvoj mehanizmov tolerance pri mikroorganizmih. Poleg omenjenih je glavni mehanizem tolerance bioredukcija toksičnega Cr(VI) iona do relativno netoksičnega Cr(III) iona (Losi in sod., 1994). Mikroorganizmi pa se lahko zavarujejo pred toksičnimi učinki kroma tudi tako, da ga akumulirajo in vežejo v inkluzijska telesca ter ga tako odstranijo iz medija (Coleman in Paran, 1983). Baldi in sod. (1990) so v svoji raziskavi pokazali, da kvasovke, ki tolerirajo Cr(VI), ne reducirajo Cr(VI) do Cr(III), temveč toleranca temelji na zmanjšanem vnosu ionov, medtem ko je pri kvasovkah občutljivih na krom opaziti povečano akumulacijo Cr(VI).

5.2 SKLEPI

Delež akumuliranega Cr(VI) v celici:

- razlike v akumulaciji Cr(VI) med netretirano biomaso in tretiranima biomasama so značilne le v primeru 25 μ M raztopine Cr(VI)
- največ Cr(VI) se akumulira takoj po dodatku Cr(VI) v kvasno suspenzijo ($t = 0$)
- največ Cr(VI) akumulira kvasna biomasa tretirana z NaCl
- v primeru 50 in 100 μ M raztopine Cr(VI) ni opaziti značilnih razlik v akumulaciji Cr(VI) med posameznimi biomasami

Metabolna aktivnost celic kvasovke *S. cerevisiae*:

- metabolna aktivnost celic se najbolj zmanjša takoj po dodatku Cr(VI) v kvasno suspenzijo ($t = 0$)
- zmanjšanje metabolne aktivnosti je opaziti pri obeh tretiranih biomasah
- metabolna aktivnost celic se najbolj zmanjša pri izpostavitvi celic 100 μ M raztopini Cr(VI)
- po eni uri inkubacije se metabolna aktivnost tretiranih biomas rahlo poveča ali približa vrednostim za netretirano biomaso

6 POVZETEK

Kromove spojine imajo široko industrijsko uporabo. V industrijskih odplakah je krom predvsem v toksični obliki Cr(VI), zato je njegova odstranitev iz okolja nujna. Mnoge konvencionalne metode za odstranjevanje Cr(VI) iz odpadnih vod so neučinkovite, drage in dolgotrajne, zato se njihova uporaba omejuje. Alternativa za čiščenje odpadnih vod predstavlja naravni proces akumuliranja Cr(VI) v biomaso. Alge, bakterije, nitaste glive in kvasovke so se izkazale kot potenciali biosorbenti težkih kovin. Velike koncentracije kromovih ionov, ki so stalno prisotne v okolju, pri mikroorganizmih spodbudijo razvoj različnih mehanizmov tolerance: bioredukcijo toksičnega Cr(VI) iona do relativno netoksičnega Cr(III) iona, zmanjšano akumulacijo Cr(VI) v celice, povečan iznos kroma iz celice, precipitacijo. Mikroorganizmi pa se lahko zavarujejo pred toksičnimi učinki kroma tudi tako, da ga akumulirajo in vežejo v inkluzijska telesca ter ga tako odstranijo iz medija. Kot vsi aerobni mikroorganizmi, so tudi kvasovke neprestano izpostavljene reaktivnim kisikovim zvrstem (ROS), ki kot stranski produkt nastajajo med celičnim metabolizmom. Stresni dejavnik, kot so Cr(VI) ioni, samo še dodatno pripomore k nastanku ROS. Zato smo pri poskusu celice kvasovke *S. cerevisiae* pred izpostavitvijo Cr(VI) ločeno tretirali z NaCl (posledica je indukcija enega najpomembnejših neencimskih obrambnih sistemov - glutationa) ali z askorbinsko kislino in jim tako povečali antioksidativni potencial. Predpostavili smo, da ima tretirana biomasa večjo sposobnost akumulacije Cr(VI) od netretirane. Izvedli smo aerobno submerzno kultivacijo kvasovke *S. cerevisiae* – ZIM 2155 v tekočem YEPD gojišču. Na sredini eksponentne faze rasti smo v brozgo dodali ali NaCl do koncentracije 8 % (w/v) ali askorbinsko kislino do koncentracije 1 mM in inkubirali eno uro. Sledila je priprava kvasne suspenzije s koncentracijo celic 10^6 celic/mL v pufru Tris HCl s pH = 4,0 in dodatek Cr(VI) do različnih koncentracij: 25, 50 in 100 μ M Cr(VI). Za določanje koncentracije Cr(VI) smo vzorčili takoj po dodatku Cr(VI) v kvasno suspenzijo ($t = 0$), po eni uri in po dveh urah inkubacije. Vzorce smo centrifugirali in v supernatantih s plamensko atomsko absorpcijsko spektroskopijo določali koncentracijo Cr(VI). Značilne razlike v akumulaciji Cr(VI) med posameznimi biomasami smo opazili le v primeru 25 μ M raztopine Cr(VI). Največjo stopnjo akumulacije (približno 10 % večjo kot pri netretirani biomas) smo opazili pri biomas tretirani z NaCl. Največ Cr(VI) se je akumuliralo takoj po dodatku v kvasno suspenzijo ($t = 0$). V primeru 50 in 100 μ M raztopine Cr(VI) nismo opazili razlik v akumulaciji Cr(VI) med netretirano biomaso in tretiranimi biomasama. Tudi v primeru določanja metabolne aktivnosti celic smo vzorčili enako in dodatno še pred dodatkom Cr(VI). Metabolno aktivnost smo določali z uporabo barvila resazurin in merjenjem fluorescence. Pripravili smo kvasno suspenzijo s koncentracijo $9 \cdot 10^7$ celic/mL. Izkazalo se je, da se je metabolna aktivnost celic najbolj zmanjšala takoj po dodatku Cr(VI) v kvasno suspenzijo ($t = 0$). Največje zmanjšanje (približno 20 % glede na netretirano biomaso) smo opazili pri obeh tretiranih biomasah po izpostavitvi 100 μ M koncentraciji Cr(VI). Po začetnem šoku je bila pri vseh treh koncentracijah Cr(VI) vidna večja metabolna aktivnost, ki se je po vrednostih približala vrednostim za netretirano biomaso. Vendar pa so energijske zaloge zadoščale le za eno uro, saj smo po dveh urah inkubacije že opazili manjšanje metabolne aktivnosti, posebno pri 50 in 100 μ M koncentraciji Cr(VI). Izkazalo se je, da je pri manjših koncentracijah Cr(VI) obstoječi antioksidativni potencial dalj časa učinkovit, medtem ko se pri večjih koncentracijah energijske rezerve hitreje porabijo in regeneracija antioksidativnih obrambnih sistemov tako ni več mogoča.

7 VIRI

- Arslan P., Beltrame M., Tomasi A. 1987. Intracellular chromium reduction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 931:10-15.
- Atlas R.M. 1993. Handbook of microbiological media. Boca Raton, CRC Press, Inc.: 1006-1007.
- Baldi F., Vaughan M.A., Olson J.G. 1990. Chromium (VI)-resistant yeasts isolated from a sewage treatment plant receiving tannery wastes. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 4: 913-918.
- Beveridge T.J., Hughes M.N., Lee H., Leung K.T., Poole R.K., Savvaidis I., Silver S., Trevors J.T. 1997. Metal-microbe interactions: contemporary approaches. *Advances in Microbial Physiology*, 38: 177-243.
- Blackwell K.J., Singleton I., Tobin M.J. 1995. Metal cation uptake by yeasts: a review. *Applied and Environmental Microbiology*, 43: 579-584.
- Cervantes C., Campos-García J., Devars S., Gutiérrez-Corona F., Loza-Tavera H., Torres-Guzmán J.C., Moreno-Sánchez R. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 3: 335-347.
- Coleman R.N., Paran J.H. 1983. Accumulation of hexavalent chromium by selected bacteria. *Environmental Technology Letters*, 4: 149-156.
- Connett P.H., Wetterhahn K.E. 1983. Metabolism of the carcinogen chromate by cellular constituents. *Structure and Bonding*, 54: 93-124.
- Costa V., Moradas-Ferreira P. 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. Review. *Molecular Aspects of Medicine*, 22: 217-246.
- Dar N., Shakoori A.R. 1999. Chromium tolerant yeast strains isolated from industrial effluents and their possible use in environmental clean-up. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 63: 744-750.
- Davies K.J.A. 1986. Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defenses: a hypothesis. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, 2: 155-173.
- Dönmez G., Koçberber N. 2005. Isolation of hexavalent chromium resistant bacteria from industrial saline effluents and their ability of bioaccumulation. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 5-6: 700-705.
- Gadd G.M. 1990. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia*, 46: 834-840.

Grant C.M., Dawes I.W. 1996. Synthesis and role of glutathione in protection against oxidative stress in yeast. *Redox Report*, 2: 223-229.

Grant C.M., Collinson L.P., Roe J.H., Dawes I.W. 1996a. Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Molecular Microbiology*, 21, 1: 171-179.

Grant C.M., MacIver F.H., Dawes I.W. 1996b. Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 29: 511-515.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford, Clarendon Press: 936 str.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 2000. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford, Oxford University Press: 936 str.

Jamieson D.J. 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14: 1511-1527.

Jamnik P. 2002. Odziv kvasovke *Candida intermedia* na Cr(VI) kot stresni dejavnik. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 123 str.

Jaspers Ch., Penninckx M.J. 1984. Glutathione metabolism in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence that γ -glutamyltranspeptidase is a vacuolar enzyme. *Biochimie*, 66: 71-74.

Kapoor A., Viraraghavan T. 1995. Fungal biosorption – An alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: A review. *Bioresource Technology*, 53: 195-206.

Klein C.B., Snow E.T., Frenkel K. 1998. Molecular mechanisms in metal carcinogenesis: role of oxidative stress. V: *Molecular biology of free radicals in human diseases*. Aruoma O. I., Halliwell B. (eds.). Saint Lucia, London, OICA International: 79-137.

Košmelj K. 2001. *Uporabna statistika*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani: 249 str.

Kumpulainen J., Koivistoinen P. 1978. Effects of glucose and chromium(III) concentrations in the medium on the uptake of ⁵¹Cr brewer's yeasts. *Bioinorganic Chemistry*, 8: 431-438.

Losi M.E., Amrhein C., Frankenberg W.T. Jr. 1994. Environmental biochemistry of chromium. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 136: 91-122.

- Mager W.H., Hohmann S. 1997. Stress response mechanisms in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. V: Yeast stress responses. Hohmann S., Mager, W.H. (eds.). Heidelberg, Springer-Verlag: 1-5.
- Manček B., Pečar S. 2001. Radikali in zaščita pred poškodbami z radikali v bioloških sistemih. Farmaceutski vestnik, 52: 133-144.
- McKersie B.D. 1996. Oxidative stress. Guelph, University of Guelph, Department of Crop science. <http://www.cropsoil.psu.edu/Courses/AGRO518/Oxygen.htm#ascorbic> (9.11.2005): 3 str.
- Medved P. 2004. Vpliv soli in temperature na vsebnost glutathiona v celicah kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 61 str.
- Mehdi K., Penninckx M.J. 1997. An important role for glutathione and γ -glutamyltranspeptidase in the supply of growth requirements during nitrogen starvation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology, 143: 1885-1889.
- Mehdi K., Thierie J., Penninckx M.J. 2001. γ -glutamyltrans-peptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its role in the vacuolar transport and metabolism of glutathione. Biochemical Journal, 359: 631-637.
- Meister A. 1988. On the discovery of glutathione. Trends in Biochemical Science, 13: 185-188.
- Meister A. 1994. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. Journal of Biology & Chemistry, 269: 9397-9400.
- Meister A., Anderson M.E. 1983. Glutathione. Annual Review of Biochemistry, 52: 711-760.
- Moradas-Ferreira P., Costa V., Piper P., Mager W. 1996. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. Molecular Microbiology, 19, 4: 651-658.
- Nieboer E., Shaw S.I. 1988. Mutagenic and other genotoxic effects of chromium compounds. V: Chromium in the natural and human environments. Nriagu J.O., Nieboer E. (eds.) New York, A Wiley – Interscience Publication: 399 – 439.
- Nies D.H. 1999. Microbial heavy-metal resistance. Applied Microbiology and Biotechnology, 51: 730-750.
- Nourbakhsh M., Sag Y., Oezer D., Aksu Z., Kutsal T., Caglar A. 1994. A comparative study of various biosorbents for removal of chromium(VI) ions from industrial waste waters. Process Biochemistry, 29: 1-5.

- Park J. 2001. Reduction of dehydroascorbic acid by homocysteine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1525: 173-179.
- Penninckx M.J. 2000. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 737-742.
- Penninckx M.J. 2002. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Research*, 2: 295-305.
- Penninckx M.J., Jaspers Ch.J., Wiame J.M. 1980. Glutathione metabolism in relation to the amino acid permeation systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 104: 119-123.
- Piper P. 1997. The yeast heat shock response. V: *Yeast stress responses*. Hohmann S., Mager W. H. (eds.). New York, Springer-Verlag: 75-99.
- Poljšak B. 2004. Pro-oxidative vs. antioxidative properties of ascorbic acid and trolox in chromium(VI) induced damage. Doctoral thesis. Nova Gorica, Polytechnic School of Environmental Science: 98 str.
- Quiévryn G., Peterson E., Messer J., Zhitkovich A. 2003. Genotoxicity and mutagenicity of chromium(VI)/ascorbate-generated DNA adducts in human and bacterial cells. *Biochemistry*, 42: 1062-1070.
- Rapoport A.I., Muter O.A. 1995. Biosorption of hexavalent chromium by yeasts. *Process Biochemistry*, 30, 2: 145-149.
- Raspor P., Batič M., Jamnik P. 1999. Measurement of yeast viability/mortality in the presence of chromium (VI). *Food Technology and Biotechnology*, 37, 2: 81-86.
- Riss T., Moravec R. 2003. Introducing the CellTiter-Blue™ cell viability assay. *Promega Notes*, 83: 10-13.
- Ruis H. 1997. Yeast stress responses: achievements, goals and a look beyond yeast. V: *Yeast stress responses*. Hohmann S., Mager W.H. (eds.). New York, Springer-Verlag: 231-247.
- Ruis H., Schüller C. 1995. Stress signaling in yeast. *BioEssays*, 17, 11: 959-965.
- Sag Y., Kutsal T., Acikel U., Aksu Z.A. 1998. Comparative study for the simultaneous biosorption of Cr(VI) and Fe(III) on *C. vulgaris* and *R. arrhizus*: application of the competitive adsorption models. *Process Biochemistry*, 33: 273-281.
- Santoro N., Thiele D.J. 1997. Oxidative stress responses in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. V: *Yeast stress responses*. Hohmann S., Mager W.H. (eds.). New York, Springer-Verlag: 171-211.

- Shi X., Dalal N.S. 1990. ESR spin trapping detection of hydroxyl radicals in the reactions of Cr(V) complexes with hydrogen peroxide. *Free Radical Research Communications*, 10: 17-26.
- Shi X., Dong Z., Dalal N.S., Gannet P.M. 1994. Chromate-mediated free radical generation from cystein, penicillamine, hydrogen peroxide, and lipid hydroperoxides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1226: 65-72.
- Siderius M., Mager W.H. 1997. General stress response: in search of a common denominator. V: *Yeast stress responses*. Hohmann S., Mager W.H. (eds.). Heidelberg, Springer-Verlag: 213-230.
- Sigler K., Chaloupka J., Brozmanova J., Stadler N., Höfer M. 1999. Oxidative stress in microorganisms – I. Microbial vs. higher cells – damage and defenses in relation to cell ageing and death. *Folia Microbiologica*, 44, 6: 587-624.
- Skoog A.D., West M.D., Holler J.F. 1996. *Fundamentals of analytical chemistry*. 7th ed. Fort Worth, Saunders College Publishing: 870 str.
- Skoog A.D., West M.D., Holler J.F. 2000. *Analytical chemistry: an introduction*. 7th ed. Fort Worth, Saunders College Publishing: 773 str.
- Squibb S.K., Snow E.T. 1993. Chromium. V: *Handbook of hazardous materials*. Corn M. (ed.). San Diego, Academic Press: 127-144.
- Standeven A.M., Wetterhahn K.E. 1991. Ascorbate is the principal reductant of chromium (VI) in rat liver and kidney ultrafiltrates. *Carcinogenesis*, 12: 1733- 1737.
- Standeven A.M., Wetterhahn K.E. 1992. Ascorbate is the principal reductant of chromium (VI) in rat lung ultrafiltrates and cytosols, and mediates chromium-DNA binding in vitro. *Carcinogenesis*, 13: 1319-1324.
- Tsapakos M.J., Wetterhahn K.E. 1983. The interaction of chromium with nucleic acids. *Chemico-Biological Interactions*, 46, 2: 265-277.
- Tobin M.J., White C., Gadd M.G. 1994. Metal accumulation by fungi: applications in environmental biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology*, 13: 126-130.
- Veglio F., Beolchini F. 1997. Removal of metals by biosorption: a review. *Hidrometallurgy*, 44: 301-316.
- Volesky B. 2001. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. *Hidrometallurgy*, 59, 2-3: 203-216.
- Walker G.M. 1998. *Yeast physiology and biotechnology*. Chichester, John Wiley & Sons: 350 str.

Wetterhahn K.E., Hamilton J.W. 1989. Molecular basis of hexavalent chromium carcinogenicity: Effect on gene expression. *Science of the Total Environment*, 86: 113-129.

Williams R.J.P., Fraústo da Silva J.J.R. 1996. *The natural selection of the chemical elements: the environment and life's chemistry*. New York, Oxford University Press Inc.: 646 str.

ZAHVALA

Mentorju, prof. dr. Petru Rasporju, se zahvaljujem za strokovno vodenje in koristne napotke med nastajanjem diplomske naloge ter za vedno dobrodošle vzpodbudne besede.

Posebna zahvala je namenjena somentorici in delovni mentorici dr. Poloni Jamnik. Hvala za odlično strokovno vodenje, poglobljene razprave ob dobljenih rezultatih, za čas, ko ste mi znali prisluhniti, predvsem pa za moralno podporo v dneh, ko je šlo vse narobe.

Doc. dr. Milici Kač se zahvaljujem za izredno strokoven in natančen pregled diplomske naloge, ki ga je opravila v vlogi recenzentke. Hvala za vse nasvete, strokovne popravke, predvsem pa za idejo, ki je dala moji diplomski nalogi še dodatno težo.

Na tem mestu se želim zahvaliti doc. dr. Lei Gašperlin, ki je priskočila na pomoč in udejanila idejo o statistični obdelavi podatkov.

Zahvala je namenjena tudi Vlasti Medvešek in Dragici Marković za urejanje birokratskih zadev, za vedno pripravljeno pomoč pri delu v laboratoriju in prijetne klepete pa se zahvaljujem Urški Debelak in Mateju Šerganu.

Za pomoč pri urejanju literature se zahvaljujem gospe Ivici Hočevar in gospe Barbari Slemenik.

Posebna zahvala je namenjena tudi mojim staršem. Hvala za vso podporo tekom študija, za vzpodbudne besede med nastajanjem diplomskega dela, predvsem pa, da sta vseskozi verjela vame.

Nenazadnje gre velike zasluge za doseg trenutnega cilja pripisati tudi tebi Lovro. Hvala za vso podporo, razumevanje in ljubezen.

Na koncu bi se rada vsem skupaj še enkrat iskreno zahvalila. Vsak od zgoraj omenjenih je pomembno prispeval k temu, da sedaj s ponosom stojim na cilju!

PRILOGE

Priloga A1: Meritve optične gostote (OD_{650}) med aerobno submerzno kultivacijo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* – ZIM 2155 na magnetni mešalni plošči v inkubatorju (priprava inokuluma)

Čas (h)	OD_{650} (A)	OD_{650} (B)	$\overline{OD_{650}} \pm s$
0	0,210	0,207	$0,209 \pm 0,002$
2	0,241	0,240	$0,241 \pm 0,001$
4	0,459	0,483	$0,471 \pm 0,017$
6	0,844	0,940	$0,892 \pm 0,068$
8	1,330	1,433	$1,382 \pm 0,073$
9	1,536	1,636	$1,586 \pm 0,071$
10	1,743	1,818	$1,781 \pm 0,053$
11	1,866	1,880	$1,873 \pm 0,010$
12	1,893	1,909	$1,901 \pm 0,011$

Priloga A2: Meritve optične gostote (OD_{650}) med aerobno submerzno kultivacijo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* – ZIM 2155 na magnetni mešalni plošči v inkubatorju (predposkus glavnega bioprocesa)

Čas (h)	OD_{650} (A)	OD_{650} (B)	$\overline{OD_{650}} \pm s$
0	0,452	0,456	$0,454 \pm 0,003$
1	0,570	0,569	$0,570 \pm 0,001$
2	0,731	0,737	$0,734 \pm 0,004$
3	0,952	0,956	$0,954 \pm 0,003$
4	1,174	1,182	$1,178 \pm 0,006$
5	1,368	1,370	$1,369 \pm 0,001$
6	1,555	1,562	$1,559 \pm 0,005$
7	1,726	1,722	$1,724 \pm 0,003$
8	1,835	1,843	$1,839 \pm 0,006$
9	1,857	1,858	$1,858 \pm 0,001$
10	1,866	1,873	$1,870 \pm 0,005$

Priloga B1: Teoretične in izmerjene vrednosti kontrole (pufer Tris HCl + različne koncentracije Cr(VI)) pri določanju koncentracije Cr(VI) v supernatantih

Teoretična vrednost pufer + Cr(VI)		Izmerjena vrednost pufer + Cr(VI) [mg/L] ± s
[μmol/L]	[mg/L]	
25	1,3	1,33 ± 0,00
50	2,6	2,64 ± 0,03
100	5,2	5,17 ± 0,04

Priloga B2: Koncentracija Cr(VI) v supernatantih (F_B) po izpostavitvi posamezne kvasne biomase 25 μM raztopini Cr(VI) za določen čas, izračunana na podlagi povprečne koncentracije Cr(VI) v supernatantih [mg/L] in dobljenih faktorjev

Čas izpostavitve Cr(VI) (h)	Kvasna biomasa	$\overline{C_{Cr(VI)}}$ v supernatantih [mg/L] ± s	F_A ± s	F_B (%) ± s	KV (%)
0	B _N	1,27 ± 0,01	0,95 ± 0,01	100 ± 1	1,0
	B _{NaCl}	1,18 ± 0,02	0,89 ± 0,01	93 ± 2	2,2
	B _{AK}	1,21 ± 0,02	0,91 ± 0,01	95 ± 1	1,1
1	B _N	1,27 ± 0,01	0,96 ± 0,01	100 ± 1	1,0
	B _{NaCl}	1,13 ± 0,04	0,85 ± 0,03	89 ± 3	3,4
	B _{AK}	1,23 ± 0,02	0,93 ± 0,01	97 ± 2	2,1
2	B _N	1,29 ± 0,01	0,97 ± 0,01	100 ± 1	1,0
	B _{NaCl}	1,17 ± 0,01	0,88 ± 0,01	91 ± 1	1,1
	B _{AK}	1,22 ± 0,01	0,92 ± 0,01	94 ± 1	1,1

Priloga B3: Koncentracija Cr(VI) v supernatantih (F_B) po izpostavitvi posamezne kvasne biomase 50 μM raztopini Cr(VI) za določen čas, izračunana na podlagi povprečne koncentracije Cr(VI) v supernatantih [mg/L] in dobljenih faktorjev

Čas izpostavitve Cr(VI) (h)	Kvasna biomasa	$\overline{C_{Cr(VI)}}$ v supernatantih [mg/L] $\pm s$	$F_A \pm s$	$F_B (\%) \pm s$	KV (%)
0	B _N	2,64 \pm 0,08	1,00 \pm 0,03	100 \pm 5	5,0
	B _{NaCl}	2,51 \pm 0,02	0,95 \pm 0,01	95 \pm 3	3,2
	B _{AK}	2,59 \pm 0,04	0,98 \pm 0,02	98 \pm 4	4,1
1	B _N	2,48 \pm 0,05	0,94 \pm 0,02	100 \pm 3	3,0
	B _{NaCl}	2,39 \pm 0,06	0,91 \pm 0,02	96 \pm 3	3,1
	B _{AK}	2,63 \pm 0,03	1,00 \pm 0,01	106 \pm 3	2,8
2	B _N	2,62 \pm 0,06	0,99 \pm 0,03	100 \pm 4	4,0
	B _{NaCl}	2,48 \pm 0,08	0,94 \pm 0,03	95 \pm 4	4,2
	B _{AK}	2,62 \pm 0,05	0,99 \pm 0,02	100 \pm 3	3,0

Priloga B4: Koncentracija Cr(VI) v supernatantih (F_B) po izpostavitvi posamezne kvasne biomase 100 μM raztopini Cr(VI) za določen čas, izračunana na podlagi povprečne koncentracije Cr(VI) v supernatantih [mg/L] in dobljenih faktorjev

Čas izpostavitve Cr(VI) (h)	Kvasna biomasa	$\overline{C_{Cr(VI)}}$ v supernatantih [mg/L] $\pm s$	$F_A \pm s$	$F_B (\%) \pm s$	KV (%)
0	B _N	4,97 \pm 0,09	0,96 \pm 0,02	100 \pm 3	3,0
	B _{NaCl}	4,95 \pm 0,05	0,96 \pm 0,01	99 \pm 2	2,0
	B _{AK}	5,23 \pm 0,06	1,01 \pm 0,01	105 \pm 3	2,9
1	B _N	4,94 \pm 0,21	0,96 \pm 0,04	100 \pm 6	6,0
	B _{NaCl}	4,98 \pm 0,11	0,96 \pm 0,02	101 \pm 5	5,0
	B _{AK}	5,26 \pm 0,10	1,02 \pm 0,02	106 \pm 5	4,7
2	B _N	4,93 \pm 0,10	0,95 \pm 0,02	100 \pm 3	3,0
	B _{NaCl}	5,06 \pm 0,11	0,98 \pm 0,02	103 \pm 3	2,9
	B _{AK}	5,27 \pm 0,06	1,02 \pm 0,01	107 \pm 3	2,8

Priloga C1: Metabolna aktivnost posamezne kvasne biomase ob $t = 0$, po 1 h in 2 h inkubacije v pufru brez dodanega Cr(VI), izračunana na podlagi povprečne fluorescence in dobljenih faktorjev

Čas izpostavitve Cr(VI) (h)	Kvasna biomasa	\bar{F} [RFU] \pm s	$F_C \pm s$	$F_D \pm s$	F_E (%) \pm s	KV (%)
0	B _N	47227 \pm 708,5	1,0 \pm 0,02	1,0 \pm 0,03	100 \pm 4	4,0
	B _{NaCl}	48872 \pm 177,5	1,0 \pm 0,01	1,0 \pm 0,01	100 \pm 3	3,0
	B _{AK}	48453 \pm 160,5	1,0 \pm 0,01	1,0 \pm 0,01	100 \pm 3	3,0
1	B _N	56562 \pm 706,4	1,20 \pm 0,02	1,0 \pm 0,03	100 \pm 4	4,0
	B _{NaCl}	51561 \pm 1675,8	1,06 \pm 0,04	1,0 \pm 0,05	100 \pm 5	5,0
	B _{AK}	52189 \pm 6142,6	1,08 \pm 0,03	1,0 \pm 0,04	100 \pm 4	4,0
2	B _N	45470 \pm 896,6	0,96 \pm 0,02	1,0 \pm 0,04	100 \pm 5	5,0
	B _{NaCl}	44965 \pm 1113,7	0,92 \pm 0,02	1,0 \pm 0,04	100 \pm 5	5,0
	B _{AK}	53387 \pm 2082,4	1,10 \pm 0,04	1,0 \pm 0,06	100 \pm 6	6,0

Priloga C2: Metabolna aktivnost posamezne kvasne biomase ob $t = 0$, po 1 h in 2 h inkubacije v pufru ob izpostavitvi 25 μ M koncentraciji Cr(VI), izračunana na podlagi povprečne fluorescence in dobljenih faktorjev

Čas izpostavitve Cr(VI) (h)	Kvasna biomasa	\bar{F} [RFU] \pm s	$F_C \pm s$	$F_D \pm s$	F_E (%) \pm s	KV (%)
0	B _N	49818 \pm 666,8	1,05 \pm 0,02	1,05 \pm 0,03	100 \pm 4	4,0
	B _{NaCl}	45509 \pm 921,4	0,93 \pm 0,02	0,93 \pm 0,02	89 \pm 3	3,4
	B _{AK}	45411 \pm 278,6	0,94 \pm 0,01	0,94 \pm 0,01	90 \pm 3	3,3
1	B _N	49717 \pm 1387,3	1,05 \pm 0,03	0,88 \pm 0,03	100 \pm 5	5,0
	B _{NaCl}	50642 \pm 2846,8	1,04 \pm 0,06	0,98 \pm 0,06	111 \pm 8	7,2
	B _{AK}	48963 \pm 1521,0	1,01 \pm 0,03	0,94 \pm 0,04	107 \pm 6	5,6
2	B _N	45489 \pm 411,5	0,96 \pm 0,02	1,00 \pm 0,03	100 \pm 4	4,0
	B _{NaCl}	44657 \pm 623,0	0,91 \pm 0,01	0,99 \pm 0,03	99 \pm 4	4,0
	B _{AK}	52297 \pm 174,7	1,08 \pm 0,01	0,98 \pm 0,04	98 \pm 5	5,1

Priloga C3: Metabolna aktivnost posamezne kvasne biomase ob $t = 0$, po 1 h in 2 h inkubacije v pufru ob izpostavitvi $50 \mu\text{M}$ koncentraciji Cr(VI), izračunana na podlagi povprečne fluorescence in dobljenih faktorjev

Čas izpostavitve Cr(VI) (h)	Kvasna biomasa	\bar{F} [RFU] $\pm s$	$F_c \pm s$	$F_D \pm s$	$F_E (\%) \pm s$	KV (%)
0	B _N	48813 \pm 716,3	1,03 \pm 0,02	1,03 \pm 0,03	100 \pm 4	4,0
	B _{NaCl}	44929 \pm 3582,9	0,92 \pm 0,07	0,92 \pm 0,07	89 \pm 7	7,9
	B _{AK}	43606 \pm 518,3	0,90 \pm 0,01	0,90 \pm 0,01	87 \pm 3	3,4
1	B _N	48694 \pm 72,8	1,03 \pm 0,02	0,86 \pm 0,02	100 \pm 3	3,0
	B _{NaCl}	49190 \pm 2361,7	1,01 \pm 0,05	0,95 \pm 0,06	110 \pm 7	6,4
	B _{AK}	48517 \pm 1191,5	1,00 \pm 0,03	0,93 \pm 0,03	108 \pm 5	4,6
2	B _N	45479 \pm 1000,6	0,96 \pm 0,03	1,00 \pm 0,04	100 \pm 5	5,0
	B _{NaCl}	46434 \pm 709,2	0,95 \pm 0,02	1,03 \pm 0,03	103 \pm 5	4,9
	B _{AK}	48590 \pm 1533	1,00 \pm 0,03	0,91 \pm 0,05	91 \pm 6	6,6

Priloga C4: Metabolna aktivnost posamezne kvasne biomase ob $t = 0$, po 1 h in 2 h inkubacije v pufru ob izpostavitvi $100 \mu\text{M}$ koncentraciji Cr(VI), izračunana na podlagi povprečne fluorescence in dobljenih faktorjev

Čas izpostavitve Cr(VI) (h)	Kvasna biomasa	\bar{F} [RFU] $\pm s$	$F_c \pm s$	$F_D \pm s$	$F_E (\%) \pm s$	KV (%)
0	B _N	50098 \pm 1140,6	1,06 \pm 0,03	1,06 \pm 0,04	100 \pm 5	5,0
	B _{NaCl}	42258 \pm 2444,5	0,86 \pm 0,05	0,86 \pm 0,05	81 \pm 5	6,8
	B _{AK}	42258 \pm 1088,9	0,87 \pm 0,02	0,87 \pm 0,02	82 \pm 4	4,9
1	B _N	47678 \pm 59,4	1,01 \pm 0,02	0,84 \pm 0,02	100 \pm 3	3,0
	B _{NaCl}	46117 \pm 1927,6	0,94 \pm 0,04	0,89 \pm 0,05	106 \pm 6	5,7
	B _{AK}	46473 \pm 2223,9	0,96 \pm 0,05	0,89 \pm 0,05	106 \pm 6	6,1
2	B _N	43623 \pm 480,1	0,92 \pm 0,02	0,96 \pm 0,03	100 \pm 4	4,0
	B _{NaCl}	43322 \pm 504,2	0,89 \pm 0,01	0,97 \pm 0,03	101 \pm 4	4,0
	B _{AK}	46111 \pm 1423,4	0,95 \pm 0,03	0,86 \pm 0,04	90 \pm 5	5,6