

გარემოში მობინადრე *Arthrobacter*-ის გვარის ბაქტერიების მიერ
ქრომის შეთვისება და დეტოქსიკაცია და აღნიშნულ პროცესზე
სხვადასხვა მეტალური იონის გავლენა

ოლია რჩეულიშვილი

*სადისერტაციო ნაშრომი წარდგენილია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის
საინჟინრო ფაკულტეტზე ფიზიკის დოქტორის აკადემიური ხარისხის მინიჭების
მოთხოვნის შესაბამისად*

ბიოფიზიკა

სამეცნიერო ხელმძღვანელები: ნუნუ მეტრეველი, დოქტორი
თამაზ ყალაბეგიშვილი, დოქტორი

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი
თბილისი, 2014

განაცხადი

როგორც წარდგენილი სადისერტაციო ნაშრომის ავტორი, ვაცხადებ, რომ ნაშრომი წარმოადგენს ჩემს ორიგინალურ ნამუშევარს და არ შეიცავს სხვა ავტორების მიერ აქამდე გამოქვეყნებულ, გამოსაქვეყნებლად მიღებულ ან დასაცავად წარდგენილ მასალებს, რომლებიც ნაშრომში არ არის მოხსენიებული ან ციტირებული სათანადო წესების შესაბამისად.

ოლია რჩეულიშვილი

5.07.2014

ნაშრომი ეძღვნება პროფესორ ნელი წიბახაშვილის ხსოვნას.

აბსტრაქტი

მძიმე მეტალებით და რადიონუკლიდებით დაბინძურებული გარემოს გასუფთავება დღესდღეობით კვლავ რჩება მსოფლიოს ერთ-ერთ მნიშვნელოვან პრობლემად. მსოფლიოს მწვავე დამაბინძურებლების სიაში ქრომი შესულია ტოქსიკური საფრთხის ტოპ-ექვსეულში. ქრომს გააჩნია რამოდენიმე ჟანგვითი მდგომარეობა -2 დან +6 ჩათვლით, თუმცა ბუნებრივ პირობებში ჩვეულებრივ არსებობს +3 და +6 ჟანგვით მდგომარეობაში. Cr(VI) არის ხსნადი და მეტად ტოქსიკური, განსხვავებით Cr(III)-გან, რომელიც არის ნაკლებად ხსნადი და ნაკლებტოქსიკური. Cr(III) ასევე მოხსენიებულია როგორც საკვებად აუცილებელი კვალური ელემენტი. მძიმე მეტალებით დაბინძურებულ გარემოში არსებობისას ბაქტერიებმა განივითარეს მეტალ-რეზისტენტობის მექანიზმები. ნაჩვენებია, რომ ბაქტერიები შეითვისებენ Cr(VI)-ს და აღადგენენ შემდეგი თანმიმდევრობით: Cr(VI)-Cr(V)-Cr(IV)-Cr(III) სხვადასხვა რედუქტანტების დახმარებით, როგორებიც არიან: გლუტათიონი (GSH), გლუტათიონ რედუქტაზა (GR), ცისტეინი, კარბოჰიდრატები, NADH, ნუკლეოტიდები და ასკორბინის მჟავა. ბაქტერიის უჯრედის კედლის შემადგენელი კომპონენტები: თეიხოის მჟავები, პოლიკარბოჰიდრატები და სხვა დიოლის შემცველი ნაერთები ფლობენ აღდგენის უნარს, გააჩნიათ მემბრანადაკავშირებული რედუქტაზური აქტივობა და შეუძლიათ გამოიწვიონ Cr(VI)-ის აღდგენა ბაქტერიის უჯრედის კედელზე. გარემოს რემედიაციის ყველაზე ეფექტურ საშუალებად გვევლინება ბაქტერიების გამოყენებაზე დაფუძნებული ბიოლოგიური მეთოდი. აქედან გამომდინარე მეტალ-რეზისტენტული ბაქტერიების პოტენციალის გამოყენება ძალზე მომგებიანია ბიორემედიაციული პროცესებისთვის. დღემდე, მხოლოდ რამოდენიმე ლაბორატორიულად ჩატარებული კვლევა არსებობს მიკროორგანიზმების პასუხზე ქრომით გამოწვეული სტრესის მიმართ -სხვა მეტალური იონების თანადროული არსებობის ფონზე. ჩვენი კვლევის მიზანია *Arthrobacter* - ის გვარის მეტალ-რეზისტენტული ბაქტერიების მიერ ქრომის აღდგენის პროცესის და აღნიშნულ პროცესზე სხვადასხვა მეტალური იონების გავლენის შესწავლა, ბაქტერიების მიერ ქრომის აღდგენის ოპტიმალური პირობების ძიება, როდესაც ბაქტერია აღადგენს მაღალი კონცენტრაციით არსებულ ტოქსიკურ

ქრომს. ბაქტერიას ქრომის და სხვა მეტალური იონების დეტოქსიკაცია შეუძლია მათი აღდგენით და აკუმულირებით უჯრედის შიგნით ან/და უჯრედის ზედაპირზე.

ნაშრომი მოიცავს ართრობაქტერიის გვარის სამი შტამის: *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter globiformis* 151B და *Arthrobacter sp.*61B ატომურ აბსორბციული, ელექტრონულ პარამაგნიტური რეზონანსის და აგაროზას გელზე ელექტროფორეზის მეთოდების გამოყენებაზე დაფუძნებულ კვლევებს. აღნიშნული კვლევებით დადგინდა რომ აღნიშნული ბაქტერიული შტამები გარემოდან ითვისებენ Cr(VI)-ს და წარმატებით აღადგენენ Cr(VI)-ს Cr(III)-ად; აღმოჩნდა, რომ Cr(III)-ის წარმოქმნის ნახევარდრო ბაქტერიაში ტოლია Cr(V)-ის გარდაქმნის ნახევარდროსი. მიკრობული აღდგენის ექსპერიმენტული შედეგები ემთხვევა არსებულ კინეტიკურ მოდელს. დადგენილ იქნა Cr(VI)-ის აღდგენის ლოკალიზაცია, კერძოდ, Cr(VI)-ის აღდგენა ნაჩვენებია ართრობაქტერიის უჯრედის კედელზე. ასევე ნაჩვენებია იქნა, რომ Zn(II)-ის იონები ზრდიან ბაქტერიული უჯრედების მიერ Cr-ის აკუმულაციის და აღდგენის პოტენციალს. ნაჩვენებია იქნა ასევე, რომ კალიუმის მაღალი კონცენტრაციებისას ბაქტერიულ უჯრედში, დაბალია ქრომის შეთვისების სიჩქარე. ორმაგი (ბინარული) სისტემებით (Cr+Cu; Cr+Mn; Cr+Ni) ზემოქმედებისას მეტალები როგორც წესი ხელს უწყობენ ბაქტერიის მიერ ქრომის შეთვისების და აღდგენის პროცესს. მეტალური იონების ერთობლივი მოქმედება ანელებს ბაქტერიების ზრდის სიჩქარეს, თუმცა აღდგენილი Cr(III)-ის შემცველობა ბაქტერიაში იზრდება ბაქტერიის ზრდის დროსთან ერთად. აგაროზას გელზე ელექტროფორეზით დადასტურდა რომ *Arthrobacter globiformis* 151B-ს გააჩნია პლაზმიდა (რიგ კვლევებში პლაზმიდას უკავშირდება მძიმე მეტალების მიმართ ბაქტერიების რეზისტენტობა). პლაზმიდა ქრება ბაქტერიის მიერ ქრომის აღდგენის პროცესში წარმოქმნილი სავარაუდოდ თავისუფალი რადიკალების გავლენით.

აღნიშნული ნაშრომში აღწერილი კვლევის შედეგები შეიძლება წარმატებით იქნას გამოყენებული ბიორემედიაციული პროცესებისთვის, კერძოდ Cr(VI)-ით დაბინძურებული გარემოს აღსადგენად.

ძირითადი საძიებო სიტყვები: *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter globiformis* 151B და *Arthrobacter sp.* 61B, მძიმე მეტალები, ქრომი, ბიორემედიაცია

Abstract

Remediation of polluted environment with heavy metals and radionuclides still remains as world's problem. Chrome is in top-six of world's acute pollutants. Chrome has several oxidation states (-2) – (+6). In natural conditions it exists in +3 and +6. Cr(VI) is soluble and more toxic unlike to insoluble and non-toxic Cr(III) – a trace element necessary for nutrition. In the presence of toxic heavy metals bacteria evolves various mechanisms to enhance their survival. Bacteria reduce Cr(VI): Cr(VI)-Cr(V)-Cr(IV)-Cr(III) with the help of non-specific reductants – glutathione, glutathione reductase, cysteine, carbohydrates, NADH, nucleotides, ascorbic acid. Bacterium cell wall components – Teichoic acids, polycarbohydrates and other diol-containing compounds have reduction ability, membrane-binding reductase activity and can reduce Cr(VI) on bacterium cell wall. The most effective environmental remediation is biological method based on bacteria usage. Using metal-resistant bacteria is very profitable for bioremediation. Nowadays there are only several laboratory researches about microorganisms' response on Cr-caused stress in the presence of other metal ions.

The aim of our research is studying chrome reduction process occurring by the metal-resistant bacteria of *Arthrobacter* species, studying the influence of various metal ions on the mentioned process, searching for the optimal conditions for chrome reduction by bacteria when bacteria reduces the toxic chrome existing in high concentration. Bacteria can detoxify chrome and other metal ions by reducing and accumulating them in cell and/or on cell surface.

The work includes researches of arthrobacteria species' three strains – *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter globiformis* 151B and *Arthrobacter sp.* 61B based on methods of atomic absorption, electron spin resonance and electrophoresis on agarose gel. These researches determined, that the mentioned strains successfully reduce Cr(VI) to Cr(III); It was shown that the halftime of Cr(III) formation in bacterium is almost equal to that of Cr(V) decomposition. These results coincides the existed kinetic model. The localization of Cr(VI) was determined – it is shown on arthrobacter's cell wall. Also it was shown that Zn(II) ions increase Cr's accumulation and reduction by bacterial cells. The high

concentrations of potassium in cell decreases Cr absorption speed. During the influence of binary systems (Cr+Cu; Cr+Mn; Cr+Ni) metals do not interrupt Cr reduction by bacteria. Influencing multi-metal (Cr+Cu+Zn+Mn+Ni) mixture on bacteria decreases bacterial biomass with 20-30%. Using agarose gel electrophoresis it was confirmed that *Arthrobacter globiformis* 151 B has plasmid, which easily disappears under the influence of free radicals produced by bacteria in the process of reducing Cr(VI).

The described results may be successfully used in bioremediation, particularly for the environment polluted with hexavalent chromium.

Key Words: *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter globiformis* 151B and *Arthrobacter sp.* 61B, heavy metals, chrome, bioremediation.

მადლობა

მადლობას ვუხდით ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტს და სადოქტორო ნაშრომის სამეცნიერო ხელმძღვანელებს თანადგომისთვის და გაწეული დახმარებისთვის.

მადლობა ივ. ჯავახიშვილის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის ელევთერ ანდრონიკაშვილის ფიზიკის ინსტიტუტის ბიოლოგიური სისტემების ფიზიკის განყოფილების თანამშრომლებს კვლევაში მონაწილეობისა და ხელშეწყობისათვის.

მადლიერებას გამოვხატავ შოთა რუსთაველის ეროვნული სამეცნიერო ფონდის მიმართ. პრეზიდენტის გრანტის დაფინანსებით სადოქტორო ნაშრომის ნაწილი შესრულდა ივ. ბერიტაშვილის ექსპერიმენტული მედიცინის ცენტრში. ასევე, სამოგზაურო გრანტის დაფინანსებით, აღნიშნული კვლევის შესახებ მოხსენება იქნა გაკეთებული კვალური ელემენტების ბიოგეოქიმიის მე-12 საერთაშორისო კონფერენციაზე აშშ-ში, ქალაქ ათენში.

სარჩევი

სარჩევი	IX
ცხრილების ჩამონათვალი	XI
გრაფიკების ჩამონათვალი	XII
ილუსტრაციების ჩამონათვალი	XIII
აბრევიატურების ჩამონათვალი	XIV
შესავალი	15
სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა	19
თავი 1. მიკრობული მდგრადობა მძიმე მეტალების მიმართ	19
1.1 ბაქტერია-მეტალის ურთიერთქმედების მექანიზმები	19
1.2 ქრომი	21
თავი 2. <i>In situ</i> ბიორემედიაციის მეთოდები	24
თავი 3. მიკრობული რეზისტენტობა Cr(VI)-ის მიმართ	25
3.1 ქრომის ბიოლოგიური აღდგენა	28
3.2 Cr(III)- ის, როგორც აღდგენილი Cr(VI)-ის საბოლოო პროდუქტის „ბედი“ გარემოში	30
თავი 4. ბაქტერიების მიერ ქრომის დეტოქსიკაცია სხვა მეტალების თანაობისას	32
თავი 5. <i>Arthrobacter</i> -ის გვარის ზოგადი დახასიათება	33
5.1 გრამ-დადებითი ბაქტერიების უჯრედის კედლის დახასიათება	34
მეთოდოლოგია	36
თავი 1. გამოყენებული მასალა	36
1.1. საკვლევი ბაქტერიული შტამების მორფოლოგიურ-კულტურალური ნიშან-თვისებები	37
1.2. საკვლევი ბაქტერიული შტამების ფიზიოლოგიურ-ბიოქიმიური ნიშან-თვისებები	38
თავი 2. ნიმუშების მომზადება ეპრ და აას გაზომვებისთვის	39
2.1. ნიმუშების მომზადება გაზომვებისთვის როდესაც შევისწავლიდით ბაქტერიების მიერ ქრომის აკუმულაციას საკვებ გარემოში Cr(VI)-თან ერთად Zn-ის და სხვა მეტალების	

არსებობისას	39
2.2. ნიმუშების მომზადება გაზომვებისთვის როდესაც შევისწავლით <i>A. oxydans</i> -ის მიერ Cr(V) დიოლების Cr(III) ნაერთებად აღდგენას	40
2.3. ბაქტერიული უჯრედების ლიოფილიზაცია	42
თავი 3. გაზომვის მეთოდები	43
3.1. ელექტრონული პარამაგნიტური რეზონანსის (ეპრ) მეთოდი	43
3.2. ატომურ-აბსორბციული სპექტრომეტრია (აას)	47
3.3. აგაროზას გელზე ელექტროფორეზი	52
შედეგები	57
თავი 1. <i>Arthrobacter oxydans</i> -ის მიერ Cr(V)-ნაერთების გარდაქმნა Cr(III)-ის ნაერთებად	57
1.1. Cr(III) -ის ფორმირება <i>A. oxydans</i> -ის ლიოფილიზირებულ უჯრედებზე Cr(VI)-ის ზემოქმედების შემდეგ	57
1.2. Cr(III)-ის ფორმირება <i>A. oxydans</i> -ის თხევად კულტურაზე Cr(VI)-ის ზემოქმედების შემდეგ	63
თავი 2. <i>Arthrobacter</i> -ის სახეობის ბაქტერიების მიერ Cr(VI)-ის აღდგენის და აკუმულირების პროცესზე Zn(II) -ის გავლენა	67
თავი 3. Cr, Fe, Mg და K-ის შეთვისების პროცესის შესწავლა ბაქტერია <i>Arthrobacter oxydans</i> მიერ	73
თავი 4. ბაქტერიის უჯრედებში ქრომის აკუმულაცია ბაქტერიის საკვებ გარემოში ექსვალენტიან ქრომთან ერთად სხვა მეტალების არსებობისას	77
თავი 5. ქრომის გავლენა <i>Arthrobacter</i> -ის სახეობის ბაქტერიების დნმ-ზე	79
დისკუსია/ინტერპრეტაცია	83
დასკვნა და რეკომენდაციები	93
ბიბლიოგრაფია	95

ცხრილების ჩამონათვალი

ცხრილი 1: Cr(VI) -ის <i>A.oxydans</i> -ზე მოქმედებისას Cr(III)-ის ფორმირების ნახევარდრო	63
ცხრილი 2: ტესტირებული ბაქტერიების მეტალების აკუმულაციის მრუდების ფიტირების პარამეტრები	70

გრაფიკების ჩამონათვალი

გრაფიკი 1: Cr(V)-ის ცვლილების დინამიკის ეპრ სპექტრები, რეგისტრირებული სისტემა Cr(VI)- <i>A. oxydans</i> -ში	58
გრაფიკი 2: Cr(III)-ის და Cr(V)-ის ეპრ სპექტრები სისტემა Cr(VI)- <i>A. oxydans</i> -ში	60
გრაფიკი 3: Cr(V)-ის და Cr(III)-ის ეპრ სპექტრების ფარდობითი ინტენსივობის დროზე დამოკიდებულება	61
გრაფიკი 4: თხევად გარემოში გაზრდილი <i>A. oxydans</i> -ში Cr(III)-ის ფორმირების დროზე დამოკიდებულება	64
გრაფიკი 5: Cr(III) -ის სიგნალის ინტენსიურობა ბაქტერიულ უჯრედებში და ბაქტერიული უჯრედების გარეთ ხსნარში	65
გრაფიკი 6: Cr(III)- ის დაგროვების დროზე დამოკიდებულება	65
გრაფიკი.7: ქრომის აკუმულირება <i>Arthrobacter sp</i> 61B (a) და <i>A. globiformis</i> 151B (b) მიერ 50 მგ/ლ Zn(II)-ის თანაობისას	67
გრაფიკი 8: Cr(VI)-ის და Zn(II) კონცენტრაციის გავლენა <i>Arthrobacter sp.</i> 61B და <i>A. globiformis</i> 151B - ზრდაზე 50 მგ/ლ Zn(II)-ის და 100 მგ/ლ Cr(VI)-ის თანაობისას	68
გრაფიკი 9: თუთიის აკუმულირება <i>Arthrobacter sp.</i> 61B და <i>A. Globiformis</i> 151 B მიერ 100 მგ/ლ Cr(VI)-ის თანაობისას	69
გრაფიკი 10: Zn(II)-ის გავლენა Cr(V)-ის და Cr(III)-ის ნაერთების წარმოქმნაზე	71
გრაფიკი 11: K, Cr (III), Cr, Fe და Mg-ის შეთვისება <i>A. oxydans</i> -ის მიერ	74
გრაფიკი 12: Cr(VI) -ის უარყოფით გავლენა <i>A. oxydans</i> - ის მიერ K-ის შეთვისების დინამიკაზე	75
გრაფიკი 13: მეტალური იონების მოქმედების გავლენა <i>A. oxydans</i> -ის ზრდაზე (Co-metal ions action)	76
გრაფიკი 14: მძიმე მეტალების ნარევის აკუმულაცია <i>A. globiformis</i> 151B-ს უჯრედებში Cr(VI)-ის თანაობისას	77
გრაფიკი 16: მძიმე მეტალების აკუმულაცია <i>Arthrobacter sp</i> 61B-ს უჯრედებში Cr(VI)-ის თანაობისას	78

ილუსტრაციების ჩამონათვალი

ილუსტრაცია 1: <i>Arthrobacter</i> -ის უჯრედები ზრდის ექსპონენციალურ და სტაციონარულ ფაზებში	33
ილუსტრაცია 2: გრამ-დადებითი ბაქტერიის უჯრედის კედელი	34
ილუსტრაცია 3: <i>Arthrobacter</i> -ის უჯრედები პეტრის ფინჯანზე	36
ილუსტრაცია 4: <i>A. oxydans</i> -ის უჯრედები ზრდის ექსპონენციალურ და სტაციონარულ ფაზებში	37
ილუსტრაცია 5: ელექტრული და მაგნიტური ველები მართკუთხა რეზონატორში	45
ილუსტრაცია 6: ატომის გადასვლის სქემა ერთი ენერგეტიკული დონიდან მეორეზე	47
ილუსტრაცია 7: აას სპექტრომეტრის სქემა	49
ილუსტრაცია 8: აას გაზომვის პროცესის სქემა	49
ილუსტრაცია 9: <i>A. globiformis</i> საკონტროლო უჯრედებიდან გამოყოფილი პლაზმიდური დნმ	79
ილუსტრაცია 10: <i>A. globiformis</i> პლაზმიდური და გენომური დნმ-ის რესტრიქციული პროფილების ნაწილობრივი დახასიათება	80
ილუსტრაცია 11: Cr(VI) -ის კონცენტრაციის, Cr(VI) -თან დაყოვნების დროის და Cr(VI) -ის დამატების დროს გავლენა <i>A. Globiformis</i> 151B-ს პლაზმიდაზე	81
ილუსტრაცია 12: ქრომის კონცენტრაციის გავლენა <i>A. globiformis</i> 151B -ს გენომურ დნმ-ზე	82

აბრევიატურების ჩამონათვალი

A. oxydans – *Arthrobacter oxydans*;

ESR (ეპრ), Electron Spin Resonance (ელექტრონული პარამაგნიტური რეზონანსი)

AAS (ასს), Atomic Absorbtion Spectroscopy (ატომურ აბსორბციული სპექტროსკოპია)

bp, ნუკლეოტიდურ ფუძეთა წყვილი (base pair);

kb, (kilobase) დნმ, რნმ-ის, ფრაგმენტის სიგრძის ერთეული, რომელიც შეესაბამება

1000 ნუკლეოტიდურ ფუძეთა წყვილს (ორჯაჭვიანი დნმ, რნმ-ის შემთხვევაში);

ppm, (part per million)- მემილიონედი ნაწილი ($1 \cdot 10^{-6}$)

შესავალი

უკანასკნელი ათწლეულების განმავლობაში მსოფლიოს მთელ რიგ ქვეყნებში ანთროპოგენური ზემოქმედების შედეგად ძლიერ შეიცვალა ეკოლოგიური მდგომარეობა: გაიზარდა მძიმე მეტალებით გარემოს დაბინძურების ხარისხი, რაც დღემდე ჯერ კიდევ რჩება მსოფლიოს ერთ-ერთ უმწვავეს პრობლემად. მეტალების ჭარბი კონცენტრაციები ცოცხალ ორგანიზმებზე ავლენენ ტოქსიკურ და კანცეროგენულ ეფექტს. განსხვავებით ორგანული ტოქსიკანტების უმრავლესობისაგან, შეუძლებელია დეგრადაციის გზით მეტალების იონების გაუვნებელყოფა, ამიტომ ძალზედ მნიშვნელოვანია იმ ტექნოლოგიების დამუშავება, რომელთა საშუალებითაც შესაძლებელია განხორციელდეს გარემოდან ტოქსიკური მეტალების მოშორება. მეტალებით დაბინძურებული გარემოს რეაბილიტაციის ყველაზე პერსპექტიული მეთოდების რიცხვს მიეკუთვნება სხვადასხვა მიკროორგანიზმის გამოყენებაზე დაფუძნებული ბიოლოგიური ტექნოლოგიები.

1987-დან 1993 წლამდე 7 წლის განმავლობაში მთლიანი Cr-ით დაბინძურებამ (როგორც Cr(III), ასევე Cr(VI)-ით) შეადგინა 200 მილიონი ფუნტი, რომელიც ორგანული და ქიმიური პროდუქციის მრეწველობის შედეგად მოხვდა მიწაში და წყალში (126). Cr(VI)-ის ასეთი რაოდენობით ჩადინებამ გამოიწვია სერიოზული ეკოლოგიური პრობლემა. ბლექსმიტის ინსტიტუტის (Blacksmith Institute NY) 2010 წლის ანგარიშში მსოფლიოს მწვავე დამაბინძურებლების სიაში ქრომი შესულია ტოქსიკური საფრთხის ტოპ- ექვსეულში, სადაც მას მესამე ადგილი უკავია ტყვიის და ვერცხლისწყლის შემდეგ. ქრომი საფრთხეს უქმნის 10 მილიონზე მეტ ადამიანს. ტოქსიკური ქრომი შეიძლება არსებობდეს ჰაერში, წყალში, ნიადაგში, საკვებში და შეუძლია გამოიწვიოს გასტროინტესტინალური, რესპირაციული, იმუნოლოგიური, რეპროდუქტიული, დერმატიტული, კანცეროგენული თუ სხვა სასიცოცხლო პრობლემები (3). საქართველოში ყველაზე დაბინძურებული გარემო კაზრეთის რაიონია. აქ არის სპილენძის-დისულფიდის და სპილენძი-თუთიის (Cu, Fe, Cr, C, Ni, Mo, Mn, Zn, Cd), ბარიტი-პოლიმეტალის (Pb, Zn, Cd, Ba) და ოქროს (Au, Ag, Hg) საბადოები. მდინარე

მაშვერაში, რომელიც რეგიონში მოედება, მძიმე მეტალების პროცენტული შემცველობა დასაშვებზე მეტია. ეს მხედველობაშია მისაღები რადგან მდინარე მაშვერას მოწამლული წყალი უერთდება მდინარე ხრამს, რომელიც უერთდება მტკვარს. ეს განგაშის მიზეზია, რადგან ამ მდინარეების წყლით ხდება სასოფლო მიწების მორწყვა და ამ მიწებზე მოყვანილი პროდუქტი ვრცელდება მთელ საქართველოში. თუ მოვლენები ასე განვითარდება საქართველო ეკოლოგიური კატასტროფის წინ აღმოჩნდება. გარემოში დიდი რაოდენობით Cr(VI)-ის მოხვედრის შემდეგ, Cr-ის ბუნებრივი გარდაქმნის (აღდგენის) ციკლი ირღვევა. Cr(VI)-ით დაბინძურებული გარემოს აღსადგენად მრავალი მეთოდი იქნა შემუშავებული. ბევრი მათგანი აქტიურად შეისწავლება გარემოს რემედიაციის შესაძლო მეთოდებად გამოსაყენებლად. აუცილებელია დამუშავებულ იქნას დაბინძურებული გარემოს აღდგენის ეფექტური, ეკოლოგიურად უსაფრთხო და იაფი მეთოდები.

მძიმე მეტალებიან გარემოში არსებობისას, მრავალმა მიკროორგანიზმმა განივითარა სხვადასხვა მექანიზმი მათი ტოქსიკური ზეგავლენისაგან თავის დასაცავად (82, 83, 84). Cr(VI)-ის მიკრობული აღდგენა არის მძიმე მეტალების მიმართ ბაქტერიული რეზისტენტობის ერთერთი მაგალითი (90). ავტორების მიერ განხილული იქნა მეტალების მიმართ ბაქტერიების რეზისტენტობის სხვადასხვაგვარი მექანიზმები (103, 107, 112). მეტალ-რეზისტენტული ბაქტერიების მეტალების ზემოქმედებისგან თავდაცვის აღნიშნული პოტენციალი, შეიძლება წარმატებით იქნას გამოყენებული მეტალებით დაბინძურებული გარემოს აღსადგენად.

ნაშრომი ეძღვნება *Arthrobacter*-ის სახეობის ბაქტერიების კვლევას. ართრობაქტერიები ჩვეულებრივ არიან ნიადაგის ბაქტერიები, მათ გააჩნიათ გარემოს აღდგენის დიდი პოტენციალი (72, 115, 139), აქვთ განსაკუთრებული უნარი გარდაქმნან არომატული ნაერთები და ჰუმუსის ნივთიერებები (72,139). ართრობაქტერიების უმრავლესობა რეზისტენტულია მძიმე მეტალების მიმართ (115). ჩვენი კვლევის მიზანი იყო შეგვეფასებინა საქართველოს დაბინძურებული რეგიონიდან გამოყოფილი *Arthrobacter*-ის სახეობის ბაქტერიების პოტენციალი ტოქსიკური Cr(VI) -ის აღდგენაზე

Zn(II)-ის და სხვა იონების თანაარსებობისას. ჩვენს მიერ გამოკვლეული იქნა *Arthrobacter*-ის სამი შტამის ბიორემედიაციული პოტენციალი აას და ეპრ მეთოდების გამოყენებით, რათა შემდგომში მოხერხდეს აღნიშნული ბაქტერიების გამოყენებაზე დაფუძნებული, ქრომით დაბინძურებული გარემოს აღდგენის მეთოდების შემუშავება. საკვლევ შტამებს წარმოადგენდა: კოლუმბიის ბაზალტის ქანებიდან გამოყოფილი *Arthrobacter oxydans* და მძიმე მეტალებით დაბინძურებული კაზრეთის რეგიონიდან გამოყოფილი *Arthrobacter globiformis* 151B და *Arthrobacter sp.* 61B. დღემდე არ არის ჩატარებული Cr(VI)-ის აღმდგენ ბაქტერიაში Cr(V)-ის ფორმირების შესწავლა, სხვა მძიმე მეტალების იონების თანაობისას. ასევე, მხოლოდ რამოდენიმე ლაბორატორიულად ჩატარებული კვლევა არსებობს მიკროორგანიზმების პასუხზე ქრომით გამოწვეული სტრესის მიმართ სხვა მეტალური იონების თანაარსებობის ფონზე (43,51,75).

დასახული მიზნის მისაღწევად ჩვენ დავგეგმეთ შემდეგი ამოცანები:

1. *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter globiformis* 151B და *Arthrobacter sp.* 61B-ის მიერ ქრომის აღდგენითუნარიანობის დადგენა;
2. ქრომის აღდგენის პროცესის ლოკალიზაციის დადგენა ბაქტერიულ უჯრედში;
3. სხვადასხვა მეტალების და მეტალური სისტემების გავლენის შესწავლა ბაქტერიების მიერ ექსცვალენტური ქრომის შეთვისების პროცესზე;
4. Cr(VI)-ის სხვადასხვა კონცენტრაციების შეთვისების უნარის შესწავლა აღნიშნული ბაქტერიების მიერ Zn(II)-ის თანაობისას;
5. Cr(V)-ის და Cr(III)-ის კომპლექსების ფორმირების დინამიკაზე დაკვირვება *Arthrobacter*- Cr(VI)- სისტემაში, Zn(II)- იონების არსებობისას. აღნ. მიზნების მართებულობა დასტურდება ბუნებრივი გარემოს დაბინძურებულ ტერიტორიებზე როგორც წესი Zn და Cr- ის თანაარსებობით.
6. კალიუმის იონების გავლენა ბაქტერიის მიერ ქრომის შეთვისების პროცესზე;
7. ქრომის გავლენის შესწავლა ბაქტერიის პლაზმიდურ დნმ-ზე;

აღნიშნულ ნაშრომში ჩატარებული კლევებით ვაჩვენეთ, რომ აშშ-სა და საქართველოს ყველაზე დაბინძურებული რეგიონების ბაზალტის ქანების ნიმუშიდან იზოლირებული ართრობაქტერიის გვარის გრამ-დადებით ბაქტერიულ შტამებს შეუძლიათ აერობულ პირობებში მაღალი ეფექტურობით აღადგინონ Cr(VI) და მისი დეტოქსიკაცია მოახდინონ (100, 120, 123, 145).

სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა

თავი 1. მიკრობული მდგრადობა მძიმე მეტალების მიმართ;

1.1 ბაქტერია-მეტალის ურთიერთქმედების მექანიზმები

მეტალები უმნიშვნელოვანეს როლს ასრულებენ მიკროორგანიზმებისა თუ სხვა ცოცხალ ორგანიზმებში მიმდინარე სასიცოცხლო პროცესებში. ზოგიერთი მათგანი, მაგ. კალციუმი, კობალტი, ქრომი, სპილენძი, რკინა, კალიუმი, მაგნიუმი, მანგანუმი, ნატრიუმი, ნიკელი და ცინკი მიეკუთვნებიან სასიცოცხლოდ საჭირო ელემენტებს. სხვა მეტალებს, როგორებიც არიან ვერცხლი, ალუმინი, კადმიუმი, ოქრო, ტყვია და ვერცხლისწყალი, დღევანდელი მონაცემებით არ გააჩნიათ ბიოლოგიური მნიშვნელობა და არ წარმოადგენენ სასიცოცხლო მნიშვნელობის ელემენტებს. სასიცოცხლოდ აუცილებელი ელემენტები ცოცხალ ორგანიზმებში მოქმედებენ როგორც მრავალი ბიოქიმიური პროცესის კატალიზატორები, არიან მრავალი მნიშვნელოვანი ცილოვანი მოლეკულის თუ ბაქტერიული უჯრედის კედლის და სტრუქტურის მასტაბილიზებელი, ემსახურებიან ოსმოსური წონასწორობის შენარჩუნებას და სხვ (50, 55) სასიცოცხლოდ მნიშვნელოვანი გარდამავალი მეტალები მაგ. რკინა, სპილენძი და ნიკელი მონაწილეობენ ჟანგვა-აღდგენით პროცესებში, მაგნიუმი და თუთია ასტაბილიზებენ ცილებისა და დნმ-ის მოლეკულებს ელექტროსტატიკური ძალებით. რკინა, მაგნიუმი, ნიკელი და კობალტი არიან ერთდროულად მრავალი ფუნქციის მქონე ელემენტები. მეტალები დიდი კონცენტრაციებით როგორც მიკროორგანიზმებისთვის, ასევე სხვა ცოცხალი ორგანიზმებისთვის არიან ტოქსიკური. ზოგიერთი ტოქსიკური მეტალის კათიონი, მაგ. $Hg(II)$, $Cd(II)$ და $Ag(I)$ არიან ტოქსიკური ნაერთების წინამორბედები, რაც ნებისმიერი ბიოლოგიური სისტემის ფუნქციონირებისთვის ზიანის მომტანია. თვით ისეთი მნიშვნელოვანი საჭირო ელემენტები როგორებიცაა $Zn(II)$, $Ni(II)$ და განსაკუთრებით $Cu(II)$, მაღალი კონცენტრაციებით უკვე ტოქსიკურ

ეფექტს ავლენენ ცოცხალ ორგანიზმებზე. ტოქსიკურობა გამოწვეულია სხვა სიცოცხლისათვის აუცილებელი ელემენტების ნატიურ უბანთან ტოქსიკური ელემენტის დაკავშირებით/ჩანაცვლებით. ანდა მათი ლიგანდებთან ურთიერთქმედებით. შედარებით დიდი ატომური რიცხვის მქონე მძიმე მეტალები, უჯრედის შიგნით უკავშირდებიან SH ჯგუფებს, მაგ. Hg^{2+} , Cd^{2+} და Ag^+ SH ჯგუფებთან დაკავშირებით მეტალები აინჰიბირებენ სხვადასხვა სენსიტიური ცილის აქტივობას. შესაძლოა სხვა მეტალის კათიონებმა იმოქმედონ მსგავსი მუხტის მქონე საჭირო კათიონების ნაცვლად, მაგ. Cd^{2+} -მა Zn^{2+} -ის ან Ca^{2+} -ის ნაცვლად; Ni^{2+} -მა და Co^{2+} -მა Fe^{2+} -ის ნაცვლად, Zn^{2+} -მა Mg^{2+} -ის ნაცვლად და ამგვარად გამოიწვიონ ფიზიოლოგიური კათიონის ფუნქციის ინჰიბირება. აღნიშნული მოვლენით გამოწვეული საბოლოო ტოქსიკური ეფექტი ვლინდება ნუკლეინის მჟავების და ცილების კონფორმაციული ცვლილებებით, ჟანგვითი ფოსფორილირების და ოსმოსური ბალანსის დარღვევით (94). ამგვარად მძიმე მეტალების უჯრედშიდა კონცენტრაცია მკაცრად კონტროლირებადია. ფიზიოლოგიური ანდა ტოქსიკური ეფექტის გამოსავლენად, მეტალი თავდაპირველად უნდა მოხვდეს უჯრედის შიგნით. არსებობს მეტალური იონების უჯრედში შესვლის ორი გზა: პირველი, სწრაფი, არასპეციფიური და ძირითადად მხოლოდ ბაქტერიის მემბრანის სხვადასხვა მხარეს აღძრული ქემიოსმოსური გრადიენტით განპირობებული და მეორე – ენერგიის ხარჯვით მიმდინარე (ხშირ შემთხვევებში ენერგიის წყაროდ იყენებს ატფ-ის ჰიდროლიზის ენერგიას, დამატებით ქემიოსმოსურ გრადიენტთან ერთად), სუბსტრატ სპეციფიური და შედარებით ნელი. აღნიშნული სატრანსპორტო სისტემა არის ინდუცირებადი, რომელიც ამუშავდება უჯრედის მიერ საჭიროების შემთხვევაში, განსაზღვრული მეტალური იონით „მიმშლის“, ან სხვა რაიმე სპეციფიური მეტაბოლური სიტუაციის დროს (84).

გარემოში, მეტალურ იონები ვერ დეგრადირდებიან, ისე როგორც ეს ტოქსიკური ორგანულ ნაერთების შემთხვევაშია შესაძლებელი. მძიმე მეტალებიან გარემოში არსებობისას, მიკროორგანიზმებმა განივითარეს სხვადასხვა მექანიზმი მეტალების ტოქსიკური ზემოქმედებისაგან თავის დასაცავად (82, 83). მიკროორგანიზმებში მეტალების რეზისტენტულობის ხარისხს მრავალი ფაქტორი განსაზღვრავს. მათ

შორისაა უჯრედებში მეტალების შეღწევის გზების ხასიათი და რაოდენობა, მეტალის როლი უჯრედის მეტაბოლიზმში და ასევე პლაზმიდებზე, ქრომოსომებსა თუ ტრანსპოზონებზე ლოკალიზებული გენების არსებობა (93, 87). დღეისათვის ცნობილია მეტალების მიმართ ბაქტერიების რეზისტენტულობის შემდეგი მექანიზმები: 1) ცვლილებები ბაქტერიის უჯრედის მემბრანაზე, კედელში ან გარსზე, რის შედეგადაც იზრდება მეტალების იონების უჯრედში შეღწევადობის ბარიერი; 2) მეტალების იონების სეკვესტრი უჯრედის შიგნით და გარეთ; 3) გამოდევნა უჯრედიდან სატრანსპორტო მექანიზმების საშუალებით (აქტიური ტრანსპორტი); 4) ენზიმური დეტოქსიკაცია და 5) უჯრედული სამიზნეების მგრძნობიარობის შესუსტება (103, 107, 112).

1.2 ქრომი

ქრომი (Cr) პირველად აღმოჩენილი იქნა ფრანგი ქიმიკოსი, ვაკულინის მიერ 1798 წელს (66). იგი არის პერიოდული სისტემის VI ჯგუფის გარდამავალი მეტალი და დედამიწის ქერქში ყველაზე გავრცელებულ მეტალებს შორის უკავია 21-ე ადგილი (9). კლდის ქანებში იგი წარმოდგენილია 4-დან 90 მგ/კგ-მდე რაოდენობით, ნიადაგში დაახლ. 70 მგ/კგ, სუფთა წყალში 1მკგ/კგ, ზღვის წყლებში 0,3 მკგ/კგ-ზე (16). Cr არის მბზინავი ფოლადისფერი, მტკიცე მეტალი. მისი ამ თვისებებისა და კოროზიისადმი მდგრადობის გამო (1) დიდია მისი გამოყენება მრავალ ინდუსტრიულ პროცესში, როგორიცაა უჟანგავი ფოლადის წარმოება, მოქრომვა, ტყავის თრიმვლა თუ ხის დამუშავება, სხვადასხვა საწარმოო საღებავების თუ პიგმენტების წარმოება (87, 89). აშშ-ში მისი გამოყენების მიხედვით იგი ერთერთი ყველაზე მნიშვნელოვანი, სტრატეგიული ლითონია. 2012 წელს აშშ-ზე მოვიდა მსოფლიოში წარმოებული ქრომის 6%-ის მოხმარება, რომლის ღირებულებაც შეადგენს დაახლ. 1,100 მილიონ აშშ დოლარს. ქრომის ძირითადი მწარმოებლები არიან სამხრეთ აფრიკის რესპუბლიკა 34 %, ყაზახეთი 17%, რუსეთი 10%, მექსიკა 5% და სხვა 34% (125).

ქრომს გააჩნია რამოდენიმე ჟანგვითი საფეხური -2 დან +6 ჩათვლით, თუმცა გეომიკრობულ- ბუნებრივ პირობებში ჩვეულებრივ იგი გვხვდება +3 და +6 ჟანგვით მდგომარეობებში. ექვსვალენტიანი ქრომი არის საკმაოდ ტოქსიკური ფიზიოლოგიურ pH-ზე მისი მაღალი ხსნადობის გამო, როგორც ქრომატის (CrO_4^{2-}) ასევე დიქრომატის ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) სახით. +3 დაჟანგვის საფეხურზე მყოფი ქრომი ნაკლებად ტოქსიკურია ფიზიოლოგიურ pH-ზე. ნეიტრალურ pH-ზე კი Cr^{+3} მიდრეკილია გამოილექვისაქვენ, როგორც ჰიდროქსიდი $[\text{Cr}(\text{OH})_3]$ ან ჰიდრატირებული ოქსიდი. ქრომატიც და დიქრომატიც არიან ძლიერი დამჟანგავი აგენტები. ქრომი ამავე დროს მოხსენიებულია როგორც საკვებად აუცილებელი ელემენტი, კვალური კონცენტრაციებით (140). ქრომი ბუნებრივად მინერალების სახით არსებობს ძირითადად: ესკოლიტების (Cr_2O_3), დაუბრელტის ($\text{FeS} \cdot \text{Cr}_2\text{S}_3$), ქროკოიტის (PbCrO_4), უვაროვიტის – იგივე გარნეტის $[\text{Ca}_3\text{Cr}_2(\text{SiO}_4)_3]$ და სხვ. სახით (117). იგი ასევე ფართოდ არის გავრცელებული ჰაერში და ბიოტაში.

სამვალენტიანი ქრომი $[\text{Cr}(\text{III})]$ არის საკმაოდ სტაბილური ფორმა და ბუნებრივად შეიძლება არსებობდეს ცხოველებში, მცენარეებში, ასევე კლდის ქანებში და ნიადაგში. მაშინ, როდესაც ძლიერ ტოქსიკური $\text{Cr}(\text{VI})$ ძირითადად ანთროპოგენური აქტივობების შედეგად ხვდება ბუნებაში (3). ბუნებაში ქრომი ნაწარმოებს ქრომიტების სახით: ქრომიტის მადანი ($\text{FeO} \cdot \text{Cr}_2\text{O}_3$) (128). იგი არის უხსნადი (21) და ძირითადად არატოქსიკური. ძუძუმწოვრებისთვის $\text{Cr}(\text{III})$ არის აუცილებელი ელემენტი, რომელიც მონაწილეობს გლუკოზის და ნახშირწყლების მეტაბოლიზმში (78, 130, 140). $\text{Cr}(\text{III})$ -ის დაჟანგვისას წარმოქმნილი ექვსვალენტიანი ქრომი $[\text{Cr}(\text{VI})]$, წარმოქმნის ოქსიანიონებს: CrO_4^{2-} და $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ნეიტრალურ pH-ზე. ეს ფორმები არიან მეტად ხსნადი CrO_4 629 გ/ლ და Cr_2O_7 49 გ/ლ კონცენტრაციებით და ასევე მობილურები გრუნტის წყალში (31). $\text{Cr}(\text{VI})$ ის გარემოში მოხვედრა სხვადასხვა ინდუსტრიული პროცესების შედეგია (62, 88). მსოფლიოს მწვავე დამაბინძურებლების სიაში იგი შესულია ტოქსიკური საფრთხის ტოპ- ექვსეულში, სადაც მას მესამე ადგილი უკავია ტყვიის და ვერცხლისწყლის შემდეგ. ქრომს თავისი ტოქსიკურობით მე-4, მე-5 და მე-6 ადგილით მოჰყვებიან დარიშხანი, პესტიციდები და რადიონუკლიდები (3). ადამიანებზე ზემოქმედების დროს, $\text{Cr}(\text{VI})$ განჰოლავს

ეუკარიოტულ მემბრანას სულფატური სატრანსპორტო სისტემებით (5, 86, 90). ქრომი $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$, K_2CrO_4 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_4$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ აღნიშნული ნაერთების სახით ავლენს ინჰიბიტორულ ეფექტს ბაქტერიების ზრდაზე, განსაზღვრული კონცენტრაციებით (15, 35, 136). როდესაც იგი მოხვდება უჯრედში, Cr(VI) მოქმედებს, როგორც მუტაგენი პროკარიოტებშიც და ეუკარიოტებშიც და როგორც კანცეროგენი ცხოველებში (27,42). გამოვლენილია, რომ რიგ ბაქტერიებს აქვს უნარი აღადგინოს Cr(VI) აერობულ თუ ანაერობულ პირობებში. ეს უმეტეს შემთხვევაში მიმდინარეობს ბაქტერიების სუნთქვის პროცესში, სადაც უამრავი ორგანული ელექტრონული დონორი ღებულობს მონაწილეობას. ბაქტერიების მიერ ქრომის აღდგენის უნარი ყოველთვის არ არის კორელაციაში მათი ქრომის მიმართ ტოლერანტობასთან.

გარემოს დაცვის სამინისტრო სასმელ წყალში ასახელებს Cr(VI) -ის ზღვრულად დასაშვებ კონცენტრაციას 0.1 ppm-ს (127). 0,5 მგ/ლ-ია სასოფლო სამეურნეო წყალმომარაგებისთვის ქრომის ზღვრულად დასაშვები კონცენტრაცია (144). Cr(VI) -ის ნაერთები ცნობილია, როგორც მეტად ტოქსიკური (137) იწვევენ რა ცხვირის ლორწოვანის პერფორაციას, კანის, თირკმელების, დაზიანებას და კიბოს. (66). Cr(VI) -ის ეუკარიოტულ უჯრედში ტრანსპორტირების შემდეგ, იგი აღდგება Cr(III) -ად გლუტათიონით [GSH], ასკორბინის მჟავით ან ციტრატით (34, 73, 113, 131, 138). აღდგენის პროცესის შედეგად გამოთავისუფლდება ჟანგბადის რეაქტიული ფორმა რამაც შეიძლება გამოიწვიოს Cr(III) -ის მრავალი ჯვარედინი კავშირები დნმ-დნმ-ს შორის, დნმ-პეპტიდის ანდა დნმ-ამინომჟავის კავშირების წარმოქმნა (34, 73, 113, 131, 138). ზუსტად ეს კავშირები უდევს საფუძვლად Cr(VI) -ის კანცეროგენულ ეფექტს. პროკარიოტებში Cr(VI) -ის ციტოპლაზმაში ტრანსპორტი მიმდინარეობს სულფატური სატრანსპორტო გზებით (57, 60, 90). Cr(VI) -ის რაოდენობა 10-დან 12ppm-მდე ავლენს ინჰიბიტორულ ეფექტს ნიადაგის ბაქტერიების უმრავლესობის მიმართ, მაშინ როდესაც Cr(III) აღნიშნული თვისებით არ გამოირჩევა.

თავი 2. *In situ* ბიორემედიაციის მეთოდები.

არსებობს დაბინძურებული გარემოს გასუფთავების მრავალი მეთოდი: ქიმიური გასუფთავება, რაც თავდაპირველად მოითხოვს დაბინძურებული გარემოს ექსკავაცია - ამოტუმბვას, რასაც ემატება აღმდგენი რეაგენტის დამატება, გამოლექვის წარმართვა და დაბინძურებული მეტალის გამოცალკევება (46). აღნიშნული მეთოდი არის ძვირადღირებული: საჭიროებს ნიადაგიდან მეთოდის მეორადი ნარჩენების დამატებით მოცილებას. ეს ყოველივე დამატებით ქიმიურ რეაქტივებთან და ენერგიასთან არის დაკავშირებული. მეტალებისგან გარემოს გასასუფთავებლად ასევე გამოიყენება მეთოდები როგორიცაა *in situ* აღდგენითი მანიპულაციები, აღმდგენის პირდაპირი ინჟექციით დაბინძურებული გარემოს სუბ ზედაპირზე (126), ელექტროდიალიზური მოცილება (101), სპეციალურ მასალებზე Cr(VI)-ის სორბციით (63) თუ ბიოსორბციით (141). დაბინძურებული გარემოს ადგილზე (*In situ*) რეაბილიტაციის სამი ძირითადი მეთოდი არსებობს: ბუნებრივი ბიორემედიაცია (ბუნებრივი გასუფთავება), ბიოგამდიდრება და ბიოსტიმულაცია. ბუნებრივი ბიორემედიაცია ზოგჯერ არსებით როლს თამაშობს. მაგალითად, როგორც ცნობილია, გასულ საუკუნეში ნიადაგის ზედა ფენებში მოხვედრილ დამბინძურებელთა დიდი ნაწილი დღეისათვის უკვე აღარ არსებობს, გარემოში მიმდინარე ბუნებრივი ბიოლოგიური პროცესების მეშვეობით მოხდა მათი ბუნებრივი გაუვნებელყოფა ადამიანების ჩარევის გარეშე. ასევეა შესაძლებელი მძიმე მეტალების დეტოქსიკაცია, მათი აღდგენილი ფორმის კვლავ ბიომასაში მოხვედრის გზით სხვადასხვა მიკროორგანიზმების გამოყენებაზე დაფუძნებული მეთოდებით. ბიოგამდიდრება ეს არის გარემოში მიკრობების გამიზნული ინჟექცია, რათა უფრო ინტენსიურად მოხდეს კონკრეტული დამბინძურებელის გაუვნებელყოფა. ბიოგამდიდრება პრაქტიკაში ხშირად არ გამოიყენება, თუმცა მისი ეფექტურობა წარმატებით იქნა ნაჩვენები ორგანული დამბინძურებლების დეგრადაციის შემთხვევაში. ბიოსტიმულაციაში იგულისხმება მიკროორგანიზმების ადგილობრივი პოპულაციების სტიმულაცია, რათა მათ

იმოქმედონ კონკრეტულ ქიმიურ ნივთიერებებზე და აღადგინონ ისინი. ხშირ შემთხვევაში ეს გულისხმობს ჟანგბადის, ელექტონების დონორების, ელექტრონების აქცეპტორების, ან არაორგანული ნივთიერებების (მაგ. C, N) დამატებას. ბიოსტიმულაციის მაგალითები მრავალრიცხოვანია (44, 45).

თავი 3. მიკრობული რეზისტენტობა Cr(VI)-ის მიმართ

დღეისათვის ქრომ-რეზისტენტობის გენეტიკური მექანიზმი და გენომიკური ბაზისი მხოლოდ რამოდენიმე ბაქტერიული შტამისთვის არის ცნობილი. რეზისტენტობის ერთერთი მექანიზმი Cr(VI)-ის მიკრობული აღდგენის მაგალითზე პირველად აღწერილ იქნა *Ohtake et al.* მიერ: ბაქტერიული უჯრედი ამცირებდა Cr(VI)-ის ტრანსპორტს უჯრედის შიგნით (90). მოგვიანებით განიხილებოდა რომ არსებობს ქრომის გამოტყორცნის საქაჩი ტუმბო, ChrA (2, 14, 22, 93). ChrA საქაჩი ტუმბოები შედგებიან 400 ამინო მჟავისგან, რომლებიც წარმოქმნიან 10 ტრანსმემბრანულ α -ჰელიკალურ სეგმენტს (85). გამოქაჩვის ტუმბოები ენერგია დამოკიდებული ტრანსლოკაციით გამოათავისუფლებენ Cr(VI)-ის ოქსიანიონებს ციტოპლაზმის გარეთ (85). ChrA ცილები კოდირდებიან როგორც პლაზმიდური, ასევე გენომური დნმ-ის მიერ (93) და წარმოდგენილი არიან როგორც გრამ დადებით ასევე გრამ უარყოფით ბაქტერიულ უჯრედებში (85). ქრომის ფიზიკურ-ქიმიური აღდგენა, მისი ბიოგეოქიმიური ციკლი მოიცავს მის გარდაქმნას +6 დან +3 ფორმამდე. Cr(VI) ნიადაგში აღდგება Cr(III)-ად არაორგანული თუ ორგანული ელექტრონული დონორების საშუალებით სანამ ნიადაგში არ მოხდება საკმაოდ ინერტული სამვალენტო ქრომის ჰიდროქსიდის გამოლექვა (10). გარემოში დიდი რაოდენობით Cr(VI)-ის მოხვედრის შემდეგ, რაც ინდუსტრიული დაბინძურების შედეგად არის გამოწვეული, Cr-ის ბუნებრივი გარდაქმნის (აღდგენის) ციკლი ირღვევა. სხვადასხვა ინდუსტრიული პროცესებიდან გამომდინარე Cr(VI)-ით დაბინძურებული გარემოს აღსადგენად

მრავალი მეთოდი იქნა შემუშავებული. მრავალი გვარის ბაქტერიას (მაგ. *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Desulfovibrio*, *Bacillus sp.*) გააჩნია უნარი აღადგინოს Cr(VI) (24). აღმოჩნდა, რომ ქრომის ტოქსიკური ზემოქმედებისაგან თავდასაცავად ბაქტერიები იყენებენ რეზისტენტულობის ყველა შესაძლო მექანიზმს. ამასთან, თავდაპირველად დადგენილ იქნა Cr(VI)-ის აღდგენის ენზიმური მექანიზმები სხვადასხვა ტიპის ბაქტერიის შემთხვევაში (15). ზოგიერთ ბაქტერიაში (*Bacillus sp.* და *E.coli* ATCC33456) Cr(VI)-ის ენზიმურ (ფერმენტულ) აღდგენას განსაზღვრავს ცილების ხსნადი სახე, ხოლო სხვა ტიპის ბაქტერიებში (*Enterobacter* და *Ps. Fluorescens*) Cr(VI)-ის აღდგენა დაკავშირებულია მემბრანასთან ბმულ ცილასთან. CrO_4^{2-} -ის აღდგენა Cr(OH)_3 -ად *P.Fluorescens* LB300 და *Enterobacter cloacae* მიერ დაკავშირებულია სუნთქვის მეტაბოლიზმთან (51). მოგვიანებით შესწავლილ იქნა, რომ ზოგიერთ ბაქტერიულ შტამში ქრომის მიმართ მდგრადობა დაკავშირებულია უჯრედიდან ქრომის იონების გამოდევნის პროცესთან (83). მოგვიანებით მიღებული მონაცემების თანახმად, ზოგიერთი ბაქტერია (*A.eutropu*) ქრომის ტოქსიკური ზემოქმედებისაგან თავს იცავს ერთდროულად ორივე ზემოდხსენებული მექანიზმის გამოყენებით. თავდაცვის ამ მექანიზმების გარდა ბევრ ბაქტერიაში გამოიყენება ე.წ. სეკვესტრის მექანიზმებიც, როდესაც უჯრედში ენერგეტიკული სატრანსპორტო სისტემით მოხვედრილი Cr(VI) ურთიერთქმედებს უჯრედის შიდა აღმდგენ ისეთ რეაგენტებთან, როგორიცაა სულფჰიდრილური ჯგუფები (*P.ambigua*). ზოგიერთ შემთხვევაში (*Thiobacillus Ferrooxidans*) Cr(VI)-ის აღდგენას განაპირობებს ქრომის ურთიერთქმედება უჯრედიდან გამოყოფილ მეტაბოლიტებთან. სხვა შემთხვევებში ბაქტერიები მოიხმარენ შაქრებს, გლუკოზას ან საქაროზას, როგორც ნახშირბადისა და ენერგიის წყაროს, რათა ხელი შეუწყონ Cr(VI)-ის აღდგენას (*Pseudomonas Fluorescens*) (65). აღმოჩნდა, რომ ბაქტერიებში Cr-რეზისტენტობა ძირითადად დაკავშირებულია პლაზმიდებთან, თუმცა შეიძლება ის ასოცირდებოდეს ქრომოსომასთან ან დაკავშირებული იყოს ორივესთან. ამასთან, შეიძლება მობილურმა ელემენტმა მიანიჭოს Cr-რეზისტენტობა. Cr-რეზისტენტობაში მონაწილე გენები ChrA და ChrB აღწერილია *Pseudomonas aureginosa*-ში და *Raltsonia metallidurans*-ში. ChrA ცილა პასუხისმგებელია ქრომის უჯრედიდან გამოტყორცნის

მექანიზმზე, ხოლო *ChrB* არის *ChrA*-ს ტრანსკრიფციული რეგულატორი. პოტენციური *ChrA* გენები აღმოჩენილია მრავალი ბაქტერიის ქრომოსომაში და პლაზმიდაში, *ChrB* გენები არაა დიდად გავრცელებული. ბაქტერია *Ochrobactrum tritici* 5bv11 ავლენს რეზისტენტობას ქრომის მაღალი კონცენტრაციების მიმართ, ინდუცირებადი ქრომ-რეზისტენტული დეტერმინანტის ექსპრესიის საშუალებით. აღნიშნული დეტერმინანტი ნანახია მობილურ ელემენტში (*TnOtChr*), რომელიც შეიცავს *chrB*, *chrA*, *chrC* და *ChrF* გენებს. *TnOtChr*-ში წარმოდგენილი *chr* ოპერონის რეგულაცია კონტროლდება ტრანსკრიპციული რეგულატორი *chrB*-ით (18). ბაქტერიაში *Pseudomonas Putida* KNU5 მძიმე მეტალების მიერ გამოწვეული ოქსიდატიური სტრესის დროს, აღწერილია ანტიოქსიდაციური ცილების: კატალაზას, პეროქსიდაზას და ასკორბატ პეროქსიდაზას გააქტიურება და მათი როლი ბაქტერიების მეტალების მიმართ რეზისტენტობაში. Zn^{2+} და Pb^{2+} ის 100 მგ/ლ კონცენტრაციის დროს იზრდება ანტიოქსიდაციური ცილების აქტივობა აღნიშნულ რეზისტენტულ ბაქტერიულ შტამში (58) მულტი- მეტალ რეზისტენტულ ბაქტერია *Arthrobacter ramosus*-ში აღწერილია კადმიუმის, კობალტის, თუთიის, ქრომის და ვერცხლისწყლის ბიოაკუმულირება. აღნიშნული ბაქტერია აღადგენს ქრომს და ვერცხლისწყალს და დიდ ინტერესს იწვევს დაბინძურებული გარემოს ბიორემედიაციის თვალსაზრისით. ბაქტერიის კულტურიდან გამოყოფილ იქნა ქრომის და ვერცხლისწყლის აღმდგენი, თერმოფილური, NADPH-სპეციფიური, 57kDa მოლეკულური წონის MerA ცილა (7). მეტალებით დაბინძურებული ტერიტორიიდან გამოყოფილი გრამ-დადებით ბაქტერიაში ნანახი იქნა პლაზმიდა. აღნიშნული ბაქტერიული შტამი *Arthrobacter spp*, ამჟღავნებდა ნიკელის და ქრომის მიმართ რეზისტენტობას (71).

3.1 ქრომის ბიოლოგიური აღდგენა

ქრომის ბიოლოგიური აღდგენა გულისხმობს ხსნადი Cr(VI)-ის უხსნად Cr(III)-ფორმად აღდგენას მიკროორგანიზმების გამოყენებით როგორც *in situ*, ასევე თხევად რეაქტორულ სისტემებში. Cr(VI)-ის ბიოლოგიური აღდგენის მეთოდები თავდაპირველად აღწერილი იყო 1977 წლებში Romaneko და Koren'kov მიერ (102). მათ აჩვენეს, რომ *Pseudomonas* შეუძლია Cr(VI)-ის აღდგენა $PbCrO_4$ დან Cr(III)-ად (102). მას მერე Cr(VI)-ით დაბინძურებული გარემოს აღსადგენად ფართოდ შეისწავლება და გამოიყენება ბიორემედიაციის მეთოდი, როგორც ყველაზე მოსახერხებელი და ხელმისაწვდომი მეთოდი. მკვლევარები ფოკუსირდნენ ინდივიდუალური ბაქტერიული შტამების და აღდგენის იდეალური პირობების იდენტიფიცირებაზე. Cr(VI)-ის აღდგენა ნაჩვენები იქნა როგორც გრამ დადებით (20, 41, 77, 116) ასევე გრამ უარყოფითი ეუბაქტერიების (80, 90, 92, 106, 114, 135), ასევე არქეების მიერ (37). ბოლო ხანებში დადგინდა, რომ აღდგენის პროცესი მიმდინარეობს საკმაოდ ფართო სპექტრში: როგორც აერობულ ასევე ანაერობულ პირობებში (41, 79, 92, 106, 114, 116). აქტიურად შეისწავლებოდა ქრომის აღდგენის პროცესში დენიტრიფიკაციის და სულფატური აღმდგენი ცილების როლი, იონების ზომასა და მუხტზე დაყრდნობით (CrO_4^{2-} , NO_3^{2-} , SO_4^{2-}) (23, 64, 129). Cr(VI)-ის აღდგენის ექსტრაცელულარული მექანიზმებიდან ნაჩვენები იქნა, როგორც ორგანული, (ჰუმუსის მჟავა) (38) და არაორგანული ელექტრონული გადამზიდების (Fe^{2+}) (135), ასევე, მიკრობული წარმოშობის აღმდგენების მონაწილეობაც (H_2S) (110). მიკრობული აღდგენა ნაჩვენები იქნა როგორც პირდაპირ უჯრედის ზედაპირზე, ასევე უჯრედის შიგნითაც. *Enterobacter cloacae*-ში ნაჩვენები იქნა მემბრანასთან დაკავშირებული აღდგენა (133), იგივე იქნა ნანახი *Pseudomonas fluorescens* (15) და *Desulfovibrio vulgaris* (69)-ში. სულფატური სატრანსპორტო სისტემებიდან უჯრედში მოხვედრილ ხსნადი Cr(VI)-ის ანიონების აღმდგენი უბნები ასევე ინტრაცელულარულადაა ლოკალიზებული (57). სხვადასხვა სამეცნიერო ჯგუფმა ხსნადი Cr(VI)-ის აღმდგენი მექანიზმები დაუკავშირა ციტოპლაზმურ ფრაქციებს (20, 41,

51, 75, 77, 80, 106). სპეციფიკური ინტრაცელულარული მექანიზმების იდენტიფიცირება შემოისაზღვრებოდა ჰიდროგენაზებით (79), ციტოქრომ C-თი (69, 79), უჯრედული აღმდგენი აგენტებით (გლუტათიონი-GSH, გლუტათიონ რედუქტაზა და ცისტეინი) (28), კარბოჰიდრატებით, NADH დამოკიდებულ აღმდგენებით (92, 114). ბაქტერიის უჯრედული კედლის კომპონენტებს (თეიხოვის მჟავები, პოლიკარბოჰიდრატები და სხვა დიოლის შემცველი ნაერთები) გააჩნიათ სპეციფიკური თუ არასპეციფიკური მემბრანადაკავშირებული რედუქტაზური აქტივობა, რის შედეგადაც შეუძლიათ გამოიწვიონ Cr(VI)-ის ნაწილობრივი აღდგენა ბაქტერიის უჯრედის კედელზე.

პუზონმა და მისმა ჯგუფმა აჩვენა და დაახასიათა Cr(VI)-ის აღდგენა *Escherichia coli*-ს მიერ თავისუფალი ფლავინებით: NAD(P)H ფლავინ ოქსორედუქტაზით (Fre) (98). ამის მიხედვით აღდგენის მექანიზმი მუშაობს როგორც სისტემა, სადაც Fre ჟანგავს NADH-ს და სამაგიეროდ აღადგენს მოკლე დროით შეკავშირებულ ფლავინს (transiently bound flavin). აღდგენილი ფლავინი გამოთავისუფლდება და სანაცვლოდ აღადგენს Cr(VI)-ს. სისტემა მოიხმარს 1,5 NADH-ს ყოველი აღდგენილი Cr(VI)-ის სანაცვლოდ, ქრომის სამვალენტო საბოლოო პროდუქტამდე. Fre – ფლავინ სისტემა სწრაფად აღადგენს Cr(VI)-ს, როგორც აერობულ, ასევე ანაერობულ პირობებში, მაშინ როდესაც NADH და გლუტათიონ დამოკიდებული ქიმიური აღდგენა საკმაოდ ნელი პროცესია. მსგავსი ტიპის ქრომის ენზიმური აღდგენის მექანიზმებია ძირითადად დამახასიათებელი ბაქტერიული უჯრედებისთვის (98). Cr(VI)-ის ბიორემედიაციის უპირატესობა ეფუძნება მეთოდის სიიაფეს და არაორგანული Cr(III)-ის აღდგენილი საბოლოო პროდუქტების უნარს, რომ შეუძლიათ გამოილექონ ნეიტრალურ pH- ზე ორგანიკით ღარიბ გარემოში (9). საბოლოო აღდგენილი პროდუქტების განსაზღვრა ბოლო პერიოდამდე მაინც არ იყო ნათელი. ზოგიერთი სამეცნიერო ჯგუფი ასახელებდა Cr(III)-ის პრეციპიტატის შემდგომ აღდგენას (22, 37, 41, 69, 102, 116). თუმცა სხვა რიგმა მკვლევარებმა ვერ მოახდინეს აღდგენილი Cr(III)-ის, როგორც საბოლოო პროდუქტის იდენტიფიცირება (15, 23, 47, 51, 79, 81, 92, 114, 119, 132). რამოდენიმე მკვლევარმა Cr(VI)-ის აღდგენის პროცესში მასური წონასწორობის ანალიზი გააკეთა და აღმოაჩინა რომ განსაზღვრული რაოდენობა აღდგენილი Cr(III)-ისა რჩება სუპერნატანტში და არ ხდება

მისი გამოლეკვა აღდგენის შემდეგ (20, 75, 77, 80, 106). სავსე კვლევებმა ისიც აჩვენა, რომ გარემოში Cr(III)-ის ხსნადი ფორმა უფრო სჭარბობს (49, 74) ვიდრე თერმოდინამიკურად ნავარაუდევია Cr(OH)₃ ფორმა. აღნიშნული აღდგენის საბოლოო პროდუქტები მოიაზრებიან ორგანიკასთან კავშირში (49). ხსნადი და ორგანიკასთან შეკავშირებული Cr(III)-ის ნაერთები ფორმირდებიან არაორგანულ Cr(III)-ის და ბუნებრივი ჰელატორების, მაგ. ნიადაგში არსებული ციტრატის (52) შეკავშირებით. პროკარიოტებისაგან განსხვავებით, ბიოლოგიურად გენერირებული Cr(III), ეუკარიოტებში ცნობილია როგორც ორგანო–Cr(III) კომპლექსების წარმოქმნელი, Cr(III)–დნმ/დნმ და Cr(III)–ცილა/დნმ (5, 34, 73, 113, 131, 138). პუზონმა და მისმა ჯგუფმა აჩვენა რომ Cr(VI)-ის ენზიმური აღდგენის დროს წარმოიქმნება ხსნადი ორგანო–Cr(III) ნაერთები, NAD⁺–Cr(III), ნეიტრალურ pH-სა და ფიზიოლოგიურ იონურ კონცენტრაციებზე (98). მსგავსი ენზიმური აღდგენის შედეგად მიღებული საბოლოო პროდუქტი NAD⁺–Cr(III), ჰქონდათ აღწერილი სხვებსაც (61). იგივე პუზონის ჯგუფმა აჩვენა რომ Cr(VI)-ის აღდგენის დროს უჯრედული ორგანიკის თანაობისას წარმოიქმნება ორგანო–Cr(III)-ის პროდუქტები, რაც ნეიტრალურ pH-ზე ინარჩუნებს ხსნადობას. აღნიშნული საბოლოო პროდუქტები რჩებიან სტაბილურად ხსნადი, წყალში დიალიზის დროსაც pH-ის ფართო დიაპაზონში. აღნიშნულით ივარაუდებოდა რომ Cr(VI)-ის მიკრობული აღდგენის დროს პირდაპირ უხსნადი სამვალენტო ქრომის ნალექის წარმოიქმნა კი არ ხდება, არამედ ჯერ წარმოიქმნება ხსნადი ორგანო–Cr(III)-ის კომპლექსები. რაც წარმოადგენს ქრომის ბიოგეოციკლის ინტეგრალურ ნაწილს.

3.2 Cr(III)-ის, როგორც აღდგენილი Cr(VI)-ის საბოლოო პროდუქტის „ბედი“ გარემოში

Cr(III) ის როგორც საბოლოო პროდუქტის ბედი ჯერ კიდევ უცნობია. რადგანაც Cr(III) ითვლება, როგორც ცვლილების მიმართ ინერტული (12) და ხასიათდება ლიგანდური ჩანაცვლების ძალიან დაბალი სიჩქარით (29), ორგანო–Cr(III) ნაერთები შესაძლოა ინარჩუნებდეს სტაბილურობას საკმაოდ დიდი პერიოდის განმავლობაში.

აღნიშნული ნაერთები ასევე შესაძლოა იყოს ხსნადი. ცნობილია, რომ გარემოში Cr(III) ხელახლა იქანგება Cr(VI)-ად MnO_2 ის ოქსიდით, მანგანუმით მდიდარ ნიადაგში, რაც იწვევს Cr(VI)-ით გარემოს ხელახალ დაბინძურებას. ხანგრძლივი პერიოდის განმავლობაში მრავალი ტოქსიკური და რადიოაქტიური მეტალის ხასიათის და გარემოში მათი ქცევის კვლევის შედეგად დადგინდა, რომ ბევრი მათგანი უკავშირდება სხვადასხვა ორგანულ ნაერთს. მეტალური იონები, როგორებიც არიან: Fe, Zn, Ca, Cu, Co, Ni, Cd, Pb, U და Cr უკავშირდებიან ბუნებრივ ჰელატორებს (ორგანო სორბენტებს). სამრეწველო სახის ჰელატორი, როგორიც არის EDTA ასევე წარმოქმნის ნაერთებს შემდეგ ელემენტებთან: Fe, Zn, Ca, Cu, Co, Ni, Cd, Pb, U და Cr. (76, 118). ფორმირებული მეტალ-EDTA კომპლექსები არიან ხსნადი და მობილური. არსებობენ ბაქტერიები რომელთაც შეუძლიათ მოახდინონ ბიოდეგრადირება სხვადასხვა ორგანო-მეტალური კომპლექსების, მაგალითად მეტალ-ციტრატული (36, 37, 54, 117) თუ მეტალ-EDTA კომპლექსების (118). ორგანული ჰელატორების დეგრადაციით ბაქტერიები ახერხებენ მეტალების გარემოში პრეციპიტაციას. პუზონის ჯგუფის მიერ აღწერილია აღნიშნული ორგანო-Cr(III) კომპლექსის PTX1 და PTX2 ბაქტერიებით ენზიმური მინერალიზაცია. *Ralstonia eutropha* JMP 134 და *Pseudomonas aeruginosa* pAO1 სწრაფად შლიან მალატის, ციტრატის და ჰისტიდინს, მაგრამ არა ორგანო-Cr(III) კომპლექსთან შეკავშირებულ მდგომარეობაში არსებული მოლეკულის ორგანულ ნაწილს. (70, 97).

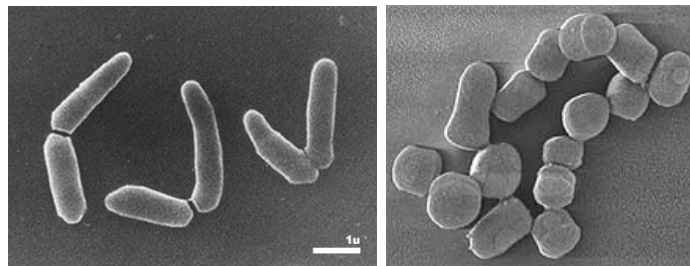
თავი 4. ბაქტერიის მიერ ქრომის დეტოქსიკაცია სხვა მეტალების თანაობისას.

Cr(VI)-ის აღდგენის ბაქტერიული პროცესი მრავალ ფაქტორზეა დამოკიდებული. მათ შორისაა ბაქტერიის ბიომასის რაოდენობა, Cr(VI)-ის საწყისი კონცენტრაცია, ნახშირბადის წყაროები, pH, ტემპერატურა, ჟანგბადის ოდენობა, ბაქტერიის ჟანგვა-აღდგენის პოტენციალი, სხვა მეტალების ოქსიანონების და კათიონების არსებობა (99). სხვადასხვა ბაქტერიას განსხვავებული მგრძნობელობა აქვს ამ ფაქტორების მიმართ, რადგან განსხვავებულია მათი მიკრობიოლოგიური აქტიურობა და ნივთიერებათა ცვლის გზები. დღესდღეობით ნაკლებად არის შესწავლილი სხვადასხვა მეტალის ზეგავლენა ბაქტერიის მიერ ტოქსიკური ქრომის გაუვნებელყოფაზე. ამ კუთხით მხოლოდ ერთეული მონაცემები არსებობს (43, 105). მაგალითად, აღმოჩნდა, რომ *E. coli* ATCC 33456-ის მიერ Cr(VI)-ის დეტოქსიკაციის პროცესი ინჰიბირდება მასზე 200 მგ/ლ Cu და 100 მგ/ლ Zn-ის თანაობისას (შესაბამისად, 16 და 33 %-ით) (134). ამავე დროს, Cr(VI)-ის დეტოქსიკაციის პროცესზე ზეგავლენა ვერ მოახდინა ბაქტერიულ კულტურაზე 20 მგ/ლ Cd და 10 მგ/ლ Pb-ის დამატებამ. ბაქტერიის *E. cloacae* HO1 მიერ Cr(VI)-ის დეტოქსიკაცია 30%-ით შემცირდა მასზე 31 მგ/ლ Cu(II)-ის დამატებით, და მთლიანად შეჩერდა 32 მგ/ლ Zn(II)-ით. Mn(II)-ის შემთხვევაში ინჰიბირება იწყება 28 მგ/ლ კონცენტრაციის დროს. ჰარდოიმ და ოკტაკემ (43, 91) აჩვენეს, რომ *E. cloacae* HO1-ის მიერ Cr(VI)-ის დეტოქსიკაციის პროცესი ითრგუნება სხვადასხვა მეტალების ზემოქმედებით. ამასთან ეს პროცესი შემდეგი თანმიმდევრობით ხდება: Hg(II)>Ag(I)>Cu(II)>Cd(II)>Zn(II)>Ni(II)>Co(II)>Mn(II). Hg(II) ახდენს ქრომის აღდგენის პროცესის სრულ დათრგუნვას 0.2 მგ/ლ კონცენტრაციაზე. ასევე დადგენილია, რომ *P. putida* PRS200-ის მიერ Cr(VI)-ის დეტოქსიკაციისთვის Hg(II) უალტერნატივო ინჰიბიტორია. მნიშვნელოვანია, რომ ზოგიერთი ბაქტერია ქრომთან ერთად არსებული სხვა მძიმე მეტალების გაუვნებელყოფასაც ახერხებს. მაგალითად, დისიმილატორული მეტალ-გარდამქმნელი ბაქტერია (DMRB) ერთდროულად გარდაქმნის გარემოში არსებულ Cr(VI), Fe(III), და U(VI). ასეთი ბაქტერიების გამოყენებას საწარმოო ნარჩენების დეტოქსიკაციისათვის დიდი პოტენციალი გააჩნია.

თავი 5. *Arthrobacter*-ის გვარის ზოგადი დახასიათება

უკანასკნელი პერიოდის გამოკვლევებმა ცხადყო, რომ ბევრი ლაბორატორიულად კარგად შესწავლილი ბაქტერია კარგავს ცხოველქმედების უნარს მისი დაჭუჭყიანებულ გარემოში გამოყენების დროს. ბევრი მიკროორგანიზმი ასევე ვერ ეგუება მეტალების მაღალ კონცენტრაციებს. ამდენად უფრო მიზანშეწონილი აღმოჩნდა ბაქტერიების გამოყოფა უშუალოდ მეტალებით დაბინძურებული ნიადაგიდან, მინერალური ქანებიდან, წყლიდან (51, 134) და ენდოგენურ მიკროორგანიზმებზე დაფუძნებული ტექნოლოგიების დამუშავება (105, 108). ქრომის აღმდგენ ბაქტერიებს შორის დიდია ინტერესი *Arthrobacter*-ის ენდოგენური სახეობის ბაქტერიების მიმართ, ვინაიდან არსებული მონაცემების თანახმად (56), მათ გააჩნიათ დაბინძურებული გარემოს რეაბილიტაციის მაღალი პოტენციალი. ისინი აქტიურად მონაწილეობენ ბუნებაში ნივთიერებათა ტრანსფორმაციაში. მათ აქვთ ჰერბიციდების, ალკალოიდების, პირიდინის, ჰეტეროციკლური ნაერთების გარდაქმნის უნარი. *Arthrobacter*-ის სახეობის ბაქტერიები გვხვდებიან მტკნარ, ზღვის და გამდინარე წყლებში, თერმულ წყაროებში, აქტიურ ლამში, ტბების დანალექებსა და მთის ქანებში. ნიადაგში გავრცელებულ მიკროორგანიზმთა შორის ართრობაქტერიების რაოდენობა 60-90%-ს აღწევს.

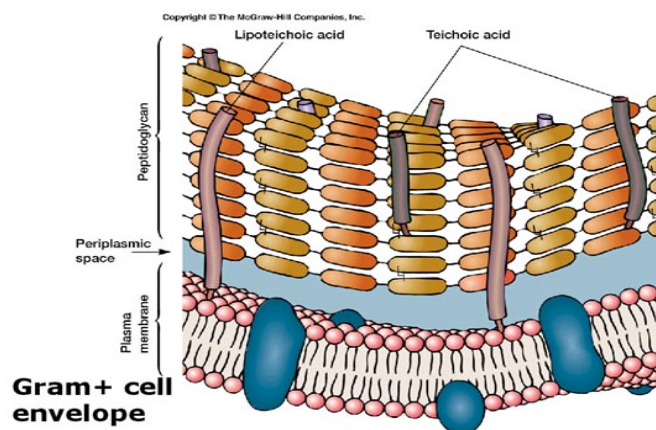
ილუსტრაცია 1. *Arthrobacter*-ის უჯრედები ზრდის ექსპონენციალურ და სტაციონალურ ფაზებში



Arthrobacter-ის სახეობის ბაქტერიები აერობული ბაქტერიებია, რომლებიც მიეკუთვნებიან გრამ-დადებითი ბაქტერიების აქტინომიცეტების შტოს. *Arthrobacter* ერთერთი ყველაზე მრავალრიცხოვანი გვარია კორინეფორმის ბაქტერიებს შორის. ზრდის ექსპონენციალურ ფაზაში მათთვის დამახასიათებელია ჩხირების ფორმა, ხოლო სტაციონარულ ფაზაში კოკების ფორმა.

5.1 გრამ-დადებითი ბაქტერიების უჯრედის კედლის დახასიათება

ილუსტრაცია 2. გრამ-დადებითი ბაქტერიის უჯრედის კედელი



გრამ-დადებითი ბაქტერიების უჯრედის კედელი შედგება სქელი პეპტიდოგლიკანისგან (ილუსტრაცია 2). პეპტიდოგლიკანი არის მოლეკულური კომპლექსი, რომელიც შედგება ორი ტიპის შაქრების მონომერისგან: N-აცეტილმურამის მჟავის (NAM) და N-აცეტილგლუკოზამინისგან (NAG). NAM და NAG მონოსაქარიდები ქმნიან ძაფებს, ხოლო ძაფები დაკავშირებულნი არიან ერთმანეთთან ისე, რომ ქმნიან ქსოვილს. ასეთი ქსოვილებისგან შედგება გრამ-დადებითი ბაქტერიის პეპტიდოგლიკანი. პეპტიდოგლიკანს კვეთენ თეიხოსის და ლიპოთეიხოსის მჟავები. თეიხოსის მჟავა არის

პოლიმერი, რომელიც შედგება რიბიტოლი-ფოსფატისა და /ან გლიცეროლი-ფოსფატისგან. ლიპოთეიხოს მჟავა არის თეიხოს მჟავა დაკავშირებული ლიპიდთან, რომელიც მოთავსებულია უჯრედის მემბრანაზე. პეპტიდოგლიკანის ფენას კვეთავს აგრეთვე მრავალი სხვადასხვა ტიპის ცილა.

მეთოდოლოგია

თავი 1. გამოყენებული მასალები

ნაშრომში სულ გამოყენებულია *Arthrobacter*-ის სახეობის სამი შტამი *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter globiformis* 151B და *Arthrobacter sp.* 61B. აქედან *Arthrobacter oxydans* გამოყოფილია აშშ-ს ნევადის პოლიგონზე არსებული კოლუმბიის ბაზალტის ქანებიდან. აღნიშნული რეგიონი ძლიერად არის დაბინძურებული მძიმე მეტალებით, რადიონუკლიდებით და ორგანული ნივთიერებების ნაერთებით. შტამის კულტივირება მოხდა ლაურენს ბერკლის ნაციონალურ ლაბორატორიაში. *Arthrobacter globiformis* 151 B და *Arthrobacter sp.* 61 B. წარმოადგენენ ქართულ შტამებს, რომელთა აღება და გამოყოფა მოხდა კაზრეთში მძიმე მეტალებით დაბინძურებული ბაზალტის ქანებიდან (121). დადგენილია, რომ აღნიშნული ბაქტერიები ტოლერანტულია ქრომის მაღალი კონცენტრაციების (>1000 მგ/ლ) მიმართ (ილუსტრაცია 3). აღნიშნული ბაქტერიების კულტივირება მოხდა აგრარული უნივერსიტეტის ბიოქიმიისა და ბიოტექნოლოგიების ინსტიტუტში და მის კოლექციას წარმოადგენს.

ილუსტრაცია 3. *Arthrobacter*-ის უჯრედები პეტრის ფინჯანზე, (1) საკონტროლო ნიმუში; (2) ბაქტერიების უჯრედები 1000 მგ/ლ კონცენტრაციის Cr(VI)-ის ზემოქმედების შემდეგ 5 დღის განმავლობაში.



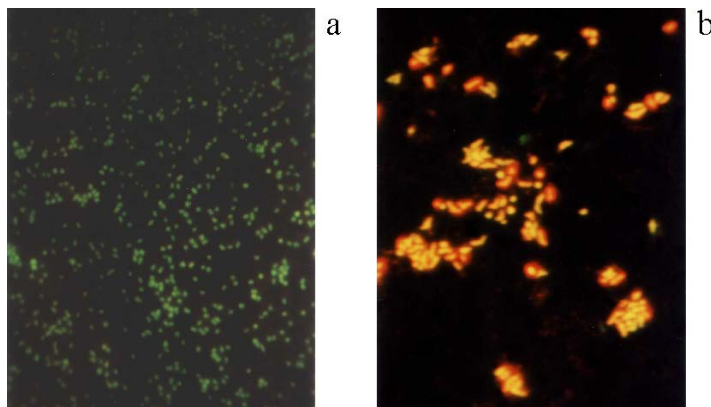
- ძირითად მოდელურ საკვლევ მეტალად არჩეული იქნა ექვსვალენტიანი ქრომი Cr(VI), მასთან ერთად შევისწავლიდით Zn, Cu, Mn, Ni-ის ზემოქმედებას Cr(VI)-ის შეთვისების პროცესზე. ასევე შევისწავლიდით ბაქტერიების მიერ Mg, Fe და K-ის შთვისების პროცესს.

კვლევაში გამოყენებული საკვები ნიადაგები და რეაქტივები:

- რესტრიქციული ენდონუკლეაზები: EcoR I, Bam H I, Hind III.
- პლაზმიდის გამოსაყოფი კიტი- QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN);
- ყველა დანარჩენი ქიმიური რეაქტივი და ნიადაგი იყო ACS რეაგენტის ხარისხის – წარმოებული “Sigma”-ს მიერ (St. Louis, Mo, USA).

1.1. საკვლევი ბაქტერიული შტამების მორფოლოგიურ-კულტურალური ნიშნ-თვისებები

Arthrobacter globiformis 151B კოლონიები ყვითელია, გლუვი, მრგვალი, ამოზურცული ზედაპირის მქონე.



ილუსტრაცია 4. *Arthrobacter oxydans*-ის უჯრედები: a) ზრდის სტაციონარულ ფაზაში, b) ზრდის ექსპონენციალურ ფაზაში. სურათები გადაღებულია ფლუორესცენტული მიკროსკოპით.

ხოლო *Arthrobacter sp.* 61B-ის კოლონიები უფერული, თეთრი, წყლის ფერი, გლუვი, მრგვალი, ამობურცული ზედაპირის მქონე, მბრწყინავია. ორივე ბაქტერიული შტამს გააჩნია შემდეგი საერთო ნიშან-თვისებები: უჯრედის კედელი შეიცავს ამინომჟავა ლიზინს და მონოსაქარიდ გალაქტოზას. კულტურები მჟავის მიმართ არამდგრადია. ზრდის ოპტიმუმი 20-30 °C. იზრდება აგრეთვე 3 °C.

1.2. საკვლევი ბაქტერიული შტამების ფიზიოლოგიურ-ბიოქიმიური ნიშან-თვისებები

კატალაზური აქტივობა დადებითია. ჟელატინს არ ათხევადებს. იწვევს რძის პეპტონიზაციას სუსტად, კოაგულაციის უნარი არ აქვს. სახამებლის ჰიდროლიზს არ იწვევს. აღადგენს ნიტრატებს. ცელულოზის დაშლის უნარი არა აქვს. გოგირწყალბადს არ წარმოქმნის. კარგად ვითარდება pH-ის 7-12 ინტერვალის პირობებში. NaCl 5-7%-ის შემცველ საკვებ არეზე არ იზრდება. ნახშირბადის წყაროებიდან ინტენსიურად ითვისებს გლუკოზას, ფრუქტოზას, გალაქტოზას, არაბინოზას, ქსილოზას, რამნოზას, საქაროზას, ლაქტოზას, მალტოზას, სახამებელს. კარგად ითვისებს აგრეთვე სორბიტს, ინოზიტს, გლიცერინს, შედარებით სუსტად დულციტს. ორგანული მჟავებიდან ითვისებს რძემჟავა-Na-ის და ქარვისმჟავა-Na-ის მარილებს. აზოტის წყაროებიდან კარგად ითვისებენ NaNO_3 , KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times \text{H}_2\text{O}$, პეპტონს, β -ალანინს, L-ასპარაგინს, გლიცერინს, თიროზინს, ტრიფტოფანს, DL-ალანინს, ასპარაგინის მჟავას, შედარებით სუსტად L-ლეიცინს, DL-მეთიონინს. ნახშირწყალბადებიდან ითვისებენ ნავთობს, ბენზოლს, ჰექსანს, ბენზოპირენს.

ანტაგონისტური თვისებები: შტამები ანტაგონისტურ თვისებებს არ ავლენენ გრამ-დადებითი ბაქტერიების, მიკობაქტერიების, სოკოების და საფუვრების მიმართ.

თავი 2. ნიმუშების მომზადება ეპრ და აას გაზომვებისთვის.

2.1. ნიმუშების მომზადება გაზომვებისთვის როდესაც შვეისწავლიდით ბაქტერიების მიერ ქრომის აკუმულაციას, საკვებ გარემოში Cr(VI)-თან ერთად Zn-ის და სხვა მეტალების არსებობისას.

გაზომვებისთვის ბაქტერიული ნიმუშების მომზადება ხდებოდა შემდეგი წესით: თავდაპირველად აგარის ფინჯნიდან ხდებოდა ბაქტერიების გადათესვა თხევად საკვებ გარემოში, საიდანაც ხდებოდა 18 საათიანი კულტურის გადათესვა 500 მლ-იან ერლენმეიერის კოლბაში, რომელშიც მოთავსებული იყო 100 მლ საკვები არე. ბაქტერიული კულტურა იზრდებოდა აერობულად, 21°C-ზე, მუდმივი რხევის პირობებში სანჯღრევლაზე. ბაქტერიის უჯრედები იზრდებოდნენ შემდეგ საკვებ გარემოში: 10გ გლუკოზა, 10გ პეპტონი, 1გ საფუარის ექსტრაქტი, 2გ კაზეინის მჟავის ჰიდროლიზატი, 5გ NaCl და 1ლ დისტილირებული წყალი. Cr(VI) დამატება ხდებოდა ბაქტერიაზე ზრდის ადრეულ სტაციონარულ ფაზაში, K_2CrO_4 მარილის სახით, ხოლო Zn(II) - $ZnSO_4$ -ის სახით.

ჩვენს მიერ ჩატარებული იქნა ექსპერიმენტების რამოდენიმე სერია:

1. ბაქტერიის ზრდის გარემოში ხდებოდა Zn(II)-ის ფიქსირებული რაოდენობის:- 50მგ/ლ დამატება, ხოლო Cr(VI)- საკვებ გარემოში შეგვქონდა სხვადასხვა კონცენტრაციული ინტერვალით 50-დან 1000 მგ/ლ.-მდე (50, 100, 150, 200, 250...1000 (მგ/ლ)-მდე)).

2. 100 მგ/ლ Cr(VI)-ის ფიქსირებული რაოდენობა ემატებოდა ბაქტერიული უჯრედების საკვებ გარემოს, ხოლო იცვლებოდა Zn(II)-ის კონცენტრაცია 50-დან 1000 მგ/ლ- ინტერვალით.

3. ბაქტერიის ზრდის გარემოში Cr(VI)-თან ერთად ხდებოდა რომელიმე სხვა მეტალის (Cu(II), ან Mn(II) ან Ni(II)) შეტანაც. ამ ექსპერიმენტებში Cr(VI)-ის კონცენტრაცია ყოველთვის იყო 100 მგ/ლ, ხოლო სხვა მეტალების კონცენტრაცია შეადგენდა 50მგ/ლ-ს რამოდენიმე ექსპერიმენტში ყველა მეტალი ერთად იქნა შეტანილი

ბაქტერიის ზრდის გარემოში, ანუ შესწავლილ იქნა მძიმე მეტალების ნარევის ზემოქმედება ბაქტერიის თხევად კულტურაზე. ამ შემთხვევაში თითოეული მეტალის კონცენტრაცია შეადგენდა 12მგ/ლ-ს. ამ ექსპერიმენტებში ჩვენს მიერ გამოყენებულ იქნა შემდეგი მეტალური მარილები: CuSO_4 , ZnSO_4 , MnCl_2 , და NiSO_4 .

აღნიშნულ ექსპერიმენტებში ბაქტერიების კულტივაცია მეტალების შემცველ გარემოში გრძელდებოდა 5 დღის განმავლობაში, ხოლო შემდეგ ხდებოდა შემდეგი პროცედურების ჩატარება: მიღებული ბაქტერიული მასის საკვები გარემოდან გამოყოფის მიზნით ვახდენდით ნარევის დაცენტრიფუგირებას (12,000g, 15წთ, 4°C) და მიღებული ბაქტერიული მასის (ნალექის) 20 mM ფოსფატურ ბუფერში ორჯერად გარეცხვას, საკვები არის ნარჩენების მოშორების მიზნით; უჯრედების ლიოფილიზაციას, რისთვისაც სველი ბიომასა თავსდებოდა ლიოფილიზატორზე და შრებოდა; ლიოფილიზირებული ბაქტერიული ბიომასის აწონვა და მომზადება ატომურ-აბსორბციული და ეპრ გაზომვებისთვის. ატომურ-აბსორბციული მეთოდით ვზომავდით Cr, Mn, Ni, Cu-ის კონცენტრაციებს ბაქტერიულ ნიმუშებში, ხოლო ეპრ-ის მეშვეობით ხუთვალენტიანი და სამვალენტიანი ქრომის კონცენტრაციას.

2.2. ნიმუშების მომზადება გაზომვებისთვის როდესაც შევისწავლიდით *A. oxydans*-ის მიერ Cr(VI) დიოლების Cr(III) ნაერთებად აღდგენას.

ბაქტერიები იზრდებოდნენ აერობულად 250 მლ-იან ერლენმეიერის კოლბებში 21°C -ზე, თხევად გარემოში: 2გ K_2HPO_4 , 0,01გ FeSO_4 , 0,2გ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1გ ამონიუმის ციტრატი, 1გ გლუკოზა, 1გ საფუარის ექსტრაქტი და 1.0 ლ დისტილირებული წყალი. კოლბები მოთავსებული იყო სანჯღრეველაზე (100 rpm სიჩქარით). Cr(VI)-ის და *A. oxydans* შორის რეაქციის გამოსაკვლევად ჩვენ დავუშვით ორი ტიპის ექსპერიმენტი *A. oxydans*-ის უჯრედების გამოყენებით, რომლებიც იყვნენ ზრდის ადრეულ სტაციონარულ ფაზაში. პირველი ტიპის ექსპერიმენტში, ვიკვლევდით რეაქციას Cr(VI)-სა და *A. oxydans*-ის ლიოფილიზირებულ უჯრედებს შორის. საკვებ გარემოში აქ თავდაპირველად *A. Oxydans*-ის უჯრედებს ვაგროვებდით ცენტრიფუგირებით (10,000

rpm, 15წთ, 4°C). ლიოფილიზაციის შემდეგ უჯრედებს ვამატებდით 400მგ/ლ Cr(VI)-ს [K₂CrO₄ -სახით]. Cr(V)-დან წარმოქმნილი Cr(III)-ის “თაობა“ იზომებოდა დროის სხვადასხვა მონაკვეთში ეპრ სპექტრომეტრით. იგივე პროცედურას ვიყენებდით Cr(VI)-დან წარმოქმნილი Cr(V)-ის გასაზომად.

მეორე ტიპის ექსპერიმენტში ვიკვლევდით რეაქციას Cr(VI)-სა და სტაციონალურ ფაზაში მყოფ *A. Oxydans*-ის ცოცხალ უჯრედებს შორის. აქ Cr(VI)-ის დამატება ხდებოდა ისე რომ მისი კონცენტრაცია უჯრედული კულტურის შემცველ არეში შეადგენდა 35 და 200 მგ/ლ-ზე. ეპრ გაზომვებამდე Cr(VI)-თან ნაურთიერთქმედები ბაქტერიული უჯრედების აღება ხდებოდა დროის სხვადასხვა მომენტში ცენტრიფუგირებით (10,000 rpm, 15წთ, 4°C). *A. oxydans*-ში Cr-ის განაწილებაზე სწორი წარმოდგენის შესაქმნელად, ყველა ნიმუში გავყავით ორ ნაწილად. პირველი ჯგუფის უჯრედები დაუყონებლივ გამზადდა ეპრ (ESR) და აას (AAS) ანალიზებისთვის.

მეორე ჯგუფის ნიმუშების უჯრედებმა გაიარეს დამატებითი გარეცხვის პროცედურები, უჯრედის ზედაპირთან შეკავშირებული ქრომის მოლეკულების მოსაცილებლად. თავდაპირველად, ქრომით „დამუშავებული“ უჯრედები გაირეცხა და დაცენტრიფუგირდა ცივ ფოსფატურ ბუფერულ მარილხსნარში (PBS), pH- 7.0, შემდეგ (PBS)-ში გარეცხილი ნალექი რესუსპენდირდა Tris-HCl-EDTA გარემოში, რომელიც შეიცავდა 0.1M Tris-HCl (pH 7.5) და 1.0 M EDTA. მოხდა მათი ინკუბირება როტაციულ სანჯღრეველაზე 2 სთ-ს განმავლობაში. ბაქტერიული უჯრედების გამოცალკევება Tris-HCl-EDTA არედან, მოხდა ცენტრიფუგირებით (10,000 rpm, 15წთ, 4°C) და გარეცხვა PBS ბუფერით. ორივე, გამოცალკევებული უჯრედები და თხევადი არე გაიზომა ეპრ (ESR) სპექტრომეტრით. ეპრ გაზომვების შემდეგ ბაქტერიული უჯრედები გაიზომა დამატებით ატომურ-აბსორბციულ სპექტრომეტრზე (აას).

2.3. ბაქტერიული უჯრედების ლიოფილიზაცია

ბაქტერიული უჯრედების განსაზღვრული დროით კულტივირების შემდეგ ვახდენდით უჯრედული სუსპენზიის ცენტრიფუგირებას. დალექილ ბიომასას ვრეცხავდით დისტილირებული დეიონიზირებული წყლით სულ მცირე 3-ჯერ, ნეიტრალურ pH-ზე მიყვანამდე (ექსპერიმენტის საჭიროების მიხედვით). სველი ბიომასა გადაგვქონდა ადსორბციულ-კონდენსაციური ლიოფილიზატორის სამუშაო კამერაში. ამ დროს ცილინდრულ კამერა შევსებულია SiO_2 -ის ახალი რეგენერირებული გრანულებით, რაც უზრუნველყოფს სველი ბაქტერიული ბიომასიდან ტენის მოცილებას, ხოლო თხევად აზოტიანი დიუარის ჭურჭელში SiO_2 -ის გრანულების შემცველი ცილინდრული-კამერის ჩაშვება მოკლე დროში უზრუნველყოფს გრანულების შემდგომ გაციებას და ტემპერატურის დაწევას სამუშაო კამერაში. ლიოფილიზატორის ტექნიკური მონაცემებია: ლიოფილიზაციის კამერის მოცულობა – 1,5ლ; SiO_2 -ის სწრაფი, ძლიერი გაციებით კამერაში გენერირდება 1-2 პა წნევის გრადიენტი, რაც მიმართულია სამუშაო კამერიდან აბსორბენტისაკენ; ლიოფილიზაციის პროცესის სტაციონარული ტემპერატურა: -17°C ; თხევადი აზოტის მოხმარება დღე-ღამეში 3 ლ;

თავი 3. გაზომვის მეთოდები

ელექტრონული პარამაგნიტური რეზონანსის (ეპრ) მეთოდი გამოიყენებოდა Cr(V)-ის და Cr(III)-ის კონცენტრაციების გასაზომად, რომლებიც მიიღებიან Cr(VI)-ის Cr(III)-ად გარდაქმნის პროცესში ბაქტერიების მიერ მათ უჯრედებში. ბაქტერიულ უჯრედებში მთლიანი ქრომის, თუთიის და სხვა მეტალების შემცველობის გაზომვისთვის ვიყენებდით ატომურ აბსორბციულ სპექტროფოტომეტრულ მეთოდს (აას), უჯრედების სველი (კონცენტრირებული აზოტმჟავით) დანაცრების შემდეგ. ბაქტერიული უჯრედების ბიომასის განსაზღვრისათვის უჯრედებს ვწონდით ლიოფილიზაციის შემდეგ, პლაზმიდური და გენომური დნმ-ის რაოდენობაზე დაკვირვებას ვახდენდით აგაროზას გელზე ელექტროფორეზის მეთოდით.

3.1. ელექტრონული პარამაგნიტური რეზონანსის (ეპრ/ESR) მეთოდი

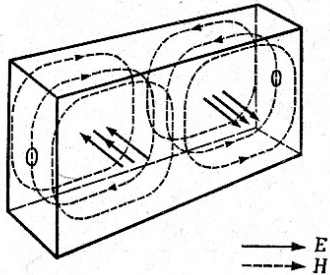
სადოქტორო ნაშრომში კვლევის ძირითად მეთოდს ეპრ წარმოადგენს. მეთოდმა ძალიან საინტერესო და მნიშვნელოვანი გამოყენება ჰპოვა ბიოქიმიასა და ბიოლოგიაში. თავდაპირველად ეპრ მეთოდი ფიზიკოსების მიერ იყო დამუშავებული. შემდეგ იგი გამოყენებულ იქნა ჯერ ფიზიკური ქიმიის დარგში, და ბოლოს უკვე, კიდევ უფრო რთული სისტემებისა და პროცესების შესასწავლად, ბიოქიმიასა და ფიზიოლოგიაში. არსებითად ეს არის მეთოდი, რომელიც საშუალებას იძლევა აღმოაჩინოს და დაახასიათოს დაუწყვილებელი ელექტრონები სისტემებში, რომლებიც იმყოფებიან როგორც უძრავ, ისე მოძრავ მდგომარეობაში. ამ მეთოდის საშუალებით შეიძლება დაუწყვილებელი ელექტრონების კონცენტრაციის განსაზღვრაც, რითაც დიდი დახმარების გაწევა შეუძლია ფერმენტაციული რეაქციების კინეტიკის შესწავლაში, მეტალო-ორგანული მოლეკულების სტრუქტურის გამოკვლევაში და სხვ.

ელექტრონულ პარამაგნიტურ რეზონანსზე (ეპრ) დაკვირვებისათვის აუცილებელია მოლეკულას გააჩნდეს მაგნიტური დიპოლური მომენტი. თუ ნიმუშს ასეთი

დიპოლებით მოვითავსებთ მუდმივ მაგნიტურ ველში და ამასთან ერთად დავასხივებთ მაღალსიხშირის ცვლადი ელექტრომაგნიტური ველით, მაშინ ერთ ან რამდენიმე სიხშირეზე შეიძლება აღმოვაჩინოთ შთანთქმა, რომელიც გამოწვეულია მაგნიტური დიპოლური მომენტის არსებობით. ამ შთანთქმის რეგისტრირებისათვის გამოიყენება ეპრ სპექტრომეტრი. იგი წარმოადგენს ხელსაწყოს, რომლის საშუალებითაც ხდება მაგნიტური დიპოლური გადასვლების აღმოჩენა. ამისათვის მონოქრომატული ელექტრომაგნიტური გამოსხივება ეცემა ნიმუშს და შესაბამისი დეტექტორის საშუალებით აკვირდებიან ნიმუშში ენერგიის შთანთქმას. ეს ხდება მხოლოდ იმ შემთხვევაში, როცა დაცემული კვანტის ენერგია ტოლია ენერგეტიკულ დონეთა შორის ენერგიების სხვაობისა. მუდმივი მაგნიტური ველის არსებობა აუცილებელია მაგნიტური დიპოლური გადასვლებისათვის. მაგნიტური ველის გარეშე მაგნიტური დიპოლების ენერგეტიკული დონეები ერთმანეთს ემთხვევა. მოლეკულების მუდმივი მაგნიტური მომენტები შეიძლება დაკავშირებული იყოს როგორც ელექტრონებთან, ისე ბირთვებთან. ამ მაგნიტური მომენტების არსებობა განპირობებულია ელექტრონებისა და ბირთვების მექანიკური მომენტების არსებობით. ელექტრონებით გამოწვეული მაგნიტური მომენტების არსებობა დამოკიდებულია ელექტრონების არაკომპენსირებული სპინური ან ორბიტალური კუთხური მომენტის არსებობით, ანდა მათი კომბინაციით. ამ მომენტების ფუნდამენტურ თვისებას წარმოადგენს მათი დაკვანტვა. ასეთი სისტემების მიერ რეზონანსულ შთანთქმას მუდმივ მაგნიტურ ველში უწოდებენ “ელექტრონულ პარამაგნიტურ რეზონანსს”. ტერმინი “რეზონანსი” მიუთითებს იმაზე, რომ აუცილებელია არსებობდეს ზუსტი შესაბამისობა ენერგეტიკულ დონეებს შორის მანძილსა და ელექტრომაგნიტური გამოსხივების კვანტის ენერგიას შორის.

რეზონანსული შთანთქმის დასაფიქსირებლად სისტემაში, რომელიც შეიცავს დაუწყვილებელ ელექტრონებს, საჭიროა სპექტრომეტრი მუდმივი მაგნიტური ველით. ეპრ სპექტრომეტრებში იმყოფება ელექტრომაგნიტური გამოსხივების წყარო და მოწყობილობა ნიმუშში შთანთქმის დეტექტირებისათვის. ყველა ეპრ სპექტრომეტრის ერთერთი ძირითადი ნაწილია რეზონატორი, სადაც თავსდება ნიმუში. რეზონატორი

წარმოადგენს ცილინდრულ ან მართკუთხა მოცულობას, რომლის შიგნითა ზედაპირი კარგი გამტარითაა დაფარული (მაგ. ვერცხლით). რეზონატორი პატარა ნახევრეტის საშუალებით დაკავშირებულია ელექტრომაგნიტური გამოსხივების წყაროსთან,რის



ილუსტრაცია 5. ელექტრული და მაგნიტური ველები მართკუთხა რეზონატორში.

შედეგადაც მასში წარმოიშვება მდგარი ტალღები.რეზონატორში შეიძლება მოთავსდეს ელექტრომაგნიტური ტალღის სიგრძის ნახევრის ჯერადი რაოდენობა. შეიძლება რეზონატორის ისეთი აღზნება, რომ მასში შევქმნათ მდგარი ტალღების რამდენიმე ტიპი ანუ "მოდა". რეზონატორში ელექტრული და მაგნიტური ველების მაქსიმუმების მდებარეობა ერთმანეთს არ ემთხვევა (ილუსტრაცია.5). ნიმუში თავსდება მაგნიტური ველის (H_1) მაქსიმუმში. ამასთან H_1 მართობული უნდა იყოს H_0 სტატიკური ველისა. რეზონატორი აწყობილია ისე, რომ მისგან არეკვლილი სიმძლავრე მინიმალური იყოს. რეზონანსის დროს ნიმუში შთანთქავს ენერგიას და რეზონატორიდან არეკვლილი სიმძლავრე იცვლება. ასეთნაირად ხდება პარამაგნიტური რეზონანსის რეგისტრირება. ეპრ სპექტრომეტრი მუშაობს გარკვეულ მიკროტალღოვან სიხშირეზე, ხოლო ეპრ სპექტრი მიიღება სტატიკური მაგნიტური ველის წრფივი ცვლილების შედეგად. სკანირების ასეთი მეთოდი შესაძლებელია იმიტომ, რომ მანძილი ენერგეტიკულ დონეებს შორის დამოკიდებულია მაგნიტური ველის სიდიდეზე. შთანთქმის ხაზები დაიშვირება მაშინ, როცა მანძილი ენერგეტიკულ დონეებს შორის გაუტოლდება ნიმუშზე დაცემული ფოტონების $h\nu$ ენერგიას. ნიმუშის მიერ ამ ფოტონების შთანთქმა გამოიყვანდება დეტექტორის დენის ცვლილების სახით. სიგნალს დეტექტირებისას ჩვეულებრივ თან ახლავს ხმაური, რომელიც სიხშირეთა ფართო დიაპაზონშია მოქცეული. ამ ხმაურის შესამცირებლად ახდენენ H_0 მაგნიტური ველის მოდულაციას ცვლადი მაგნიტური ველით. ამ დროს დეტექტორზე მიღებული სასარგებლო სიგნალი წარმოადგენს მოდულაციის სიხშირის მქონე ცვლად ძაბვას. ეს სიგნალი ძლიერდება

ვიწროზოლოვანი გამაძლიერებლის საშუალებით. რჩება ხმაურის მხოლოდ ის ნაწილი, რომელიც ამ ვიწრო ზოლშია მოქცეული. შედეგად კი იზრდება შეფარდება სიგნალი/ხმაური. მაგნიტური ველის მოდულირება ხდება მცირე ამპლიტუდით. მოდულაციის სიხშირე კი, ჩვეულებრივად, 100 კილოჰერცის ტოლია. იგი ხორციელდება პატარა კოჭების საშუალებით. თუ 100 კილოჰერციანი მოდულაცია ხაზის სიგანეზე ნაკლებია, მაშინ დეტექტირებადი სიგნალის ამპლიტუდა დაახლოებით პროპორციულია შთანთქმის მრუდის დახრილობისა.

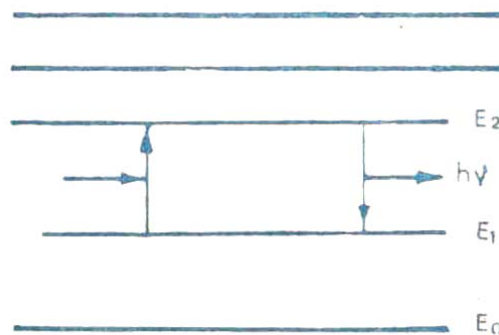
ეპრ (ESR) გაზომვები ტარდებოდა RE 1306 რადიო სპექტრომეტრზე (რუსეთი) 9,4 გჰც სიხშირეზე, მოდულაციის სიხშირე 100 კჰც-ია. Cr(III)-ის გაზომვა ხდებოდა შემდეგ პირობებში: ზემაღალი სიხშირე = 9.39 გჰც, მოდულაციის სიხშირე = 100 კჰც, ზემაღალი სიხშირის ელექტრომაგნიტური ველის სიმძლავრე – 50 მვტ, დროის მუდმივა = 0.3 წმ, მაგნიტური ველის სკანირების დრო 20 წთ, მოდულაციის ამპლიტუდა = 8 გაუსი. 100 kHz მოდულაციით 9,4 GHz-ზე. ექსპერიმენტები ტარდებოდა როგორც თხევადი აზოტის ტემპერატურაზე (77K), ასევე ოთახის ტემპერატურაზე (300K) (56) მიხედვით. ეპრ სიგნალის ინტენსიურობა იზომებოდა სიგნალის სიმაღლის პიკიდან-პიკამდე (ეპრ ხაზის სიგანე არ იცვლება და მაშასადამე სიგნალის ინტენსიურობა პარამაგნიტური ცენტრების კონცენტრაციის პირდაპირ პროპორციულია). გ-ფაქტორის სიდიდის ზუსტი განსაზღვრისათვის, ჩვენ მხედველობაში მივიღეთ სხვადასხვა პოზიციაში მყოფი ნიმუშების და სენსორის მიერ გამოწვეული განსხვავება მაგნიტური ველის მნიშვნელობებს შორის. გავზომეთ სტანდარტული ნიმუშის გ-ფაქტორის სიდიდე და მიღებული მცირე სხვაობა გავითვალისწინეთ ნიმუშების გ-ფაქტორის სიდიდეების გაზომვისას. გ-ფაქტორის სიდიდეების ცდომილება იყო: Cr(V)-თვის ± 0.0003 და Cr(III)-თვის ± 0.005 შესაბამისად.

3.2. ატომურ-აბსორბციული სპექტრომეტრია (აას/AAS).

ნაშრომში კვლევის ერთ-ერთ ძირითად მეთოდს ატომურ-აბსორბციული სპექტრომეტრია წარმოადგენს. იგი ემყარება ატომების თვისებებს, კერძოდ, ატომურ-აბსორბციული სპექტროსკოპიის მეთოდს საფუძვლად უდევს თავისუფალ მდგომარეობაში გადაყვანილი საზომი ელემენტის ატომების მიერ სინათლის რეზონანსული შთანთქმის ეფექტი, ე.ი. იმ ტალღის სიგრძის მქონე სინათლის შთანთქმა, რომლის გამოსხივებაც შეუძლია ამავე ატომებს აგზნების შემთხვევაში.

ცნობილია, რომ მოცემული ელემენტის თავისუფალ ატომებს (ე.ი. ისეთ ატომებს, რომლებიც არ არის რაიმე ქიმიურ ბმაში) აქვს ენერგეტიკულ დონეთა მხოლოდ მათთვის დამახასიათებელი სისტემა, რომლითაც ისინი მკვეთრად განსხვავდებიან სხვა ელემენტების ატომებისაგან. ატომები აუცილებლად იმყოფებიან ენერგეტიკულ დონეებზე და მათი გადასვლა ერთი დონიდან მეორეზე ხდება ნახტომისებრ.

ილუსტრაცია 6. ატომის გადასვლის სქემა ერთი ენერგეტიკული დონიდან მეორეზე



ნახ. 1

თუ ატომი გადადის ზედა ენერგეტიკული დონიდან E_2 ენერგიით ქვედა ენერგეტიკულ დონეზე E_1 ენერგიით (ილუსტრ. 6), მაშინ იგი გამოასხივებს სინათლის კვანტს, რომლის სიხშირე განისაზღვრება ბორის ცნობილი ფორმულით:

$$E_2 - E_1 = h\nu \quad (1)$$

სადაც ν გამოსხივებული სინათლის სიხშირეა წმ⁻¹, ხოლო h – პლანკის მუდმივა ($h=6.63 \times 10^{-34}$ ჯ.წმ).

იმისათვის, რომ ატომი გადავიდეს ქვედა ენერგეტიკული დონიდან ზედა ენერგეტიკულ დონეზე, საჭიროა ატომმა გარედან მიიღოს დონეთა შორის ენერგიათა სხვაობის ტოლი ენერგია. თუ ენერგიის ეს შევსება ხდება ატომის მიერ სინათლის შთანთქმის შედეგად, მაშინ შთანთქმული სინათლის კვანტის ენერგია განისაზღვრება ისევ (1) ფორმულით.

თუ როგორ არის განაწილებული ატომები ენერგეტიკული დონეების მიხედვით, ე.ი. როგორია დონეების დასახლება, გვაძლევს ბოლცმანის ფორმულა:

$$\frac{N_i}{N_0} = \exp(-\varepsilon_i / kT) \quad (2)$$

სადაც N_i არის ატომების რიცხვი ჩვენთვის საინტერესო i -ურ ენერგეტიკულ დონეზე, ხოლო N_0 – ატომის რიცხვი ძირითად, ანუ ნულოვანი ენერგიის მქონე დონეზე, ε_i – ჩვენთვის საინტერესო ენერგეტიკული დონის შესაბამისი ენერგია, T – აბსოლუტური ტემპერატურა გარემოში, სადაც იმყოფებიან გამოსაკვლევი ატომები, e – ნეპერის რიცხვი, k – ბოლცმანის მუდმივა.

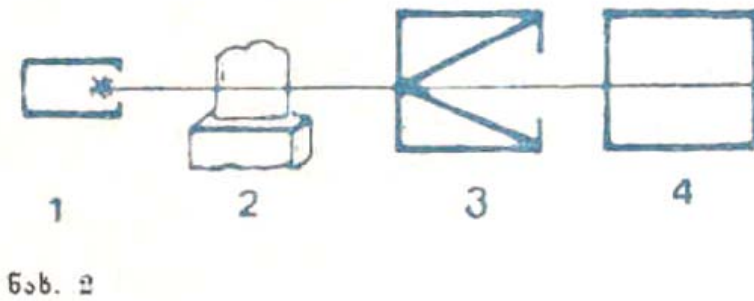
ბოლცმანის ფორმულის თანახმად, ატომთა უდიდესი ნაწილი იმყოფება ძირითად ენერგეტიკულ დონეზე. ტემპერატურის გაზრდით ზედა დონეების დასახლება იზრდება, მაგრამ მათი რაოდენობა ატომთა მთლიან რაოდენობასთან შედარებით მაინც უმნიშვნელოა. მაგალითად, 2000 °C ტემპერატურის დროს (დაახლოებით ასეთი ტემპერატურა აქვს აცეტილენ-ჰაერის ალს) პირველ აგზნებულ დონეზე თუთიის (Zn) ატომებისათვის

$$\frac{N_i}{N_0} = 7 \cdot 10^{-15}$$

ხოლო კალციუმის (Ca) ატომებისათვის –

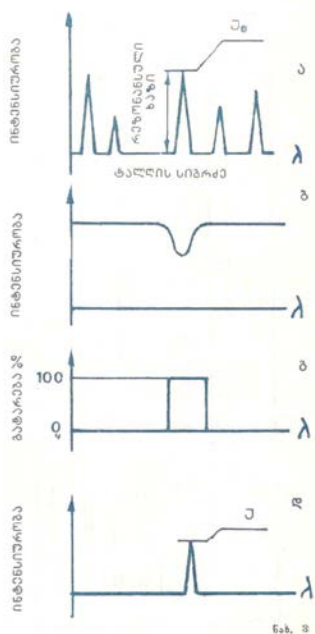
$$\frac{N_i}{N_0} = 1 \cdot 10^{-7}$$

ილუსტრაცია 7. აას სპექტრომეტრის სქემა



ატომურ-აბსორბციული ხელსაწყოს ძირითადი ნაწილებია: სინათლის წყარო (1), რომლის დანიშნულებაც მოგვცეს განსასაზღვრავი ელემენტის გამოსხივების სპექტრის მქონე სინათლე; ატომიზატორი (2), რომელსაც თავისუფალი ატომების მდგომარეობაში გადაჰყავს მასში ხსნარის სახით შეტანილი (შესხურებული) გამოსაკვლევი ნიმუში. იგი უმრავლეს შემთხვევაში წარმოადგენს ჩვეულებრივ აცეტილენ-ჰაერის ალს; მონოქრომატორი (3), რომლის დანიშნულებაც მასში გამავალი სინათლიდან გამოყოს მოცემული ელემენტის გასაზომად გამოყენებული სპექტრული ხაზის შემცველი სპექტრული უბანი; სინათლის მიმღები და მისი ინტენსიურობის საზომი მოწყობილობა (4).

ილუსტრაცია 8. აას გაზომვის პროცესის სქემა



ილუსტრ. 8ა-ზე მოცემულია სინათლის წყაროს მიერ გამოსხივებული სინათლის, ანუ განსასაზღვრავი ელემენტის, გამოსხივების სპექტრის მაგალითი (აქ მთლიანი ოპტიკური სპექტრის მცირე ნაწილია). ატომიზატორში, ატომებად დაშლილი იმავე ელემენტის შთანთქმის სპექტრში (**ილუსტრ.** 8ბ) გამოსხივების სპექტრის მრავალი ხაზის მაგივრად ერთი ხაზია. საერთოდ, ატომების გამოსხივების სპექტრული ხაზების რიცხვი დაახლოებით 100-ჯერ მეტია ამავე ელემენტის ატომების შთანთქმის ხაზებზე, რის გამოც სხვა ელემენტებისაგან გამოწვეული ოპტიკური დაბრკოლება ატომურ-აბსორბციულ სპექტროსკოპიაში პრაქტიკულად არა გვაქვს, რაც ამ მეთოდის ერთ-ერთ ღირსებად ითვლება.

ემისიური და აბსორბციული ხაზების ეს თანაფარდობა შეიძლება შემდეგნაირად აიხსნას: ვინაიდან ემისიური ხაზები მიიღება ატომების გადასვლით ზედა ენერგეტიკული დონიდან ქვედაზე, ამიტომ ამ ხაზების რიცხვი განისაზღვრება ასეთი გადასვლების ყველა შესაძლო ვარიანტის რიცხვით. ზედა აგზნებული დონიდან ატომი შეიძლება გადავიდეს ნებისმიერ ქვედა დონეზე, თუ არ ჩავთვლით ე.წ. აკრძალულ გადასვლებს. ასევე მომდევნო ქვედა დონიდან ატომი შეიძლება გადავიდეს ნებისმიერ შემდეგ ქვედა დონეზე და ა.შ.

აბსორბციული ხაზი მიიღება ატომის გადასვლით ქვედა ენერგეტიკული დონიდან ზედაზე, მაგრამ როგორც უკვე აღნიშნული იყო, ატომები პრაქტიკულად იმყოფება ძირითად ენერგეტიკულ დონეზე, ამიტომ შთანთქმის სპექტრში იქნება მხოლოდ ის სპექტრული ხაზები, რომლებიც შეესაბამება ატომების გადასვლას ძირითადი ენერგეტიკული დონიდან რომელიმე ზედა დონეზე. შთანთქმის ხაზები, რომლებიც შეესაბამება აგზნებული დონიდან გადასვლას ზედა დონეზე, შთანთქმის სპექტრში პრაქტიკულად არ იქნება. სპექტრულ ხაზებს, რომელთა წარმოშობაში მონაწილეობს ძირითადი ენერგეტიკული დონე, ე.ი. რომლებიც იმყოფება როგორც ემისიურ, ისე შთანთქმის სპექტრში, ეწოდება რეზონანსული ხაზები.

მონოქრომატორის მიერ მთლიანი სპექტრიდან გამოყოფილი სპექტრული უბნის **ილუსტრ.** 8გ გარეთ მონოქტომატორი სინათლეს არ ატარებს. **ილუსტრ.** 8დ-ზე მოცემულია სინათლის წყაროს მიერ გამოსხივებული სინათლის სპექტრი

ატომიზატორისა და მონოქრომატორის გავლის შემდეგ. როგორც ჩანს, მონოქრომატორმა პირველად (სინათლის წყაროს) სინათლეს ჩამოაშორა ყველა არარეზონანსული ხაზი და დატოვა მხოლოდ რეზონანსული ხაზი, რომლის ინტენსიურობა შემცირებულია ატომიზატორში მყოფი ატომების მიერ შთანთქმის გამო. ატომიზატორში მყოფი მშთანთქმელი ატომების რაოდენობაზეა დამოკიდებული რეზონანსული ხაზის ინტენსიურობის შემცირების სიდიდე. ლამბერტი ბერის კანონი ამყარებს დამოკიდებულებას ატომიზატორში შემავალი და გამავალი სინათლის ინტენსიურობებსა და მშთანთქმელი ატომების კონცენტრაციას შორის:

$$C \sim \lg(I_0/I) = D \quad (3)$$

სადაც C არის საძიებელი ატომების კონცენტრაცია, I_0 – რეზონანსული ხაზის ინტენსიურობა ნათურის გამოსხივების სპექტრში მის შთანთქმამდე ატომიზატორში, I – რეზონანსული ხაზის ინტენსიურობა ატომიზატორის გავლის შემდეგ, D – ოპტიკური სიმკვრივე, რომელსაც ხელსაწყო გვაძლევს I_0 და I სიდიდეების გაზომვის საფუძველზე. როგორც (3) ფორმულა გვიჩვენებს, საძიებელი კონცენტრაცია პროპორციულია ოპტიკური სიმკვრივისა, რომელსაც ხელსაწყო ზომავს. ამიტომ კონცენტრაციის ზუსტად გასაგებად (გასაზომად) ხმარობენ ე.წ. შედარების ხერხს, რაც შემდეგში მდგომარეობს: დასაწყისში აწარმოებენ ხელსაწყოს გრადუირებას, რისთვისაც ზომავენ ოპტიკურ სიმკვრივეებს გასაზომი ელემენტის ცნობილი კონცენტრაციების შემცველი ხსნარებისათვის. საზომი ელემენტის კონცენტრაციების ჩვენ მიერ დამზადებულ ეტალონური ხსნარები უნდა მოიცავდეს საკმაოდ ფართო კონცენტრაციულ არეს იმ ვარაუდით, რომ ელემენტის კონცენტრაცია საკვლევ ნიმუშში მოთავსდეს ამ არეში.

AAS გაზომვები ბაქტერიებში მთლიანი ქრომის და თუთიის შემცველობაზე ტარდებოდა ხელსაწყოზე Analyst 800, (Perkin Elmer) (აცეტილენ-ჰაერის ალში). ელემენტების დეტექტირება ხდებოდა შემდეგი ტალღის სიგრძის მქონე სინათლეზე: ქრომის 357.9 ნმ-ზე, Zn-ის 213.8 ნმ-ზე, Cu-ის 324.7 ნმ-ზე, Ni-ის 232.0 ნმ-ზე, Mn-ის 279.5 ნმ-ზე. ამ ელემენტების განსაზღვრის მგრძნობიარობა (აპარატურის დეტექციის ზღვარი) შეადგენდა შესაბამისად Cr-3 მკგ/ლ; Zn-1,5 მკგ/ლ; Cu-1,5 მკგ/ლ; Ni-6,0 მკგ/ლ; Mn-1,5 მკგ/ლ.

3.3. აგაროზას გელზე ელექტროფორეზი

ელექტროფორეზი არის ცილებისა და ნუკლეინის მჟავების შესწავლის ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი მეთოდი. თანამედროვე კვლევებში, რომლებშიც შეისწავლება ცილებისა და ნუკლეინის მჟავების თვისებები და ფუნქციები, სხვა მეთოდებთან ერთად, ფაქტობრივად, ყოველთვის გამოიყენება ელექტროფორეზიც. აღნიშნული მეთოდი საშუალებას იძლევა ერთმანეთისგან დავაცალკეოთ მაკრომოლეკულები ისეთი ძირითადი პარამეტრების მიხედვით, როგორიცაა ზომა, მოლეკულური მასა, სივრცითი კონფიგურაცია, მეორეული სტრუქტურა და ელექტრული მუხტი. მეთოდის არსი შემდეგში მდგომარეობს: მაკრომოლეკულებს, რომლებიც იმყოფებიან ბუფერულ ხსნარში, აქვთ ჯამური ელექტრული მუხტი, რომლის სიდიდე და მნიშვნელობა დამოკიდებულია გარემომცველი არის pH-ზე. იმ შემთხვევაში თუ ამგვარ ხსნარში, რომელსაც წინასწარ მოვათავსებთ საიზოლაციო მასალის მილში (დავუშვათ, მინის მილში) და მასში გავატარებთ ელექტრულ დენს, მაშინ მილაკის გასწვრივ წარმოიქმნება განსაზღვრული ძაბვის გრადიენტი, ანუ ჩამოყალიბდება ელექტრული ველი. მისი დამაბულობა იზომება მილაკის ბოლოებს შორის პოტენციალთა სხვაობის შეფარდებით მილაკის სიგრძეზე (ვოლტი/სმ). წარმოქმნილი ველის მოქმედებით მაკრომოლეკულები თავიანთი სუმარული (ჯამური) მუხტით მიგრირებენ კათოდის ან ანოდის მიმართულებით. ამ დროს ხახუნი, რომელიც წარმოიქმნება მაკრომოლეკულებსა და გარემომცველ არეს შორის, ზღუდავს მიგრაციის სიჩქარეს. ზომებისა და მუხტის სიდიდის მიხედვით, მაკრომოლეკულებს ენიჭებათ სხვადასხვა სიჩქარე. თანდათან საწყისი პრეპარატი, შედგენილი სხვადასხვა მოლეკულისაგან, იყოფა ერთნაირი მოლეკულების ზონებად, რომლებიც მოძრაობენ ერთი და იმავე სიჩქარით. გარკვეული დროის განმავლობაში აღნიშნული ზონები ნაწილდებიან მილაკის მთელ სიგრძეზე.

უმარტივესი ელექტროფორეზის აპარატის ძირითად კომპონენტებს წარმოადგენს ორი ელექტროდი, (რომლებიც წარმოადგენენ პლატინის მავთულებს) და ამ ელექტროდების რეზერვუარები. რეზერვუარებში მოთავსებული ბუფერული ხსნარებისა და მილაკის საშუალებით ორ ელექტროდს შორის იკვრება ელექტრული

წრედი. თანამედროვე აპარატებში მილაკი ივსება გელით. გელის ჰიდროფილური და სივრცობრივი ცხაური აბრკოლებს სითხის ჩამოდვრასა და კონვექციას. გელში, რომელიც შეიცავს 80-99,5% წყალს, მიგრირებენ მაკრომოლეკულები და ამავე დროს ეჯახებიან გელის პოლიმერის ძაფებს. ეს პროცესი ზრდის ხახუნს და ამცირებს მიგრაციის სიჩქარეს. თუ გელის ცხაურის სივრცობრივი უჯრედების საშუალო დიამეტრი აღმოჩნდება მაკრომოლეკულის ტოლი, მაშინ მიგრაციის სიჩქარე ძალზე ეცემა და შესაძლებელია საერთოდ შეწყდეს, თუ ცილის ან ნუკლეინის მჟავას მოლეკულის სიდიდე განსაკუთრებით დიდია.

ჩვენს კვლევაში ელექტროფორეზის ჩასატარებლად ვიყენებდით აგაროზას გელს. აგაროზა წარმოადგენს ხაზოვანი პოლისაქარიდის – აგარის განსაკუთრებულად გასუფთავებულ ფრაქციას. აგარი მიიღება ზოგიერთი სახის ზღვის წყალმცენარეებიდან. საქაროზას პოლიმერში მონაცვლეობენ β -D- გალაქტოპირანოზა და 3,6 –ანჰიდრო- α -L – გალაქტოპირამოზა. აგაროზის მოლეკულური მასაა 104 — 105. გელის წარმოქმნა ხდება სივრცობრივ ცხაურში ძაფების გადაბმით იონებს შორის არსებული წყალბადური ბმების ხარჯზე. 84 – 96°C ტემპერატურაზე (ზოგიერთი სახის აგაროზისათვის 70°C-ზე) აგაროზას ხსნარი გარდაიქმნება გამჭვირვალე სითხედ, ანუ ლღვება. აგაროზას ხსნარი გამყარებისას წარმოქმნის გელს, ეს ხდება 36–42°C ტემპერატურაზე. შემდეგ შეაცხელებენ, რასაც მოსდევს გაგრილება 50-55°C და ჩასხმა სათანადო ყალიბში. აღსანიშნავია, რომ იგი არ განიცდის თერმულ დეფორმაციებს. გაღლობა და გელის წარმოქმნა დამოკიდებულია აგაროზაში მეტოქსი ჯგუფების შემცველობაზე, რომელთა რაოდენობაც 3-4% აღწევს. ამ ჯგუფების არსებობა აფერხებს გელის წარმოქმნის პროცესს. აგაროზა შეიცავს გოგირდმჟავა ეთერსაც. მათი არსებობა გავლენას ახდენს არა მხოლოდ ლღობასა და გელის წარმოქმნაზე, არამედ თავად ელექტროფორეზის მიმდინარეობის პროცესზე. კონკრეტულად ისინი პასუხისმგებლები არიან ე.წ ენდოსმოსის პროცესზე, რომელიც ხდება ელექტროფორეზის მიმდინარეობისას. ამ პროცესის არსი შემდეგია: უარყოფითად დამუხტული გოგირდმჟავას ნაშთი მკვიდრად უკავშირდება აგაროზას პოლიმერის ძაფებს. შესაბამისად, დადებითად დამუხტული იონები ამ დროს იმყოფებიან წყლის ფაზაში და ელექტრული ველის მოქმედებით

მიგრირებენ კათოდის მიმართულებით. მათ ადგილს იკავებენ ანოდიდან მომავალი კათიონები. წარმოიქმნება დამატებითი დენი ძლიერ ჰიდრატირებული კათიონებისა, რომლებიც ქაჩავენ გელში არსებულ წყლის მასას და მასთან ერთად გელის წყლოვან ფაზაში გახსნილ მაკრომოლეკულებს. ისინი დრეიფობენ (მიყვებიან) ხსნარს და ხდება ამ მოძრაობის თანხვედრა მოძრაობასთან, რომელიც გამოწვეულია ელექტრული ველით. აგაროზის გელში ელექტროფორეზისას იყოფიან უარყოფითად დამუხტული მაკრომოლეკულები, რომლებიც მიგრირებენ ანოდისკენ. ენდოსმოსი მიმართულია საწინააღმდეგო მიმართულებით და აუარესებს დაყოფის ხარისხს. აგაროზას კომერციულ პრეპარატებში სულფატების შემცველობა არ აღემატება 0.5%-ს. აგაროზას პრეპარატები, რომლებიც ხასიათდებიან სუსტად გამოხატული ენდოსმოსით, შეიცავენ 0.3%-ზე ნაკლებ სულფატს. თუ საჭიროა აგაროზას გასუფთავება სულფატის იონისაგან, იგი მუშავდება 0.05%-იან ნატრიუმის ბოროჰიდრატის 1M NaOH და გამოილექება/დაილექება 50%-იანი ეთანოლით. პროცესის მიმდინარეობაზე დაკვირვების მიზნით, საკვლევ პრეპარატს უმატებენ საღებავს, რომელსაც ელექტრული მუხტის ისეთივე ნიშანი აქვს, როგორიც დასაყოფ მაკრომოლეკულებს. საღებავი და მაკრომოლეკულები ერთმანეთთან არ რეაგირებენ. საღებავი გადაადგილდება ელექტრულ ველში შეღებილი ზონის სახით. საღებავი იმდაგვარადაა შერჩეული, რომ დასაყოფი მაკრომოლეკულების მიგრაციის სიჩქარე საღებავის მოლეკულების მიგრაციის სიჩქარეზე დაბალი იყოს. როდესაც შეღებილი ზონა მიაღწევს მილაკის (აგაროზას გელის) ბოლოს, ელექტროფორეზი დასრულებულად ითვლება.

თანამედროვე ელექტროფორეზის აპარატებში ცილინდრული შუშის მილაკების ნაცვლად გამოიყენება შუშის თხელი ფირფიტები, რომელთა შორის ასხამენ გელს. ასეთი გელების უპირატესობა ისაა, რომ მათზე შეიძლება ერთდროულად დაიყოს რამდენიმე პრეპარატი. ჩვეულებრივ, პრეპარატები დაიტანება გელის კიდედან დაწყებული, მის გასწვრივ ერთმანეთისგან თანაბარ მანძილებზე. თითოეული პრეპარატი ელექტრულ ველში იყოფა ცალ-ცალკე, მეზობელი პრეპარატებისგან დამოუკიდებლად და წარმოქმნის საკუთარ დაყოფილ ზონებს. თითოეულ ასეთ ზონაში შეღებილი ხაზების სახით შეიმჩნევა სხვადასხვა სიდიდის დაყოფილი ოლიგონუკლეოტიდები. ფირფიტაზე

ელექტროფორეზს კიდევ ერთი უპირატესობა აქვს: გელი ისხმება ერთდროულად, ანუ ბუფერის კონცენტრაცია, შემადგენლობა და ყველა სხვა დანამატის შემცველობა ერთნაირია გელის ნებისმიერ მონაკვეთში. შესაბამისად, ერთნაირი იქნება ელექტრული ველის რეჟიმი. ზემოაღნიშნული შესაძლებლობას იძლევა გელზე დატანილ ყველა პრეპარატს შევუქმნათ ერთნაირი პირობები, რაც აადვილებს მათ შედარებასა და მართებული დასკვნების გაკეთებას.

აგაროზას გელი მზადდება აგაროზას ფხვნილის გახსნით შესაბამის ბუფერში, როგორც არის TAE (Tris/Acetate/EDTA) ან TBE (Tris/Borate/EDTA). აგაროზას გელი ცხელდება თითქმის დუდილის ტემპერატურამდე. ადულებამდე მიყვანილი გელის გაცივების შემდეგ, (სანამ იგი გადავა ჟელესმაგვარ მდგომარეობაში) ვამატებთ საღებავ ეთიდიუმ ბრომიდს (EtBr). გაგრილებულ მდგომარეობაში მყოფ თხევად მასას ვასხამთ ფორეზის გამშვებ ფირფიტაზე, სადაც წინასწარ მოთავსებული გვაქვს „სავარცხელი“, რათა უზრუნველვყოთ ნიმუშების შესატანი ადგილების („ორმოების“) გამოყოფა. ფორეზის კარგად წარმართვისათვის დიდი მნიშვნელობა ენიჭება აგაროზას გელის კონცენტრაციას. სტანდარტული ელექტროფორეზისათვის 0,8% იანი გელი ითვლება ოპტიმალურად 5-10kb დნმ-ის ფრაგმენტების ვიზუალიზაციისათვის, მაშინ როდესაც 2%-იანი გელი გამოიყენება პატარა 0,2-1kb ფრაგმენტების დასაცალკეებლად. ყველაზე ხშირად კი იყენებენ 1%-იან აგაროზას გელს.

დასხმული გელის კარგად გაცივების შემდეგ, ვაცილებთ „სავარცხელს“ და „ორმოების“ ადგილზე პიპეტით ფრთხილად შეგვაქვს ექსტრაგირებული დნმ-ნიმუშები. აღნ. ნიმუშებს გელის „ორმოებში“ შეტანამდე ვურევთ Loading Buffer-ს რაც თავისთავად შეიცავს საღებავს (მაგ green buffer, ან bromophenol blue) და სიმკვრივის მოსამატებელ რაიმე ნივთიერებას მაგ. გლიცეროლს, რათა ნიმუში კარგად ჩაიყურსოს გელში და არ მოხდეს მისი გაფანტვა ზემოდან დასხმულ ბუფერში. ამის შემდეგ ხდება აპარატზე ძაბვის მოდება (60-120 V).

ორივე გენომური და პლაზმიდური დნმ სისუფთავე შემოწმდა 1.0 %-იან აგაროზას გელზე ელექტროფორეზით (Promega). ელექტროფორეზი წარიმართა 1x TBE (Tris-Borate EDTA) ბუფერში, რომელშიც შეგვქონდა 1µg/ml ეთიდიუმ ბრომიდი (EtBr).

ელექტროფორეზის შემდეგ დნმ-ის „ბენდების“ ვიზუალიზაციას და ფოტოგრაფირებას ვახდენდით ულტრაიისფერი სინათლის ქვეშ ციფრული კამერით (DSC-S600, Sony).

გენომური და პლაზმიდური დნმ-ის გამოყოფა

გენომური დნმ გამოვყავით ფენოლ-ქლოროფორმის მოდიფიცირებული მეთოდით: 5.4 მლ ბაქტერიული უჯრედების სუსპენზიის ცენტრიფუგირების შემდეგ (12,000g 5-წთ განმავლობაში), უჯრედული ნალექი რესუსპენდირდა 570 μ l TE ბუფერში (10mM Tris-HCl, pH7.0, 1mM Na₂EDTA), შემდეგ დაემატა 30 μ l 10% -იანი SDS და 3 μ l პროტეინაზა K (20 მგ/მლ) და ინკუბირდა 37 °C-ზე 2 საათის განმავლობაში, ცილის ნარჩენების მოსაცილებლად. ინკუბაციის შემდეგ დაემატა 100 μ l 5M NaCl და თანაბარი მოცულობა ქლოროფორმი, რის შემდეგ კვლავ დავაცენტრიფუგეთ. ცენტრიფუგირების შემდეგ, სუპერნატანტს ვიღებდით და ვათავსებდით თანაბარ მოცულობა ფენოლ/ქლოროფორმთან (1:1). დნმ გამოვლექეთ 0.6 V იზოპროპანოლით 30წთ 16,000 g ზე დაცენტრიფუგირების შემდეგ. ნალექი გაირეცხა 70% -იანი ეთანოლით, გაშრა და გაიხსნა 200 μ l 10mM Tris-HCl -ში (pH 7.0).

პლაზმიდური დნმ გამოვყავით 100 მლ უჯრედული სუსპენზიიდან მოდიფიცირებული ტუტე ლიზისის მეთოდით Brandsch & Decker-ის მიხედვით (17) და ასევე 3 მლ უჯრედული სუსპენზიიდან Qiagen-ის კრებულით (Plasmid DNA purification using the QIA prep spin Miniprep Kit and a Microcentrifuge).

რესტრიქციული ანალიზი

რესტრიქციული ანალიზისთვის გამოყენებული იქნა 3 სხვადასხვა რესტრიქციული ფერმენტი (EcoR I, Bam H I, Hind III) სტანდარტული პროტოკოლის მიხედვით. დნმ-ის ფრაგმენტების დასაცალკევებლად გამოყენებული იქნა ელექტროფორეზი (0,8% აგაროზას გელი, 80 ვოლტი).

შედეგები

თავი 1. *Arthrobacter oxydans* -ის მიერ Cr(V)-ნაერთების გარდაქმნა Cr(III)-ის ნაერთებად

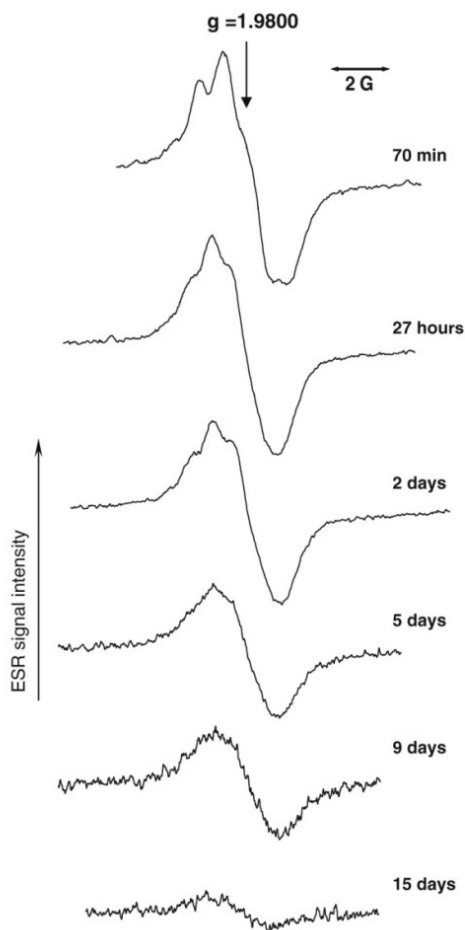
1.1. Cr(III)-ის ფორმირება *A. oxydans*-ის ლიოფილიზირებულ უჯრედებზე Cr(VI)-ის ზემოქმედების შემდეგ.

აღმოვაჩინეთ, რომ Cr(VI)-ის ნაერთები იოლად გარდაიქმნებიან Cr(V)-დიოლ შემცველ ნაერთებად გრამდადებითი ბაქტერია *Arthrobacter oxydans*-ის უჯრედის ზედაპირზე, რომლებიც შემდეგ აღდგებიან Cr(III) ნაერთებად. აღნიშნული ბაქტერიები გამოყოფილია აშშ-ს ძლიერად დაბინძურებული ტერიტორიიდან: კოლუმბიის ბაზალტის ქანებიდან.

კვლევა ჩატარდა ელექტრონული პარამაგნიტური რეზონანსის (ეპრ) გამოყენებით. Cr(III) ჰიდროქსიდის ფორმირება Cr(V)-დიოლებიდან ბაქტერიული შტამის *Arthrobacter oxydans*-ის გამოყენებით მიმდინარეობდა პირობებში, როდესაც Cr(VI); 35, 200 და 400 მგ/ლ კონცენტრაციებით მოქმედებდა აერობულ გარემოში არსებულ ბაქტერიების თხევად კულტურაზე და ლიოფილიზირებულ უჯრედებზე. (ეპრ) დრო-დამოკიდებულმა კვლევებმა გვიჩვენა, რომ Cr(III)-ის ნახევრადწარმოქმნის დრო თითქმის თანაბარია Cr(V)-ის გარდაქმნის დროსი, რომელიც მერყეობს 3-დან 6 დღემდე. Cr(III)-ის წარმოქმნის სიჩქარე არის 300-ჯერ უფრო ნელი, ვიდრე Cr(V)-ის წარმოქმნის პროცესი. დამატებით ატომურ-აბსორბციული სპექტროფოტომეტრი იქნა გამოყენებული ბაქტერიულ უჯრედებში მთლიანი ქრომის შემცველობის განსაზღვრისათვის დროის სხვადასხვა მონაკვეთში. გამოთვლილ იქნა Cr(III)-ის ნაერთების წარმოქმნის კინეტიკა. სხვადასხვა კონცენტრაციის ქრომატის ხსნარში მოთავსებულმა *A. oxydans*-ის უჯრედებმა, რამდენიმე წუთში უკვე მოგვცა ეპრ სიგნალი, რომლის გ-ფაქტორი 1.980-ის ტოლია, ხოლო ხაზის სიგანე-12 გაუსი და შეესაბამება Cr(VI)-ის სწრაფ გადასვლას Cr(V)-ში. სისტემა *A. oxydans*-ში Cr(V)-ის შემდგომი ქცევები

და მისი დრო-დამოკიდებული გარდაქმნა Cr(III)-ად წარმოდგენილია 1, 2, 3 და 4 გრაფიკებზე.

გრაფიკი 1: Cr(V)-ის ცვლილების დინამიკის ეპრ სპექტრები, რეგისტრირებული სისტემაში 400 მგ/ლ Cr(VI) – *A. oxydans* ის უჯრედები. ეპრ სპექტრები გადაღებულია ბაქტერიული ნიმუშების ქრომატის ხსნარში მოთავსებიდან 70 წთ, 27 სთ, 2, 5, 9 და 15 დღის შემდეგ. ეპრ გაზომვები ჩატარდა 1 მმ დიამეტრის მქონე კვარცის კაპილარში, ოთახის ტემპერატურაზე. გაზომვის პირობები: მაგნიტური ველის სიდიდე = 3300 გაუსი, მაგნიტური ველის გაშლის სიდიდე – 100 გაუსი, სკანირების დრო = 3 წთ, მოდულაციის ამპლიტუდა = 0.2 გაუსი

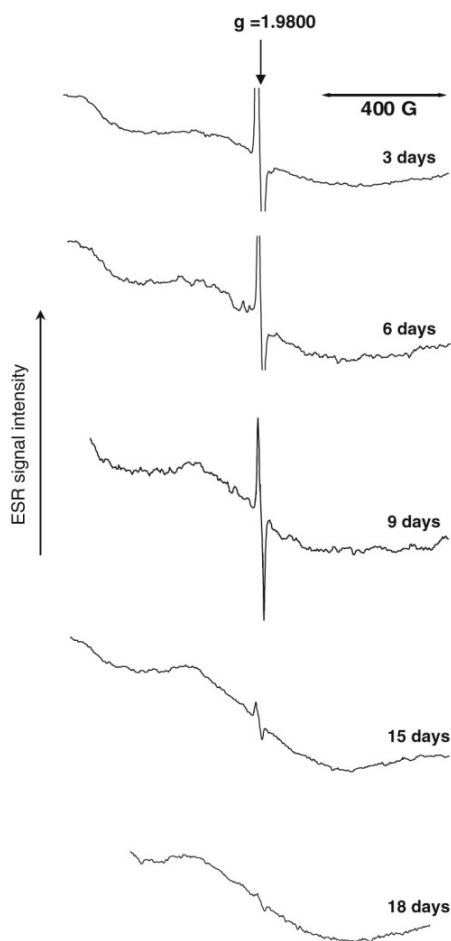


გრაფიკი 1-ზე წარმოდგენილია *A. oxydans*-ის უჯრედებში რეგისტრირებული Cr(V)-ის ცვლილების დინამიკა ორი კვირის განმავლობაში. ეპრ სიგნალები ჩაწერილია

ბაქტერიებზე 400 მგ/ლ Cr(VI) ქრომატის ხსნარის მოქმედების დასაწყისიდან დროის სხვადასხვა მომენტში. ამასთან, ჩვენი ექსპერიმენტული მონაცემები ცხადყოფენ, რომ საკვლევ ბაქტერიულ სისტემაში ოქსო Cr(V)-დიოლების შემდგომი ტრანსფორმირება მნიშვნელოვნად ნელი პროცესია: Cr(V)-ის ეპრ სიგნალი მისი პირველი დაფიქსირებიდან 2 კვირის შემდეგაც დაიშორება. გრაფიკი 1-ზე შესაძლებელი გახდა დაგვენახა Cr(V)-ის ეპრ-ხაზის ზენაზი სტუქტურა (დაახლ. 1G), რაც დამახასიათებელია Cr(V)-ის ნაერთების დიოლ-შემცველ მოლეკულაში წყალბადთან ახლოს არსებული ზენაზი ურთიერთქმედებებისთვის (68). გრაფიკი 1-ზე ნაჩვენებია Cr(V) ეპრ სიგნალის ინტენსივობა, Cr(V)-დიოლების კონცენტრაციის პროპორციულია, არის საკმაოდ სტაბილური და ხშირად რამოდენიმე დღე გრძელდება. ჩვენმა მონაცემებმა აჩვენა, რომ ოქსო Cr(V)-დიოლების შემდგომი თანმიმდევრული აღდგენა, აღნიშნულ ბაქტერიულ სისტემებში საგრძნობლად ნელი პროცესია. მაგალითისთვის, Cr(V) ეპრ სიგნალი არ გამქრალა ორ კვირამდე.

შემდგომ ექსპერიმენტებში, ეპრ სპექტრის გადაღებისას მაგნიტური ველის დიდ ინტერვალში, როგორც ეს გრაფიკი 2-ზეა ნაჩვენები, Cr(V)-ის მკვეთრ სიგნალთან ერთად, დაფიქსირდა განიერი რეზონანსული ხაზი გ-ფაქტორით 2,02 და ხაზის სიგანით 650 გაუსი. აღნიშნული ფართო ეპრ ხაზი შეესაბამება Cr(III)-ის ჰიდროქსიდს (56). ამგვარად, Cr(III)-ის ეპრ სიგნალი ჩვენს ბაქტერიულ სისტემაში ჩნდება Cr(V)-ის რეზონანსული ხაზის დაფიქსირებიდან რამოდენიმე დღის შემდეგ. აქედან გამომდინარეობს რომ *Arthrobacter oxydans*-ს ესაჭიროება რამდენიმე დღე Cr(V)-დან Cr(III)-ის იმ რაოდენობის ტრანსფორმირებისათვის რომელიც საკმარისია მისი დეტექტირებისთვის.

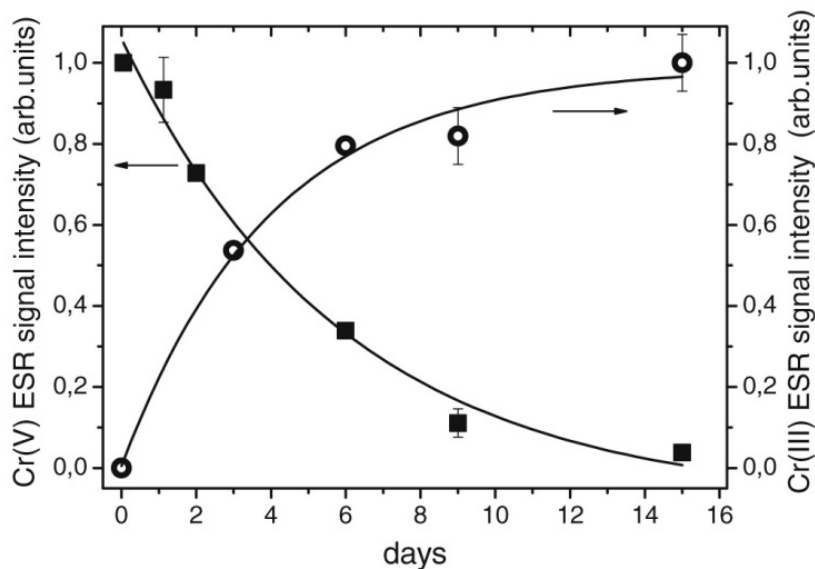
გრაფიკი 2: Cr(III)-ის და Cr(V) ეპრ სპექტრები, სისტემა *A.oxydans*-Cr (VI)-ის ლიოფილიზირებული უჯრედებიდან. სპექტრები რეგისტრირებულია 3, 6, 9, 15 და 18 დღიან ბაქტერიულ ნიმუშებზე 400 მგ/ლ Cr(VI)-იანი ხსნარის ზემოქმედებს შემდეგ. გაზომვები ჩატარდა 1 მმ დიამეტრის მეონე კვარცის კაპილარში ოთახის ტემპერატურაზე. გაზომვის პირობები: მაგნიტური ველის სიდიდე = 3400 გაუსს, მაგნიტური ველის გამლის სიდიდე = 1500 გაუსს, სკანირების დრო = 6 წთ, მოდულაციის ამპლიტუდა = 20 გაუსს.



Cr(III)-ის ეპრ სიგნალის ფარდობითი ინტენსივობის დროზე დამოკიდებულება მოცემულია მე-3 გრაფიკზე. როგორც ამ ნახაზიდან ჩანს Cr(III)-ის რაოდენობა დროის

ყოველი მომენტისათვის იზრდება ზუსტად Cr(V)-ის რაოდენობის შემცირების პროპორციულად. Cr(III)-ის ეპრ სიგნალის ინტენსივობა პროპორციულია Cr(III)-ის კონცენტრაციის. რაც გვამღევს იმის საფუძველს, ვივარაუდოთ, რომ Cr(VI)-ის თითოეულ კონცენტრაციაზე Cr(VI)-ის დიდი ნაწილი ტრანსფორმირდა Cr(III)-ში.

გრაფიკი 3: Cr(V)-ის და Cr(III) ეპრ სპექტრების ფარდობითი ინტენსივობის დროზე დამოკიდებულება, რომლებიც რეგისტრირებულია სისტემაში 400 მგ/ლ Cr(VI)–*A. oxydans*-ის ლიოფილიზირებული უჯრედები. (Cr(V)-ის დაშლის და Cr(III)-ის ფორმირების დროში დამოკიდებულება). გაზომვის პირობები მოცემულია 1 და 2 გრაფიკებთან.



უწყვეტი ხაზით მოცემულია კინეტიკურ მოდელზე დაყრდნობით მიღებული მოდელირების შედეგები. ამ მოვლენის ასახსნელად, ჩვენ ჩავატარეთ Cr(III)-ის წარმოქმნის პროცესის კინეტიკური ანალიზი. ამ მიზნისთვის, გამოყენებული იქნა შემდეგი განტოლება:

$$I_t = I_0 - A \exp(-k_f t) \quad (1)$$

სადაც k_f არის Cr(III)-ის პირველადი წარმოქმნის სიჩქარის მუდმივა (დღე⁻¹), I_t არის Cr(III)-ის ეპრ სიგნალის ინტენსივობა (ფარდ. ერთ.), I_0 არის Cr(III)-ის ეპრ სიგნალის ინტენსივობის მაქსიმალური მნიშვნელობა (ფარდ. ერთ.), A არის ექსპონენციალური

კოეფიციენტი (ფარდ. ერთ.), და t არის დრო (დღეები). Cr(III)-ის წარმოქმნის ნახევარ დრო $(t_{1/2})_{0.5}$ გამოთვლილი იქნა $(t_{1/2})_{0.5} = 0.693 / k_f$ (დღეები). ჩვენი შედეგებიდან მივიღეთ რომ $k_f = 0.12$ დღე⁻¹ და $(t_{1/2})_{0.5} = 5.9$ დღეს.

რომ აღვწეროთ Cr(V)-ის დაშლის (გარდაქმნის პროცესი) *A. oxydans*-ში, ჩვენ გამოვიყენეთ (4) და (56) მონოგრაფიებში გამოყენებული განტოლება, რომელიც გამოყენებული იქნა *Spirodela polyrhiza*-ში და ბაზალტში მობინადრე ბაქტერიაში Cr(V)-ის წარმოქმნის და აღდგენის პროცესის ასაღწერად:

$$I_2 = B \exp(-k_d t) \quad (2)$$

სადაც k_d არის Cr(V)-ის პირველი რიგის გარდაქმნის სიჩქარის კონსტანტა (დაშლის სიჩქარის მუდმივა) (დღე⁻¹), I_2 არის Cr(V)-ის ეპრ სიგნალის ინტენსივობა (ფარდ. ერთ.), B ექსპონენციალის (ფარდ. ერთ.) კოეფიციენტი, და t დრო (დღეები). (2) ტოლობიდან ვღებულობთ:

$k_d = 0.17$ დღე⁻¹ და $(t_d)_{0.5} = 4.0$ დღეს. ამგვარად, Cr(III)-ის კომპლექსის წარმოქმნის და Cr(V)-ის დიოლის დაშლის კინეტიკური ანალიზი გვიჩვენებს რომ $k_f \approx k_d$. აღსანიშნავია რომ ფიტირების მრუდები მიღებულია არაწრფივი „Levenberg-Marquardt“-ის მეთოდის გამოყენებით, (1) და (2) განტოლებების მიხედვით.

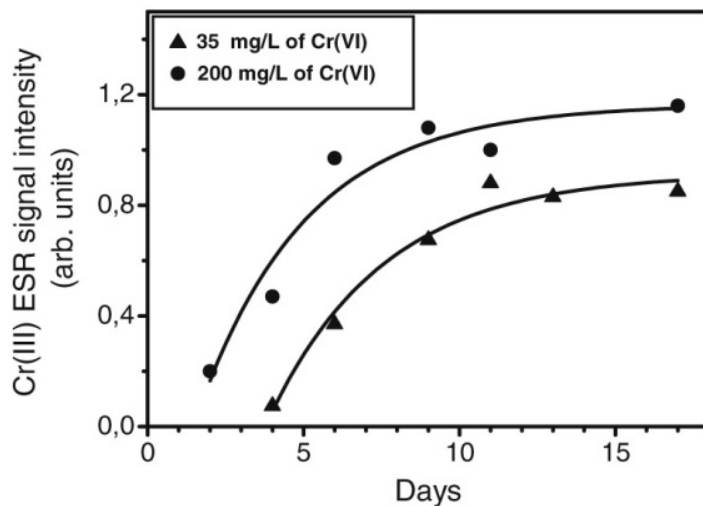
ცხრილი 1. *A. Oxydans*-ზე Cr(VI)-ით მოქმედებისას Cr(III)-ის ფორმირების ნახევარდრო

ბაქტერიული ნიმუშის აღწერა	Cr(VI) -ის კონცენტრაცია [მგ/ლ]	Cr(III)-ის ფორმირების ნახევარდრო ($t_{0.5}$) [დღე]	R^2
ლიოფილიზებული <i>A. oxydans</i> -ის უჯრედები	400	5.9 ± 1.6	0.99
თხევად გარემოში გაზრდილი <i>A. oxydans</i> -ის უჯრედები	200	3.5 ± 1.8	0.95
თხევად გარემოში გაზრდილი <i>A. oxydans</i> -ის უჯრედები	35	3.7 ± 1.7	0.95

1.2. Cr(III)-ის ფორმირება *A. oxydans*-ის თხევად კულტურაზე Cr(VI)-ის ზემოქმედების შემდეგ

ექსპერიმენტების მეორე ნაწილში, უშუალოდ *A. oxydans*-ის თხევად კულტურაში იყო დამატებული ქრომატის ხსნარი. გამოყენებული იყო Cr(VI)-ის როგორც დაბალი (35მგ/ლ) ასევე მაღალი (200მგ/ლ) კონცენტრაციები. Cr(VI)-ის დაბალ კონცენტრაციას ვიყენებდით იმისათვის, რომ უზრუნველგვეყო უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა მთელი ექსპერიმენტის განმავლობაში.

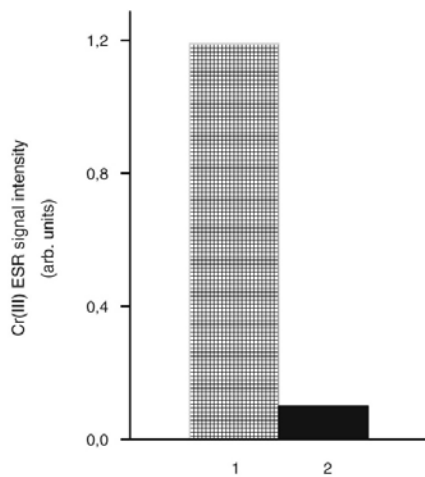
გრაფიკი 4. თხევად გარემოში გაზრდილი *A.oxydans*-ში Cr(III)-ის ფორმირების დროზე დამოკიდებულება. ზრდის სტაციონარულ ფაზაში მყოფი ბაქტერიული უჯრედები განიცდიდნენ 35 ან 200 მგ/ლ Cr(VI) ქრომატის მოქმედებას. ეპრ გაზომვის პირობები იგივეა, რაც იყო მე-2 გრაფიკზე. უწყვეტი ხაზით ნაჩვენებია კინეტიკურ მოდელზე დაყრდნობით მიღებული მოდელირების შედეგები.



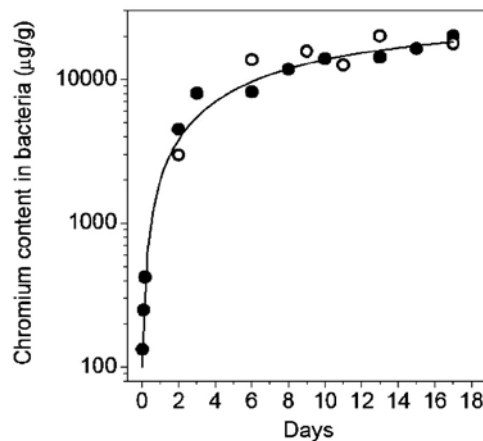
Cr(OH)₃-ის შესამაზისი Cr(III)-ის ეპრ სიგნალი კვლავ დარეგისტრირდა აღნიშნულ ბაქტერიულ უჯრედებში. ამასთან Cr(VI)-ის და ბაქტერიის ხანგრძლივი ურთიერთქმედების შემდეგ Cr(III)-ის ჰიდროქსიდის შესაბამისი სუსტი სიგნალები დაიშვია თხევად გარემოშიც. Cr(III)-ის სხვა ტიპის კომპლექსები არ დაფიქსირებულა არც ბაქტერიის უჯრედებში და არც თხევად გარემოში. მე-4 გრაფიკზე არსებული მონაცემები ცხადყოფს, რომ Cr(III)-ის ჰიდროქსიდის წარმოქმნა *A.oxydans*-ში არის დოზადამოკიდებული და Cr(III)-ის ეპრ სიგნალის ინტენსივობა მაღალია მაღალ დოზებზე (200მგ/ლ) დროის ყველა წერტილში. თუმცა, Cr(III)-ის წარმოქმნის დინამიკა Cr(VI)-ის ორივე დოზის დროს არის მსგავსი ხასიათის, რაც ნაჩვენებია მე-4. გრაფიკზე და ორივე დოზის შემთხვევაში Cr(III)-ის ფორმირების დინამიკა აღიწერება ერთნაირად. Cr(III)-ის წარმოქმნის მუდმივების დასადგენად გამოვიყენეთ ტოლობა (1). მიღებული კინეტიკური სიდიდეები განვათავსეთ ცხრილში #1, საიდანაც ჩანს რომ ყველა შემთხვევისთვის Cr(VI)-დან Cr(III)-ის წარმოქმნას რამდენიმე დღე ესაჭიროება.

გრაფიკი 5: Cr(III)- სიგნალის ინტენსიურობა ბაქტერიულ უჯრედებში (1) და ბაქტერიული უჯრედების გარეთ ხსნარში (2), ბაქტერიული უჯრედების ცივ-ყინულიან Tris-HCl EDTA ბუფერით გარეცხვის შემდეგ. ექსპერიმენტები ჩატარდა ბაქტერიული უჯრედების 200მგ/ლ Cr(VI)-თან 13 დღის განმავლობაში ინკუბირების შემდეგ.

გრაფიკი 6: Cr(III)-ის დაგროვების დროზე დამოკიდებულება თხევად არეში გაზრდილ *A.oxydans*-ის შემთხვევაში. ბაქტერიულ უჯრედებზე ზრდის სტაციონარულ ფაზაში მოქმედებდა Cr(VI) 200 მგ/ლ-კონცენტრაციით. (გამჭვირვალე წრეები „გარეცხილი“ უჯრედებია, შავი წრეები კი – „გაურეცხავი“).



გრაფიკი 5.



გრაფიკი 6.

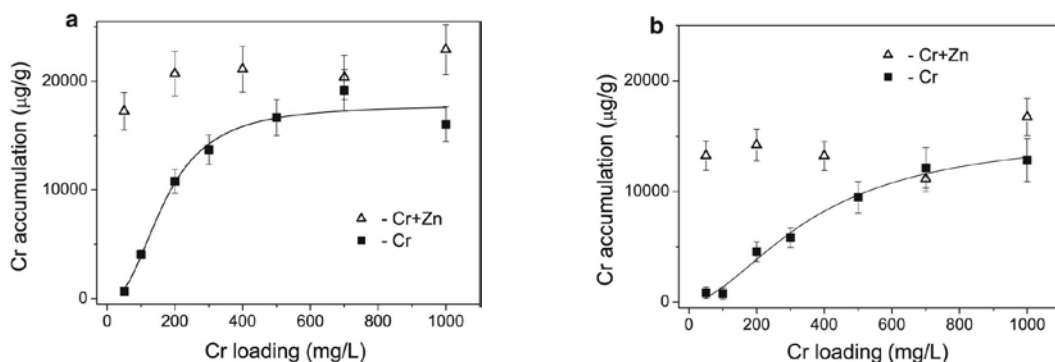
ბაქტერიული უჯრედების ერთი ნაწილი რომელიც 200 მგ/ლ კონცენტრაციის Cr(VI)-ის ხსნარში იყო მოთავსებული, გაირეცხა კარგად, ცივ ყინულიანი Tris-HCl/EDTA ბუფერში, რათა მოგვეცილებინა ბაქტერიის ზედაპირთან დაკავშირებული Cr-ის ნაერთები. ეპრ გაზომვებმა არ გამოავლინა მნიშვნელოვანი განსხვავება გარეცხილ და გაურეცხავ ბაქტერიულ უჯრედების Cr(III)-ის ეპრ სიგნალებს შორის. „გარეცხვის“ ეფექტის საილუსტრაციოდ მე-5 გრაფიკზე წარმოდგენილია ეპრ გაზომვის მონაცემები. ეპრ გაზომვების შემდეგ, გარეცხილი და გაურეცხავი ბაქტერიული ნიმუშები გაზომილ იქნა მთლიანი Cr-ის შემცველობა ატომურ აბსორბციული (AAS) მეთოდით. მე-6 გრაფიკზე

ნაჩვენებია აღნიშნულ ნიმუშებში არსებული მთლიანი ქრომის კონცენტრაციის ცვლილება დროში. იგი აჩვენებს, რომ გარეცხილ უჯრედებში, Cr(VI)-ის მოქმედების პირველ დღეებში, Cr-ის მნიშვნელოვანი რაოდენობა არ ფიქსირდება. დროის გასვლის შემდეგ მთლიანი ქრომის შემცველობა იზრდება და Cr(VI)-ის ხანგრძლივი ზემოქმედების შემდეგ, გარეცხილ და გაურეცხავ უჯრედულ ნიმუშებს შორის ქრომის რაოდენობაში უკვე აღარ არის დიდი განსხვავება.

თავი 2. *Arthrobacter*-ის სახეობის ბაქტერიების მიერ Cr(VI)-ის აღდგენის და აკუმულირების პროცესზე Zn(II)-ის გავლენა.

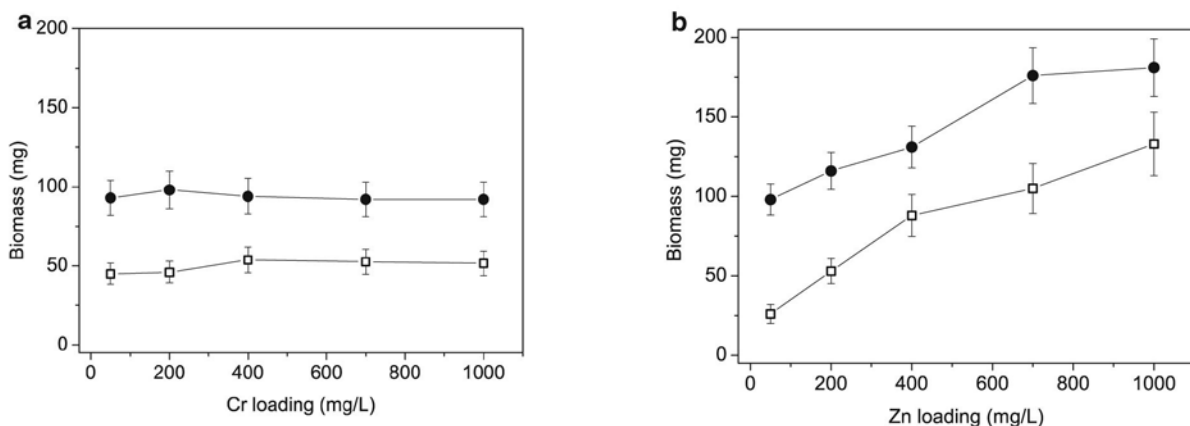
ჩვენი კვლევის შედეგებით ვაჩვენეთ, რომ აერობულ პირობებში ქრომის აკუმულაცია *A.globiformis*-151B-ში და *Arthrobacter sp.* 61B-ში არის დოზაზე დამოკიდებული და მისი დაგროვების ხასიათი საკმაოდ იცვლება Cr(VI)-ის მაღალი კონცენტრაციების დროს (122). სხვა მეტალურ იონებს თავისი სინერგისტული თუ ანტაგონისტური ურთიერთქმედებებით შეუძლიათ Cr(VI)-ის დაკავშირების ეფექტურობაზე უარყოფითი ან დადებითი ზეგავლენის მოხდენა (39). იმისთვის რომ შეგვესწავლა თუთიის გავლენა ბაქტერიების მიერ ქრომის შეთვისების პროცესზე, ექსპერიმენტების I სერიაში ბაქტერიულ უჯრედებს დავუმატეთ 50მგ/ლ-კონცენტრაციის Zn(II). უნდა აღინიშნოს, რომ ექსპერიმენტების ყოველი სერია გავიმეორეთ სულ მცირე 3-ჯერ და გრაფიკებზე წარმოდგენილი მონაცემები არის მიღებული შედეგების საშუალო მნიშვნელობები. აღნიშნული კვლევით გამოვლინდა, რომ Zn(II)-ის დამატება მოცემული კონცენტრაციებით საკვლევ ბაქტერიულ უჯრედებზე მნიშვნელოვნად ზრდის ბაქტერიების მიერ Cr-ის აკუმულირების უნარს.

გრაფიკი 7: ქრომის აკუმულირება *Arthrobacter sp.* 61B-ს (a) და *A. globiformis* 151B-ს (b) მიერ 50 მგ/ლ Zn(II)-ის თანაობისას საკვებ გარემოში.



მე-7 გრაფიკზე, უწყვეტი ხაზით და შავი კვადრატებით ნაჩვენებია Cr-ის შემცველობა *Arthrobacter sp.* 61B (a) და *A. globiformis* 151 B (b)-ში, როდესაც საკვებ გარემოში Cr(VI) შეტანილი იყო სხვადასხვა კონცენტრაციით (50 – 1,000 მგ/ლ), Zn(II)-ის იონების დამატების გარეშე. იგივე მე-7 გრაფიკზე, თეთრი სამკუთხედებით წარმოდგენილია აღნიშნულ ორივე ბაქტერიაში Cr-ის დაგროვების ბუნება, როდესაც ბაქტერიულ უჯრედებზე ქრომთან ერთად დამატებული იქნა 50მგ/ლ კონცენტრაციის Zn(II). როგორც ჩანს 50მგ/ლ Zn(II) ის დამატებამ Cr-ის შეთვისების დონე ბაქტერიებში მნიშვნელოვნად გაზარდა.

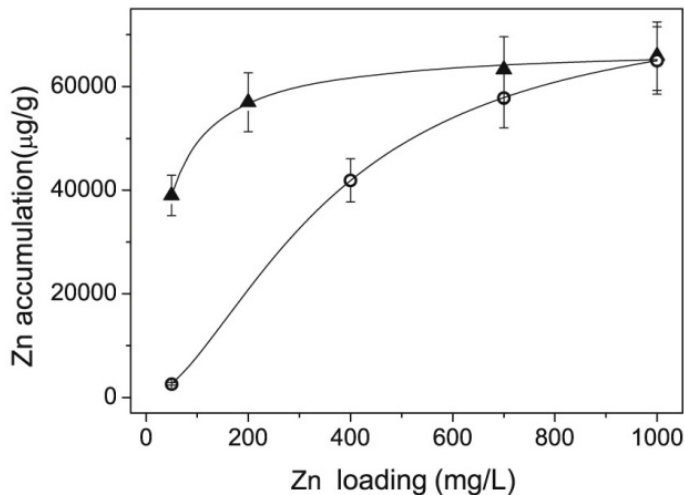
გრაფიკი 8: (a) Cr(VI)-ის კონცენტრაციის გავლენა ბაქტერიების *Arthrobacter sp.* 61 B (შავი წრეები) და *A. globiformis* 151B (თეთრი კვადრატები) ზრდაზე 50 მგ/ლ Zn(II)-ის თანაობისას; (b) Zn(II)-ის კონცენტრაციის ეფექტი *Arthrobacter sp.* 61B (შავი წრეები)-ის და *A. globiformis* 151B (თეთრი კვადრატები)-ის ზრდაზე 100 მგ/ლ Cr(VI)-ის თანაობისას.



ექსპერიმენტების მეორე სერიაში, ბაქტერიულ უჯრედებს დაემატა 100 მგ/ლ Cr(VI), ბაქტერიების საკვები გარემო შეიცავდა Zn(II)-ის სხვადასხვა კონცენტრაციებს: 50-დან 1,000 მგ/ლ-მდე. ანალიზები ჩატარდა ბაქტერიული უჯრედების ზემოთ აღნიშნულ პირობებში 5 დღიანი კულტივირების შემდეგ. აღნიშნული ექსპერიმენტით გამოვლინდა რომ 50მგ/ლ Zn(II)-ის დამატებამ ბაქტერიული უჯრედების რაოდენობა არ შეამცირა Cr(VI)-ის კონცენტრაციის მომატებისას (გრაფიკი 8 a). გრაფიკი 8 b გვიჩვენებს,

რომ ორივე ბაქტერიული ბიომასა იზრდება თითქმის წრფივად, საკვებ გარემოში Zn-ის შემცველობის ზრდასთან ერთად.

გრაფიკი 9: თუთიის აკუმულირება *Arthrobacter sp.* 61B მიერ (მუქი სამკუთხედები) და *A. globiformis* 151B მიერ (თეთრი წრეები) 100 მგ/ლ Cr(VI)-ის თანაობისას საკვებ გარემოში.



მე-9 გრაფიკი აჩვენებს Zn-ის შეთვისების განსხვავებას *A. globiformis* 151B-სა და *Arthrobacter sp.* 61B-ს შორის. Zn(II)-ით დატვირთვის გაზრდისას *Arthrobacter sp.* 61B-თვის Zn-ის აკუმულაციის ტემპი მცირდება, უფრო ადრე, ვიდრე *A. globiformis* 151B-თვის. რომ გამოვითვალოთ Zn-ის შეთვისება აღნიშნულ ბაქტერიაში, ვიყენებთ ლენგმიურ-ფროინდლიხის განტოლებას (109),

$$q = \frac{q_{\max}(bc)^{\frac{1}{n}}}{1+(bc)^{\frac{1}{n}}} \quad (3)$$

სადაც c-არის მეტალური იონების კონცენტრაცია; $q_{\max}$ წარმოადგენს მეტალური აკუმულირების მაქსიმუმს; b-არის იზოთერმას აფინურობის პარამეტრი, რომელიც ასახავს ბიოსორბენტის აფინურობას სორბატის მიმართ; n არის ემპირიული პარამეტრი, რომელიც მერყეობს ჰეტეროგენულობის (არაერთგვაროვნების) ხარისხთან ერთად. მე-9 გრაფიკის მიხედვით, უჯრედების მიერ თუთიის აკუმულაცია კარგად შეესაბამება ლენგმიურ ფროინდლიხის (LF) მოდელს. ფიტირების პარამეტრები კარგად შეესაბამება

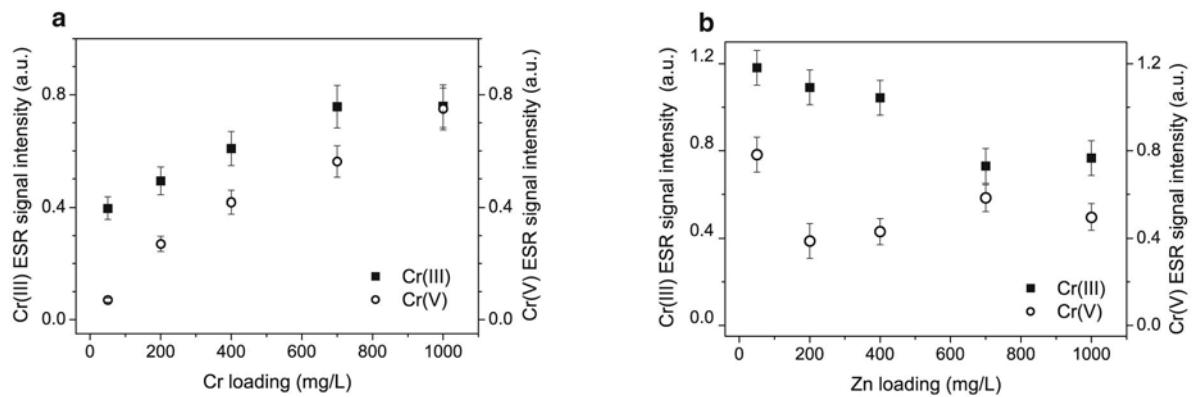
A.globiformis 151B და *Arthrobacter sp.* 61B-ს აკუმულირების მრუდს, რაც წარმოდგენილია მე-2 ცხრილში. ამ მონაცემების მიხედვით, 100მგ/ლ- Cr(VI)-ის არსებობის დროს, თუთიის აკუმულაციის აფინურობის მაგნიტუდა *Arthrobacter sp.* 61B - ში უფრო მაღალია, ვიდრე *A.globiformis* 151B-ში. *Arthrobacter sp.* 61B-ს უჯრედებში თუთიის მაღალი რაოდენობა მიიღწეოდა საკვებ გარემოში Zn(II)-ის დაბალი კონცენტრაციების არსებობის დროს. აღმოჩნდა, რომ Zn-ის მაქსიმალური რაოდენობა აკუმულირდება (გროვდება) ორივე ბაქტერიაში თითქმის თანაბრად და დაახლოებით 4-5 ჯერ აჭარბებს Cr-ის დაგროვებას (122).

ცხრილი 2: ტესტირებული ბაქტერიების აკუმულაციის მრუდების ფიტირების პარამეტრები.

ბაქტერიული სისტემა	q_{max} (mg/g)	b (1/mg)	n	R ²
<i>A. globiformis</i> 151B+ Zn(II)+100mg/l Cr(VI)	76,4±3.9	0.003±0.00002	0.59±0.007	1
<i>Arthrobacter</i> 61B+ Zn(II)+ 100 mg/l Cr(VI)	68.0±2.2	0.027±0.0023	1.05±0.19	0.997

აღნიშნული ექსპერიმენტის ბოლო სერიაში შეისწავლეს Zn-ის გავლენა Cr(VI)-ის აღდგენაზე *A.globiformis* 151B-ს მიერ. ეპრ გაზომვების მიხედვით, ბაქტერიულ სისტემაში Cr(V) ეპრ ხაზი ხასიათდება 1.980 გ-ფაქტორით და 12G ხაზის სიგანით (რაც შეესაბამება Cr(V) დიოლებს) და Cr(III)-ის ეპრ სიგნალი ხასიათდება 2.02 გ-ფაქტორით და ხაზის სიგანე 650G (რაც შეესაბამება Cr(III) ჰიდროქსიდს) (26, 56). ამგვარად Zn(II)-ის იონების არსებობა არ ცვლის Cr(III)-ის და Cr(V)-ის ნაერთების ბუნებას, რომლებიც წარმოიქმნებიან Cr(VI)-ის აღდგენის დროს აღნიშნული ბაქტერიული შტამების მიერ.

გრაფიკი 10: (a) Cr(VI)-ის კონცენტრაციის გავლენა Cr(V)-ის (თეთრი რგოლები) და Cr(III)-ის (შავი კვადრატები) ნაერთების წარმოქმნაზე *A.globiformis* 151B მიერ 50 მგ/ლ Zn(II)-ის თანაობისას; (b) Zn(II)-ის კონცენტრაციის გავლენა Cr(V)-ის (თეთრი რგოლები) და Cr(III)-ის (შავი კვადრატები) ნაერთების წარმოქმნაზე *A. globiformis* 151B მიერ 100მგ/ლ Cr(VI)-ის თანაობისას.



გრაფიკი 10 (a) წარმოადგენს Cr(V) და Cr(III) ეპრ სიგნალების ინტენსივობას *A.globiformis* 151B-ში Cr(VI)-ის განსხვავებული კონცენტრაციების დროს 50 მგ/ლ Zn(II)-ის არსებობისას საკვებ გარემოში. ბაქტერიების კულტივირება ხდებოდა 5 დღის განმავლობაში Cr(VI)-ის ყველა მოცემულ კონცენტრაციაზე. მე-10 გრაფიკი ილუსტრირებს უკეთეს *A.globiformis* 151B-ში Cr(V) და Cr(III)-ის კომპლექსების დოზა-დამოკიდებულ წარმოქმნას. Cr(V) ეპრ სიგნალის ინტენსივობა იზრდება საკვებ გარემოში Cr(VI)-ის კონცენტრაციის მატებასთან ერთად. Cr(III) ნაერთების ფორმირება კარგად არის გამოხატული დასაწყისში (50-დან 500 მგ/ლ დიაპაზონში) და შემდეგ ნელდება Cr(VI)-ის მაღალი კონცენტრაციების დროს. სრულიად განსხვავებული სურათი დაიკვირვებოდა, როცა 100მგ/ლ Cr(VI) იქნა აღდგენილი *A.globiformis* 151B მიერ Zn-ის განსხვავებული კონცენტრაციების არსებობის დროს (გრაფიკი 10 b). ამ სურათის თანახმად Cr(V)-ის და Cr(III)-ის კომპლექსების მაქსიმალური რაოდენობა წარმოიქმნება 50 მგ/ლ Zn(II)-ის არსებობისას და შემდეგ მცირდება, საკვებ გარემოში თუთიის შემცველობის გაზრდასთან ერთად. ამის გარდა, 10 b გრაფიკის მიხედვით, Cr(V) დიოლების რიცხვმა საგრძნობლად დაიკლო Zn-ის დაბალი კონცენტრაციების დროს,

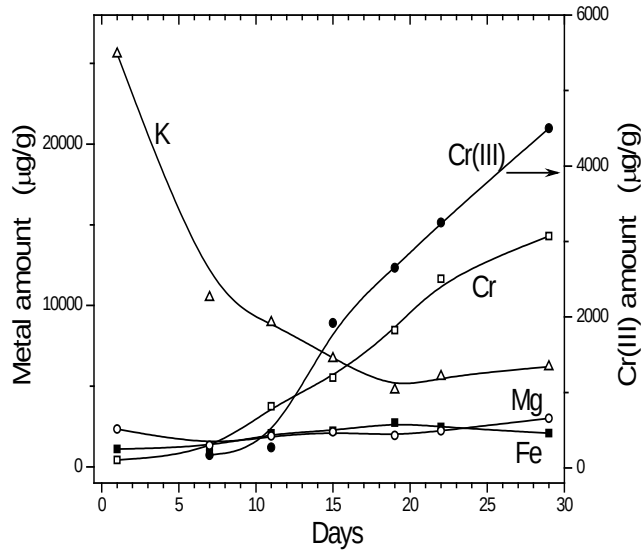
სანამ Cr(III)-ის კომპლექსების ნაერთების რიცხვი თანდათანობით იწყებდა შემცირებას. მაგალითად, 200მგ/ლ Zn(II)-ის არსებობისას, Cr(V) ეპრ სიგნალის ინტენსივობა თითქმის 2-ჯერ შემცირდა ხოლო Cr(III)-ის ESR-სიგნალის ინტენსივობამ დაიკლო მხოლოდ დაახლოებით 15%-ით.

თავი 3. Cr, Fe, Mg და K-ის შეთვისების პროცესის შესწავლა ბაქტერია *Arthrobacter oxydans*-ის მიერ.

A. oxydans-ის ბაქტერიული უჯრედის ზრდის ხანგრძლივობამ მეტალის ხსნარის შემცველ საკვებ გარემოში შეადგინა 1, 7, 11, 15, 19, 22 და 29 დღე. ბაქტერიები იზრდებოდნენ საკვებ გარემოში, რომელიც შეიცავდა $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2 გ/ლ, FeSO_4 – 0.01 გ/ლ, K_2HPO_4 2 გ/ლ და Cr(VI) 70 მკგ/მლ-ზე K_2CrO_4 -ის მარილის სახით. ზრდის შემდგომ, ბაქტერიული უჯრედების მასა საკვები გარემოდან გამოცალკევებული იქნა ცენტრიფუგის მეშვეობით (12000g, 4 °C, 15 წთ), შემდეგ გაირეცხა NaCl -ის ხსნარით (0.15M, pH 7) და გაშრა (ლიოფილიზატორში). მიღებული ნიმუშები აიწონა, მოთავსდა სინჯარებში. დანაცრდა, განზავდა ბიდისტილირებული წყლით და ჩაუტარდა ანალიზი ატომურ-აბსორბციული სპექტრომეტრით (აას). ექსპერიმენტში გამოყენებული იყო აა სპექტრომეტრი Analyst 800. Cr, Fe, Mg და K-ის კონცენტრაციების განსაზღვრისათვის გამოყენებული იყო აცეტილენ-ჰაერის ალი (C_2H_2). ართრობაქტერის სახეობის გრამ-დადებითი Cr(VI) -ის აღმდგენ *A. oxydans*-ში ჩვენ შევისწავლეთ:

- Cr, Fe, Mg და K -ის შეთვისების პროცესი,
- Cr-ის შეთვისების პროცესზე K -ის გავლენა,
- Cr-ის, K-ის და Cr-K-ის ერთობლივი მოქმედების შესწავლა ბაქტერიული ნაზრდის მასაზე.

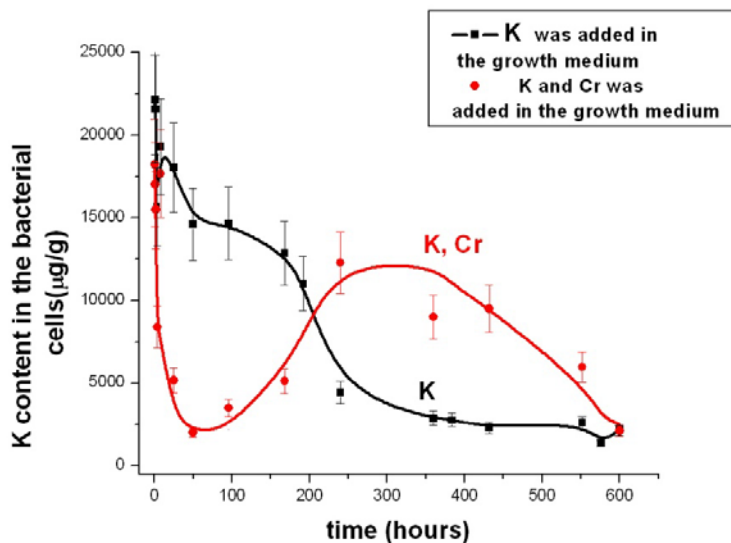
გრაფიკი 11: K, Cr (III), Cr, Fe და Mg *A. oxydans*-ის ცოცხალი უჯრედების მიერ მათი შეთვისების პროცესში, ავლენენ განსხვავებულ მეტალურ რეაქციებს.



ექსპერიმენტით ნაჩვენები იქნა რომ:

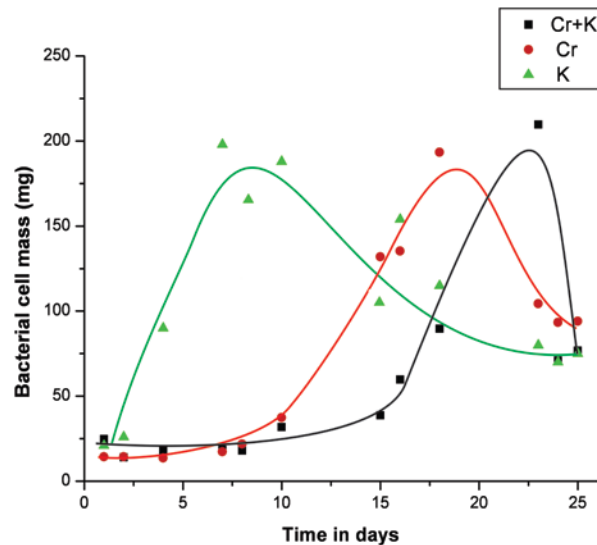
- Fe-ის და Mg-ის კონცენტრაციები *A. oxydans*-ის უჯრედებში რჩება თითქმის მუდმივი მთელი სარეაქციო დროის განმავლობაში: ბაქტერია-მეტალის ურთიერთქმედების დროის ზრდისას.
- Cr(III) და Cr-ის საერთო რაოდენობა *A. oxydans*-ის უჯრედებში იზრდება ბაქტერია-მეტალის ურთიერთქმედების დროის ზრდისას და K-ის კონცენტრაცია *A. Oxydans*-ში მცირდება Cr(VI) რეაქციის მოქმედების დროსთან ერთად.
- Cr(III)-ის და Cr-ის შემცველობა ბაქტერიაში შესამჩნევად გაიზარდა, მაშინ როდესაც K-ის კონცენტრაცია იყო დაბალი.
- K-ის კონცენტრაცია ბაქტერიაში მცირდება ბაქტერია-მეტალის ურთიერთქმედების დროის ზრდისას.

გრაფიკი 12: Cr(VI)-ის უარყოფითი გავლენა *A. oxydans*-ის მიერ K შეთვისების დინამიკაზე.



Arthrobacter oxydans-ის მიერ K-ის შეთვისების პროცესზე გავლენას ახდენს Cr(VI)-ის იონები. როდესაც ბაქტერიის საკვებ გარემოში დამატებული არ არის ქრომი, K-ის შესვლა ბაქტერიულ უჯრედში მაქსიმუმს აღწევს საკვებ გარემოში მისი შეტანის პირველივე საათებში, ამის შემდეგ ხდება მისი კონცენტრაციის თანდათანობითი დაკლება ბაქტერიულ უჯრედში. მაშინ როდესაც, ქრომის თანაობისას, ბაქტერია ვერ ახერხებს კალიუმის იმ რაოდენობის შეთვისებას საკვებ გარემოში მოთავსებისთანავე, როგორც ამას უქრომო ნიადაგში აკეთებდა. გარდა ამისა, ბაქტერია კალიუმის გამოდევნას იწყებს სწრაფად და მე-2 დღეს ბაქტერიულ უჯრედში ფიქსირდება კალიუმის მინიმალური მაჩვენებელი: 2000 მკგ/გ და ამის შემდეგ კვლავ იწყებს კონცენტრაციაში მომატებას. მაქსიმუმს აღწევს უჯრედული ზრდის 12-ე დღეს. საკვები არე შეიცავდა: 500 µg/ml K-ს (KCl-ის სახით). საკვებ გარემოში Cr(VI)-ის კონცენტრაცია შეადგენდა 50 µg/ml Na₂CrO₄-ის სახით. ეს ექსპერიმენტი განსხვავდებოდა წინასგან: კალიუმი აქ შეტანილი იყო KCl 500 µg / ml-ის სახით (ნაცვლად K₂HPO₄).

გრაფიკი 13: მეტალური იონების მოქმედების გავლენა *A. oxydans*-ის ბაქტერიების ზრდაზე (Co-metal ions action).

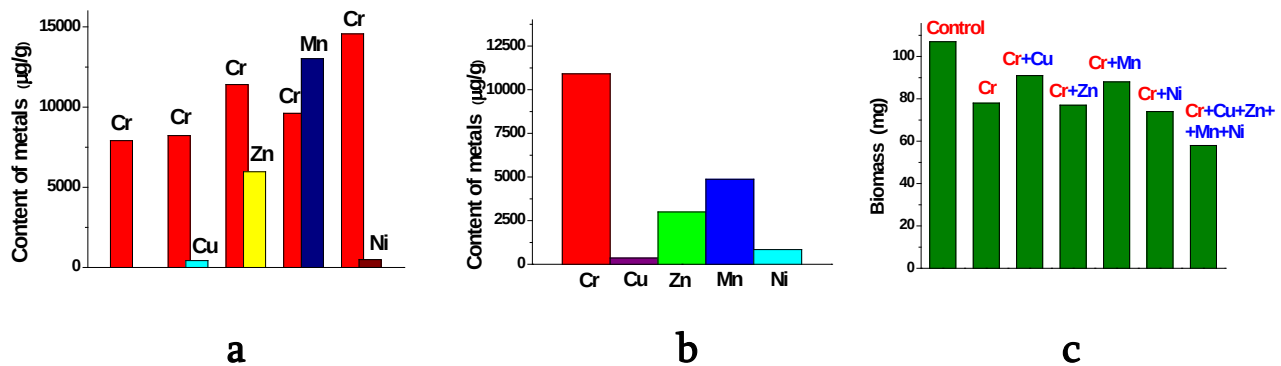


გამოვლინდა, რომ მეტალური იონების ერთდროული მოქმედების შედეგად ბაქტერიული ნაზრდის მასა მაქსიმუმს აღწევს გაცილებით გვიან. ნაჩვენები იქნა, რომ ბაქტერიულმა მასამ კალიუმთან არეზე ($[K]$ 500 მგ/ლ) მიაღწია მაქსიმუმს ზრდის მე-5 დღეზე. ბაქტერიული ნაზრდის მასა ქრომის შემცველ საკვებ არეზე ($[Cr(VI)]$ 50 მგ/ლ) მაქსიმუმს აღწევს ზრდის 17 დღეზე, ხოლო ბაქტერიული ნაზრდი, არეზე სადაც კალიუმი 500 მგ/მლ და ქრომი 50 მგ/მლ დამატა ერთდროულად, ზრდის მაქსიმუმი აჩვენა 23-ე დღეს (გრაფიკი 13).

თავი 4. ბაქტერიის უჯრედებში ქრომის აკუმულაცია ბაქტერიის საკვებ გარემოში Cr(VI)-თან ერთად სხვა მეტალების არსებობისას

შესწავლილ იქნა ქრომის აკუმულაცია ბაქტერიის უჯრედებში მასზე ქრომთან ერთად სხვა მძიმე მეტალების ზემოქმედებისას. მიღებული შედეგები წარმოდგენილია გრაფიკებზე 14 (*A. globiformis* 151B) და 15 (*Arthrobacter sp.* 61 B).

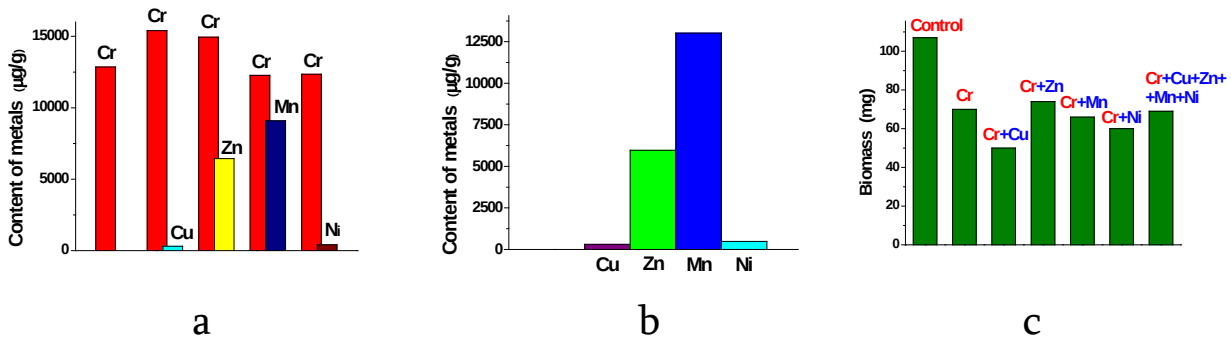
გრაფიკი 14: მძიმე მეტალების აკუმულაცია *A. globiformis* 151 B-ს უჯრედებში Cr(VI)-ის თანაობისას საკვებ გარემოში (A); მძიმე მეტალების აკუმულაცია *A. globiformis* 151 B-ს უჯრედებში ხსნარიდან რომელიც შეიცავდა ერთდროულად შემდეგი მეტალების ნარეც Cr(VI), Cu(II), Zn(II), Mn(II) და Ni(II) (B); *A. globiformis* 151 B-ს ბიომასა, როდესაც ბაქტერიის ზრდის გარემოში დამატებული იყო Cr(VI) და რომელიმე სხვა მძიმე მეტალი



(C).

გრაფიკი 15-ზე წარმოდგენილი მონაცემები გვიჩვენებს, რომ მსგავსი შედეგებია მიღებული *Arthrobacter sp.* 61B-ს შემთხვევაშიც. ეს ბაქტერია კარგად იზრდება 100მგ/ლ Cr(VI)-ის და 50მგ/ლ სხვა მძიმე მეტალის (Cu(II), ან Zn(II) ან Mn(II) ან Ni(II)) თანაობისას (ნახ.15 A). განსხვავებით წინა ბაქტერიისგან, *Arthrobacter sp.* 61 B კარგად იზრდება მასზე მძიმე მეტალების (Cr(VI), Cu(II), Zn(II), Mn(II), Ni(II)) ნარეცის ზემოქმედების დროსაც.

გრაფიკი 15: მძიმე მეტალების აკუმულაცია *Arthrobacter sp* 61 B-ს უჯრედებში Cr(VI)-ის თანაობისას (A); მძიმე მეტალების აკუმულაცია *Arthrobacter sp* 61 B-ს უჯრედებში ხსნარიდან რომელიც შეიცავდა შემდეგი მეტალების ნარევეს Cr(VI), Cu(II), Zn(II), Mn(II), და Ni(II) (B) *Arthrobacter sp* 61 B-ს ბიომასა როდესაც ბაქტერიის ზრდის გარემოში დამატებული იყო Cr(VI) და რომელიმე სხვა მძიმე მეტალი (C).



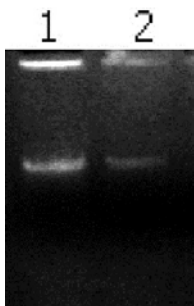
Arthrobacter sp. 61 B-ს უჯრედში Cr-ის შემცველობა დაახლოებით 12×10^3 მგ/გ იყო (უფრო მეტია, ვიდრე *A.globiformis*-ის შემთხვევაში). თითქმის იგივე რაოდენობა ქრომი იყო შენარჩუნებული ბაქტერიის უჯრედებში, როდესაც ბაქტერიები იზრდებოდნენ გარემოში სადაც ერთდროულად დამატებული იყო ორი მეტალი: 100მგ/ლ Cr(VI) და 50 მგ/ლ Zn(II); Cu(II); Ni(II); ან Mn(II). ბაქტერია *Arthrobacter sp* 61B-ში დაიკვირვებოდა Zn(II)-ის და Mn(II)-ის მნიშვნელოვანი რაოდენობები.

თავი 5. ქრომის გავლენა *Arthrobacter*-ის სახეობის ბაქტერიების დნმ-ზე

Arthrobacter globiformis 151 B -ს პლაზმიდური დნმ-ის რაოდენობაზე დაკვირვებას ვახდენდით აგაროზას გელზე ელექტროფორეზის საშუალებით დადგინდა, რომ დნმ-ის რაოდენობა პრაქტიკულად არ იცვლება ბაქტერიული ზრდის 14, 24, 38 და 62 საათიან ნიმუშებში. დნმ-ის რაოდენობა იცვლება, როდესაც ბაქტერიული უჯრედები იზრდებიან Cr(VI) -იან გარემოში. ელექტროფორეგრამებზე დაიკვირვებოდა ექსტრაგირებული პლაზმიდური დნმ-ის გაუჩინარება Cr(VI)-ის კონცენტრაციის ზრდისას (0-დან 200 მგ/ლ). ამავდროულად ეს ბაქტერიები ინარჩუნებდნენ სიცოცხლისუნარიანობას ქრომის აღნიშნული კონცენტრაციების თანაობისას.

ექსპერიმენტების პირველ სტადიაზე ვიკვლევდით პლაზმიდის არსებობას ბაქტერია *A. globiformis* 151B-ში. პლაზმიდის აღმოსაჩენად ვიყენებდით ტუტე ლიზისის მეთოდს Brandsch and Decker-ის მიხედვით, რაც *Arthrobacter*-ის სახეობიდან შედარებით დიდი რაოდენობით პლაზმიდის გამოყოფის საშუალებას იძლევა (17). დამატებით ვიყენებდით ქიაგენის კრებულს (QIA prep Spin Miniprep Kit) მიღებული შედეგების გადასამოწმებლად. ორივე მეთოდმა საშუალება მოგვცა გამოგვეყო განსაზღვრული რაოდენობის პლაზმიდური დნმ-ი *A. globiformis* 151B-ს საკონტროლო უჯრედებიდან. თუმცა ტუტე ლიზისის მეთოდით დნმ-ის უფრო დიდი რაოდენობა იქნა გამოყოფილი (ილუსტრაცია 9).

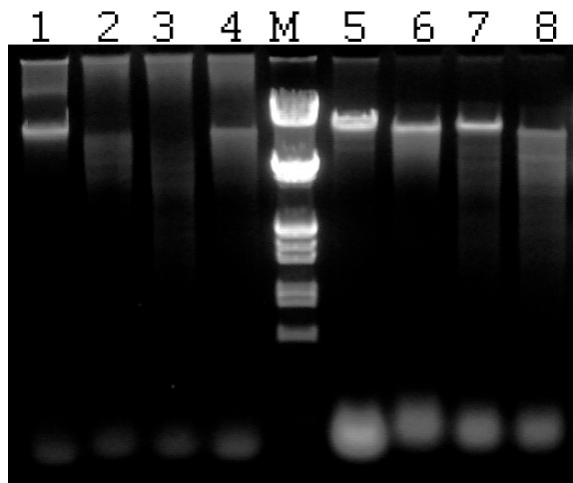
ილუსტრაცია 9: *A. globiformis* საკონტროლო უჯრედებიდან გამოყოფილი პლაზმიდური დნმ



ილუსტრაცია 9.-ზე ნაჩვენებია პლაზმიდური დნმ-ის ექსტრაქტი *Arthrobacter globiformis* 151B ბაქტერიული კულტურიდან, რომელიც გაზრდილია 14 საათის განმავლობაში Cr(VI)-ისგან თავისუფალ საკვებ არეზე. *ბაზი 1*-ზე ნაჩვენებია პლაზმიდური დნმ, გამოყოფილი ტუტე ლიზისის მეთოდით (5 μ l -200 μ l ექსტრაქტიდან) და *ბაზი 2*-ზე ქიაგენის კრებულის გამოყოფილი (QIA prep Spin Miniprep Kit) 5 μ l - 50 μ l ექსტრაქტიდან.

რესტრიქციული ფრაგმენტების ნაწილობრივმა დახასიათებამ ნათლად აჩვენა განსხვავება დნმ-ის პლაზმიდურ და გენომურ რესტრიქციულ პროფილებს შორის. კვლევაში გამოყენებული იყო სამი ენდონუკლეაზა: EcoR1, Bam H1, and HindIII (ილუსტრაცია 10). მიღებულმა შედეგებმა ცხადყო, რომ *Arthrobacter globiformis* 151B „ინახავს“ პლაზმიდას, რომელიც განსხვავდება გენომური დნმ-გან.

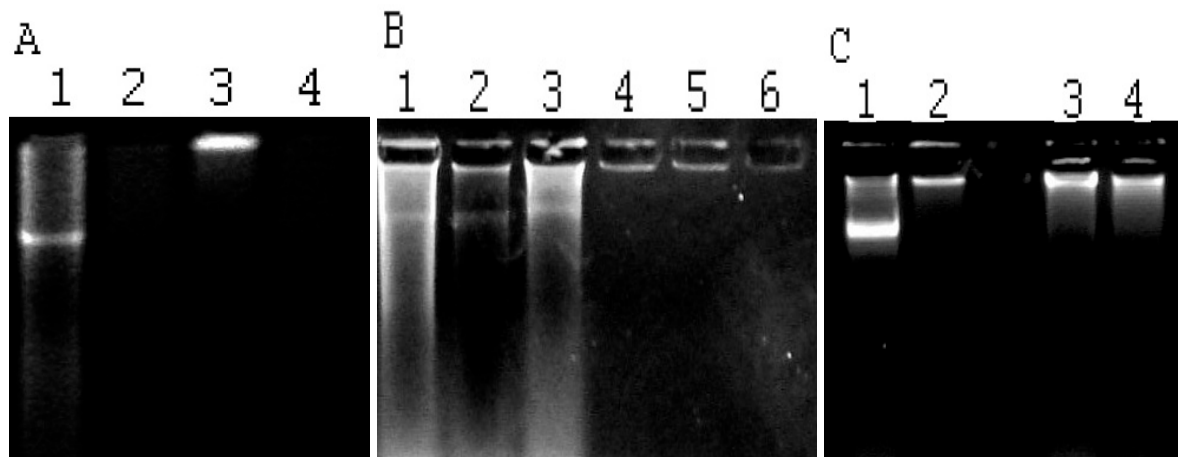
ილუსტრაცია 10: *A. globiformis* პლაზმიდური და გენომური დნმ-ის რესტრიქციული პროფილების ნაწილობრივი დახასიათება.



ილუსტრაცია 10-ზე ნაჩვენებია *Arthrobacter globiformis* 151B-ს პლაზმიდური (*ბაზი 2-4*) და გენომური (*ბაზი 6-8*) დნმ-ის რესტრიქციული ფრაგმენტები. *ბაზი 1*-ზე ნაჩვენებია ინტაქტური პლაზმიდური დნმ; *ბაზი 5* -ზე ინტაქტური გენომური დნმ. რესტრიქციული ენდონუკლეაზების მიერ დაჭრილი დნმ- ფრაგმენტები: *2 და 6 ბაზები* Eco R1-ით; *ბაზები 3 და 7* Bam H1-ით ; *ბაზები 4, 8.* Hind III. *M.* მარკერი (21 kb, 5 kb, 4 kb, 3.5 kb, 2 kb, 1.9 kb, 1.6 kb, 1.4 kb, 0.9 kb, 0.8 kb, 0.5 kb).

ექსპერიმენტების შემდეგ ეტაპზე, ვიკვლევდით ქრომის გავლენას *A.globiformis*-ის პლაზმიდური დნმ-ზე (ილუსტრაცია 11). ილუსტრაცია 11A -ზე ნაჩვენებია ქრომის განსხვავებული კონცენტრაციების (0 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, და 200 mg/L) შემცველ არეზე გაზრდილი უჯრედებიდან იზოლირებული პლაზმიდური დნმ-ების ელექტროფორეზი აგაროზას გელზე. 11A ილუსტრაციაზე ნაჩვენები ელექტროფორეგრამა მიუთითებს, რომ პლაზმიდური დნმ აღარ ჩანს (გამქრალია) უჯრედების 50 მგ/ლ Cr(VI) ის თანაობისას 14 საათის განმავლობაში დაყოვნების შემდეგ. (ილუსტრაცია 11A, ხაზი 2).

ილუსტრაცია 11: Cr(VI) -ის კონცენტრაციის, Cr(VI) -თან დაყოვნების დროის და Cr(VI) -ის დამატების დროს გავლენა *A. globiformis* 151-B-ს პლაზმიდაზე

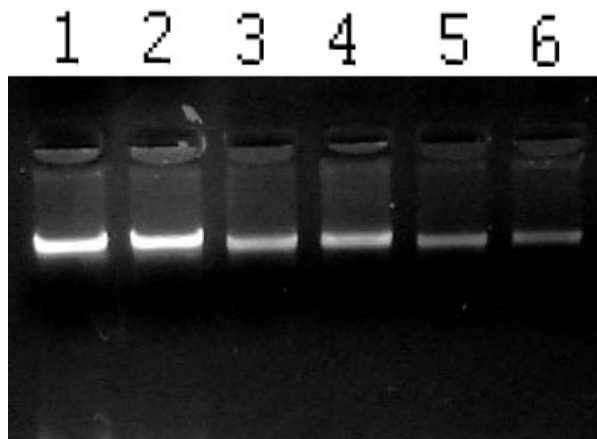


ილუსტრაცია 11A ზე ნაჩვენებია 14 საათიანი კულტურა Cr (VI)-ის თანაობისას: ხაზი 1. 0 მგ/ლ (კონტროლი); ხაზი 2. 50 მგ/ლ; ხაზი 3. 100 მგ/ლ; ხაზი 4. 200 მგ/ლ. ბაქტერიული დნმ დაიკვირვება მხოლოდ საკონტროლო ბაქტერიულ ნიმუშში. მე-11B ილუსტრაციაზე ნაჩვენებია დროის გავლენა პლაზმიდურ დნმ-ზე Cr(VI)-ის გარეშე ნიმუშებში: ხაზი 1 - 14 სთ; ხაზი 2 - 38 სთ; ხაზი 3 - 62 სთ; და 50 მგ/ლ Cr(VI)-თან დაყოვნებულ ნიმუშებში: ხაზი 4 - 14 სთ; ხაზი 5 - 38 სთ; ხაზი 6 - 62 სთ. მე-11 C ილუსტრაციაზე ნაჩვენებია პლაზმიდური დნმ-ის ელექტროფორეგრამები, როდესაც ქრომი (50მგ/ლ) ბაქტერიულ ნიმუშებში დროის სხვადასხვა ეტაპზე (ხაზი 2 - 6 სთ; ხაზი 3 - 12 სთ; ხაზი 4 - 24 სთ) იყო დამატებული. პლაზმიდა მოჩანს მხოლოდ მე-11C ილუსტრაციის 1 ხაზზე, სადაც

უერომო 62 საათიანი კულტურიდან გამოყოფილი პლაზმიდური ექსტრაქტი იქნა შეტანილი (10 μ l - 200 μ l -დან).

ამგვარად, ქრომიან არეზე გაზრდილი უჯრედების პლაზმიდური ექსტრაქტებიდან ვერ მოხდა პლაზმიდის დაფიქსირება. ხდება პლაზმიდური დნმ-ის გაქრობა ბაქტერიების ქრომიან არეზე ინკუბირების შემთხვევაში. ექსტრაგირებული გენომური დნმ-ის აგაროზას გელზე ელექტროფორეზმა ცხადყო, რომ საკვებ გარემოში ქრომის კონცენტრაციის მატება, უარყოფითად მოქმედებს გამოყოფილი გენომური დნმ-ის რაოდენობაზე (ილუსტრაცია 12).

ილუსტრაცია 12: ქრომის კონცენტრაციის გავლენა *A.globiformis* 151B-ს გენომურ დნმ-ზე



ნაჩვენებია გენომური დნმ-ის რაოდენობის კლება როდესაც ბაქტერიული უჯრედების საკვებ გარემოში ქრომის კონცენტრაციები იმატებს. მე-12 ილუსტრაციის *ხაზი 1-2* -ზე ნაჩვენებია ქრომის გარეშე არეზე გაზრდილი *A. globiformis*-ის გენომური დნმ; *ხაზი 3-4* -ზე ნაჩვენებია ბაქტერიული გენომური დნმ, როდესაც ზრდის არეში შეტანილი იყო Cr (50 მგ/ლ); *ხაზი 5-6* -ზე ნაჩვენებია გენომური დნმ ექსტრაგირდა 100 მგ/ლ ქრომის შემცველ არეზე გაზრდილი *A. globiformis*-ის უჯრედებიდან.

ინტერპრეტაცია/დისკუსია

Cr(VI)-ის Cr(III)-ად აღდგენა Cr(VI)-ის დეტოქსიკაციის მნიშვნელოვანი გზაა ეკოლოგიურ სისტემებში. ნიადაგს თავისთავად შეუძლია აღადგინოს Cr(VI), მაგრამ ბუნებრივ ნიადაგში, აღდგენის პროცესი არის უკიდურესად ნელი, დროში გაწელილი პროცესი, რასაც შეიძლება წლები დასჭირდეს (11, 33). მრავალ მიკროორგანიზმს, წყალმცენარეს თუ მცენარეს დაბინძურებულ ნიადაგში შეუძლია აღადგინოს Cr(VI) ჯერ Cr(V)-ად და საბოლოოდ Cr(III)-ად (4, 48, 68) წყალმცენარეებში Cr(VI)-ის აღდგენა სწრაფი პროცესია, Cr(V)-ის სიგნალი მაქსიმალურ მაჩვენებელს აღწევს 10 წუთში მისი Cr(VI)-თან (2 mM ნატრიუმის დიქრომატი) ინკუბირების შემდეგ (4, 68). ხმელეთის მცენარეებში ამას სჭირდება 10 საათზე მეტი, რომ Cr(V)-ის „სიგნალმა“ მიაღწიოს აღსაქმელ მაქსიმალურ დონეს (68). Cr(V)-ის შემდგომი აღდგენა წყალმცენარეებით გრძელდება რამოდენიმე დღეს (4). ზოგიერთი მცენარის ქსოვილებში, Cr(V)-ის ნაერთები გარდაიქმნებიან როგორც Cr(III)-ის ჰიდროქსიდ, ასევე Cr(III)-ის ოქსალატო ნაერთებად (48).

ნაშრომში განხილულია ფართოდ გავრცელებული, ბაზალტში მოზინადრე *Arthrobacter*-ის სახეობის ბაქტერიების უნარი: აღადგინოს ძლიერ ტოქსიკური Cr(VI) ნაერთები ნაკლებად ტოქსიკურ Cr(III) ფორმად. ჩვენი სამუშაო ჯგუფის წინა კვლევებში (56) დეტალურად შეისწავლებოდა *A. oxydans*-ის მიერ Cr(V)-ის ფორმირების და გარდაქმნის კინეტიკა Cr(VI)-ის აღდგენის პროცესის დროს. დადგენილ იქნა, რომ ორივე, - Cr(V)-ის წარმოქმნაც და დაშლაც, ხდება უფრო სწრაფად, როდესაც Cr(VI) დაემატა ბაქტერიულ კულტურას ზრდის ექსპონენციალურ ფაზაში. მნიშვნელოვანია, რომ *Arthrobacter sp* 61B და *A. globiformis* 151B-თან შედარებით, Cr(V)-ის წარმოქმნის და გარდაქმნის პროცესი *A. oxydans*-ში იყო შედარებით ნელი:- Cr(V)-ის ეპრ სიგნალი ფიქსირდება ბაქტერიების ქრომატიან ხსნარში მოთავსებიდან დაახლ. 20 წუთის შემდეგ. როდესაც 35მგ/ლ Cr(VI) იქნა დამატებული სხვა ტესტირებულ ბაქტერიებზე ადრეულ სტაციონალურ ფაზაზე, Cr(VI)-ის აღდგენა წარმართა იმდენად სწრაფად, რომ ვერ

მოხერხდა Cr(V)-ის ფორმირების ნახევარ-დროის განსაზღვრა. ჩავთვაlet, რომ Cr(VI)-ის Cr(V)-ად აღდგენის შედარებით დაბალი სიჩქარე *A. oxydans*-ში შესაძლოა *Arthrobacter*-ის გვარის ბაქტერიული უჯრედის კედლის თავისებურებით იყოს გამოწვეული. ართრობაქტერიის გვარის ბაქტერიები შეიცავენ ცვილის და მიკოლის მჟავების (mycolic acids) შემცველი ლიპიდების ბიშრეს, პეპტიდოგლიკანის სქელი ფენის გარდა, რაშიც დიდი რაოდენობით არიან პოლისაქარიდები, თეიხოის მჟავები და ცილის მოლეკულები (104). ჩვენი ჯგუფის წინა კვლევები ხაზს უსვამს *A. oxydans*-ის უჯრედის კედლის მნიშვნელოვან როლს (67).

აღნიშნული კვლევა მოიცავს *A. oxydans*, *A. globiformis* 151B და *Arthrobacter* sp.61B-ის მიერ Cr(VI)-ის Cr(III)-ად მიკრობული აღდგენის პროცესის ანალიზს ელექტრონული პარამაგნიტური რეზონანსის (ეპრ) გამოყენებით. ჩვენ გამოვიყენეთ კინეტიკური მოდელი, რათა უჯრედებში მიმდინარე Cr(III)-ის წარმოქმნა შეგვედარებინა Cr(V)-ის გარდაქმნასთან. ნაჩვენები იქნა რომ Cr(III)-ის ნახევრად წარმოქმნის დრო ტოლია Cr(V)-ის ნახევარ გარდაქმნის დროსი. თუმცა, ნათელი არ არის, ტოქსიკური Cr(VI)-ის უჯრედული შეთვისების და აღდგენის პროცესები ციტოპლაზმაში მიმდინარეობს თუ ექსტრაცელულარულად. სხვადასხვა კვლევებმა ცხადყო, რომ Cr(VI)-ის აღდგენა ბაქტერიის ხსნადი ცილებით (51) და უჯრედული კედლის ცილებით (30, 81) კატალიზებული პროცესია და ზოგიერთი მათგანი ამჟღავნებს NADH ან NADPH დამოკიდებულებას, (51) ხოლო ზოგიერთი არა (75). მეტალ-რეზისტენტული ბაქტერიები ფლობენ სხვადასხვა უნარს მეტალების მომატებული კონცენტრაციებისაგან თავის დასაცავად, მათი მოცილების ან მათი ტოქსიკურობის შემცირების გზით (158). ბაქტერიული რეზისტენტობის მექანიზმების უმეტესობა დაკავშირებულია (I) მეტალის იონების აქტიურ გამოტყორცნასთან (active efflux), (II) მეტალური იონის გარდაქმნასთან მის უფრო ნაკლებტოქსიკურ ფორმად და (III) გამოლექვასთან უჯრედის გარეთ ან შიგნით (152, 153, 115, 154). Cr-ის მიერ გამოწვეული სტრესის მიმართ პასუხი ბაქტერია *C. crescentus*-ში რეგულირდება სულფატური ტრანსპორტერების მოქმედების შემცირებით, რათა შემცირდეს უჯრედში არასპეციფიური შეტანის გზით ქრომის შესვლა (151).

იმის გასარკვევად, თუ სად მიმდინარეობდა Cr-ის აღდგენა: უჯრედის ზედაპირზე თუ უჯრედის შიგნით, Cr(VI)-ის ზემოქმედების შემდეგ უჯრედები გავრცხეთ 0.1 M Tris-HCl-ით და 1.0 M EDTA-თი. ჩვენმა შედეგებმა გვიჩვენა, რომ ძალიან ცოტა Cr აღდგა ხსნარში, რაც მიუთითებდა რომ Cr უმეტესწილად უჯრედთან არის კავშირში. უახლესი კვლევებით მიიჩნევა, რომ აღდგენილი Cr ძირითადად ხსნადია და კავშირშია ხსნარის ორგანიკასთან და რომ Cr(VI)-ის აღდგენა რთული პროცესია და ორგანო-Cr(III) ნაერთების წარმოქმნა ქრომის ბიოგეოქიმიური ციკლის ინტეგრალურ ნაწილს წარმოადგენს (95, 97). მაგალითად, პუზონმა და მისმა ჯგუფმა (97) აღმოაჩინა, რომ *Escherichia coli*-ის შეუძლია Cr(VI) აღადგინოს ხსნად Cr(III)-ად, და ხსნადი Cr კი მიიჩნევა „ორგანო- Cr(III)“ სახეობად, რომელიც იგივეა რაც NAD^+ - Cr(III) და ასკორბინი-Cr(III) კომპლექსები, რომლებიც Cr(VI)-ის აღდგენის დროს წარმოიქმნებიან. ანალოგიურად პრიესტერის და მისი ჯგუფის მიერ (95) *Pseudomonas putida*-ს კვლევის დროს ნაჩვენები იქნა, რომ Cr-ის აღდგენა ნაწილობრივ კავშირშია ხსნარში არსებულ ეგზოპოლიმერულ ნივთიერებასთან (EPS). მათმა მიგნებამ ცხადი გახადა, რომ უჯრედები ქრომის ზემოქმედების შემდეგ წარმოქმნიან აღნიშნულ ეგზოპოლიმერულ ნივთიერებას (EPS) მომატებული კონცენტრაციებით. ვანგმა და მისმა ჯგუფმა (133) გამოავლინეს, რომ ბაქტერიას მემბრანა-დაკავშირებული რედუქტაზათი შეუძლია აღადგინოს Cr(VI) Cr(III)-ად ექსტრაცელულარულად, მემბრანულ რედუქტაზებთან შეწყვილებული ელექტრონ-გადამტანი ნაერთებით.

ჩვენი სამუშაო ჯგუფის წინა კვლევებშიც იქნა გამოვლენილი მსგავსი ფაქტი: EPS- (ეგზოპოლიმერული) ნაერთების და სხვა უჯრედის კედელთან დაკავშირებული მაკრომოლეკულების წარმოქმნა *A. oxydans*-ში რომელიც ქრომის გავლენით იყო განპირობებული (67). სადოქტორო ნაშრომის ექსპერიმენტული მონაცემები გვაძლევს იმის ჩვენების საშუალებას, რომ Cr(VI)-ის აღდგენის პროცესი მიმდინარეობს ბაქტერიული უჯრედის კედლის გარე ზედაპირზე. კერძოდ, გამოვლინდა შემდეგი ფაქტები:

- უჯრედების გარეცხვამ, მათში მთლიანი ქრომის შემცველობაზე გავლენა იქონია მხოლოდ Cr(VI)-ის მოქმედების დასაწყისში (3 დღე). Cr(VI)-ის აღდგენის პირველ ეტაპზე – Cr(V)-ის ნაერთების წარმოქმნა ძალიან სწრაფი პროცესია, ამგვარად, Cr(VI)-ის მოქმედების დასაწყისში მთლიანი ქრომის აკუმულირებული რაოდენობა ძირითადად წარმოდგენილია Cr(V)-ნაერთებით. ეს ნაერთები სპეციალური ბუფერით ადვილად ჩამოირეცხებიან უჯრედებიდან. გარეცხილ ბაქტერიაში, Cr(V)-ის ეპრ სიგნალი არ ფიქსირდება (120), გამოდის, რომ Cr(VI)-ის Cr(V)-ად აღდგენა ხდება უჯრედის ზედაპირზე. აღდგენილი Cr(V) რჩება ექსტრაცელულარულად, რომელიც ძალიან სწრაფად იშლება და გარდაიქმნება Cr(III)-ად.
- დაახლოებით 1 კვირის შემდეგ, მთლიანი Cr -ის შემცველობაში უკვე აღარ იყო დიდი განსხვავება გარეცხილ თუ გაურეცხავ უჯრედებს შორის. ამ დროისთვის Cr(V)-ის ძირითადი ნაწილი გარდაიქმნა Cr(III)-ად. მივიჩნევთ რა, ბაქტერიული უჯრედის კედლებს უმეტესი Cr(III)-ის ნაერთებისთვის შეუღწევადად, ვთვლით, რომ Cr(V) აღდგება უჯრედის გარეთ.
- Cr(III)-ის ეპრ სიგნალის ინტენსიურობაზე უარყოფითი გავლენა არ მოუხდენია *A. oxydans*-ის უჯრედების გარეცხვას, მივიჩნევთ რა, რომ Cr(III)-ის ძირითადი ნაწილი მტკიცედ არის დაკავშირებული უჯრედებთან. Cr(III) შესაძლოა დაკავშირებული იყოს უჯრედის კედლის ზედაპირზე არსებულ ფუნქციონალურ ჯგუფებთან (კარბოქსილის, ფოსფორილის თუ ჰიდროქსილის).
- ჩვენ ვაჩვენებთ რომ, Cr(VI)-ით დაბინძურებულ გარემოში, *A. oxydans* აქვს უნარი რამოდენიმე დღეში აღადგინოს კანცეროგენული Cr(VI) მის არატოქსიკურ Cr(III)-ჰიდროქსიდ ფორმად.

ვინაიდან ბუნებრივი პირობები ხშირად ხასიათდებიან Zn-ის, Cr-ის, Fe-ის, K-ის, Mn-ის, Cu-ის, Ni-ის თუ სხვა ელემენტების თანაარსებობით, საინტერესო იყო გაგვერკვია რა გავლენა აქვთ სხვადასხვა მეტალებს აღნიშნული ბაქტერიების მიერ ქრომის აღდგენის პროცესზე. ელექტრონული პარამაგნიტური რეზონანსით (ეპრ) ჩატარებულმა კვლევებმა

აჩვენა, რომ 50მგ/ლ Zn(II)-ის იონების თანაობისას მნიშვნელოვნად გაიზარდა ბაქტერიულ უჯრედებში Cr- ის აკუმულაციის დონე.

ეპრ გაზომვების მიხედვით Zn(II)-ის იონების არსებობა არ ცვლის Cr(VI)-ის მიკრობული აღდგენისას წარმოიქმნილი Cr(V) და Cr(III)-ის ნაერთების ბუნებას.

ბაქტერიების მიერ Cr(VI)-ის აღდგენის ეფექტურობა შეუცვლელი რჩება 50მგ/ლ Zn(II)-ის დამატებისას ბაქტერიულ უჯრედებზე. თუმცა Zn(II)-ის მაღალი კონცენტრაციებისას (200მგ/ლ-ზე მეტი) Cr(VI)-ის და Cr(V)-ის გარდაქმნა Cr(III)-ის ნაერთებად მნიშვნელოვნად შემცირდა.

ამასთან ნაჩვენებია, რომ Zn-ის აკუმულაცია 100მგ/ლ კონცენტრაციის Cr(VI)-ის თანაობისას მოსინჯულ ბაქტერიულ სახეობაზე კარგად შეესაბამება ლენგმიურ-ფროინდლიხის მოდელს. ორი შესწავლილი ბაქტერიული შტამი (*A.globiformis* 151B და *Arthrobacter sp.* 61B) ამჟღავნებს განსხვავებულ ბუნებას Zn-ის აკუმულაციის პროცესის მიმართ.

მიღებული შედეგები შეიძლება შემდეგნაირად აიხსნას: Zn(II)-ის იონებს შეუძლიათ დაუკავშირდნენ ბაქტერიულ უჯრედების ზედაპირზე არსებულ უარყოფითად დამუხტულ ჯგუფებს და ეს მეტალური იონები შესაძლოა ეხმარება CrO_4^{2-} იონების და ბაქტერიულ უჯრედებს შორის კონტაქტს. *Arthrobacter*-ის სახეობის ბაქტერიების სიცოცხლისუნარიანობა მცირდება საკვებ გარემოში Cr(VI)-ის კონცენტრაციის მომატებისას (6) ჩვენი ექსპერიმენტებით აიხსნა, რომ 50 მგ/ლ Zn-ის დამატების შემდეგ, ბაქტერიული უჯრედების რიცხვი პრაქტიკულად არ მცირდება Cr(VI)-ის კონცენტრაციის გაზრდისას (გრაფიკი 8a). თუთია თამაშობს მნიშვნელოვან როლს როგორც სასიცოცხლო “კვალი ელემენტი” ყველა ცოცხალი სისტემის განვითარების, ზრდის და დიფერენცირების პროცესში (89) იგი არის ენზიმების, მემბრანებისა თუ სხვადასხვა მაკრომოლეკულის მასტაბილიზებული შემადგენელი კომპონენტი. ექსპერიმენტში, სადაც Zn(II)-ის სხვადასხვა კონცენტრაციებს ვამატებდით ბაქტერიული უჯრედების ზრდის გარემოს 100 მგ/ლ Cr(VI)-ის თანაობისას, თუთიის ყოველ მოცემულ კონცენტრაციაზე, ნაჩვენებია იყო Zn-ის განსაზღვრულ დადებითი ეფექტი. გრაფიკი 8b აჩვენებს რომ ორივე ბაქტერიის (*Arthrobacter sp* 61B და *A. globiformis* 151B) ბიომასა

იზრდება თითქმის წრფივად, საკვებ გარემოში $Zn(II)$ -ის შემცველობის გაზრდისას. უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა მეტალების შემცველ გარემოში ოპტიმიზირდება ნორმალური უჯრედული მეტაბოლიზმისა და რეზისტენტობის მექანიზმების კოოპერირებით. ამის საშუალებით უჯრედი იგროვებს ფიზიოლოგიურად აუცილებელ ელემენტებს და ინარჩუნებს მეტალ-დამოკიდებულ აქტივობებს (19, 25, 103) მე-8ხ გრაფიკზე წარმოდგენილი მონაცემების მიხედვით, Zn -ის კონცენტრაცია 50-დან 1,000 მგ/ლ-ზე ხელს უწყობს ორივე ბაქტერიული შტამის ნორმალურ ზრდას.

აუცილებელი მეტალური იონები უჯრედში შედიან სპეციფიკური თუ არასპეციფიკური სატრანსპორტო სისტემების საშუალებით (40). სპეციფიკური შეტანის სისტემები გამოირჩევიან სისწრაფით და მუშაობენ მიკროორგანიზმის პლაზმური მემბრანის სხვადასხვა მხარეს აღძრული ქემიოსმოსური გრადიენტის მიხედვით. მეორე ტიპის შეთვისების სისტემა კი არის ინდუცირებული. მაგ. საფუარა *Sacharomyces cerevisiae*-ში არსებობს თუთიის შეტანის ორი განცალკევებული სისტემა (142) ერთი სისტემა სუბსტრატის მაღალ აფინურობით, აღიძვრება თუთია დეფიციტურ უჯრედებში და მეორე, რომელიც ნაკლებ აფინურობით ხასიათდება, კარგად რეგულირდება თუთიის არსებული მდგომარეობით. მე-9 გრაფიკი აჩვენებს Zn -ის შეთვისებას *A. globiformis* 151B-ს და *Arthrobacter sp.* 61B-ს მიერ 100 მგ/ლ $Cr(VI)$ -ის არსებობისას საკვებ გარემოში. იგი გვიჩვენებს, რომ მოსინჯულ ბაქტერიებში თუთიის შეთვისება, ქრომის შეთვისების მსგავსად, მოიცავს 2 ფაზას: სწრაფს და ნელს. სწრაფი ფაზა დაკავშირებულია მეტაბოლიზმ - დამოუკიდებელ $Zn(II)$ იონების ბაქტერიულ ზედაპირზე მიმაგრებასთან. *Arthrobacter*-ის სახეობის უჯრედის კედელი შეიცავს ცვილისებრი ლიპიდების ორმაგ შრეს და სქელი პეპტიდოგლიკანის შრეს. პოლისაქარიდების, მენაქინონების ფუნქციური ჯგუფები ამ ბიომოლეკულების შიგნით აწვდიან ამინო, კარბოქსილის, სულფჰიდრილის, ფოსფატის და თიოლის ჯგუფებს, რომლებსაც შეუძლიათ მეტალური იონების დაკავშირება. თუთიის აკუმულაციის ყველაზე დაბალი ტემპი შეიძლება აიხსნას $Zn(II)$ -ის იონების ინტრაცელულარული შეტანით. მე-9 გრაფიკი ასევე აჩვენებს Zn -ის შეთვისების განსხვავებას *A. globiformis* 151B-სა და *Arthrobacter sp.* 61B-ს შორის. განსაკუთრებით *Arthrobacter sp.* 61B-თვის Zn -

ის აკუმულაციის ტემპი მცირდება, (იკლებს) უფრო ადრე, ვიდრე *A.globiformis* 151 B-სთვის Zn(II) დატვირთვის გაზრდით.

Mg, Fe, K მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ ცოცხალი ორგანიზმების ფუნქციონირებაში. *Arthrobacter oxydans*-ის მიერ Cr-ის შეთვისების პროცესზე მათი გავლენის შესწავლისას ნაჩვენები იქნა, რომ Fe-ის და Mg-ის შემცველობა ბაქტერიულ უჯრედში თითქმის არ იცვლებოდა დროის მიხედვით. მთლიანი ქრომისა და Cr(III)-ის შემცველობა ბაქტერიულ უჯრედებში იზრდება Cr(VI)-ის მოქმედების დროის ზრდასთან ერთად ექსპერიმენტის მთელ პერიოდში გაჯერების გარეშე, მაშინ როდესაც K-ის შემცველობა მკვეთრად მცირდება. K-ის კონცენტრაციის მაქსიმალური მაჩვენებელი ფიქსირდება ბაქტერიებში მათ საკვებ გარემოში მოთავსებიდან პირველივე საათში, რის შემდეგაც იწყება K-ის რაოდენობის თანდათანობით შემცირება (145). აქედან გამომდინარე ბაქტერია *A. oxydans* შეიძლება გამოყენებული იქნას Cr(VI)-ით დაბინძურებული გარემოს გასაწმენდად (აღსადგენად). ექსპერიმენტის დასაწყისში Cr-ის და Cr(III)-ის შეთვისება საკმაოდ ნელა მიმდინარეობდა. შეთვისება მნიშვნელოვნად გაიზარდა მე-11 დღეს, როდესაც კალიუმის დონემ დაიწია ბაქტერიულ უჯრედში. შესაძლებელია ვივარაუდოთ, რომ კალიუმის ჭარბი კონცენტრაცია ამცირებს ქრომის შეთვისების სიჩქარეს. თავის მხრივ კალიუმის ასეთი სწრაფი შესვლა და მისი კონცენტრაციის მაღალი მაჩვენებელი ბაქტერიის ზრდის პირველივე საათში შესაძლოა განპირობებული იყოს K^+ -ის როგორც ციტოპლაზმა-სასიგნალო მოლეკულის მოქმედებით, რომელიც ააქტიურებს და ინდუცირებას უკეთებს ცილებსა და სატრანსპორტო სისტემებს, რაც უჯრედს ეხმარება შეეგუოს გარემო არეში აწეულ ოსმოლარობას (32, 8) შესაძლოა იგი Cr(VI)-ის ტოქსიკური ზემოქმედებისგან თავდაცვის სპეციალურ მექანიზმის ასამოქმედებლად ეხმარება აღნიშნულ ბაქტერიებს.

ქრომთან ერთად სხვა მეტალების ურთიერთქმედებამ ორმაგი (ბინარული) სისტემებით, თუთიის და ნიკელის შემთხვევაში *Arthrobacter globiformis* 151B-ში ქრომის შეთვისების დონე დაახლოებით 2-ჯერ გაზარდა. ხოლო ბიომასა, საკონტროლო უჯრედებთან შედარებით მნიშვნელოვნად არ შემცირებულა გარდა იმ შემთხვევისა, როდესაც მეტალების ნარევი (Cr+Cu+Zn+Mn+Ni) მოქმედებდა: ამ დროს ბიომასა

შემცირდა დაახლოებით 20-30%-ით. მეორე ტესტირებულ ბაქტერიაზე მეტალების ბინარულ და პოლიმეტალურ სისტემებს ქრომის შეთვისებაზე და ბაქტერიების ბიომასაზე მნიშვნელოვანი გავლენა არ მოუხდენია.

მიუხედავად გარემოში ართრობაქტერიების ასეთი ფართო გავრცელებისა, ცოტა რამ არის ცნობილი მათ პლაზმიდებზე (53). ადრე სხვადასხვა ზომის წრიული და წრფივი პლაზმიდები იქნა ნანახი *Arthrobacter*-ის სხვადასხვა სახეობებში (53,17). პლაზმიდური დნმ იქნა იდენტიფიცირებული *A. globiformis*-ის ზოგიერთ სახეობაში (59, 124), თუმცა პლაზმიდური დნმ არ აღმოჩნდა *A. globiformis*-ის არცერთ სახეობაში D.S.M. Culture Collection (Gottingen, FRG) [17]. DOE-ს გაერთიანებული გენომის ინსტიტუტის პროგრამის ფარგლებში გაიშიფრა მულტიმეტალტოლერანტული ბაქტერია *Arthrobacter* sp FB24-ის გენომი. ბაქტერია მდგრადია ქრომის მაღალი კონცენტრაციების მიმართ, შეიცავს წრიულ ქრომოსომას (4,698,945 bp) და სამ პლაზმიდას (96,488, 115,507 და 159,536 bp) მთლიანობაში: 5,070, 478 bp, აკოდირებს 4,536 ცილას, საიდანაც 1257-ის ფუნქცია უცნობია (150).

აგაროზას გელზე ელექტროფორეზით ჩვენი ექსპერიმენტების შედეგად ნაჩვენები იქნა რომ *Arthrobacter globiformis* 151B-ს გააჩნია პლაზმიდა, რომლის გამოყოფაც ბაქტერიიდან მოხერხდა როგორც ტუტე ლიზისის მეთოდით, ასევე ქიაგენის კრებულით (QIA prep Spin Miniprep Kit) (ილუსტრაცია 9,10,11). ჩვენი შედეგებით ქრომი კრიტიკული ფაქტორი აღმოჩნდა და უარყოფითი გავლენა მოახდინა ქრომ რეზისტენტული ბაქტერია *A. globiformis* 151B-დან გენომური თუ პლაზმიდური დნმ-ის ექსტრაქციაზე: ქრომის 50 მგ/ლ კონცენტრაციის შემცველ გარემო არეზე გაზრდილ ბაქტერიულ უჯრედებში პლაზმიდური დნმ აღარ დაფიქსირდა. მაშინ როდესაც 62 საათიან საკონტროლო (ქრომისგან თავისუფალ არეზე გაზრდილ) ბაქტერიულ უჯრედებში პლაზმიდური დნმ, კვლავ ფიქსირდებოდა.

ქრომი აღდგება უჯრედის შიგნით ან მის ზედაპირზე როგორც ენზიმური ასევე არაენზიმური მექანიზმების საშუალებით. აღდგენის პროცესში წარმოქმნილი ჟანგბადის რეაქტიული ფორმის წარმოქმნის შედეგად ზიანდება უჯრედული კომპონენტები დნმ-ის და ცილების ჩათვლით (155,156, 115).

მრავალი ბაქტერიული ცილა აკატალიზებს ქრომის ერთელექტრონიან აღდგენას Cr(V)-მდე, აღდგენის ციკლში წარმოქმნილი ჟანგბადის რეაქტიული ფორმის თანაობით. მსგავსი ცილები არ არიან ხელსაყრელი ბიორემედიაციისთვის, ვინაიდან ზიანს აყენებენ ბაქტერიას და მათი აღდგენის საბოლოო პროდუქტი სულაც არ არის Cr(III). *Pseudomonas putida*-ს ხსნადი ფლავოპროტეინი ChrR და *E.coli*-ის YieF დიმერული ცილები აღადგენენ ქრომს Cr(III)-მდე. აღნიშნული ცილები აღდგენის პროცესში წარმოქმნილ ჟანგბადის რეაქტიულ ფორმას აწვდიან NADH-ის ელექტრონს, რის საფუძველზეც ამცირებენ უჯრედში ჟანგბადის რეაქტიული ფორმის მომატებულ კონცენტრაციას (157).

ოქსიდაციური სტრესი, რომელიც იწვევს დნმ-ის დაზიანებას, ხშირ შემთხვევაში დაკავშირებულია ეგზოგენურ აგენტებთან, როგორც შეიძლება იყოს მეტალური იონები კერძოდ: რკინა, სპილენძი, ქრომი, კობალტი, ვანადიუმი, კადმიუმი, დარიშხანი, ნიკელი. მათი უჯრედშიდა აღდგენის პროცესში ხდება თავისუფალი რადიკალების ფორმირება, რისი საშუალებითაც ზიანდება როგორც ბირთვული, ასევე მიტოქონდრიული დნმ, ლიპიდები და ცილები (146). ქრომის ნაერთების *in vitro* კვლევებით ნაჩვენებია, რომ იგი შესაფერის ლიგანდურ გარემოში აზიანებს დნმ-ს, იწვევს პლაზმიდის და ცილის დახლეჩას (147, 148, 149). აღნიშნულ ფაქტებზე დაყრდნობით გამოდის რომ ბაქტერიული უჯრედის მიერ Cr(VI)-ის Cr(III)-ად აღდგენის პროცესს თან ახლავს ბაქტერიების ოქსიდაციური სტრესი, რაც დაკავშირებულია თავისუფალი რეაქტიული რადიკალების წარმოქმნასთან, რომლებიც აზიანებენ ბაქტერიის გენომურ დნმ-ს და ხლეჩენ პლაზმიდურ დნმ-ს. შედეგად ქრომიან არეზე გაზრდილი *A. globiformis* 151B-ს უჯრედებში აღარ მოჩანს პლაზმიდური დნმ და ქრომის მაღალი კონცენტრაციების დროს გენომური დნმ-ის რაოდენობის შემცირებას აქვს ადგილი. პლაზმიდის გაქრობის მიუხედავად, აღნიშნული ბაქტერიები ინარჩუნებენ სიცოცხლისუნარიანობას და ხანგრძლივი ექსპერიმენტის პერიოდში განაგრძობენ ტოქსიკური Cr(VI)-ის Cr(III) ფორმამდე აღდგენას და ბაქტერიულ უჯრედში დაგროვებას. აღნიშნული ფაქტის დასტურია ეპრ სპექტრომეტრზე დაფიქსირებული Cr(III)-ის ნაერთების მკვეთრი სიგნალი, რომელიც ფიქსირდება ბაქტერიული

უჯრედების ქრომატიან ხსნარში ინკუბირების შემდეგ 2 კვირაზე ხანგრძლივი პერიოდის განმავლობაში.

დასკვნა და რეკომენდაციები

1. *Arthrobacter*-ის გვარის ბაქტერიული შტამები *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter globiformis* 151B და *Arthrobacter* sp.61B გარემოდან ადვილად ითვისებენ Cr(VI)-ს და აღადგენენ Cr(VI)-ს Cr(III) ნაერთებად.
2. Cr(III)-ის წარმოქმნის ნახევარდრო ბაქტერიებში თითქმის ტოლია Cr(V)-ის გარდაქმნის ნახევარდროსი და იგი მერყეობს 3-დან 6 დღემდე.
3. დადგენილ იქნა Cr(VI)-ის აღდგენის ლოკალიზაცია; კერძოდ, Cr(VI)-ის აღდგენა ნაჩვენებია ართრობაქტერიის უჯრედის კედელზე: აღდგენილი Cr(III)-ნაერთები მტკიცედ არიან დაკავშირებული ბაქტერიულ უჯრედთან.
4. კალიუმის შეთვისება ბაქტერიაში აღწევს მაქსიმალურ რაოდენობას ბაქტერიის კალიუმიან გარემოში ზრდის პირველივე საათში, ერთი საათის შემდეგ ბაქტერია იწყებს კალიუმის “გამოდევნას” უჯრედიდან. ნაჩვენები იქნა, რომ კალიუმის მაღალი კონცენტრაციებისას ბაქტერიულ უჯრედში დაბალია ქრომის შეთვისების სიჩქარე.
5. ნაჩვენები იქნა, რომ Zn(II)-ის იონები განსაზღვრული კონცენტრაციით (50 მგ/ლ) ზრდიან ბაქტერიული უჯრედების მიერ Cr-ის აკუმულაციის და აღდგენის პოტენციალს. Zn-ის მაღალი კონცენტრაციები (200მგ/ლ-ზე მეტი) ხელს უშლის Cr(VI)-ის Cr(III)-ად გარდაქმნის პროცესს.
6. ორმაგი სისტემებით (Cr+Cu; Cr+Mn; Cr+Ni) ზემოქმედებისას მეტალები არ აფერხებენ ბაქტერიის მიერ ქრომის შეთვისების და აღდგენის პროცესს. მეტალური იონების ერთობლივი მოქმედება ანელებს ბაქტერიების ზრდის სიჩქარეს.
7. აგაროზას გელზე ელექტროფორეზით დადასტურდა, რომ *Arthrobacter globiformis* 151B- გააჩნია პლაზმიდა, რომელიც ქრება ბაქტერიის მიერ ქრომის აღდგენის პროცესში, სავარაუდოდ, წარმოქმნილი თავისუფალი რადიკალების გავლენით.

8. აღნიშნულ ნაშრომში აღწერილი კვლევის შედეგები შეიძლება წარმატებით იქნას გამოყენებული ბიორემედიაციული პროცესებისთვის, კერძოდ Cr(VI)-ით დაბინძურებული გარემოს აღსადგენად.

ბიბლიოგრაფია

1. Adriano DC, 1986. Trace elements in the terrestrial environment. Springer-Verlag, New York
2. Alvarez AH, Moreno-Sanchez R, Cervantes C. 1999. Chromate efflux by means of the ChrA chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 181:7398-7400.
3. Andrew McCartor JD, Dan Becker BA, World's worst pollution problems 2010., Blacksmith Institute; New York & Green Cross; Switzerland
4. Appenroth KJ, Bischoff M, Garbys H, Stoeckel J, Swartz HM, Walezak T, Winnefeld K, 2000 Kinetics of chromium(V) formation and reduction in fronds of the duckweed *Spirodela polyrrhiza*-a low frequency EPR study. J Inorg Biochem 78:235-242
5. Arslan P, Beltrame M, Tomasi A. 1987. Intracellular chromium reduction. Biochim. Biophys. Acta 931:10-15.
6. Asatiani N, Abuladze M, Kartvelishvili T, Bakradze N, Sapojnikova N, Tsibakhashvili N, Tabatadze L, Lejava L, Asanishvili L, Holman HY, 2004. Effect of Cr(VI) action on *Arthrobacter oxydans*. Curr Microbiol 49:321-326
7. Bafana A, Krishnamurthi K, Patil M, Chakrabarti T; 2010. Heavy metal resistance in *Arthrobacter ramosus* strain G2 isolated from mercuric salt-contaminated soil. Journal of hazardous materials; 177(1-3):481-6
8. Ballal A, Basu B, Apte SK, 2007. The Kdp-ATPase system and its regulation. J Biosci. 32(3):559-68
9. Barnhart, J. 1997. Chromium chemistry and implications for environmental fate and toxicity. J. Soil Contam. 6:561-568.
10. Bartlett, R. J. 1991. Chromium cycling in soils and water: Links, gaps, and methods. Environ. Health Perspect. 92:17-24.
11. Bartlett R, James BR, 1988. Mobility and bioavailability of chromium in soils. Adv Environ Sci Technol 20:267-304

12. Beattie JK, Haight GPJ. 1972. Chromium(VI) oxidations of inorganic substrates. Prog. Inorg. Chem. 17:93-145
13. Beveridge TJ, Murray RG, 1980. Sites of metal deposition in the cell wall of bacillus subtilis. J Bacteriol 141:876-887
14. Bopp LH, Chakrabarty AM, Ehrlich HL, 1983. Chromate resistance plasmid in Pseudomonas fluorescens. J. Bacteriol. 155:1105-1109
15. Bopp LH, Ehrlich HL, 1988. Chromate resistance and reduction in Pseudomonas fluorescens strain LB300. Arch. Microbiol. 150:426-431
16. Bowen Humphry John Moule, 1979 Environmental chemistry of the elements, Academic press, London
17. Brandsch R, Decker K, 1984. Isolation and partial characterization of plasmid DNA from *Arthrobacter oxidans*, Arch. Microbiol, 138: 15-17
18. Branco R, Molaris PV, 2013. Identification and Characterization of the Transcriptional Regulator ChrB in the Chromate Resistance Determinant of Ochrobactrum tritici 5bv11; PloS ONE 8(11): e77987. Doi:10.1371/journal.pone.0077987
19. Bruins MR, Kapil S, Oehme F, 2000. Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicol Environ Saf 45:198-207
20. Campos J, Martinez-Pacheco M, Cervantes C, 1995. Hexavalent-chromium reduction by a chromate-resistant Bacillus sp. strain. Antonie Van Leeuwenhoek 68:203-208
21. Cary, E. E. 1982. Chromium in air, soil, and natural waters, p. 49-64. In S. Langard (ed.), Biological and environmental aspects of chromium, vol. 5. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam
22. Cervantes C, Silver S, 1992. Plasmid chromate resistance and chromate reduction. Plasmid 27:65-71
23. Clark DP, 1994. Chromate reductase activity of Enterobacter aerogenes is induced by nitrite. FEMS Microbiol Lett. 122:233-238
24. Chen JM, Hao OJ, 1998. Microbial Cr(VI) reduction, Crit. Rev. Environ. Sci. Technol, 28(3):219-251

25. Choudhury R, Srivastava S, 2001. Zinc resistance mechanisms in bacteria. *Curr Sci* 81:768-775
26. Codd R, Lay PA, Tsibakhashvili NY, Kalabegishvili TL, Murusidze IG, Holman HY, 2006. Chromium(V) complexes generated in *Arthrobacter oxydans* by simulation analysis of EPR spectra. *J inorg Biochem* 100:1827-183
27. Coleman RN, Paran JH, 1983. Accumulation of hexavalent chromium by selected bacteria. *Environ. Technol. Lett.* 4:149-156
28. Connett PH, Watterhahn KE, 1983. Metabolism of carcinogen chromate by cellular constituents. *Struct. Bonding* 54:93-124
29. Cotton FA, Wilkinson G, Murillo CA, Bochmann M, 1999. *Advanced Inorganic Chemistry*, 6 ed. Wiley-Interscience, New York
30. Daulton TL, Little BJ, Meehan JJ, Blom DA, Allard LF, 2007. Microbial reduction of chromium from the hexavalent to divalent state., *Geochim Cosmochim Acta* 71:556-565
31. Dragun J. 1988. Element Fixation in Soil, *The Soil Chemistry of Hazardous Materials*. Hazardous Materials Control Resources Institute, Silver Spring, Md, p. 75-152
32. Epshtein W, 2003. The roles and regulation of potassium in bacteria; *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*;75:293-320
33. Fendorf SE, 1995. Surface reactions of chromium in soils and waters. *Geoderma* 67:55-71
34. Flores A, Perez JM, 1999. Cytotoxicity, apoptosis, and in vitro DNA damage induced by potassium chromate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 161:75-81
35. Forsberg, CW, 1978. Effects of heavy metals and other trace elements on the fermentative activity of the rumen microflora and growth of functionally important rumen bacteria. *Can. J. Microbiol.* 24:298-306
36. Francis, A. J., C. J. Dodge, and J. B. Gillow. 1992. Biodegradation of metal citrate complexes and implications for toxic-metal mobility. *Nature* 356:140-142.
37. Francis CA, Obraztsova AY, Tebo BM, 2000. Dissimilatory metal reduction by the facultative anaerobe *Pantoea agglomerans* SP1. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:543-548.

38. Fredrickson, J. K., H. M. Kostandarithes, S. W. Li, A. E. Plymale, and M. J. Daly. 2000. Reduction of Fe(III), Cr(VI), U(VI), and Tc(VII) by *Deinococcus radiodurans* R1. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2006-2011
39. Gadd GM, 1990. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia* 46. Birkhauser, Basel pp.834-840
40. Gadd GM, Griffiths A, 1978 Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microb Ecol* 4:303-317.
41. Garbisu, C., I. Alkorta, M. J. Llama, and J. L. Serra. 1998. Aerobic chromate reduction by *Bacillus subtilis*. *Biodegradation* 9:133-141
42. Gruber, J.E., and K.W. Jennette. 1978. Metabolism of the carcinogen chromate by rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82: 700-706
43. Hardoyo KJ, Ohtake H, 1991. Effect of heavy metal cations on chromate reduction by *Enterobacter cloacae* strain H01. *J Gen Appl Microbiol* 37:519
44. Hazen, T. C., and H. H. Tabak. 2005. *Rev. Environ. Sci. & Bio/Technol.* 4: 157-185
45. Hazen, T. C., and D. A. Stahl. 2006. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17: 285-290
46. Higgins, T. E., A. R. Halloran, and J. C. Petura. 1997. Traditional and innovative treatment methods for Cr(VI) in soil. *J. Soil Contam.* 6:767-797.
47. Horitsu, H. 1987. Enzymatic reduction of hexavalent chromium by hexavalent chromium tolerant *Pseudomonas ambigua* G-1. *Agric. Biol. Chem.* 51:2417-2420.
48. Howe JA, Loeppert RH, Deroose VJ, Hunter DB, Bertsch PM, 2003. Localization and speciation of chromium in subterranean clover using XRF, XANES, and EPR spectroscopy. *Environ Sci Technol* 37:4091-4097
49. Icopini, G. A., and D. T. Long. 2002. Speciation of aqueous chromium by use of solid-phase extraction in the field. *Environ. Sci. Technol.* 36:2994-2999.
50. Issazadeh K, Jahanpour N, Pourghorbamli F, Raeisi G, Faekhondaeh J, 2013. Heavy metals resistance by bacterial strains. *Annals of Biological Research*, 4(2): 60-63
51. Ishibashi Y, Cervantes C, Silver S, 1990. Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2268-2270

52. James, B. R., and R. J. Bartlett. 1983. Behavior of chromium in soils: V. Fate of organically complexed Cr(III) added to soil. *J. Environ. Qual.* 12:169-172
53. Jerke K, Nakatsu CH, Beasley F., Konopka F A, 2008. Comparative analysis of eight *Arthrobacter* plasmids, *Plasmid*, 59, 73-85
54. Joshi-Tope, G., and A. J. Francis. 1995. Mechanisms of biodegradation of metal-citrate complexes by *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 177:1989-1993
55. Ji G, Silver S, 1995. Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern, *J. Ind. Microbiol.* 14, 61-75
56. Kalabegishvili TL, Tsibakhashvili N Ya, Holman HY. N, 2003, Electron spin resonance (ESR) study of chromium(V) formation and decomposition by basalt-inhabiting bacteria, *Environmental Science & Technology*, 37, 4678 – 4684
57. Karbonowska, H., A. Wiater, and D. Hulanicka. 1977. Sulphate permease of *Escherichia coli* K12. *Acta Biochim. Pol.* 24:329-334
58. Khalid A, Hussein, Jin Ho Joo, 2013. Heavy metal resistance of bacteria and its impact on the production of antioxidant enzymes, academic journals: *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 7(20), pp.2288-2296
59. Kolenbrander, M. Weinberger. 2-Hydroxypyridine Metabolism and Pigment Formation in Three *Arthrobacter* Species, *Journal of Bacteriology*, 1977, 132, 51-59
60. Kredich, N. M. 1996. Biosynthesis of cysteine, p. 514-527. In F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli and Salmonella cellular and molecular biology*, 2 ed, vol. 1. ASM Press, Washington D.C.
61. Kwak, Y. H., D. S. Lee, and H. B. Kim. 2003. *Vibrio harveyi* nitroreductase is also a chromate reductase. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4390-4395.
62. Langard, S. 1990. One hundred years of chromium and cancer: A review of epidemiological evidence and selected case reports. *Am. J. Ind. Med.* 17:189-215
63. Li, Z., and R. S. Bowman. 2001. Regeneration of surfactant-modified zeolite after saturation with chromate and perchloroethylene. *Water Res.* 35:322-326.

64. Lloyd, J. R., A. N. Mabbett, D. R. Williams, and L. E. Macaskie. 2001. Metal reduction by sulphate-reducing bacteria: physiological diversity and metal specificity. *Hydrometallurgy* 59:327-337.
65. Lloyd J. R, and Lovley D. R., Microbial detoxification of metals and radionuclides. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2001**, 12, 248-253
66. Losi ME, Amrhein C, 1994. Environmental Biochemistry of Chromium; Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 136, pp 91-121
67. Lin Z, Zhu Y, Kalabegishvili TL, Tsibakhashvili NY, Holman HY, 2006. Effect of chromate action on morphology of basalt-inhabiting bacteria. *Mater Sci Eng C* 26:610-612
68. Liu KJ, Jiang J, Schi X, 1995. Low frequency EPR study of chromium VI in living plants, *Biochem Biophys Res Commun* 206:829-834
69. Lovley, D. R., and E. J. P. Philips. 1994. Reduction of chromate by *Desulfovibrio vulgaris* and Its c3 Cytochrome. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:726-728.
70. Luo Z, Wadhawan A, Bouwer EJ, 2010. Sorption behavior of nine chromium (III) organic complexes in soil; *Int.J Environ. Sci. Tech*, 7 (1), 1-10, ISSN: 1735-1472
71. Margesin R, Schinner F, 2007. Bacterial heavy metal-tolerance extreme resistance to nickel in *Arthrobacter* spp. strains, *Journal of Basic Microbiology*, 36(4):269 - 282.
72. Marthur SP, Paul EX, 1967. Microbial utilization of soil humic acids. *Can J Microbiol* 13:573-580
73. Mattagajasingh, S. N., and H. P. Misra. 1996. Mechanism of the carcinogenic chromium(VI)-induced DNA-protein cross-linking and their characterization in cultured intact human cells. *J. Biol. Chem.* 271:33550-33560.
74. Mattuck, R., and N. P. Nikolaidis. 1996. Chromium mobility in freshwater wetlands. *J. Contam. Hydrol.*
a. 23:213-232.

75. McLean J, Beveridge TJ. 2001. Chromate reduction by a *Pseudomonad* isolated from a site contaminated with chromated copper arsenate. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1076-1084
76. Means, J. L., D. A. Crerar, and J. O. Duguid. 1978. Migration of radioactive wastes: radionuclide mobilization by complexing agents. *Science* 200:1477-1480.
77. Megharaj, M., S. Avudainayagam, and R. Naidu. 2003. Toxicity of hexavalent chromium and its reduction by bacteria isolated from soil contaminated with tannery waste. *Curr. Microbiol.* 47:51-54.
78. Mertz W, 1975. Effects and metabolism of glucose tolerance factor. *Nutr. Rev.* 33:129-135.
79. Michel, C., M. Brugna, C. Aubert, A. Bernadac, and M. Bruschi. 2001. Enzymatic reduction of chromate: comparative studies using sulfate-reducing bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55:95-100.
80. Middleton, S. S., R. B. Latmani, M. R. Mackey, M. H. Elisman, B. M. Tebo, and C. S. Criddle. 2003. Cometabolism of Cr(VI) by *Shewanella oneidensis* MR-1 produces cell-associated reduced chromium and inhibits growth. *Biotechnol. Bioeng.* 83:627-637.
81. Myers, C. R., B. P. Carstens, W. E. Antholine, and J. M. Myers. 2000. Chromium(VI) reductase activity is associated with the cytoplasmic membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J. Appl. Microbiol.* 88:98-106. (Cr-20)-
82. Nies, D. H. 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:313-339.
83. Nies, D. H. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:730-750
84. Nies D. H, Silver S, 1995. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances, *J. Bacteriol*, 14, 189-199
85. Nies, D. H., S. Koch, S. Wachi, N. Peitzsch, and J. M. H. Saier. 1998. CHR, a novel family of prokaryotic proton motive force-driven transporters probably containing chromate/sulfate antiporters. *J. Bacteriol.* 180:5799-5802.

86. Norseth, T. 1986. The carcinogenicity of chromium and its salts. Br. J. Ind. Med. 43:649-651.
87. Nriagu J. O., Pacnya J. M. 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals, *Nature*, 333, 134-139
88. Nriagu, J. O., and J. B. Sprague. 1988. Chromium in the natural and human environments, vol. 20. Wiley, New York.
89. Ohnesorge FK, Wilhelm M 1991. Zinc. In: Merian E (ed) Metals and their compounds in the environment. Wiley-VCH, Wein-heim, pp 1309-1342.
90. Ohtake, H., C. Cervantes, and S. Silver. 1987. Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. J. Bacteriol. 169:3853-3856.
91. Ohtake H., Fujii E., Toda K., Reduction of toxic chromate in an industrial effluent by use of chromate-reducing strain of *Enterobacter cloacae* HO1, *Biocatalysis*, **1990**, 4(2), 227-234
92. Park, C. H., M. Keyhan, B. Wielinga, S. Fendorf, and A. Martin. 2000. Purification to homogeneity and characterization of novel *Pseudomonas putida* chromate reductase. Appl. Environ. Microbiol. 66:1788-1795.
93. Pimentel, B. E., R. Moreno-Sanchez, and C. Cervantes. 2002. Efflux of chromate by *Pseudomonas aeruginosa* cells expressing the ChrA protein. FEMS Microbiol. Lett. 212:249-254.
94. Poole R. K, Gadd G. M. 1989. Metals: Microbe interactions, IRLR Press, Oxford, ,37p
95. Priester JH, Olson SG, Webb SM, Neu MP, Hersman LE, Veholden PA, 2006. Enhanced exopolymer production and chromium stabilization in *Pseudomonas Putida* unsaturated biofilms. Appl Environ Microbiol 72:1988-1996.
96. Puzon GJ, Tokala RK, Zhang H, Yonge D, Peyton BM, Xun L, 2008. Mobility and recalcitrance of organo –chromium(III) complexes; Journal: Chemosphere , vol. 70, no. 11, pp. 2054-2059

97. Puzon GJ, Roberts AJ, Kramer DM, Xun L, 2005. Formation of soluble organo-chromium(III) complexes after chromate reduction in the presence of cellular organics. *Environ Sci Technol* 38:2811-2817
98. Puzon, GJ, Petersen JN, A. G. Roberts, D. M. Kramer, and L. Xun. 2002. A bacterial flavin reductase system reduces chromate to a soluble chromium(III)-NAD⁺ complex. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 294:76-81.
99. Remediation of metals contaminated soils and groundwater. technology Evaluation Report, GWRTAS, TE-2002
100. Rcheulishvili O, Datukishvili N, Gabriadze I, Kutateladze T, Pataraya D, Gurielidze M, Metreveli N, 2013. Effect of chromate on DNA of *Arthrobacter globiformis*, *Nano Studies*, 7:193-200
101. Ribeiro AB, Mateus EP, Ottosen LM, Bech-Nielsen G, 2000. Electrodialytic removal of Cu, Cr, and As from chromated copper arsenate-treated timber waste. *Environ. Sci. Technol.* 34:784-788
102. Romanenko, V. I., and V. N. Koren'kov. 1977. A pure culture of bacteria utilizing chromates and bichromates as hydrogen acceptors in growth under anaerobic conditions. *Mikrobiologiya* 43:414-417
103. Rouch DA, Lee BTO, Morby AP, 1995. Understanding cellular responses to toxic agents: A model for mechanism choice in bacterial metal resistance. *J. Ind. Microbiol*, 14, 132-241
104. Salzman G, Holz O, 2002. The bacterial cell wall. Springer, Berlin, pp 211-217
105. Sani R.K., Peyton B.M., Smith W.A., Apel W.A., Opeterson J.N. Dissimilatory reduction of Cr(VI), Fe(III), and U(VI) by *Cellulomonas* isolates, **2002**, 60, 192-199
106. Shen, H., and Y. Wang. 1993. Characterization of enzymatic reduction of hexavalent chromium by *Escherichia coli* ATCC 33456. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3771-3777
107. Silver S, 1992. Plasmid-determined metal resistance mechanisms: range and overview, *Plasmid*, 27, 1-3
108. Sisti F., Allegretti P., and Donati E., Reduction of dichromate by *Thiobacillus ferrooxidans*, *Biotechnol. Lett.*, **1996**, 18, 1477-1480

109. Slaveykova, VI, Wilkinson KJ, 2005. Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: critical review of the biotic ligand model. *Environ. Chem*, 2:9-24
110. Smillie, R. H., K. Hunter, and M. Loutit. 1981. Reduction of chromium(VI) by bacterially produced hydrogen sulphide in a marine environment. *Water Res.* 15:1351-1354
111. Smith, C. H. 1972. Chromium: Element and geochemistry. In: R. W. Fairchild, ed. *The encyclopedia of Geochemistry and Environmental Science. Encyclopedia of earth sciences Series. Vol. IVA.* Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 167-170
112. Srivastava P, Kowshik M, 2013. Mechanisms of Metal Resistance and Homeostasis in Haloarchaea, *Journal: Archaea*, Volume 2013, Article ID 732864, 16 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/732864>
113. Stearns, D. M., L. J. Kennedy, K. D. Courtney, P. H. Giangrande, L. S. Phieffer, and K. E. Wetterhahn. 1995. Reduction of chromium(VI) by ascorbate to chromium-DNA binding and DNA strand breaks in vitro. *Biochemistry* 34:910-919
114. Suzuki T, Miyata N, Horitsu H, Kawai K, Takamizawa K, Tai Y, Okazaki M, 1992. NAD(P)H-dependent chromium(VI) reductase of *Pseudomonas ambigua* G-1: a Cr(V) intermediate is formed during the reduction of Cr(VI) to Cr(III). *J. Bacteriol.* 174:5340-5345
115. Suzuki Y, Banfield J, 2004. Resistance to accumulation of uranium by bacteria from a uranium- contaminated site. *Geomicro-biol J* 21:113-121
116. Tebo BM, Obraztsova AY, 1998. Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors. *FEMS Microbiol. Lett.* 162:193-198
117. Thomas RAP, Beswick AJ, Basnakova G, Moller R, Macaskie E, 2000. Growth of naturally occurring microbial isolates in metal-citrate medium and bioremediation of metal-citrate wastes. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 75:187-195
118. Thomas R A P, Lawlor K, Bailey M, Macaskie L E, 1998. Biodegradation of metal-EDTA complexes by an enriched microbial population. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1319-1322

119. Turick, C. E., W. A. Apel, and N. S. Carmiol. 1996. Isolation of hexavalent chromium-reducing anaerobes from hexavalent-chromium-contaminated and noncontaminated environments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44:683-688
120. Tsibakhashvili NY, Kalabegishvili TL, Rcheulishvili AN, Murusidze IG, Kerkenjia SM, **Rcheulishvili OA**, Holman HY, 2009. Decomposition of Cr(V)-diols to Cr(III) complexes by *Arthrobacter oxydans*. *Microb Ecol* 57:360-365
121. Tsibakhashvili N, Mosulishvili L , Kalabegishvili T, Pataraya D, Gurielidze M, Nadareishvili G, Holman HY, 2002. Chromate –resistant and reducing microorganisms in Georgia basalts: their distribution and characterization, *Fresenius Environmental Bulletin* 11(7), 352-361
122. Tsibakhashvili NY, Mosulishvili LM, Kalabegishvili TL, Kirkesali EI, Murusidze IG, Kerkenjia SM, Frontasieva MV, Holman HY, 2008. Biotechnology of Cr(VI) transformation into Cr(III) complexes. *J radioanal Nucl Chem* 278:565-569
123. Tsibakhashvili NY, Kalabegishvili TL, Rcheulishvili AN, Ginturi EN, Lomidze LG, **Rcheulishvili OA**, Gvarjaladze DN, Holman HY, 2011. Effect of Zn(II) on the reduction and accumulation of Cr(VI) by *Arthrobacter* species. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 38:1803-1808
124. Turnbull GA, Ousley M, Walker A, Shaw E, Morgan JA, 2001. Degradation of substituted phenylurea herbicides by *Arthrobacter globiformis* strain D47 and characterization of a plasmid-associated hydrolase gene puhA, *Appl. Environ. Microbiol*, 67, 2270-2275
125. U.S. Department of the Interior U.S. Geological Survey; Mineral commodity summaries 2013
126. U.S. Department of Energy Office of Environmental Management. 2000. In Situ Redox Manipulation. Innovative Technology Summary Report DOE/EM-0499. U.S. Department of Energy Office of Environmental Management
127. U.S. Environmental Protection Agency. 2002. Consumer Factsheet on Chromium. U.S. Environmental Protection Agency

128. U.S. Environmental Protection Agency. 2002. Occurrence Summary and Use Support Document for the Six-Year Review of National Primary Drinking Water Regulations. Environmental Protection Agency
129. Viamajala, S., B. M. Peyton, W. A. Apel, and J. Petersen, N. 2002. Chromate reduction in *Shewanella oneidensis* MR-1 is an inducible process associated with anaerobic growth. *Biotechnol. Prog.* 18:290-295
130. Vincent, J. B. 2000. Elucidating a biological role for chromium at a molecular level. *Acc. Chem. Res.* 33:503-510
131. Voitkun V, Zhitkovich A, Costa M, 1998. Cr(III)-mediated crosslinks of glutathione or aminoacids to the DNA phosphate backbone are mutagenic in human cells. *Nucleic Acids Res.* 26:2024-2030
132. Wang P, Mori T, Kommori K, Sasatsu M, Toda K, Ohtake H, 1989. Isolation and characterization of an *Enterobacter cloacae* strain that reduces hexavalent chromium under anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1665-1669
133. Wang, P, Mori T, Toda K, Ohtake I, 1990. Membrane-associated chromate reductase activity from *Enterobacter cloacae*. *J. Bacteriol.* 172:1670-1672
134. Wang Y.-T., Shen H., Modeling Cr(VI) reduction by pure bacterial cultures. *Wat. Res.*, **1997**, 3(4), 727-732
135. Wielinga, R., M. M. Mizuba, C. M. Hansel, and S. Fendorf. 2001. Iron promoted reduction of chromate by dissimilatory iron-reducing bacteria. *Environ. Sci. Technol.* 35:522-527
136. Wong C M, Silver and D.J. Kushner. 1982. Effects of chromium and manganese on *Thiobacillus ferrooxidans*. *Can. J. Microbiol.* 28:536-544
137. World Health Organization. 1996. Health criteria and other supporting information., p. 206-215, Guidelines for drinking-water quality, 2 ed, vol. 2, Geneva.
138. Xu, J., G. J. Bubley, B. Detrick, L. J. Blankenship, and S. R. Patierno. 1996. Chromium(VI) treatment of normal human lung cells results in guanine-specific DNA polymerase arrest, DNA-DNA cross-links and S-phase blockade of cell cycle. *Carcinogenesis* 17:1511-1517

139. Yamada Y, Motoi H, Kinoshita S, Takada N, Okoda H, 1975. Oxidative degradation of squalene by *Arthrobacter* species. *Appl Microbiol* 29:400-404
140. Yeghiazaryan K, Peeva,V, Shenoy A, Schild H, Golubnitschaja, O; 2013. Chromium-picolinate therapy in diabetes care: molecular and subcellular profiling revealed a necessity for individual outcome prediction, personalised treatment algorithms & new guidelines; *Infect Disord Drug Targets*.. 11(2): 188–195
141. Yun, Y, D. Park, J. M. Park, and B. Volesky. 2001. Biosorption of trivalent chromium on the brown seaweed biomass. *Environ. Sci. Technol.* 35:4353-4358.
142. Zhao H, Eide DJ, 1996. The yeast *ZRT1* gene encodes the zinc transporter protein of a high affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2454-2458
143. U.S. Environmental Protection Agency. 2002. Occurrence Summary and Use Support Document for the Six-Year Review of National Primary Drinking Water Regulations. Environmental Protection Agency
144. ჰიგიენური მოთხოვნები ნახმარი წყლებისა და მათი ნალექების სარწყავად და სასუქად გამოყენებისადმი სანიტარული წესები და ნორმები სან წ. დან 2.1.7. საქართველოს შრომის, ჯანმრთელობისა და სოციალური დაცვის მინისტრის 2001წ. 16 აგვისტოს N297/6 ბრძანება
145. Rcheulishvili OA, Metreveli NO, Rcheulishvili AN, Kalabegishvili TL, Holman HY, 2013. Uptake of Cr, Fe, Mg and K by Bacteria *Arthrobacter oxydans*, *Icobte* 2013 Proceedings of the International Conference on the Biogeochemistry of trace elements, pp.543-544
146. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovich M, Mazur M; 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-incuded cancer; *Chem Biol Interact.* 10:160(1):1-40;
147. Vijayalakshmi R, Kanthimathi M, Subramanian V, Nair BU, 2000. “Interaction of DNA with $[Cr(\text{Schiff base})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{ClO}_4$,” *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1475, no. 2, pp. 157–162

148. Shrivastava HY, Nair BU, 2001. "Chromium(III)-mediated structural modification of glycoprotein: impact of the ligand and the oxidants," Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 285, no. 4, pp. 915–920
149. Shrivastava HY, Nair BU, 2000. "Protein degradation by peroxide catalyzed by chromium (III): role of coordinated ligand," Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 270, no. 3, pp. 749–754
150. Nakatsu CH, Barabote R, Thompson S, Bruce D, Detter C, Brettin T, Han C, Beasley F, Chen W, Konopka A, Xie G, 2013. Complete genome sequence of *Arthrobacter* sp. strain FB24; Standards in Genomic Science; 9(1): 106–116
151. Hu P, Brodie E, Suzuki Y, Mcadams HH, Andersen GL, 2005. Whole genome Transcriptional Analysis of heavy metal stress in *Caulobacter crescentus*; Journal of Bacteriology, vol. 187 no.24, 8437-8449
152. Macaskie LE, Bonthron KM, Yong P, Goddard DT, 2000. Enzymatically mediated bioprecipitation of uranium by a *Citrobacter* sp.: a concerted role for exocellular lipopolysaccharide and associated phosphatase in biomineral formation. Microbiology 146:1855-1867
153. Strandberg GW, Shumate II SE, Parrott JR, 1981. Microbial cells as biosorbents for heavy metals: Accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ Microbiol. 41:237-245.
154. Suzuki Y, Kelly SD, K. M. Kemner, and J. F. Banfield. 2003. Microbial populations stimulated for hexavalent uranium reduction in uranium mine sediment. Appl. Environ. Microbiol. 69:1337-1346
155. Cervantes CJ, Campos-Garcia S, Devars F, Gutierrez-Corona H, Loza-Tavera, J. C. Torres-Guzman, and R. Moreno-Sanchez. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. FEMS Microbiol. Rev. 25:335-347
156. Singh J, Carlisle DL, Pritchard DE, Patierno SR, 1998. Chromium-induced genotoxicity and apoptosis: relationship to chromium carcinogenesis. Oncol. Rep. 5:1307-1318.

157. Ackerley DF, Gonzalez CF, Keyhan M, Blake II R, Matin A. 2004. Mechanism of chromate reduction by the *Escherichia coli* protein, NfsA, and the role of different chromate reductases in minimizing oxidative stress during chromate reduction. *Environ. Microbiol.* **6**:851-860
158. Valls M, Lorenzo Vde. 2002. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**:327-338