

**Chemical and Biological Methods  
Of Environmental Pollution Determination**

**AvtandilTsurtsunia**

*Master thesis is submitted at the Ilia State University School of Natural Sciences and  
Engineering*

*Of the requirements for the Nature Management Master Degree*

Master program of life Sciences

Supervisors:

Agnieszka Węgrzyn(JU) , PhD

Stefan Witkowski(JU) , PhD

Irakli Macharishvili, Doctorante (ISU) Associate professor, PhD

**Ilia State University**

**Tbilisi, 2015**

## Acknowledgment

This master thesis has been supported by ErasmusMundusELECTRA scholarship program and Jagiellonian University in Krakow.

I have taken efforts in this project. However, it would not have been possible without the kind support and help of many individuals and organizations. I would like to extend my sincere thanks to all of them.

I am highly indebted to Ms. Agnieszka Węgrzyn and Mister Stefan Witkowski, for their guidance and constant supervision as well as for providing necessary information regarding the project & also for their support in completing the project.

I would like to express my gratitude and thanks to my supervisor at Ilia State University mister Irakli Macharashvili and our dean mister David Tarkhnishvili.

I would like to express my special gratitude and thanks to Company of oil and gas in Krakow, giving me such attention and time.

My thanks and appreciations also go to my colleague in developing the project and people who have willingly helped me out with their abilities.



# Contents

சுருக்கம்.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCTION.....	3
CHAPTER 1 HEAVY METALS.....	4
1.1 Definition .....	4
1.2 Environmental Hazards (Sodhi 2005) .....	5
1.3 Characterization of selected groups of microorganisms .....	6
1.4 Bioremediation .....	7
CHAPTER 2 YEAST (SACCHAROMYCES CEREVISIAE) .....	8
2.1 Biomaterial for research.....	8
2.2 Saccharomyces cerevisiae cell structure.....	8
2.3 Life Cycle .....	10
2.4 Energy Budget for Growth of baker yeast.....	11
2.5 Heavy metals binding to microorganisms .....	12
CHAPTER 3. TOXICITY TEST .....	14
3.1 LD50 .....	14
3.2 LC <sub>50</sub> .....	15
3.3 Characterization of adsorbent – expanded vermiculite .....	15
CHAPTER 4 – METHODOLOGY.....	18
4.1 Equipment and materials .....	18
4.2 Characterization of adsorbent – expanded vermiculite .....	18
4.3 Determination of toxicity parameters .....	20
4.3.1 Preparation of the experimental setup for measurement.....	21
4.3.2 Optimization of experimental conditions for measurement of metabolic activity of yeast .....	22
4.3.3 Measurement of toxicity level of selected heavy metals: Cd, Zn, Hg .....	23

4.3.4 Decreasing of toxicity of wastewater using adsorption properties of expanded vermiculite (toxicity tests with pre-adsorption) .....	24
<b>4.4 Determination of reaction mixture (wastewater model) parameters before and after toxicity measurements ....</b>	<b>25</b>
4.4.1 Concentration of heavy metals .....	26
<b>4.5 Calculations .....</b>	<b>26</b>
<b>CHAPTER 5- RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>28</b>
5.1 Optimization of experimental conditions for measurement of metabolic activity of yeast.....	28
5.2 Measurement of toxicity level of selected heavy metals: Cd, Zn, Hg .....	31
5.3 Decreasing of toxicity of wastewater using adsorption properties of expanded vermiculite .....	48
<b>CHAPTER 6 - CONCLUSIONS .....</b>	<b>57</b>
<b>BIBLIOGRAPHY.....</b>	<b>59</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>63</b>
<b>ANNEXES 1.....</b>	<b>63</b>
<b>ANNEXES 2.....</b>	<b>68</b>

## Abbreviations

Fig. – Figure

E.g – Example

SSA – specific surface area

W – weight of sample

$\Sigma \text{CO}_2$  – cumulative volume of  $\text{CO}_2$  evolved; the amount of  $\text{CO}_2$  evolved since the beginning of the experiment to the point of measurement;

$\Delta \text{CO}_2$  – differential volume of  $\text{CO}_2$  evolved; the amount of  $\text{CO}_2$  evolved in a given period of time, between the measuring points, for different concentrations of poisons;

$\alpha/\alpha_0$  – relative conversion ratio; a ratio for a given exposure time between conversion of substrate at a given concentration of studied metal to conversion of substrate measured for a reference mixture without poison.

## აბსტრაქტი

მსოფლიოში ერთ-ერთი ყველაზე სერიოზულ პრობლემას წარმოადგენს მძიმე მეტალებით გამოწვეული დაბინძურება, რომელიც ასოცირდება ინდუსტრიალიზაციასთან. *S. cerevisiae* ცნობილი, როგორც საფუარი სოკო, შესაძლებელია გამოყენებულ იქნეს მძიმე მეტალებით დაბინძურებული გარემოს გასაწმენდად. მას შეუძლია შეიერთოს და შთანთქმოს მძიმე მეტალების ატომები. *Saccharomyces cerevisiae* არის არაპათოგენური მიკროორგანიზმი, რომელიც ხელმისაწვდომია ნებისმიერ დროს და ადვილია მისი კულტივირება. კვლევის მიზანს წარმოადგენდა შერჩეული მძიმე მეტალების ტოქსიკურობის დონის დემონსტრაცია და გაზომვა საფუარი სკოსთვის (*Saccharomyces cerevisiae*). ელემენტების ტოქსიკურობას შორის განსხვავებების შესამჩნევად შერჩეულ იქნა სამი ქიმიური ელემენტი: ვერცხლისწყალი (Hg), თუთია (Zn) და კადმიუმი (Cd). ტესტი LD<sub>50</sub>, რომელიც ტარდება თაგვებზე, ვირთხებზე და სხვა ლაბორატორიის ცხოველებზე, შესაძლებელია ჩანაცვლდეს საფუარი სოკოს ტოქსიკურობის ტესტით. მიღებული შედეგები კორელირებს LD<sub>50</sub> ის შედეგებთან. ჩატარებულ კვლევის მიხედვით, დადგინდა, რომ ვერცხლისწყალი არის უფრო ძლიერი საწამლავი ცოცხალი ორგანიზმებისთვის, ვიდრე თუთია. ხდება ვერცხლისწყლის ბიოაკუმულირება, რაც იწვევს ქსოვილების დაზიანებას. ვერცხლისწყლისგან განსხვავებით თუთია არ აკუმულირდება დიდი რაოდენობით. ეს შეიძლება აიხსნას იმით, რომ თუთია წარმოადგენს სიცოცხლისთვის საჭირო ელემენტს, დადებით გავლენას ახდენს ორგანიზმზე, რადგან მონაწილეობს რამდენიმე ენზიმის სინთეზის პროცესში.

**ძირითადი საძიებო სიტყვები:** საფუარი სოკო (*Saccharomyces cerevisiae*), LD<sub>50</sub>, ვერცხლისწყალი (Hg), თუთია (Zn) და კადმიუმი (Cd).

## Abstract

Heavy metal pollution became one of the most serious environmental problems that are associated with industrialization. *S. cerevisiae* can absorb and bind heavy metal in microorganism's cells. It is a testing object that is available at any time, is non-pathogenic, and easy to cultivate. The aim of the toxicity test was the determination of lethal dose/concentration of selected heavy metals for yeast. In order to observe differences between elements, three metals were used such as Hg, Cd, and Zn. These metals were characterized with different physicochemical properties as well as toxicity and for that reason they were studied at various concentration ranges. LD<sub>50</sub> test in mice, rats, and other laboratory animals can be replaced by yeast toxicity test. The results correlate well with those furnished by the customary methods of acute toxicity testing. According to the results of the experiments we exactly know Hg is a stronger poison than Zn for living organisms. Hg is bioaccumulating and damages tissues. In contrast to Hg, Zn does not accumulate so efficiently in microorganisms. Moreover, a low dose of Zn may have a positive effect due to the building of several enzymes (microelement).

**Key Words:** *Saccharomyces cerevisiae*, LD<sub>50</sub>, Hg, Zn, Cd.