

О. Г. Мамеєва, В. С. Підгорський

Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного 154, Київ, ДСП, Д03680, Україна,
тел.: 8 (044) 526 11 79,
e-mail: *Mameeva@ukr.net*

ОПТИМІЗАЦІЯ БІОСОРБЦІЇ ЙОНІВ Cr (VI) ДРІЖДЖАМИ *S. CEREVISIAE* УКМ У-1968 МЕТОДАМИ СТАТИСТИЧНОГО АНАЛІЗУ

*Рівень аерації, рН та початкова кількість йонів Cr (VI) були досліджені з використанням методів статистичного аналізу (моделі Бокса-Бенкена). Оптимальними є значення рН 2,0, аерація 100 % та початкова кількість йонів Cr (VI) у MES-буфері 100 мг/л, щодо біосорбції йонів Cr (VI) дріжджами *S. cerevisiae* УКМ У-1968. Найвищий розрахований ймовірний рівень біосорбції йонів Cr (VI) дорівнює 40,708 мг/г за 3 години впливу факторів. Були отримані регресійні рівняння, як функція від двох основних ефектів, таких як рівень рН та початкова концентрація йонів Cr (VI) в середовищі культивування з коефіцієнтами регресії та коефіцієнтами детермінації R^2 : 0,9648; 0,9766; 0,9524; 0,9334.*

Ключові слова: Saccharomyces cerevisiae, статистична оптимізація, модель Бокса-Бенкена, біосорбція, йони Cr (VI).

Питання біосорбції та біоаккумуляції йонів шестивалентного хрому дріжджами широко висвітлюється в останні роки в науковій літературі [2, 5, 12]. Але переважно вивчення сорбційної спроможності живої біомаси дріжджів, як правило, носить порівняльний характер. Так, в роботах Volesky В. із співавторами зазначається, що нежива біомаса дріжджів сорбує на 40 % більше йонів металів, ніж жива [11, 12]. В роботах інших авторів показано, що сорбція пекарськими дріжджами *Saccharomyces cerevisiae* при використанні сухої біомаси у випадку дослідження йонів Cr (VI) дорівнює 29,12 мг/г, а живої — 17,68 мг/г [4], а для деяких штамів *S. cerevisiae* (10 шт.) біосорбційна спроможність по відношенню до йонів Cr (VI) варіює від 1 мг/г до 26 мг/г щодо сухої біомаси [5].

В наших попередніх дослідженнях спиртовий промислово важливий штам *S. cerevisiae* УКМ У-1968 мав максимальну біосорбційну спроможність щодо йонів Cr (VI) на рівні 40,02 мг/г, розраховану за ізотермою Ленгмюра, з паралельним встановленням оптимальних умов для проведення сорбційних експериментів [3, 6, 13, 14]. Але слід відзначити, що оптимізація проводилася відносно великої кількості досліджуваних штамів та йонів міді, свинцю і хрому. Отже, отримані нами параметри не можна вважати на 100 % оптимальними для *S. cerevisiae* УКМ У-1968 і йонів Cr (VI), оскільки відомо, що біосорбція — процес штамоспецифічний. Саме тому виникла необхідність оптимізації за такими основними параметрами, як рН, рівень аерації та початкова кількість йонів Cr (VI) в середовищі культивування для штаму *S. cerevisiae* УКМ У-1968.



Метою роботи була оптимізація рівнів біосорбції йонів шестивалентного хрому дріжджами *S. cerevisiae* УКМ У-1968 за такими параметрами як рН, рівень аерації та початкова кількість йонів Сг (VI) з використанням статистичних методів планування експериментів та аналізу даних.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були спиртові дріжджі *S. cerevisiae* Meyen ex Hansen (1883) УКМ У-1968 з Української колекції мікроорганізмів (УКМ).

В роботі використовували середовище Рідер, яке містило (г/л дистильованої води): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 3,0$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,1$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1,0$, $\text{MgSO}_4 - 0,7$, $\text{NaCl} - 0,5$, глюкоза – 1 %, дріжджовий екстракт – 0,1 %; та 5 мМ MES-буфер (2-(N-морфолино)-етансульфонова кислота). Для отримання потрібного значення рН у розчин додавали кристали гідроксиду тетраметил амонію [10]. рН розчинів визначали на рН-метр (рН-150МА).

Для інокуляції використовували культури дріжджів, попередньо вирощені на сусло-агарі протягом 24 годин. Всі експерименти провадили за однакових умов, культивування здійснювали в гойдальних пробірках, що містили 9,9 мл середовища та 0,1 мл дріжджової суспензії з концентрацією клітин 99,0 мг/мл, при температурі 28 °С. Приріст біомаси досліджуваних культур вимірювали фотоелектроколориметрично (фотоелектроколориметр ЛМФ-69), проводили перерахунок на абсолютно суху вагу.

Для визначення біосорбційної активності дріжджі відділяли від середовища центрифугуванням 5 хв, 6000 об/хв, залишкову кількість йонів шестивалентного хрому визначали дифенілкарбозидним методом [15].

Відповідно кількість металу, що може виводитись з розчину, підраховували за формулою: $q = V (C_i - C_f) / S$,

де V – об'єм розчину з сорбентом (л), C_i і C_f – початкова і рівноважна концентрації металів в розчині (мг/л), S – кількість біосорбенту (г АСР), q – кількість сорбованого металу (мг/г АСР) [11, 12, 14].

Умовами оптимізації рівня біосорбції йонів шестивалентного хрому дріжджами *S. cerevisiae* УКМ У-1968 були рівень рН (X_1), рівень аерації (X_2) та вихідна концентрація йонів Сг (VI) у MES-буфері або середовищі Рідер (X_3) з використанням моделі Бокса-Бенкена, впродовж 1, 3, 144 годин експерименту.

Експериментальна модель визначає вплив комбінації вказаних факторів процесу та їх взаємозв'язки при зміні відгуку. Ця модель описує три рівновіддалені фактори (X_1 , X_2 і X_3) та зміну відгуку рівня біосорбції йонів Сг (VI) (Y):

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 b_{ij} X_i \cdot X_j \quad (1)$$

де b_0 – константа, b_i – лінійний коефіцієнт, b_{ii} – квадратичний коефіцієнт, b_{ij} – коефіцієнт взаємодії другого порядку.

Загалом, було використано 15 комбінацій факторів (табл. 1). Рівні трьох факторів та їх рівновіддаленість були відібрані, орієнтуючись на дані попередніх експериментів [3, 6, 13, 14].

Дисперсійний аналіз використаний для визначення достовірної різниці отриманих результатів і для визначення середніх значень при 95 % ймовірності ($p \leq 0,05$). Вплив кожного з факторів та їх взаємозв'язки з отриманим результатом оцінені за допомогою ANOVA (Analysis of Variance) (табл. 2). Дані з оптимізації впливу



умов середовища на рівень біосорбції йонів (VI), проаналізовані для отримання коефіцієнтів регресії і побудови регресійних рівнянь [1].

Таблиця 1.

Незалежні фактори, використані для оптимізації експерименту

Table 1.

The independent factors used for experimental optimization

№	Рівень рН X_1	Рівень аерації, % X_2	Концентрація йонів Cr (VI), мг/л X_3
1	2,0	0,0	50,0
2	6,0	0,0	50,0
3	2,0	100	50,0
4	6,0	100	50,0
5	2,0	50,0	0,0
6	6,0	50,0	0,0
7	2,0	50,0	100
8	6,0	50,0	100
9	4,0	0,0	0,0
10	4,0	100	0,0
11	4,0	0,0	100
12	4,0	100	100
13	4,0	50,0	50,0
14	4,0	50,0	50,0
15	4,0	50,0	50,0

Функція ймовірності вирахована методом найменших квадратів, та графіки площин для біосорбції йонів Cr (VI) побудовані, як функція від значень рН та початкової концентрації йонів Cr (VI), з використанням програмного забезпечення STATISTICA 6,0 (StatSoft Inc., 2001).

Результати та їх обговорення

Комбінації факторів оцінювались в трьох часових проміжках, орієнтуючись на попередньо отримані дані, протягом 1, 3 та 144 годин за сталої температури 28 °C [3, 6, 13, 14].

Значимими факторами, які впливають на зміни рівня біосорбції йонів Cr (VI) (Y), мг/л є рівень рН MES-буферу (X_1) та початкова концентрація йонів Cr (VI), де (X_2) – лінійна залежність та (X_3^2) – квадратична залежність. Результати, отримані після проведення експерименту впродовж 1, 3 та 144 годин за стандартних умов, описуються рівняннями 1, 2, 3, відповідно:

$$Y = 9,916 + 5,875 \cdot X_1 + 10,250 \cdot X_3 + 6,500 X_1 \cdot X_3 \quad (1),$$

$$Y = 9,250 - 5,250 \cdot X_1 + 10,500 \cdot X_3 - 2,729 \cdot X_3^2 - 6,750 X_1 \cdot X_3 \quad (2),$$

$$Y = 10,416 - 8,125 \cdot X_1 - 3,395 \cdot X_1^2 + 9,000 \cdot X_3 - 6,500 X_1 \cdot X_3 \quad (3),$$

де Y – рівень біосорбції йонів Cr (VI), мг/л, 9,916; 5,875; 10,250 і т. д. – коефіцієнти регресії.



Рівняння регресії (4), отримане після проведення оптимізаційного експерименту впродовж 144 годин у середовищі Рідер:

$$Y = 20,75 + 20,375 X_3 \quad (4),$$

Регресійна модель включає від 2-х (4), 4-х (1), 5-ти (2, 3) коефіцієнтів регресії, з лінійною (1, 4) і квадратичною залежністю впливу (2, 3) та лінійний вплив взаємодій факторів і описує взаємозв'язки між відповіддю (Y) та експериментальними факторами (1, 4) (X_1, X_3).

Отже, отримані регресійні рівняння свідчать, що рівень біосорбції йонів шестивалентного хрому є функцією впливу двох факторів з використанням коефіцієнту регресії, якими є рівень рН середовища та початкова концентрація йонів Cr (VI) в середовищі культивування. При проведенні даних експериментів рівень аерації є єдиним фактором, який не впливає на рівень біосорбції йонів Cr (VI). При тривалості експерименту впродовж 1 години спостерігаємо сумачію двох основних факторів X_1 і X_3 та позитивний ефект від їх взаємодії.

Збільшення тривалості експерименту призводить до зміни параметрів регресійних рівнянь, за 3 години основний вплив здійснює саме фактор початкової концентрації йонів Cr (VI) (X_3), тоді як за 144 години — фактор рН (X_1), за умови проведення експерименту в MES-буфері. Проведення експерименту в середовищі Рідер впродовж 144 годин нівелює квадратичні впливи і являє собою лінійну взаємодію, причому основним діючим фактором, що позитивно і в значній мірі впливає на рівень біосорбції йонів Cr (VI), є фактор початкової концентрації даних йонів (X_3), що також підтверджує ANOVA аналіз — сума квадратів є найвищою при оцінці усіх впливів (табл. 2) та діаграма Парето, де проводиться оцінка впливу абсолютних значень кожного ефекту (табл. 3, 4).

Таблиця 2.

ANOVA для рівня біосорбції йонів Cr (VI)

Table 2.

ANOVA for the level of Cr (VI) ions biosorption

Фактори	Сума квадратів	Розподілення числа ступенів свободи між факторами	Середня сума квадратів	F	p
протягом 1 години (MES — буфер)					
pH (X_1)	276,125	1	276,125	8,53	0,003669
Cr (VI) (X_3)	840,50	1	840,50	25,96	0,000290
$X_1 \cdot X_3$	169,00	1	169,00	16,12	0,010107
протягом 3 годин (MES — буфер)					
pH (X_1)	220,50	1	220,50	30,91	0,002589
Cr (VI) (X_3)	882,00	1	882,00	123,64	0,000103
Cr (VI) (X_3^2)	110,00	1	110,00	15,42	0,011103
$X_1 \cdot X_3$	182,25	1	182,25	25,54	0,003918
протягом 144 годин (MES — буфер)					
pH (X_1)	528,12	1	528,12	32,23	0,002360
pH (X_1^2)	224,16	1	224,16	13,68	0,014015
Cr (VI) (X_3)	648,00	1	648,00	39,55	0,001494
$X_1 \cdot X_3$	169,00	1	169,00	10,31	0,023682
протягом 144 годин (середовище Рідер)					
Cr (VI) (X_3)	3321,25	1	3321,25	101,99	0,000008

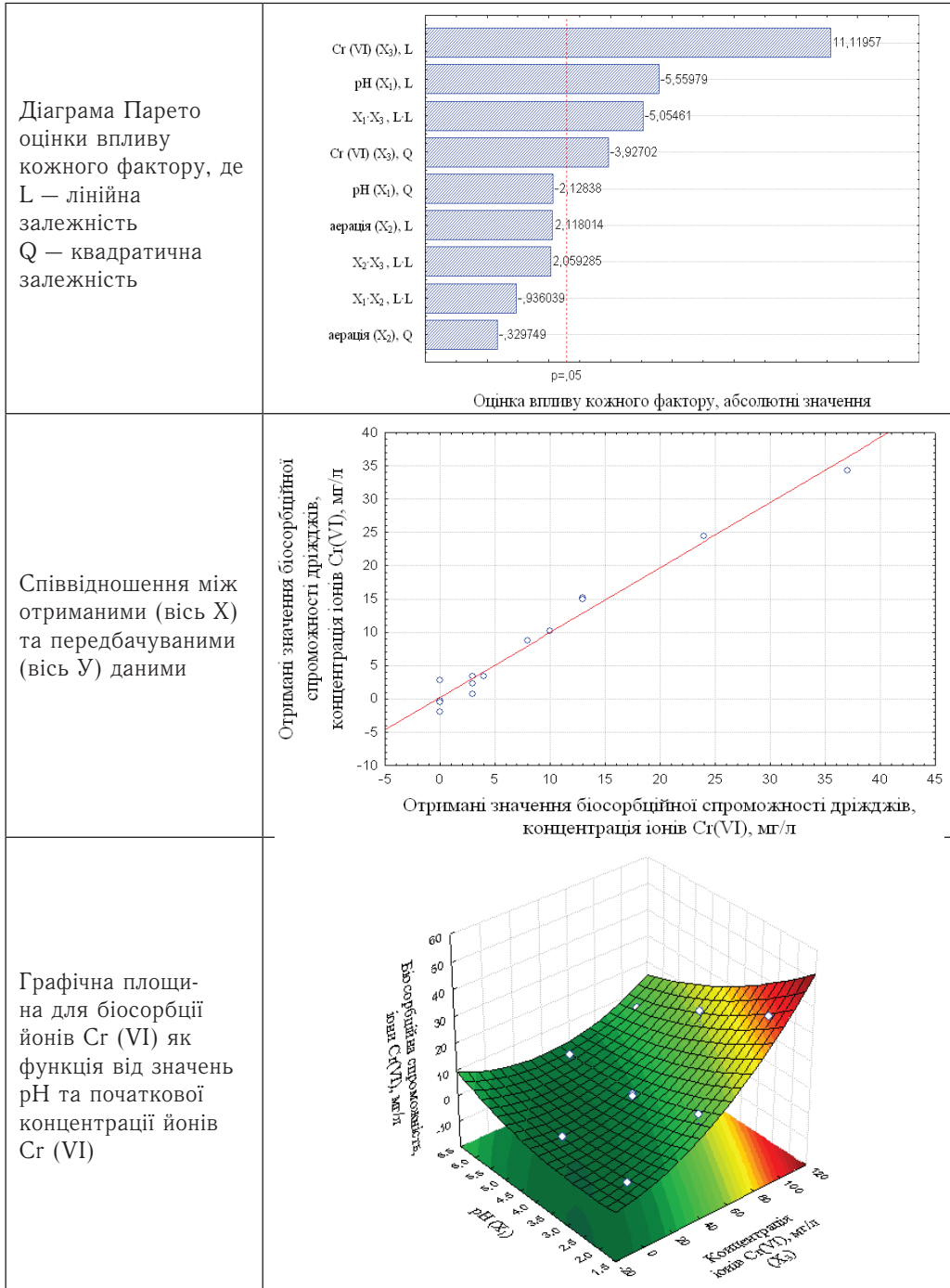


Таблиця 3.

Статистична обробка даних методом Бокс-Бенкен щодо впливу факторів на рівень біосорбції йонів Cr (VI) протягом 3 годин експерименту у MES-буфері

Table 3.

Statistical data-processing of the factors influenced on the level of Cr (VI) ions biosorption for 3 hours in the MES-buffer by Box-Behnken design

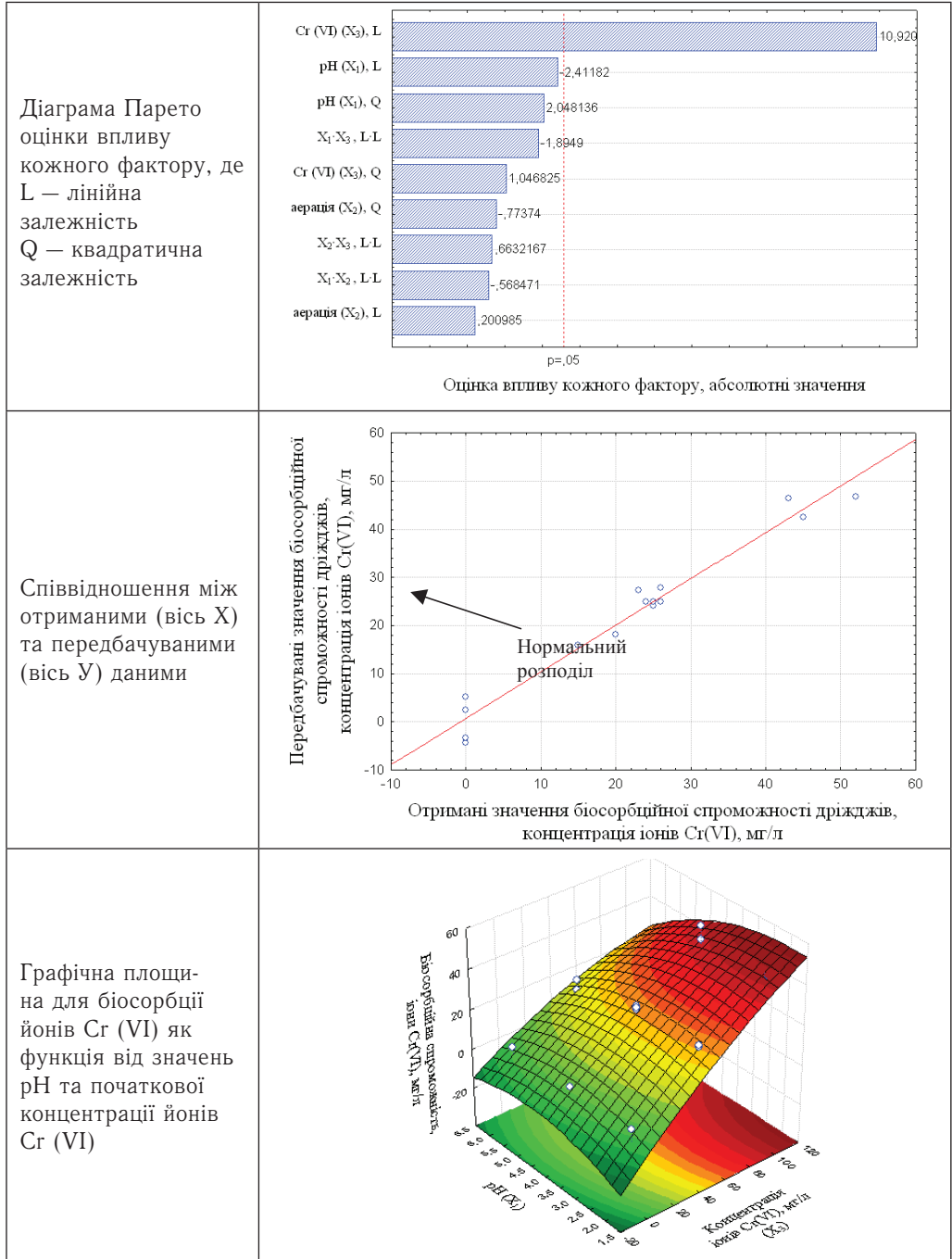


Таблиця 4.

Статистична обробка даних методом Бокс-Бенкен щодо впливу факторів на рівень біосорбції йонів Cr (VI) протягом 144 годин експерименту у середовищі Рідер

Table 4.

Statistical data-processing of the factors influenced on the level of Cr (VI) ions biosorption for 144 hours in the Rider-medium by Box-Behnken design



З практичної точки зору, такий ефект можна пояснити впливом приросту біомаси *S. cerevisiae* УКМ У-1968, оскільки середовище Рідер є досить оптимальним для росту біомаси дріжджів за достатньо довгий проміжок часу та впливом зростаючої кількості біомаси на процеси акумуляції йонів хрому, які відбуваються впродовж цього часу.

Кореляція між отриманими (вісь X) та передбачуваними (вісь Y) даними є досить високою (коефіцієнт детермінації, R^2 : 0,9648 — для рівняння 1; 0,9766 — для рівняння 2; 0,9524 — для рівняння 3; 0,9334 — для рівняння 4), що свідчить про те, що регресійні рівняння можуть бути використані для визначення рівня біосорбції йонів Cr (VI) (табл. 3, 4).

Графічні площини для біосорбції йонів Cr (VI), як функція від значень рН та початкової концентрації йонів Cr (VI), показують, що у випадку тривалості експерименту протягом 1 години рівень біосорбції йонів Cr (VI) буде закономірно збільшуватись із зростанням рН та початкової концентрації йонів Cr (VI). При більш тривалому експерименті топографія графічної площини змінюється, при цьому нижчі значення рН та висока початкова концентрація йонів Cr (VI), призводять до зростання рівня біосорбції йонів Cr (VI), що є характерним для 3 годин (табл. 3) та 144 годин експерименту у MES-буфері та у середовищі Рідер (табл. 4).

Профілі прогнозованих значень та бажаних рівнів оптимізації біосорбції йонів Cr (VI) показують, що наявність у середовищі початкової концентрації йонів Cr (VI) на рівні 100 мг/л (X_3) є оптимальним для всіх часових експериментів, змінними елементами є фактор рН (X_1) та фактор аерації (X_2), хоча останній фактор не є значимим фактором регресійного рівняння. Найвищий розрахований імовірний рівень біосорбції йонів Cr (VI) у MES-буфері відповідає 3 год впливу факторів і дорівнює 40,708 мг/г, при 144 годинах впливу у середовищі Рідер цей показник вищий і відповідає 45,844 мг/г і нижчий у MES-буфері — 38,167 мг/г (рис. 1, 2).

На біосорбційну активність рН розчину впливає, змінюючи поверхневі властивості біомаси і самого металу. Більшість дослідників засвідчують, що значення рН в межах 4,0 — 8,0 є оптимальним для сорбції різних металів, а такі метали, як хром і срібло сорбуються при більш кислих значеннях рН від 2,0 до 4,0 [6, 7, 11, 12]. Окрім цього, протягом всього часу культивування дріжджів в середовищі з йонами хрому відбувається зниження рН до 2,0. Özer A. та Özer D. показали, що оптимальне значення рН для біосорбції йонів Cr (VI) клітинами *S. cerevisiae* дорівнює 1,0 [8].

Таке зниження рН корелює зі зростанням кількості біомаси в середовищі, та відповідним збільшенням кількості вторинних метаболітів, що і призводить до закислення середовища. Фактор рН (X_1) має оптимальне значення на рівні 2,0 у MES-буфері (рис. 1). В середовищі Рідер рН дорівнює 3,0, що у комплексі з найвищим значенням рівня біосорбції йонів Cr (VI) 45,844 мг/г свідчить про комплексуювальну роль йонів, які входять до складу середовища і тим самим підвищують рівень зв'язування йонів Cr (VI), метаболічну активність дріжджових клітин та біоаккумуляційну спроможність дріжджів *S. cerevisiae* УКМ У-1968 (рис. 2).



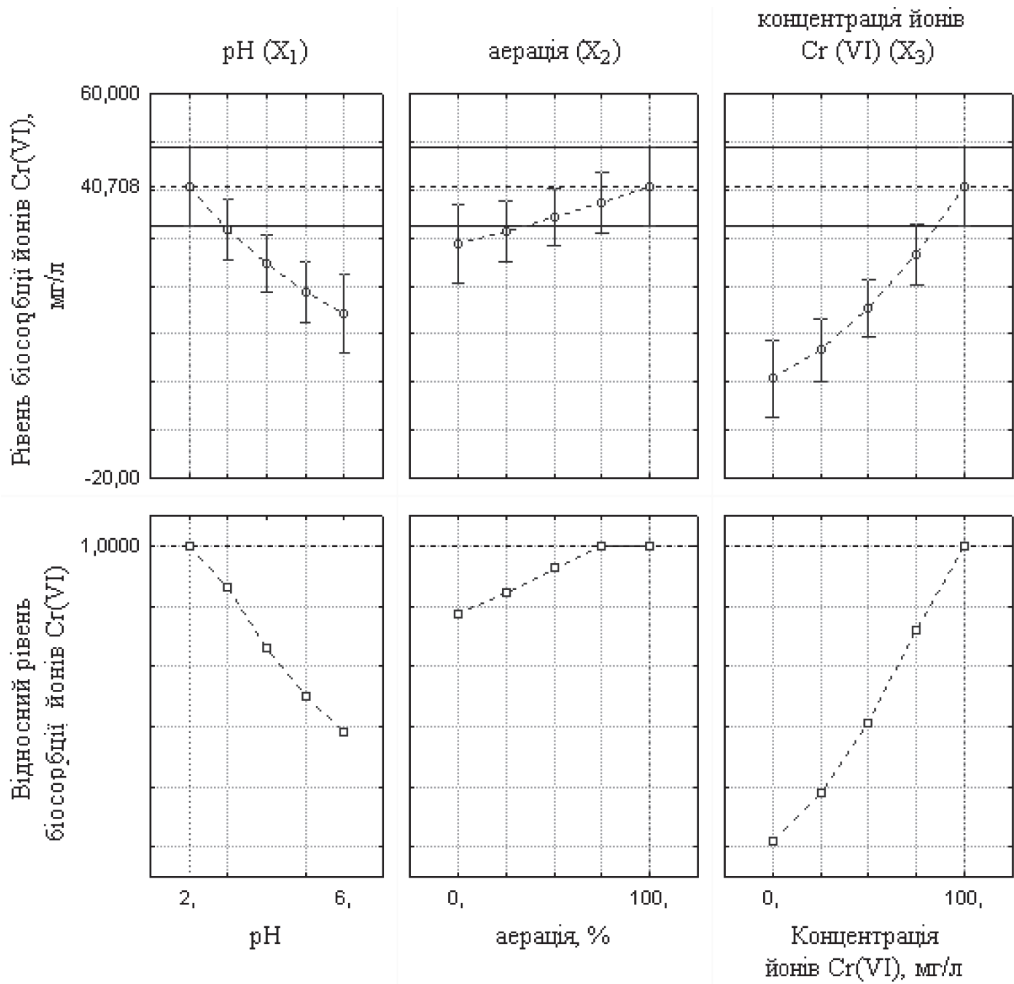


Рис. 1. Профілі прогнозованих значень для оптимізації біосорбції йонів Cr (VI), де вплив факторів здійснюється протягом 3 годин у MES-буфері.

Fig. 1. The profiles of predicted values for optimization of Cr (VI) ions biosorption under the factors influenced for 3 hours in the MES-buffer.



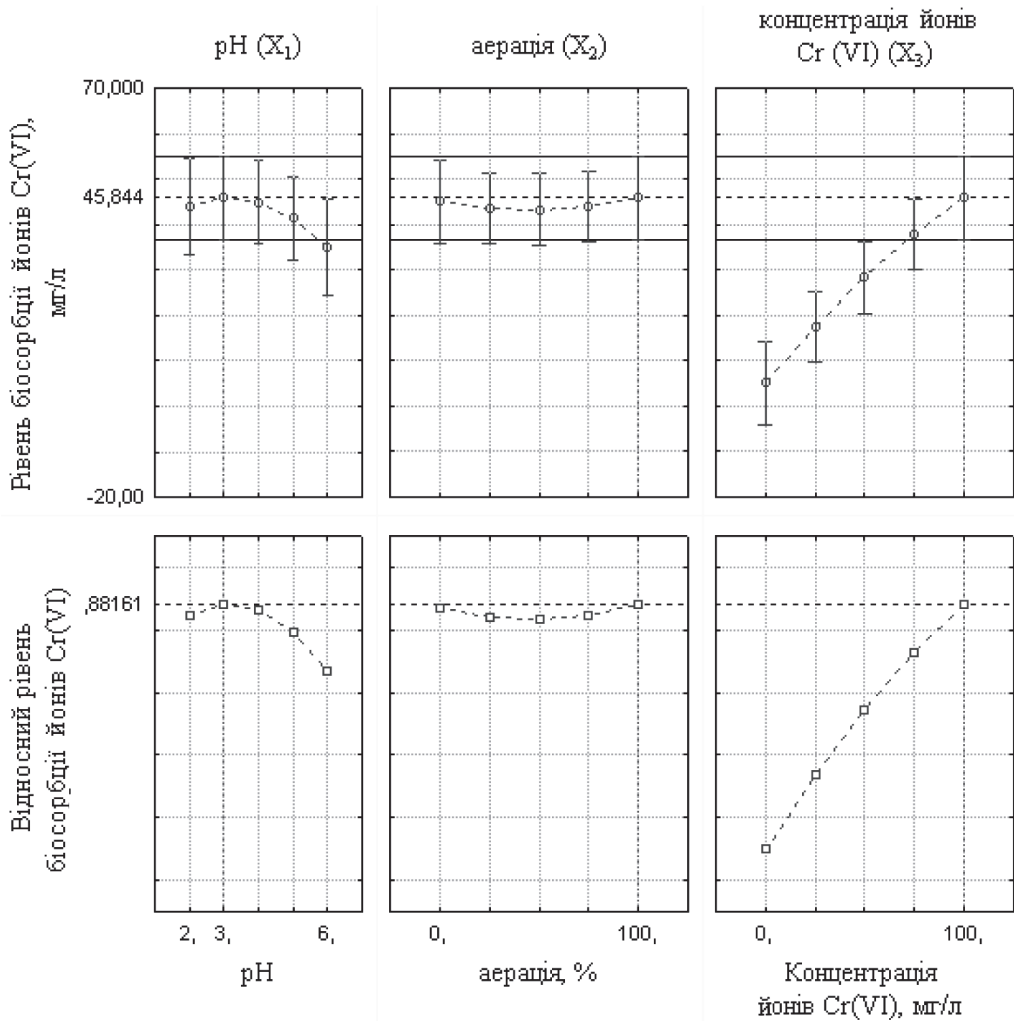


Рис. 2. Профілі прогнозованих значень для оптимізації біосорбції йонів Cr (VI), де вплив факторів здійснюється протягом 144 годин у середовищі Рідер.

Fig. 2. The profiles of predicted values for optimization of Cr (VI) ions biosorption under the factors influenced for 144 hours in the Rider medium.

Таким чином, статистична оптимізація біосорбції йонів Cr (VI) дріжджами *S. cerevisiae* УКМ У-1968 показує, що оптимальними є значення pH 2,0, аерація 100 % та початкова кількість йонів Cr (VI) у MES-буфері 100 мг/л. Найвищий розрахований ймовірний рівень біосорбції йонів Cr (VI) за зазначених параметрів відповідає 3 год впливу факторів і дорівнює 40,708 мг/г. Отже, всі проведені статистичні дослідження повністю підтверджують раніше отримані експериментальні дані, а дріжджі *S. cerevisiae* УКМ У-1968 можуть бути використані як експериментальна модель для подальшого вивчення механізмів біосорбції.

ЛІТЕРАТУРА

1. Armstrong R., Hilton A. The use of variance (ANOVA) in applied microbiology // *Microbiologist*. — 2004. — 12. — P. 18-21.
2. Cervantes C., Campos-Garcia J., Devars S. et al. Interactions of chromium with microorganisms and plants // *FEMS Microbiology Reviews*. — 2001. — 25. — P. 335-347.
3. Kasatkina T., Lozovaya O., Podgorsky V. Chromium (VI) biosorption by yeasts: influence of pH and biomass concentration on the biosorption // 11th European Congress on Biotechnology, 24-29 August 2003, Basel, Switzerland. Book of Abstract. — p. 128.
4. Kratochvil D., Volesky B. Advances in the biosorption of heavy metals // *Trends. Biotechnol.* — 1998. — 16, №7. — P. 291-300.
5. Krauter P., Martinelli R., Williams K., Martins S. Removal of Cr (VI) from ground water by *Saccharomyces cerevisiae* // *Biodegradation*. — 1996. — 7, №4. — P. 277-286.
6. Lozovaya O. G., Kasatkina T. P., Podgorsky V. S., Fomina M. A Hexavalent chromium removal by yeasts biomass // 15th International Biohydrometallurgy Symposium, 26-29 September 2005, Cape Town, South Africa. — P. 617-624.
7. Mameeva O. G., Kasatkina T. P., Podgorsky V. S. The role of carotenoid pigments in Cr (VI) tolerance, biosorption and bioaccumulation by *Rhodotorula mucilaginosa* UCM Y-1776 and its mutants // *Advanced Materials Research*. — 2007. — Vols. 20-21. — p. 611-614.
8. Özer A. and Özer D. Comparative study of the biosorption of Pb (II), Ni (II) and Cr (VI) ions onto *S. cerevisiae*: determination of biosorption heats // *J. Hazard Mater.* — 2003. — 100. — P. 219-229.
9. Paknikar K. M., Puranik P. R., Pethkar A. V. Development of microbial biosorbents — a need for standardization of experimental protocols // In: *Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century (part B): International Biohydrometallurgy Symposium-Proceedings*; Amils R., Ballester A., Eds.; Elsevier: Amsterdam, — 1999. — P. 363-372.
10. Soares E. V., Duarte A. and Soares H. Study of the suitability of 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid pH buffer for heavy metals accumulation studies using *Saccharomyces cerevisiae* // *Chemical Speciation and Bioavailability*. — 2000. — 12, 2. — P. 59-65.
11. Volesky B., Holan Z. R. Biosorption of heavy metals: a review // *Biotechnol. Prog.* — 1995. — 11. — P. 235-250.
12. Volesky B., May-Phillips H. A. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 1993. — 42. — P. 797-806.
13. Лозовая О. Г., Касаткина Т. Р., Подгорский В. С. Влияние хрома (VI) на физиологию роста и сорбционную способность дрожжей // *Микробиол. журн.* — 2004. — т.66, №3. — С. 42-50.
14. Лозова О. Г. Дріжджі — сорбенти деяких йонів важких металів: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — Київ, 2004. — 20 с.
15. Лурье Ю. Ю., Рыбникова А. И. Химический анализ производственных сточных вод, — М.: Химия, — 1974. — 335 с.



О. Г. Мамеева, В. С. Подгорский

Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академіка Заболотного 154, Киев, ДСП, Д03680, Украина, тел.: 8 (044)
526 11 79,
e-mail: Mameeva@ukr.net

ОПТИМИЗАЦИЯ БИОСОРБЦИИ ИОНОВ CR (VI) ДРОЖЖАМИ *S. CEREVISIAE* УКМ У-1968 МЕТОДАМИ СТАТИСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Реферат

Уровень аэрации, pH, и начальная концентрация ионов Cr (VI) были исследованы с использованием методов статистического анализа (модель Бокса-Бенкена). Оптимальными являются значения pH 2,0, аэрация 100 % и начальная концентрация ионов Cr (VI) в MES-буфере 100 мг/л для биосорбции ионов Cr (VI) дрожжами *S. cerevisiae* УКМ У-1968. Самый высокий рассчитанный вероятностный уровень биосорбции ионов Cr (VI) равен 40,708 мг/г за 3 часа влияния факторов. Были получены уравнения регрессии, как функция от двух основных эффектов, таких как уровень pH и начальная концентрация ионов Cr (VI) в среде культивирования с коэффициентами регрессии и коэффициентами детерминации R^2 : +0,9648; +0,9766; +0,9524; +0,9334.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, модель Бокса-Бенкена, статистическая оптимизация, биосорбция, ионы Cr (VI).

O. G. Mameeva, V. S. Pidgorsky

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NASU, Academ. Zabolotny str.,
154, Kyiv, Ukraine, tel.: 8 (044) 526 11 79, e-mail: Mameeva@ukr.net

THE OPTIMIZATION OF THE CR (VI) IONS BIOSORPTION BY YEAST *S. CEREVISIAE* UCM Y-1968 BY THE STATISTICAL ANALYSIS METHODS

Summary

The level of aeration, pH and initial concentration of Cr (VI) ions have been investigated with use of statistical analyses experiments (Box-Behnken design). The values pH 2.0, aeration of 100 % and initial concentration of Cr (VI) ions in the MES-buffer of 100 mg/l for biosorption of Cr (VI) ions of yeasts' *S. cerevisiae* UCM Y-1968 are optimum ones. The highest calculated predicted level of the biosorption of Cr (VI) ions was 40,708 mg/g for 3 hours of the factors influence. The received regression equations as the function from two main effects, such as a level pH and initial concentration of ions Cr (VI) in cultivation medium with use of regress factors were derived by the statistical analysis, and the models with multiple correlation coefficient R^2 : 0,9648; 0,9766; 0,9524; 0,9334 were obtained.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, Box-Behnken design, statistical optimization, biosorption, Cr (VI) ions.

