



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Tvariosios inžinerijos principų taikymas sunkiųjų metalų šalinime

Baigiamasis magistro projektas

Mindaugas Matijūnas

Projekto autorius

doc. dr. Remigijus Ivanauskas

Vadovas



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Tvariosios inžinerijos principų taikymas sunkiųjų metalų šalinime

Baigiamasis magistro projektas

Taikomoji chemija (6211CX014)

Mindaugas Matijūnas

Projekto autorius

doc. dr. Remigijus Ivanauskas

Vadovas

doc. dr. Neringa Petrašauskienė

Recenzentė

Kaunas, 2025



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Mindaugas Matijūnas

Tvariosios inžinerijos principų taikymas sunkiųjų metalų šalinime

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama(s) kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi(s) Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto (toliau – Universitetas) intelektinės nuosavybės valdymo ir perdavimo nuostatų bei Universiteto akademinės etikos kodekse nustatytų etikos reikalavimų;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjęs (-usi);
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Universitete galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta(s) iš Universiteto, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Mindaugas Matijūnas

Patvirtinta elektroniniu būdu

Mindaugas Matijūnas. Tvariosios inžinerijos principų taikymas sunkiųjų metalų šalinime. Magistro baigiamasis projektas / vadovas doc. dr. Remigijus Ivanauskas; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): chemija, fiziniai mokslai.

Reikšminiai žodžiai: *Tetrahymena thermophila*, bioakumuliacija, sunkieji metalai, spirulina, tvarumas, filtras, selektyvus veisimas

Kaunas, 2025. 54 p.

Santrauka

Tyrimo metu analizuota *Tetrahymena thermophila* pirmuonių bioakumuliacinė geba, reaguojant į įvairių sunkiųjų metalų (Zn^{2+} , Mo^{6+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+}) jonų koncentracijas. Nustatyta, kad pirmuonys, susidūrę su toksiškomis sąlygomis, modifikuoja savo metabolizmą, keičiasi jų judėjimo pobūdis, jonų surišimo geba ir augimo dinamika. Nagrinėtas selektyvaus veisimo metodas, tačiau dėl sunkiųjų metalų keliamo toksiškumo perdavimo dukterinėms ląstelėms, šis būdas buvo atsisakytas – vietoj to rekomenduojama genų modifikacija. Tyrimo metu sukurtas tekstilės atliekų pagrindu pagamintas filtras, kuris, nors ir nėra biologiškai skaidus, pasižymi tvariu antriniu panaudojimu ir utilizuojamas deginant. Filtras sėkmingai panaudotas *Tetrahymena thermophila* imobilizavimui ir praktinio bioakumuliacijos proceso atlikimui. Įrodytas filtro tvarumas, remiantis dumbliu spirulina kaip pirminiu energijos šaliniu. Šis darbas apima daug multidiscipliniškumo ir inovacijų bruožų, atveria galimybes kurti tvarius, pasyvios filtracijos pagrindu veikiančius biotechnologinius sprendimus sunkiųjų metalų šalinimui iš aplinkos.

Mindaugas Matijūnas. Application of sustainable engineering principles in heavy metal remediation. Master's Final Degree Project / supervisor Assoc. Prof. Dr. Remigijus Ivanauskas; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area (study field group): Chemistry, Physical Sciences.

Keywords: *Tetrahymena thermophila*, bioaccumulations, heavy metals, spirulina, sustainability, filter, selective breeding

Kaunas, 2025. 54 p.

Summary

The study analyzed the bioaccumulation capacity of the protozoan *Tetrahymena thermophila* in response to various heavy metal ion concentrations (Zn^{2+} , Mo^{6+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+}). It was determined that under toxic conditions, the protozoa modify their metabolism, exhibit altered movement patterns, change their ion-binding capacity, and display shifts in growth dynamics. A selective breeding method was investigated; however, due to the transmission of toxicity to daughter cells, this approach was abandoned and genetic modification is suggested as an alternative in all future studies. During the study, a filter made from textile waste was developed. Although not biodegradable, the filter demonstrates sustainable secondary use and is intended for disposal through incineration. It was successfully applied for the immobilization of *Tetrahymena thermophila* and the practical execution of the bioaccumulation process. The sustainability of the filter was supported by the use of *Spirulina* algae as the primary energy source. This work incorporates strong elements of multidisciplinary and innovation, opening opportunities for the development of sustainable, passive-filtration-based biotechnological solutions for the removal of heavy metals from the environment.

Turinys

Įvadas.....	8
1. Literatūros apžvalga	9
1.1. Sunkieji metalai	9
1.2. Sunkiųjų metalų šalinimo metodai	9
1.2.1. Elektrocheminės technologijos.....	10
1.2.2. Membraninis atskyrimas	10
1.2.3. Adsorbcija.....	10
1.2.4. Hidrogeliais paremtas šalinimas.....	11
1.2.5. Fotokatalizė	11
1.2.6. Jonų mainai.....	11
1.2.7. Koaguliacija, flokuliacija	11
1.2.8. Cheminis nusodinimas.....	12
1.2.9. Biologinis atskyrimas	12
1.3. Biologiniai sunkiųjų metalų šalinimo būdai.....	12
1.3.1. Sunkiųjų metalų pernaša į organizmą.....	14
1.3.2. Sunkiųjų metalų akumuliacija organizme	15
1.4. Tvariosios inžinerijos principai	15
1.4.1. Bioreaktoriai	16
1.5. Darbo su biologija etiniai aspektai	16
1.6. Protistai.....	17
1.6.1. <i>Tetrahymena</i>	17
1.6.2. <i>Tetrahymena Thermophila</i>	18
1.6.3. Saugumo kriterijai <i>Tetrahymena thermophila</i> pirmuonims	18
1.6.4. <i>Tetrahymena thermophila</i> auginimo sąlygos	19
1.6.5. <i>Tetrahymena thermophila</i> mitybos mechanizmas.....	20
1.6.6. <i>Tetrahymena thermophila</i> dauginimosi mechanizmas.....	21
1.6.7. <i>Tetrahymena thermophila</i> mirties mechanizmas.....	24
1.7. Literatūros analizės apibendrinimas	24
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	26
2.1. Medžiagų ir įrankių sąrašas	26
2.2. Sterilizacija	26
2.3. Ląstelių skaičiavimas.....	27
2.4. Sunkiųjų metalų analizė	28
2.5. Efektyvių pirmuonių kūrimas	28
2.6. Tvarios sistemos dizainas ir utilizacija.....	29
2.7. Tvaraus filtro dizainas	30
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	31
3.1. <i>Tetrahymena thermophila</i> augimo greičio analizė	31
3.2. <i>Tetrahymena thermophila</i> judėjimo analizė.....	31
3.3. <i>Tetrahymena thermophila</i> atsparumas sunkiesiems metalams.....	32
3.4. Sunkiųjų metalų bioakumuliacinė geba.....	34
3.4.1. Ideali metalo bioakumuliacinė geba	35

3.4.2. Cinko bioakumuliacinė geba	36
3.4.3. Vario bioakumuliacinė geba.....	36
3.4.4. Molibdeno bioakumuliacinė geba	37
3.4.5. Chromo (III) ir chromo (VI) bioakumuliacinė geba.....	38
3.5. Selektivaus veisimo rezultatai	39
3.6. Peptono pakeitimas spirulina.....	39
3.7. Tvarus sunkiųjų metalų filtras	40
3.8. Tvarus filtro bioakumuliacinė geba.....	41
3.9. Tvarus filtro energetinė analizė	42
3.10. Priešgrybelinis protokolas	44
Išvados	45
Rekomendacijos.....	46
Literatūros sąrašas	47
Publikacijų sąrašas	54

Įvadas

Ištirpę sunkieji metalai, išmetami į aplinką su vandens nuotekomis, kelia ilgalaikį pavojų aplinkosauginiu ir sveikatos atžvilgiu [1]. Tradiciniai metalų šalinimo metodai – cheminis nusodinimas ar mikro/nano ultrafiltracija pasižymi didelėmis energijos sąnaudomis ir ribotu tvarumu [2], todėl šiame darbe siekiama naudoti mikroorganizmų prigimtines savybes, kaip alternatyvų, tvarų, sunkiųjų metalų šalinimo metodą [3].

Mikroorganizmai sunkiuosius metalus fiksuoja bioakumuliacijos, bionusodinimo ir biosorbcijos metodais [4]. Šiame darbe analizuojamos plačiai literatūroje aprašyto pirmuonio *Tetrahymena Thermophila* bioakumuliacinės savybės sunkiųjų metalų šalinimo atžvilgiu. Šiame kontekste, procesas yra menkai išnagrinėtas ir šis darbas yra pirmasis, sistemingai apimantis ir įvertinantis visą proceso grandinę – nuo inokuliavimo iki utilizavimo, ir siekiantis parodyti praktinę naudą, sukuriant fizinį, bioakumuliaciją paremtą, sunkiųjų metalų filtrą.

Darbo tikslas

Sistemingai įvertinti *Tetrahymena thermophila* bioakumuliacinę sunkiųjų metalų gebą, ir ją panaudoti sukuriant tvarų filtrą sunkiesiems metalams. Pagerinti sistemos efektyvumą, naudojant selektyvaus veisimo metodiką.

Darbo uždaviniai

1. Išanalizuoti *Tetrahymena Thermophila* bioakumuliacinę talpą, naudojant skirtingus sunkiuosius metalus.
2. Siekti padidinti ir pagerinti *Tetrahymena Thermophila* bioakumuliacinę talpą atliekant selektyvaus veisimo procedūrą.
3. Sukurti tvarų filtrą, paremtą bioakumuliaciją, naudojantį tik *Tetrahymena Thermophila* ir tvarų maistinių medžiagų šaltinį – dumblių *Spirulina*.
4. Įvertinti sistemos tvarumą, atliekant kalorimetrinę analizę.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Sunkieji metalai

Terminu „sunkieji metalai“ paprastai apibūdinami metalai ir pusmetaliai, pasižymintys dideliu atominiu tankiu bei biologiškai toksiškomis savybėmis. Įprastai ši kategorija nėra apibrėžiama remiantis vienu rodikliu, todėl literatūroje sutinkami įvairūs apibrėžimai. Vienas plačiausiai vartojamų kriterijų — atominis skaičius didesnis nei 20 ir atominis tankis didesnis kaip $4\text{--}5\text{ g/cm}^3$. Sunkieji metalai taip pat pažymimi gebėjimu formuoti teigiamus jonus (oksidacijos būsenoje), laidumu šilumai ir elektros srovei bei atsparumu korozijai [5, 6].

Metalai nėra griežtai apibūdinami sąvokomis ir jų grupavimas atliekamas pagal skirtingus požymius [5]:

- metalas – cheminis elementas, pasižymintis būdingomis fizikinėmis savybėmis: lengvai atiduoda elektronus, sudaro teigiamus jonus, didelis šilumos ir elektros laidumas,
- pusmetalis (metaloidas) – elementas, turintis metalui būdingą išvaizdą, tačiau cheminiu požiūriu elgiasi kaip nemetalas,
- lengvieji metalai – nekonkretus terminas, apibūdinantis metalus, kurių tankis mažesnis kaip 4 g/cm^3 ,
- sunkieji metalai – minėti anksčiau; charakterizuojami didesniu atominio tankio ir galimu toksiškumu,
- būtinieji metalai – organizmui gyvybiškai svarbūs elementai, reikalingi normaliam augimui, metabolizmui ir organų funkcijoms. Metalai, kurie organizmuose naudojami dideliais kiekiais apibūdinami kaip makroelementai,
- nebūtinieji arba toksiški metalai – organizmui nereikalingi elementai, kurie geba net mažomis koncentracijomis trikdyti metabolinius procesus,
- pėdsakiniai metalai (mikroelementai) – organizme aptinkami labai nedideliais kiekiais, reikalingi specifinėms biologinėms funkcijoms atlikti.

Biologinėse sistemose sunkieji metalai skirstomi į naudingus ir nenaudingus. Taip pat vartojami smulkesni terminai, kaip toksiški, netoksiški, makroelementai, mikroelementai, būtinieji, nebūtinieji ir kt. Biologiškai naudingų metalų pavyzdžiai apima kalcį, magnį, kalį, natrių, geležį, cinką, varį, manganą, seleną, molibdeną, kobaltą, chromą, jodą ir kt. Kaip biologiškai nenaudingi apibūdinami: švinas, gyvsidabris, kadmis, arsenas, nikelis ir kt. Apibūdinimai taip pat priklauso nuo metalų kiekio sistemoje ar aplinkoje [7,8].

1.2. Sunkiųjų metalų šalinimo metodai

Sunkiųjų metalų šalinimu iš sistemų vadinamas procesas, kurio metu cheminio elemento jonai arba dalelės yra atskiriami nuo terpės, tirpalo, atliekų srauto ar aplinkos komponentų. Šiame darbe nagrinėjamas tik vienas procesas, kai sunkusis metalas yra skystosios homogeniškos fazės dalis, kurios tirpiklis vanduo.

Literatūroje aprašoma mažiausiai 10 skirtingų sunkiųjų metalų išskyrimo būdų: elektrochemija, membraninis atskyrimas, adsorbcija, cheminiai hidrogeliai, fotokatalizė, jonų mainai, koaguliacija, flokuliacija, cheminis nusodinimas, biologinis atskyrimas.

Atlikus išsamią visų nagrinėtų sunkiųjų metalų šalinimo metodų lyginamąją analizę, nuspręsta, šio darbo metodologiją paremti biologinio atskyrimo technologijomis. Remiantis literatūrinių šaltinių apžvalga, šie metodai pasižymi dideliu metalų jonų fiksavimo efektyvumu, mažu energijos suvartojimu ir galimybe taikyti tvariosios inžinerijos principus. Be to, biologinių metodų taikymas sunkiųjų metalų šalinime yra mažai aprašytas literatūroje, tad analizuojant šią metodiką labiau prisidedama prie mokslinio naujumo. Sieksime įvertinti šių sistemų galimybes ir bandysime jas modifikuoti maksimizuojant sunkiųjų metalų šalinimo gebą.

1.2.1. Elektrocheminės technologijos

Pagrindinės elektrocheminės technologijos apima: elektrokoaguliaciją, elektroflotaciją, elektrodializę, elektrodpoziciją bei elektroadsorbciją (talpinę dejonizaciją). Elektrokoaguliacijos metodas grindžiamas anodo ištirpimu (naudojamas dažniausiai geležies arba aliuminio anodas). Anodo fragmentai skatina sudaryti kompleksus, kurie koaguliuoja į didesnes struktūras ir jungiasi su sunkiųjų metalų jonais tirpale. Elektroflotacijos veikimo principas panašus į elektrokoaguliaciją, tačiau čia grupės (koaguliatai arba metalų kompleksai) prisijungia prie vandens molekulių, sudarydami mikroburbulų apvalkalą. Šie burbuliai kyla į paviršių, ir formuoja nuosėdų plėvelę. Elektrodializė remiasi katodo ir anodo sąveika, kai tarpusavyje naudojama membrana. Pritaikius potencialų skirtumą, metalų jonai migruoja iš tirpalo per membraną link atitinkamo elektrodo, tačiau sulaikomi membranoje. Elektrodpozicijos šalinimo metu sunkiųjų metalų šalinimas vyksta tiesiogine metalų jonų redukcija ir nusėdimu ant katodo paviršiaus. Elektroadsorbcija (talpinė dejonizacija) apjungia elektrocheminį ir adsorbcinį efektus: esant elektros srovei, katodo paviršiuje susidaro elektrostatinė trauka, gebanti pritraukti ir sulaikyti sunkiųjų metalų jonus adsorbcijos būdu [9].

1.2.2. Membraninis atskyrimas

Vandens membraninio valymo technologijos yra tokios, kaip: atvirkštinio, tiesioginio osmoso, pervaporizacijos ir filtravimo. Tradiciniai metodai remiasi slėgio varomais procesais. Naudojamos maišytos matricos, plonasluoksnės membranos ir polimerinės membranos. Procesai apibūdinami kaip nanofiltracija, mikrofiltracija ir ultrafiltracija. Mikrofiltracijos metu, membranų porų dydis nuo 0,1 iki 10 μm , ultrafiltracijos metu – nuo 0,1 iki 10 nm, vykdant nanofiltraciją, porų dydis < 1 nm. Atvirkštinio osmoso metu atskiriamos dalelės, kurių dydis < 1 nm. Tiesioginio osmoso membraninė filtracija remiasi vandens pernešimo iš mažesnės tirpalo į didesnę ir nereikalauja išorinio slėgio. Pervaporacijos metodu, mišinio komponentai išgarinami per selektyvią membraną, kuri sulaiko nepageidaujamas daleles. Maišytos matricos membranos, sudarytos iš skirtingų medžiagų pluoštų, tarpusavyje persidengusių ir prisitaikiusių atlikti skirtingas funkcijas. Plonasluoksnėse membranose, funkcinis komponentas yra plonas, porėtas ir selektyvus sluoksnis. Polimerinės membranos sudarytos tik iš vieno polimerinio komponento, kuriose sunkieji metalai geba koordinaciniais ryšiais prisijungti prie funkcinų grupių (pavyzdžiui: PVDF, PSU, PSF, PA ir kt.) [10].

1.2.3. Adsorbcija

Adsorbcijos procesas remiasi sunkiųjų metalų jonų arba koloidinių kompleksų surišimu ant nanoporėtos medžiagos paviršiaus. Šį procesą lemia elektrostatinės ir dispersinės sąveikos, o efektyvumą tiesiogiai veikia temperatūra, adsorbento kiekis, pH, kontakto laikas ir pradinė metalų koncentracija. Didėjant temperatūrai įprastai spartėja sorbcijos kinetika ir didėja talpa, tačiau per aukšta temperatūra gali destabilizuoti funkcinį sluoksnį. Padidinus adsorbento masę auga bendra

sorbcijos geba. PH reguliuoja tiek sorbento paviršiaus krūvį, tiek jonų specifiškumą. Dažniausiai naudojami anglies pagrindu pagaminti adsorbentai, kurių sorbcinė geba padidinama funkcinėmis modifikacijomis – azotinimu, oksidacija ar sierinimu. Egzistuoja ekologiškai tvarūs sprendimai, pavyzdžiui chitosano dariniai. Adsorbcija įprastai grįžtamasis procesas, pagrįstas silpnosiomis van der Valso jungtimis. Adsorbuoti sunkieji metalai gali būti atlaisvinti eliuavimo metu, išplaunant adsorbuotą medžiagą tirpikliu ir tokiu būdu adsorbentas gali būti regeneruojamas [2].

1.2.4. Hidrogeliais paremtas šalinimas

Hidrogeliai – tai sąlyginai naujas ir perspektyvus būdas sunkiųjų metalų šalinimui iš vandeninių sistemų, veikiantis pagal adsorbcijos principą. Šios trimačios tinklinės struktūros junginiai gali būti sudaryti tiek iš natūralių, tiek iš sintetinių polimerų, o dėl savo gebėjimo absorbuoti didelius kiekius vandens ir išbrinkti, jie užtikrina didelį sąlyčio plotą su tirpale esančiais teršalais. Tvarūs hidrogeliai kuriami naudojant celiuliozę, chitosaną, alginatą ar kitus polisacharidus. Hidrogeliai gali pasižymėti įvairiomis savybėmis, priklausomai nuo jų porų dydžio – mažesnių porų atveju jie veikia panašiai kaip membraninės sistemos, o didesnės poros leidžia efektyviai adsorbuoti didelius kompleksinius junginius. Keičiant hidrofiliškumo laipsnį, koreguojama sąveiką su vandeniniais tirpalais. Pagrindinės hidrogelių paviršiuje esančios funkcinės grupės: karboksilo ($-\text{COOH}$), amino ($-\text{NH}_2$), sulfono ($-\text{SO}_3\text{H}$) ir hidroksilo ($-\text{OH}$). Jų dėka sunkiųjų metalų jonai geba koordinaciniu ryšiu prisijungti prie hidrogelių [11, 12].

1.2.5. Fotokatalizė

Sunkieji metalai taip pat gali būti pašalinami naudojant fotokatalizės metodiką. Fotokatalizė yra dar vienas inovatyvus ir aplinkai draugiškas metodas sunkiųjų metalų šalinimui iš vandeninių sistemų. Šiuo atveju naudojama šviesa kaip pagrindinis energijos šaltinis. Proceso metu, fotonai pasiekia medžiagos substratą ir šviesos kvantas suteikia pakankama energijos sužadinti sunkiųjų metalų elektronus – jie perskoka iš valentinės juostos į kondukcinę juostą, taip sukeldami elektronų ir skylių susidarymą. Sužadinti metalų jonai tampa reaktyvūs ir geba dalyvauti cheminėse reakcijose su substratu, prisijungdami prie jo kovalentiniais arba koordinaciniais ryšiais. Pagrindinis šio metodo iššūkis – tinkamų fotokatalizatorių substratų paruošimas ir jų regeneravimo galimybės [13].

1.2.6. Jonų mainai

Jonų mainų metodas yra dar vienas sunkiųjų metalų šalinimo būdas, pagrįstas kietosios fazės ir vandeninio tirpalo jonų apykaita, kuomet tirpale esantys toksiški metalų katijonai pakeičiami mažiau kenksmingais ir pigiais katijonais, esančiais jonų mainų dervoje arba kitoje sorbentų matricoje – Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , H^+ ir kt. Šių procesų mechanizmai gali remtis skirtingomis sąveikos jėgomis – nuo kovalentinių ryšių formavimosi iki elektrostatinės sąveikos. Sunkiesiems metalais fiksuoti, dažnai naudojami jonų mainai su zeolitais (aliuminio silikato mineralais). Jonų mainų derva gali būti regeneruojama koncentruotu rūgšties tirpalu [14, 15, 16].

1.2.7. Koaguliacija, flokuliacija

Koaguliacijos procesas paaiškinamas koloidinio tirpalo destabilizacija ir dalelių aglomeracija. Dažniausiai naudojamos aliuminio druskos (aliuminio sulfatas) arba geležies druskos (geležies sulfatas, geležies chloridas), kurios neutralizuoja koloidų paviršiaus krūvį ir mažina elektrostatinę sąveiką tarp dalelių. Smulkios dalelės pradeda jungtis į didesnius aglomeratus. Tada vykdomas

flokuliacijos procesas. Kaip flokuliantai naudojami didelės molekulinės masės junginiai – šakoti polimerai. Priklausomai nuo šakotumo ir molekulinės polimerų masės skiriasi floko (*angl. Floc*) dydis ir mechaninis stabilumas [2].

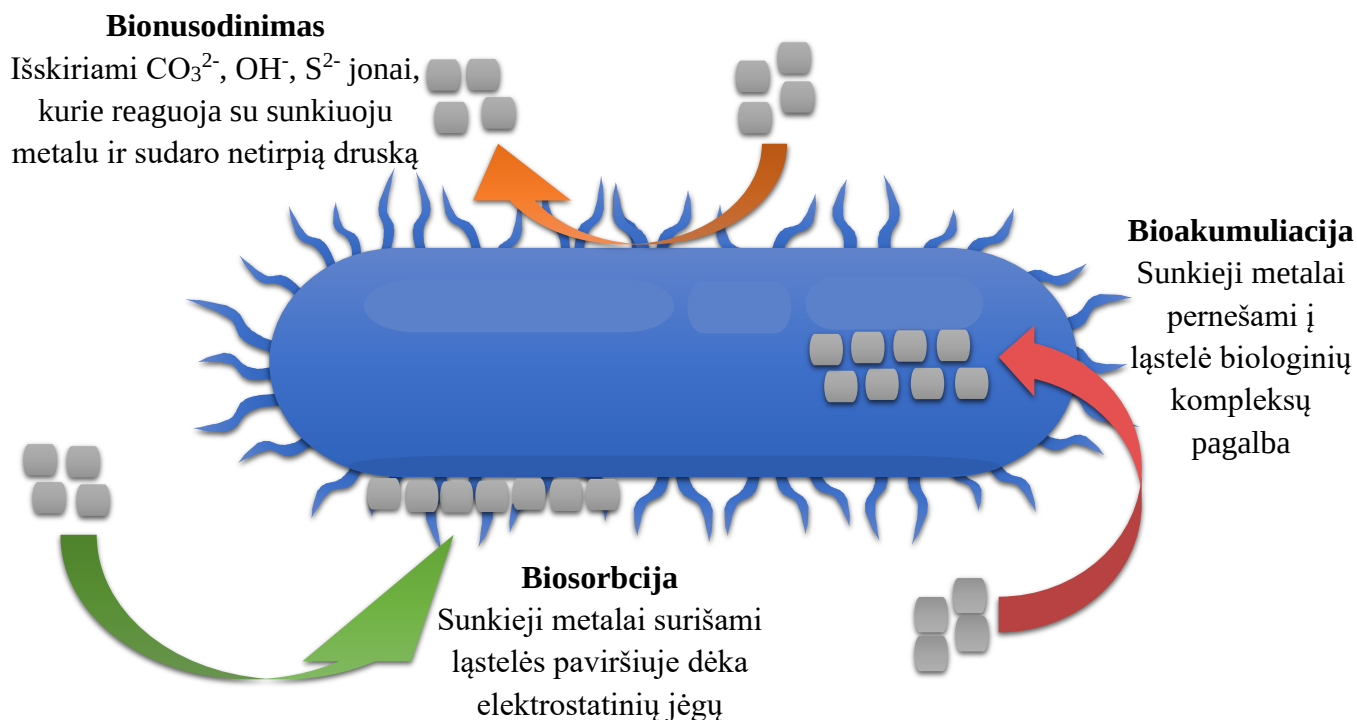
1.2.8. Cheminis nusodinimas

Cheminio nusodinimo metodas yra vienas iš paprasčiausių ir plačiausiai taikomų sunkiųjų metalų šalinimo. Metodas grindžiamas metalų jonų išsikristalizavimu ir transformacija į vandenyje netirpius junginius. Jie nuo vandens atskiriami centrifugavimo, filtravimo, sedimentacijos ir kitomis metodikomis. Tipiškai naudojamas natrio sulfidas (Na_2S) ir sudaromi metalų sulfidai. Praktiškai visi sunkiųjų metalų sulfidai netirpūs vandenyje. Kartais formuojami metalų hidroksidai ar karbonatai. Cheminė reakcija negrįžtama.

1.2.9. Biologinis atskyrimas

Biologinio atskyrimo metodai remiasi gyvų ar negyvų biologinių sistemų gebėjimu fiksuoti sunkiuosius metalus ir apima tris pagrindinius mechanizmus: bioakumuliaciją, bionusodinimą ir biosorbciją. Bioakumuliacijos atveju metalų jonai aktyviai transportuojami į mikroorganizmo ląstelę specifinių baltyminių struktūrų pagalba ir kaupiasi vidinėje ląstelėje. Bionusodinimo metu mikroorganizmai išskiria chelatuojančius anijonus, kurie jungiasi su metalais, suformuodami netirpias druskas ar kompleksus, nusodinančius sunkiuosius metalus. Tuo tarpu biosorbcijos metu metalai pasyviai adsorbuojami ant ląstelės sienelės paviršiaus, surišant metalų jonus be metabolinės veiklos. Plačiau apie šiuos metodus aprašyta 1.3. Biologinio surišimo metodika remiasi tuo, kad naudojama biologinės sistemos metalų fiksavimo darbo atlikimui ir tvarumas pateisinamas maistinių medžiagų kilme [4].

1.3. Biologiniai sunkiųjų metalų šalinimo būdai



1 pav. Biologiniai sunkiųjų metalų šalinimo būdai

Bionusodinimas yra biologinis procesas, kurio metu mikroorganizmai, ypač sulfatus redukuojančios bakterijos (SRB), paverčia tirpius sunkiųjų metalų jonus netirpiomis nuosėdomis. Šis procesas vyksta anaerobinėmis sąlygomis, kai SRB naudoja sulfatą (SO_4^{2-}) kaip galutinį elektronų akceptorį, redukuodamas jį į sulfidą (S^{2-}). Kai kurie organizmai išskiria karbonato (CO_3^{2-}) arba hidrokarbonato (HCO_3^-) anijonus. Šie anijonai išskiriami kalcio surišimui ir panaudojami pH korekcijai, tačiau šis metabolizmo kelias taip pat gali būti panaudojamas sunkiųjų metalų redukcijai. Taip pat gali susidaryti hidroksido (OH^-) jonai, vykstant amino rūgščių deaminacijai, kai susidaro amoniakas (NH_3), kuris vandenyje hidrolizuojasi į amoniakinį vandenį (NH_4OH). Viena iš bionusodinimo metodo problemų yra tai, kad susidariusios nuosėdos gali kauptis sistemoje ir išlikti toksiškos, jei nėra tinkamai pašalinamos. Procesas apibūdinamas kaip ląstelių gynybinis mechanizmas, siekiant panaikinti toksišką aplinką arba pašalinti dugne esančią konkurenciją [4, 17, 18, 19, 20, 21].

Biosorbcijos metu sunkiųjų metalų jonai pasyviai surišami ant mikroorganizmų ląstelių sienelių ir membranų, nevykdant aktyvių ląstelės metabolinių veiksmų. Procesas pagrįstas silpnosiomis cheminėmis sąveikomis – jonų mainais, kompleksų formavimu, chelavimu, van der Valso jėgomis ir dažnai apibūdinamas kaip paprastas adsorbcijos mechanizmas. Sunkieji metalai geba sudaryti kompleksus, su funkcinėmis grupėmis membranoje, kurios elgiasi kaip kompleksodario ligandai. Pagrindinės: karboksilo, hidroksilo, sulfato, merkaptio (tiolio), fosfato, amino, amido, imino, esterio, tioeterio, karbonilo, imidazolo ir fosfodiesterio grupės. Tikslūs procesai skiriasi, priklausomai nuo naudojamo organizmo vykdant biosorbcijos procesą [21, 22].

Bioakumuliacijos metu, aktyviosios pernašos mechanizmo pagalba, sunkiųjų metalų jonai įsiskverbia į gyvos ląstelės vidų ir fiksuojami baltyminėse struktūrose. Šiai pernašai naudojama energija, susidaranti metabolizmo metu. Sunkieji metalai, tokie kaip cinkas ar varis, naudojami DNR replikacijoje, tarpląstelinį signalų perdavime ir reduktazių ar oksidazių centro sandaroje. Baltyminės pernašos sistemos, nepakankamai išrankios ir neatskiria specifinių sunkiųjų metalų iš mišinio, todėl kartu su naudingaisiais sunkiaisiais metalais gali būti pasisavinami toksiškieji metalai. Esant žemoms koncentracijoms, bioakumuliacijos procesas vadinamas mikroelementų akumuliacija, o didėjant metalų kiekiui – toksinų kaupimu. Didėjant sunkiojo metalo koncentracijai, metalas prisijungia ne tik prie pernašos ir kaupimo baltymų, bet ir geba koordinaciniais ryšiais prisijungti prie kitų baltyminių struktūrų. Tai gali lemti ląstelės mirtį [21, 23].

1 lentelė. Biologinių sunkiųjų metalų šalinimo būdų privalumai ir trūkumai. Žalia spalva žymi metodo pranašumą, raudona – trūkumą.

	Bionusodinimas	Biosorbcija	Bioakumuliacija
Selektyvumas	Priklauso nuo aplinkos sąlygų	Mažas, sąlygojamas ligandų įvairove	Sąlygojamas metabolizmo, naudingieji sunkieji metalai įsisavinami pirmiausia
Kaina	Didelė, gyvos ląstelės	Maža, naudojamos atliekos	Didelė, gyvos ląstelės

	Bionusodinimas	Biosorbicija	Bioakumuliacija
Įsisavinimo greitis	Lėtas, sąlygojamas metabolizmo ir aplinkos sąlygų	Greitas	Lėtas, sąlygojamas metabolizmo
Įsisavinimo kiekis	Mažas, apima tik dalį ląstelės metabolinių procesų, bet pastovus.	Labai mažas	Vidutinis, išreiškiamas daugeliu ląstelės metabolinių procesų. Sąlygojamas metabolizmo
Metalo patvarumas	Didelis, sudaromos nuosėdos	Mažas, gali vykti desorbicija, priklauso nuo metalo oksidacinio laipsnio	Didelis, vandenyje nelieka metalo pėdsakų
Energijos poreikis	Reikalingas periodinis maistinių medžiagų papildymas, energija auginimui	Procesas nepriklauso nuo metabolizmo	Reikalauja energijos ir maistinių medžiagų aktyvios pernašos vykdymui
Regeneracija	Energijos šaltinio papildymas	Gali vykti regeneracija, procesą vykdo gyvos ir žuvusios ląstelės	Procesą vykdo tik gyvos ląstelės, dėl toksiškumo miršta dauguma ląstelių
Universalumas	Reikalingas metabolizmo energijos šaltinis, reikalinga periodiškai pašalinti metalų nuosėdas	Neatsparus anijonams, mažas pH selektyvumas	Reikalingas metabolizmo energijos šaltinis

1.3.1. Sunkiųjų metalų pernaša į organizmą

Sunkieji metalai per ląstelės membraną įsisavinami keliais sudėtingais mechanizmais, kurių pagrindą sudaro aktyviosios pernašos sistemos, vykdomos specifinių transporterių – baltyminių pernešėjų – pagalba. Dažniausi sunkiųjų metalų pernašos keliai: selektyvios porinės kanalų struktūros, cinką pernešantys baltymai (žymimi ZIP, Zrt, ZnT), divalenčių metalų transporteriai, ATP sintazės ABC transporterių baltymai (*angl. ATP-Binding Cassette*) ir tam tikros sideroforų sistemos. Labai maži metalų jonų kiekiai gali difunduoti paprastosios difuzijos būdu per lipidų sluoksnį. Aktyvioji pernaša įveikia elektrocheminį koncentracijų gradientą, naudojant energijos šaltinį, dažniausiai kylantį iš ATP [21, 24, 25].

Aktyviosios pernašos baltymai savo struktūriniu ir elektroniniu lygmeniu primena fermentų aktyviuosius centrus: pernašos centre susidaro koordinacinis ryšys tarp sunkiojo metalo jonų ir specifinių aminorūgščių liekanų, dažniausiai turinčių deguonies atomus (karboksilo ar hidroksilo grupių), kurios veikia kaip ligandai, prisitaikantys prie metalo valentinių elektronų konfigūracijos. Šiame centre metalas stabilizuojamas aukštos energijos būsenoje, o vėliau, pernešamas į tolesnes baltymines struktūras, pereina į mažesnės energijos koordinacines konformacijas. Pavyzdžiui, vario jonų pernešimo metu, P_{IB}-ATPazės pagalba, transporterioje sudaroma trigoninė plokštuminė struktūra, o po pernašos sudaromi metalobaltymai, kuriuose struktūra tetraedrinė ar tetragoninė [21, 26, 27].

1.3.2. Sunkiųjų metalų akumuliacija organizme

Įvykdžius sunkiojo metalo pernašą per plazminę membraną, metalų jonai fiksuojami ląstelėje specialių baltyminių struktūrų pagalba, užtikrinant jų kaupimąsi ir tolimesnį biologinį panaudojimą.

Paprasčiausi organizmai, tokie kaip grybai ir bakterijos, naudoja sideroforus – nedidelius baltymus, kurių aktyvųjį centrą sudaro okso- grupėmis prisotintos aminorūgščių liekanos. Dažniausiai – histidino fragmentai. Sideroforų sunkiojo metalu surišimo procesas vadinamas chelavimu [28, 29].

Sudėtingesnės ląstelės, beveik visada gamina metalotioneinus sunkiųjų metalų surišimui. Tai žemo molekulinio svorio baltymai (apie 7 kDa), turintys daug cisteino fragmentų. Metalų surišimas vykdomas koordinaciniu ryšiu tarp cisteine esančių tiolio grupių ir metalo. Metalotioneinus sintetina Goldžio kompleksas, jie aptinkama Goldžio komplekso plazminėje membranoje arba ląstelės sienelėje. Aromatiniai fragmentai ir disulfidinis ryšys mažina metalotioneinių koordinacinę gebą [29].

Metalotioneinai gali būti klasifikuojami pagal homologines savybes į tris klases:

- 1 klasė – polipeptidai, kuriose cisteino fragmentų vietos baltyminėje struktūroje atitinka cisteino fragmentų vietas baltymuose, išgautų iš arklio inkstų žievės.
- 2 klasė – polipeptidai, kuriuose cisteinų fragmentų vietos baltyminėje struktūroje tik nedaug panašios į arklio inkstų žievėje aptinkamų polipeptidų cisteino fragmentų. Pavyzdžiui mielių.
- 3 klasė – netipiški, sintetinti metalo tiolio polipeptidai, pavyzdžiui kadistinas, fitometalotioneinas ar fitochelatinas.

Šią klasifikavimo sistemą sukūrė *Fowler et al.*, 1987 metais ir šiais laikais ji nebenaudojama, tačiau vis dar minima literatūros šaltiniuose. Taip pat, šiais laikais, kaip standartas homologiems požymiams nebenaudojama arklio inkstų žievė, tačiau naudojama triušio inkstų žievė [29, 30].

Moderniais laikais metalotioneinai klasifikuojami į 16 ar daugiau šeimų, pagal *Binz et al.* 2001 metais sukurta sistema, tiesiogiai atsižvelgiant į genetinę informaciją ir evoliucinę koreliaciją [29, 31, 32]:

- 1 šeima – stuburinių (slankstelių) gyvūnų metalotioneinai, aptinkami žinduoliuose, paukščiuose, driežuose, žuvyse, rykčiuose, varlėse.
- 2 šeima – moliuskų metalotioneinai, aptinkami midijose, pilvakojuose ir kituose moliuskuose.
- 3 šeima – vėžiagyvių metalotioneinai, aptinkami tik vėžiagyviuose.
- 4 šeima – echinodermata (dygiaodžiai)
- 5 šeima – diptera (dvisparniai)
- 6 šeima – nematodai (kirminai)
- 7 šeima – ciliatai (pirmuonys)
- 8 – 13 šeima – atitinkamai grybų I, II, III, IV, V ir VI šeimos
- 14 šeima – prokariotai
- 15 šeima – augalai
- 99 šeima – fitochelatinai ir kiti nebaltyminiai į metalotioneinus panašūs polipeptidai

1.4. Tvariosios inžinerijos principai

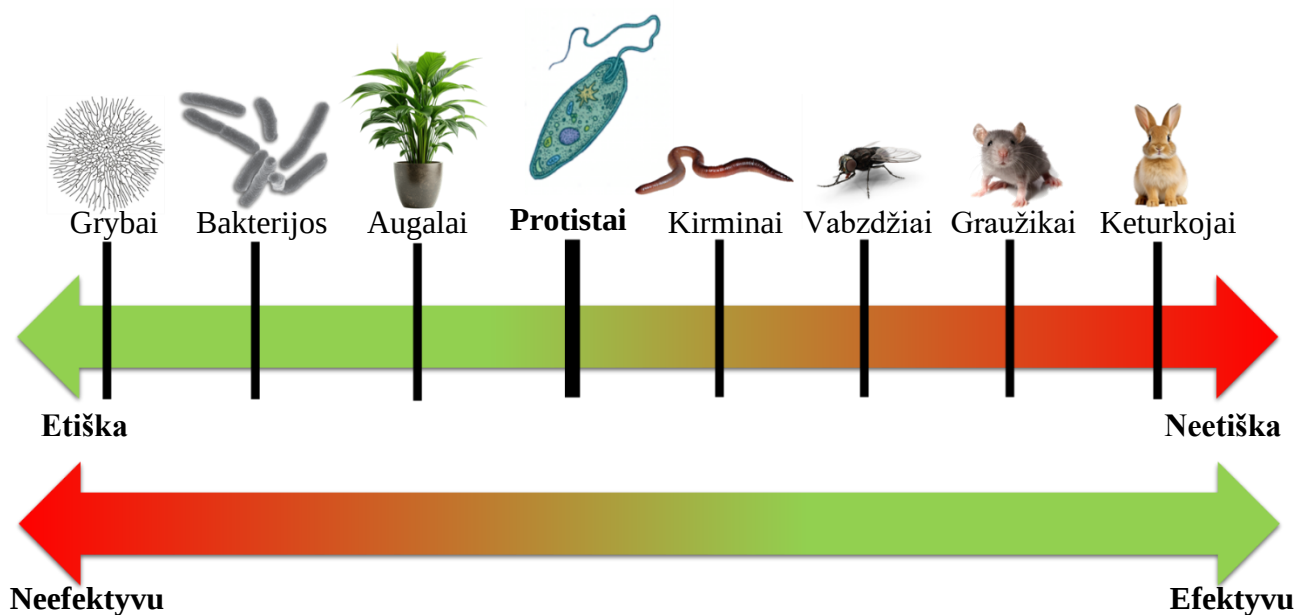
Tvarusis vystymasis suprantamas kaip toks plėtojimosi modelis, kuris užtikrina dabartinių kartų poreikių tenkinimą neišnaudojant ir nekompromituojant ateities kartų gebėjimo tenkinti savo

poreikius. Ši filosofija remiasi trimis pagrindiniais aspektais – ekonominiu augimu, aplinkos apsauga ir socialine lygybe. Pasireiškia sistemų kūrimu bei valdymu, pagrįstu atsakingo dizaino principais, ilgalaikė vertės kūrimo strategija, atliekų prevencija, natūraliais energijos srautais bei atsinaujinančios energijos naudojimu. Taip pat, atkreipiama dėmesį į projektavimo apribojimus, nuolatinį tobulinimą, biologinę įvairovę ir bioregionalumą, gyvųjų sistemų integravimą koevoliucijos principais, ekologinio poveikio vertinimą ir apskaitą, gamtos matomumo skatinimą, pagarbą gamtos ištekliams, žmonių poreikių užtikrinimą, sisteminiam mąstymui, produkto gyvavimo ciklui, inovacijų diegimam, atsakomybę, tarpdiscipliniškumą, multikultūralizmą, skurdo mažinimą, darnių sistemų kūrimą ir kitus aspektus. Procesas, apimantis kuo daugiau šių aspektų, apibūdinamas kaip tuo labiau tvarus [33].

1.4.1. Bioreaktoriai

Bioreaktoriai, naudojami sunkiųjų metalų šalinimui iš vandens, veikia kaip kontroliuojamos auginimo terpės, kuriose talpinami specializuoti mikroorganizmai – dažniausiai mikrodumbliai, tokie kaip *Spirulina*, *Stichococcus*, *Chlorella* ar *Scenedesmus*. Šios ląstelės pritaikytos atlikti bionusodinimo ir biosorbcijos funkcijas. Įprastai pasireiškia ir bioakumuliaciniai bruožai, dėl ląstelių augimo ir dauginimosi. Tokiu būdu bioreaktoriaus procesas yra nuoseklus, integruotas ir bioreaktoriai turi daug plačių praktinių panaudojimų galimybių šiuolaikinėse pramonės srityse. Bioreaktoriai atitinka tvariosios inžinerijos principus – naudoja atsinaujinančius biologinius išteklius, veikia naudodami žemą energijos kiekį ir minimaliai teršia aplinką [34].

1.5. Darbo su biologija etiniai aspektai



2 pav. Etikos ir bioakumuliacinės gebos efektyvumo palyginimas

Šiame darbe susiduriama su neįprasta problema – kuo sudėtingesnis mikroorganizmas, tuo efektyvesnė sunkiųjų metalų bioakumuliacija dėl platesnės metalotiečių ir baltymų įvairovės. Tad organizmo pasirinkimas turi būti paremtas organizmo sudėtingumu, atsižvelgiant į etikos standartus.

Stuburiniai gyvūnai ir smulkūs žinduoliai turi didelę metalotioneinų ir kitų baltymų įvairovę, todėl pasižymi didele bioakumuliacijos geba. Šiems organizmam taikomas 3R etikos principas – pakeitimas, sumažinimas, rafinavimas (*angl. Replacement, Reduction, Refinement*). Šis principas teigia, kad kuo labiau įmanoma, tyrimai su šiais gyvūnais turėtų būti pakeisti alternatyviais metodais, gyvūnų skaičius turėtų būti sumažintas iki pačio minimalaus rezultatams gauti ir eksperimentiniai metodai turi būti tokie, kad sumažintų gyvūnų kančią. Diptera (dvisparniai/musės), vabzdžiai ir nematodai (kirminai) neapibūdinami griežtais etikos standartais, tačiau darbas su jais gali būti apibūdinamas griežtais teisės aktais, saugant nuo populiacijos kryžminimosi ar pabėgimo iš laboratorijos. Nematodų bioakumuliacinės savybės itin geros, naudojamos dirvožemio valyme, kitų vabalų – ganėtinai prastos, prisitaikiusios fiksuoti varį. Jūrų organizmai pasižymi plačia įvairove ir apibūdinami daugeliu skirtingų standartų. Darbas su protistais, bakterijomis, grybeliais ir augalais nesąlygojamas griežtų etikos standartų, nes šie organizmai neturi nervų sistemų ir nėra laikomi kaip jautrūs organizmai etikos atžvilgiu. Protistai sudaro sudėtingas metalotioneinų sistemas, panašias į daugialąsčių organizmų ir prisitaikę fiksuoti cinką. Bakterijos naudoja fitochelatinus, kurių efektyvumas mažesnis, nei metalotioneinų. Grybai ir grybeliai pasižymi labai plačia metalotioneinų įvairove, tačiau mažu efektyvumu. Prisitaikę fiksuoti varį. Augalai pasižymi plačia metalotioneinų įvairove, tačiau maža koncentracija, lyginant su kitais organizmais [29, 35, 36, 37].

1.6. Protistai

Protistai yra bet kokie eukariotiniai organizmai, kurie nėra priskiriami gyvūnų, augalų ar grybų karalystei. Protistų karalystė skirstoma į amebas, pirmuonis (žiuželinius arba ciliatinius organizmus), fotosintetinančius dumblius, grybelinius protistus, sporas sudarančius protistus ir kt. Dauguma protistų yra heterotrofai – minta bakterijomis, organinėmis dalelėmis arba kitais vienaląsčiais. Ląstelės neturi standžios sienelės, todėl pasižymi įvairiomis ir kintančiomis formomis, geba aktyviai judėti pseudopodijų, žiuželių ar blakstienėlių pagalba. Protistai paplitę gėluose, bei aptinkami druskiniuose vandens telkiniuose, dirvožemyje, gali parazituoti [38].

1.6.1. *Tetrahymena*

Tetrahymena protistai priskiriama eukariotų domenui – ląstelės turi branduolį, apsuptą membrana. Ciliatų tipui – aplink membraną egzistuoja blakstienėlės, kurių pagalba juda mikroorganizmai, tačiau daug mažesnės nei žiuželiai ir jų aptinkama daug daugiau. *Oligohymenophorea* klasei – dideli ciliatai, kurie įprastai turi oralinį (į burną panašų) erdvinį komponentą savo struktūroje, sudarytą iš trijų judamųjų komponentų (kinetidų). *Hymenostomatida* eilei – aptinkama ir gyvena gėlame vandenyje. *Tetrahymenidae* šeimai – pavadinimas kyla todėl, nes pažymimi keturi oraliniai komponentai – trys į membraną panašūs kinetidai ir pati burnos ertmė (vadinama banguojančia arba paroralinė membrana). *Tetra* žymi keturis, *hymena*, žymi membranas. Gentis – *Tetrahymena*. Aptiktos bent 41 rūšys, tačiau egzistuoja daug daugiau. Neoficialiai, klasifikuojama į tris kladus: *pyriformis*, *rostrata* ir *patula*, pagal dauginimąsi ir mitybą. *Pyriformis* grupė yra charakterizuojama kaip lytinė, vykdo konjugacijos procesą ir turi ramybės būseną. *Rostara* grupė pasižymi histofagine mityba – minta ląsteliniiais audiniais, parazituoja. Ląstelių dalijimasis vyksta reprodukciniėje citoje (pūsleje), gaubiančią ląsteles. *Patula* grupė pasižymi makrostomos formos morfotipu – bado metu padidėja oralinis aparatas ir ląstelės geba praryti didesnius ciliatus, įskaitant seserines ląsteles. Dauginimasis taip pat vyksta reprodukciniėje citoje (pūsleje) ir makrostomos geba transformuotis į mikrostomas, sumažinant oralinį komponentą. Dėl šios priežasties, reprodukciniėje citoje gali tilpti daug daugiau ląstelių ir susidaryti daug daugiau ląstelių dauginantis [39, 40].

1.6.2. *Tetrahymena Thermophila*

Tetrahymena thermophila ląstelės apytiksliai 20 – 35 μm pločio ir 30 – 70 μm ilgio. Būdinga ovalios (kriaušės) forma. Savo vidinių organelių dėka, geba pakeisti savo formą iš apvalios į pailgą, priklausant nuo aplinkos sąlygų ir vykdomo biologinio proceso. Taip pat forma vizualiai gali keistis stebint, dėka erdvinio judėjimo aplink savo ašį. Apvali forma įprastai reiškia ramybės periodą. Ši būseną, taip pat vadinama, kaip sustabdytos animacijos būseną, kai sulėtinamos metabolizmo funkcijos [39]. Šios būsenos metu oralinis komponentas suardomas ir ląstelės stabdo metabolizmą [43]. Pailga forma rodo bado būseną ir dažnai aptinkama bado terpėje. Ovali ir stambi kriaušės forma rodo ląstelių augimą, koncentruotoje mitybinėje terpėje. Auginant ląsteles galima aptikti visas ląstelių formas mitybinėje terpėje. Ląstelės vykdo visas funkcijas kaip individai, o ne kaip homogeninė terpė, tad egzistuoja plati įvairovė tarp ląstelių [39].



3 pav. *Tetrahymena thermophila* tipiniai dydžiai ir formos

1.6.3. Saugumo kriterijai *Tetrahymena thermophila* pirmuonims

Tetrahymena thermophila – nepatogeniškas, nepavojingas, netoksiškas pirmuonis [44]. Nesąlygojamas ES standartų, apibrėžiančių karantino priemones ar apribojimus pagal įgyvendinimo reglamentą 2019/2007 [44]. Pagal ES 2000/54/EC direktyvą ir JK COSHH reguliacijas priskiriamas prie 1 pavojaus grupės mikroorganizmų, nes nesudaro jokių žmonių sveikatai pavojingų baltymų ar pašalinių medžiagų [45, 46].

Darbas su pirmos pavojaus grupės mikroorganizmais reikalauja tik paprastų higieninių, organizmą izoliuojančių sąlygų ir apibūdinamas šimis procedūromis [44, 45]:

- laboratorija turi būti lengvai valoma, paviršiai nereaguoti su bazėmis, rūgštimis, tirpikliais, dezinfekcijos priemonėmis,
- jei naudojamas oro srautas, rekomenduojama naudoti išmetamąjį srautą, kurio metu oro srautas nukreiptas į laboratoriją ir išeina į atmosferą,
- laboratorija turi rankų plovimo įrangą,
- darbo chalatai dėvimi laboratorijoje ir nusivelkami išėjus iš jos,
- valgymas laboratorijoje uždraustas,
- rankos dezinfekuojamos kontaminacijos metu, po darbo su užkrečiamosiomis medžiagomis ir prieš išeinant iš laboratorijos,
- minimizuojamas aerozolių sudarymas,
- medžiagų išsiliejimo metu naudojami efektyvūs dezinfekantai,

- dažnai valomi stalų paviršiai,
- panaudoti indai prieš sterilizaciją laikomi saugiai. Pipetės visiškai įmerktos į sterilizacinį tirpalą,
- visos nedeginamos atliekos saugiai sterilizuojamos prieš išmetimą.

Antros grupės mikroorganizmai gali sukelti ligas žmonėms ir kelia pavojų darbuotojams, tačiau nelinkę plisti ir galima lengvai panaikinti jų poveikį žmogaus organizme. Trečios grupės mikroorganizmai gali sukelti stiprias ligas ir kelia didelį pavojų žmogaus ir darbuotojų sveikatai, tačiau gydymo ir profilaktinės priemonės lengvai pasiekiamos. Ketvirtos grupės mikroorganizmai sukelia stiprias ligas, turi aukštą riziką plisti tarp populiacijos ir nėra efektyvių gydymo, prevencijos ar profilaktikos priemonių [45, 47].

1.6.4. *Tetrahymena thermophila* auginimo sąlygos

Tetrahymena thermophila auginama nekonkurencinėmis (akseniškomis) sąlygomis [44]. Auginimui naudojamas koncentruotas maistinių medžiagų mitybinis tirpalas. Proteazės peptonas vykdo pagrindinę maistinių medžiagų šaltinio funkciją. Tikslūs receptai skiriasi. Čia pateikti keli, patys dažniausi receptai:

- PPYG arba PYG terpė [48, 49, 50]: 0,4 – 0,5 % proteazės peptono, 0,15 – 0,2 % mielių ekstrakto, 0,1 – 1,0 % gliukozės. Standartinė terpė, naudojama auginant anaerobines bakterijas.
- PP terpė [51]: 2 % proteazės peptono, 10 μM FeCl_3 arba 90 μM Fe-EDTA. Paprasta terpė, sudaryta tik iš dviejų komponentų.
- SSP terpė [52]: 2 % proteazės peptono, 0,1 % mielių ekstrakto, 0,2 % gliukozės, 33 μM FeCl_3 . Labai tanki maistinių medžiagų terpė. Smarkiai skatinamas augimas.

Taip pat egzistuoja chemiškai standartizuota mitybinė terpė *Tetrahymena thermophila* auginimui [52].

Šiame darbe pasirinkta naudoti modifikuotą PP terpę. Darbe naudojamas kazeino ir sojų peptonas. Pasirinkta 2 % peptono koncentracija, nes tai buvo didžiausias naudojamas peptono kiekis, literatūros šaltiniuose. Taip pat naudojamas nedidelis kiekis gliukozės, atsižvelgiant į *Tetrahymena thermophila* metabolizmo mechanizmą (žr. 1.6.5), tam, kad būtų palengvintas dauginimasis iš kart po inokuliacijos. Tyrimo metu nustatyta, kad gliukozės įtaka minimali ir šiame recepte ji nebūtina. Taip pat papildomai naudojamas 20 μM FeCl_3 tirpalas, dauginimui skatinti.

Tyrimo metu buvo lygintas sojų ir kazeino peptonas. Nustatyta, kad augimas labai tapatus tarp abiejų rūšių. Gyvų ląstelių skaičius nesiskyrė pastebimais kiekiais. Visos diagnostinės kreivės brėžiamos, naudojant kazeino peptoną analizei. Sojų peptonas naudojamas genetinio modifikavimo procesuose, dėl mažesnės kainos. Darbo metu analizuota mikroelementų sudėtis maistinėse medžiagose. Analizė vykdyta paruošus mitybinės terpės tirpalą ir jį centrifuguojant 5 minutes 3000 aps./min centrifugoje. Analizuotas supernatantas. Analizės metu, nustatyta, kad peptonai skyrėsi savo mikroelementų sudėtimi. Didžiausias skirtumas – kazeino peptonas turi daug daugiau cinko ir vario jonų, nei sojų peptonas, o sojų peptonas turi daugiau geležies jonų, nei kazeino peptonas. Į šias jonų koncentracijas atsižvelgta sunkiųjų metalų analizių metu ir ruošiant mitybinės terpės tirpalus.

2 lentelė. Naudotų energijos šaltinių mikroelementų sudėtis (tik ištirpę jonai)

	Kazeino peptonas	Sojų peptonas	Spriulina
Fe jonai	7,1 – 9,3 μM	21,0 – 24,0 μM	4,6 – 6,8 μM
Zn jonai	12,6 – 16,8 μM	Jonų neaptikta	Jonų neaptikta
Mo jonai	Jonų neaptikta	0,7 – 3,6 μM	Jonų neaptikta
Cu jonai	1,4 – 2,0 μM	0,5 – 2,3 μM	Jonų neaptikta
Cr jonai	1,0 – 1,3 μM	1,0 – 1,2 μM	1,1 μM

Ideali augimo temperatūra egzistuoja tarp 30 °C ir 40 °C [44, 53, 54], tad vidurinė temperatūra – 35 °C buvo pasirinkta, kaip ideali augimui. Kadangi naudojamas didelis peptono kiekis ir aukšta temperatūra, skatinama nepageidaujamos, pašalinės biologijos augimas. Tai dar labiau skatinamas todėl, nes darbo metu naudojamos toksinės medžiagos, kurios žudo *Tetrahymena thermophila*, tad konkurencija pašalinei biologijai tampa mažesnė. Dėl šių priežasčių būtina užtikrinti aukštą sterilumo lygį ir didžiausią pavojų sukelia grybelinės ir dumblių prigimties, ore esantys mikroorganizmai.

Optimali pH vertė yra tarp 7,0 [48, 50] ir 7,4 [55]. Analizuojant pH įtaką darbe, nustatyta, kad tai labai svarbus faktorius. Neigiama augimo įtaka pastebėta pH sumažėjus, vos iki 6,5, ląstelių mirtis pastebima pH pasiekus vos 6,0. Literatūros šaltiniuose teigiama, kad ląstelės gali išgyventi iki pH 5 [56]. Stebint bazinį atsparumą, neigiama augimo įtaka pastebėta ties pH 8,0, ląstelių mirties, ties pH 8,5. Literatūros šaltiniuose, ties pH 9,0 pastebėtas stiprus pH atsakas [57]. Mikrobiologinė tarša – labai didelis pavojus. Grybelis ir dumblas sugeba labai greitai nukonkuruoti *Tetrahymena thermophila*, pakeičiant terpės pH. Analizuojant *Tetrahymena thermophila* augimą, nenustatyti dideli pH pokyčiai. Auginant kultūras 4 savaites, pH pakito nuo 7,0 iki 6,8. Dėl visų šių priežasčių, nuspręsta naudoti buferinę sistemą mitybinėje terpėje. Kaip pH buferis naudojama 0,05 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ buferinė sistema, nutaikyta palaikyti pH 7,0.

Galutinė mitybinės terpės sudėtis, patvirtinta analizės įranga:

- 20,00 g/L kazeino arba sojų peptono,
- 2,00 g/L w/v D-gliukozės
- papildomai pridedama 19,0 μM FeCl_3 . Maistinėse medžiagose Fe kiekis: kazeino – $\sim 8 \mu\text{M}$, sojų – $\sim 23 \mu\text{M}$
- 4,76 g/L NaH_2PO_4
- 2,96 g/L Na_2HPO_4
- Zn iš maistinių medžiagų: kazeino – $\sim 15 \mu\text{M}$, sojų – $0 \mu\text{M}$
- Mo iš maistinių medžiagų: kazeino – $0 \mu\text{M}$, sojų – $\sim 2 \mu\text{M}$
- Cu iš maistinių medžiagų: kazeino – $\sim 1,5 \mu\text{M}$, sojų – $\sim 1 \mu\text{M}$
- Cr iš maistinių medžiagų: kazeino – $\sim 1 \mu\text{M}$, sojų – $\sim 1 \mu\text{M}$

1.6.5. *Tetrahymena thermophila* mitybos mechanizmas

Tetrahymena thermophila minta naudojant oralinį aparatą. Jo sudėtyje yra 150 bazinių kūnų (*angl. basal bodies*), kurie stabilizuoja ir sudaro blakstienėlių branduolį. Mityba vyksta dėka 4 kinetoidų, kurie sudaro oralinį komponentą. Blakstienėlių (membranelių) pagalba maistas nukreipiamas link

oralinės ertmės. Taip pat blakstienėlės sukuria vandens srovės tėkmę link oralinės ertmės. Šiuo metodu maistas pernešamas į citostomas fagocitozei [58, 59].

Tetrahymena thermophila minta naudojant citrato (Krebso) ciklą savo mitybai [60]. Šis ciklas yra būdingas mitochondriniam kvėpavimui. Dvi anglies acetil grupės oksiduojamos iš acetil-CoA fermento iki CO₂. Šio metu taip pat sulaikomi didelės energijos elektronai iš NADH ir FADH₂ ir generuojama viena ATP molekulė [61]. Šiam ciklui reikalingas deguonis, kuris patenka į ląstelę pasyvios difuzijos metodu. Šis pralaidumas apibūdinamas pagal kelis parametrus: Henrio O₂ tirpumu, deguonies difuzyvumu, koncentracijų gradientu, paviršiaus plotu per kurį vyksta difuzija ir difuzijos paviršiaus keliu. Difuzija pirma vyksta į vandeninį tirpalą, tada į ląstelę [62]. *Tetrahymena thermophila* taip pat pasižymi tuo, kad turi blakstienėles. Jas judinant, sukuriamos vandens srovės aplink ląstelę. Tai padidina vandens sluoksnį, su kuriuo liečiasi ląstelės paviršiumi ir tokiu būdu padidinama deguonies absorbcija. Taip pat maišomas vandens tirpalas neleidžia vandeniui užsistovėti. Kadangi ląstelės nedidelės, per plazminę membraną deguonis gali prasiskverbti pasyvios difuzijos būdu, nereikalauja aktyvios pernašos komponentų. Ląstelės viduje deguonis pasiekia mitochondrijas ir į jų tarpmembraninę terpę pernešamas difuzijos metodu per porinus. Į vidinę mitochondrinę terpę deguonis pernešamas naudojant paprastą difuziją arba reaguojant tiesiogiai su citochromu c oksidaze (IV kompleksu). Komplexas IV redukuoja deguonį ir sudaro vandenį. Šios reakcijos metu išskirti elektronai perduodami į kompleksą V ir juos naudoja NADH ir FADH₂ baltymai ATP sintezei [61]. Krebso ciklui vykti reikalingos riebalinės rūgštys ir gliukozė [62].

1.6.6. *Tetrahymena thermophila* dauginimosi mechanizmas

Tetrahymena thermophila pasižymi neįprasta savybe – branduoliniu dualumu. Šie mikroorganizmai turi somatinį branduolį (makrobranduolį), kuris yra transkripciškai aktyvus. Jis sąlygoja ląstelės augimą, metabolizmą ir genų ekspresiją. Didelis, poliploidinis, neperduodamas ląselinio dalijimosi metu. Organizmai taip pat turi germinalinį branduolį (mikrobranduolį). Elgiasi kaip genetinis rezervuaras ir naudojamas lytinio dauginimosi metu. Diploidinis ir kompaktiškas su pilnomis, bet neaktyviomis chromosomomis [63]. Mikrobranduolio chromosomos netranskribuojamos į mRNR. Ląstelinį fenotipą nusako makrobranduolys [64].

Tetrahymena thermophila gali daugintis lytiniu ir nelytiniu būdu. Kai yra pakankamai maisto, ląstelės dauginasi binarinio skilimo (nelytiniu) metodu. Tai pagrindinis visų pirmuonių dalijimosi būdas. Šio dalinimosi metu DNR replikacija ir segregacija vyksta tuo pačiu metu. Binarinis skilimas inicijuojamas ląstelei pasiekus specifinį dydį ir esant pakankamai maistinių medžiagų kieki. Šią funkciją, kaip ir kitose eukariotų ląstelėse, reguliuoja G2/M kontrolės kompleksai. Jie neleidžia ląstelės pradėti mitozės, jei aptinkama DNR žala ir sukuria galimybes šiai žalai pašalinti. Jei aptinkama pakankamai didelė DNR žala, ląstelė vykdo apoptozę ir žūsta [65]. Somatinis ir germinalinis branduolys atlieka skirtingas funkcijas. Makrobranduolys vykdo keturias fazes: G1/S/G2 ir amitozę. Mikrobranduolys tik tris: S/G2/M [64]. G1 fazėje (*angl. Gap 1*) ląstelės paruošia baltymus ir organelas DNR replikacijai. Stebimi aplinkos požymiai, ar galima pradėti replikaciją. *Tetrahymena thermophila* atveju, pagrindinis stebimas požymis yra maistinių medžiagų prieinamumas. S (*angl. Synthesis*) fazės metu visas genomus yra dvigubinamas naudojant DNR polimerazes. G2 fazės metu (*angl. Gap 2*) vykdoma staigi baltymų sintezė, kurios metu ląstelės patvirtina, kad padaugintas pilnas genomus ir jame nėra transkripcijos klaidų. Taip pat suformuojamas baltymų mechanizmas, reikalingas mitozei atlikti. M fazė (*angl. Mitosis*) apibūdina fazę, kai padaugintos chromosomos kondensuojasi ir išsirikiuoja ant verpstės aparato skirtinguose

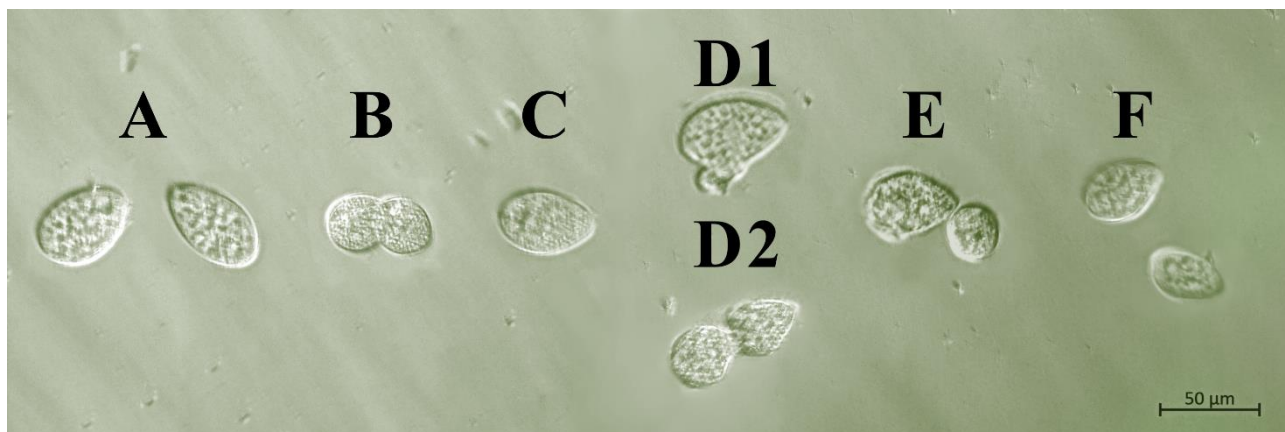
poliuose. Taip pat šioje fazėje vyksta citokinezė, kurios metu ląstelinė citoplazma fiziškai padalinama į dvi ląsteles. Mikro ir makro branduolio S fazės vyksta ne tuo pačiu metu. Makrobranduolys pradeda savo S fazę greičiau ir pabaigia greičiau, nei citokinezė pabaigiama dukterinėse ląstelėse. Amitozė – procesas, kai branduolys ir citoplazma fiziškai sulaikomi be verpstės aparato. *Tetrahymena thermophila* atveju, mitozė vyksta pirmiau, nei amitozė. Šis dvigubėjimo procesas trunka 2-4 valandas [63, 65, 66].

Lytinis dauginimasis yra daug sudėtingesnis. Jį inicijuoja ląstelių badėjimas. Ląstelių badėjimas nėra apibūdinamas vienos molekulinės medžiagos trūkumu ir norint jį sukelti reikia pilnai pakeisti mitybinę terpę arba palaukti kol mitybinėje terpėje ženkliai sumažės maistinių medžiagų koncentracija [43]. Taip pat dar keliami kiti reikalavimai: ląstelės turi būti skirtingų poravimosi lyčių ir pakankamo seksualinio brandumo [63]. Išbadėjusios ląstelės suformuoja 100 nm dydžio mikro pūsleles ant išorinio membranos paviršiaus (*angl. cEMVs*). Priklausomai, nuo ląstelės lyties, pūslelėje sudaromi baltymai, koduojantys lytinę informaciją ir elgiasi kaip stimulatoriai lytiniam dauginimuisi [67]. Susidūrus dvejoms suderinamoms ląstelėms vykdomas konjugacijos procesas. Konjugacijos metu ląstelės tarpusavyje susijungia ir vykdo genetinių mainų procesą. Pirma, mikrobranduolys vykdo mitozę ir sudaro keturis haploidinius gametinius probranduolius. Trys iš jų suyra ir žysta. Likusysis dar kartą dalinasi mitozės būdu į migratorinį ir stacionarinį probranduolį. Migratorinis branduolys pernešamas į priešingą ląstelę ir susijungia su priešingosios ląstelės mikrobranduoliu. Tokiu būdu genetinė informacija apkeičiama tarp ląstelių ir sudaromas zigotinis branduolys. Zigotinis branduolys vykdo du mitozinius skilimus ir sudaro 4 genetiškai tapačius diploidinius branduolius. Du iš jų pasilieka ląstelės priekyje (šalia konjugacijos vietos), o du keliauja į ląstelės galą. Priekiniai branduoliai diferencijuoja tarpusavyje ir tampa nauju ląstelės makrobranduoliu, o galiniai branduoliai išlieka kaip du mikrobranduoliai. Naujas sudarytas makrobranduolys bus atsakingas už ląstelės funkcijas ir lytį. Makrobranduolio sudarymo metu gali pasikeisti ląstelės lytis. Naujos sudarytos lytys tarpusavyje nepriklausomos. Tai vadinama karionidiškumu. Po šio proceso ląstelės atsiskiria ir sustabdomas konjugacijos procesas. Senasis makrobranduolys ir vienas iš naujų mikrobranduolių yra sunaikinami. Toliau ląstelės dalijasi binarinio skilimo metodu. Šis lytinio dalijimosi periodas trunka apie 12 – 14 valandų [63, 64, 67, 68].

Po genetinės informacijos apsikeitimo, ląstelės yra genetiškai skirtingos, nei prieš tai buvusios, tačiau genetiškai tapačios viena kitai su skirtingomis lytimis. Dėl šios priežasties, gali vykti poravimasis tarp šių, genetiškai tapačių individų. Tai prilyginama autogamijai – pačiai ekstremaliausiai giminingo kryžiovimo (*angl. inbreeding*) pavidalui. Siekiant išvengti su giminingu kryžiavimuisi susijusių problemų ir padidinti genetinę įvairovę, *Tetrahymena thermophila* turi septynias skirtingas lytis ir gali poruotis 21 skirtingu būdu. Tos pačios lyties mikroorganizmai negali poruotis tarpusavyje. Lytis žymimos romėniškais skaitmenimis nuo I iki VII. Poravimasis žymimas ženklų x. Lytiškai taip pat skatinama poruotis su tomis lytimis, kurių aptinkama aplinkoje mažiausiai. Dėl šių faktorių sumažinama, tačiau nepanaikinama, tikimybė, kad poruosis genetiškai tapatūs individai [63, 66].

3 lentelė. Visos *Tetrahymena thermophila* poravimosi grupės. Kiekviena grupė lygi atvirkštinei vertei (pvz.: VI x I = I x VI)

I x II					
I x III	II x III				
I x VI	II x VI	III x IV			
I x V	II x V	III x V	IV x V		
I x VI	II x VI	III x VI	IV x VI	V x VI	
I x VII	II x VII	III x VII	IV x VII	V x VII	VI x VII



4 pav. *Tetrahymena thermophila* dauginimosi stadijos. Ženklėjimas paaiškintas po paveikslu.

- A – dvi skirtingos lyties ląstelės. Ant ląstelės paviršiaus susidaro mikro pūslelės, kuriose esantys baltymai koduoja lytinę informaciją. Šis etapas indukuojamas badu.
- B – konjugacijos procesas. Suderinamoms ląstelėms sujungia savo oralinius komponentus ir jų pagalba vykdo genetinės informacijos mainus. Sukuriamas naujas ir sunaikinamas senas makrobranduolys. Mikro ir makro branduoliai tampa genetiškai vienodi. Ląstelės tampa genetiškai identiškos, tačiau su naujais genais. Įprastai, kinta ląstelių lytis. Šis periodas trunka apie 12 – 14 valandų ir apibūdinamas 5 branduolių mitozės etapais.
- C – konjugacijos procesas sustoja. Ląstelės toliau vykdo binarinio skilimo procesą. Binarinis skilimas inicijuojamas esant pakankamai maistinių medžiagų.
- D1 – esant mažam maistinių medžiagų kiekiui, binarinis skilimas vyksta ląstelėms skylant neproporcingu dydžiu. Dukterinės ląstelės gali atskirti pasiekus vos 7 – 12 μm dydį [68]. Šis dalijimasis taip pat pastebimas binarinio skilimo metu po konjugacijos proceso.
- D2 – esant dideliame maistinių medžiagų kiekiui, dukterinė ląstelė dalijasi didelį kiekį maistinių medžiagų pasisavinant iš motininės ląstelės. Ląstelės forma ir dydis panašus į motininės.

Skilimas vyksta, kai dukterinė ląstelė pasiekia apie 60 – 100 % motininės ląstelės dydžio. Motininė ląstelė būna priekyje ir vykdo pirminę navigacijos/judėjimo funkciją, tempdama su savimi dukterinę ląstelę. Šis savybė taip pat mažina vandens pasipriešinimą ir leidžia ląstelėms judėti sunaudojant mažiau energijos.

E – ląstelių skilimo vietoje susikaupia struktūriniai komponentai. Dukterinėje ir motininėje ląstelėje formuojamas citoskeletas naudojant filamentinį aktiną [69].

F – binarinis skilimas baigiasi. Susidaro dvi identiškos ląstelės. Binarinio skilimo procesas trunka 2 – 4 valandas. Lytinis ir nelytinis dauginimasis nesąlygojamas dauginimosi kartų skaičiumi, vyksta pagal aplinkos sąlygas.

1.6.7. *Tetrahymena thermophila* mirties mechanizmas

Literatūros šaltiniuose teigiama, kad ląstelėse nepastebimas mikrobranduolio senėjimas ir teigiama, kad su amžiumi susiję defektai neegzistuoja [70]. Ląstelės ištukus defektams ar žalai, lytinio dauginimosi metu, ląstelėse esantis branduolys sunaikinamas ir sukuriamas iš naujo (žr. 1.6.6) [63]. Mūsų darbe pastebėta, kad netaikant jokių papildomų maistinės terpės korekcijų, natūrali mirtis dalį ląstelių ištinka po 2 – 4 savaičių nuo inokuliacijos. Šios vertės greičiausiai priklauso nuo mitybinių sąlygų ir ląstelių priežiūros.

Tetrahymena thermophila ląstelės nepasižymi stipriu kvapu. Gyvos ląstelės vykdo medžiagų apykaitą ląstelių viduje ir neišskiria smarkaus kvapo išmetamųjų junginių. Nepastebimi sensoriniai ar uosliniai bruožai. Įprastai, maistinės medžiagos nulemia kvapą labiau, nei pačios ląstelės. Literatūros šaltiniai tai patvirtina [71]. Negyvos ląstelės pasižymi labai silpnu fermentacijos/rūgimo proceso kvapu.



5 pav. Negyvos *Tetrahymena thermophila* ląstelės.

Negyvos *Tetrahymena thermophila* ląstelės nuo gyvų atskiriamos pagal jų morfologinius ir fiziologinius pakitimus: mirusios ląstelės praranda tipinę kriaušės formą, ji pakinta į neaiškios ovalios geometrijos kūnus, ląstelės susitraukia arba išsipučia, tampa nejudrios, jų plazminė membrana gali sutrūkinėti, taip pat gali išsiskirti citoplazmos turinys ir pasikeisti ląstelės tekstūra.

1.7. Literatūros analizės apibendrinimas

Šiame darbe, remdamiesi lentelėje 1 pateiktu metodų palyginimu, nusprendėme naudoti bioakumuliacinį sunkiųjų metalų šalinimo metodą. Šis metodas pasižymi didele tvarumo perspektyva ir literatūriniu naujumu. Priešingai nei biosorbcija ar bionusodinimas, bioakumuliacija nereikalauja cheminio nuosėdų apdorojimo, sunkiųjų metalų šalinimui. Teršalų jonai tiesiogiai pernešami ir

fiksuojami mikroorganizmo ląstelėje, todėl užtenka surinkti tik metalais prisotintas ląsteles. Be to, šio metodo taikymo metu galima diegti tvarios inžinerijos principus, o šio darbo metu vertiname ne tik bioakumuliacijos efektyvumą, bet ir siekiame gerinti ir optimizuoti metalų transportą.

Atlikus išsamią įvairių organizmų bioakumuliacijos gebėjimų ir etinių apribojimų analizę, šio darbo tiriamuoju objektu pasirinkti protistai: jų naudojimas patenkina visas etikos reikalavimų nuostatas, auginimas nenaudoja gyvūninės kilmės maisto bei nereikalauja dirvožemio. Protistai pasižymi itin sparčiu dauginimosi greičiu ir judrumu, auginami skystyje, tad eksperimentai gali būti atliekami kompaktiškose terpėse su minimaliu resursų ir laiko sąnaudomis.

Pyriiformis kladas daug ištirtas ir plačiai aprašytas literatūroje, pasižymintis neparazitiniu gyvenimo būdu ir nedideliu ekologiniu bei sanitariniu pavojumi, tad naudojami šios grupės pirmuoniai. Šio darbo tyrimų objektu pasirinkti *Thermophila* rūšies pirmuonys, nes jiems būdingas ypač platus augimo temperatūros diapazonas – nuo 10 °C iki 40 °C [41, 42].

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Medžiagų ir įrankių sąrašas

Gyvi *Tetrahymena thermophila* pirmuoniai pirkti iš *Culture Collection of Algae and Protozoa* (CCAP).

Sojų ir kazeino peptonas pirktas iš *Sigma-Aldrich*.

Spirulinos milteliai pirkti iš *Vehgro B.V.*

Sunkiųjų metalų analizė atlikta naudojant šias druskas, kaip metalų jonų šaltinį: $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, ZnSO_4 , CuSO_4 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, FeCl_3 .

Sterilizacijai naudojamas 1 % $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ tirpalas ir skystos terpės sterilizuotos *CertoClav CV-EL* autoklavu.

Centrifuguota naudojant *BioSan LMC-3000* centrifugą.

Energetinei analizei atlikti naudojamas bombos kalorimetras *IKA C 2000*.

Dokumentinės nuotraukos fotografuotos naudojant optinį mikroskopą *Zeiss Scope.A1 Axio*.

Sunkiųjų metalų analizė atlikta naudojant *PerkinElmer Optima 8000 ICP-OES* spektrofotometrą.

2.2. Sterilizacija

Sterilizacija atliekama dviem pagrindiniais būdais: garų autoklavavimu ir sąlyčiu su skystais chemikalais. Šiame tyrime mitybinės terpės ir distiliuotas vanduo sterilizuojamas garų autoklavu. Autoklavavimas vykdomas 120 °C temperatūroje 30 minučių. Laboratoriniai indai, įranga ir paviršiai sterilizuojami taikant skystą chemikalų sterilizacijos metodiką, kuri naudoja šiuos chemikalus: etanolį (60 – 80 %), izopropanolį (60 – 80 %), peracto rūgštį (15 %), formaldehidą (35 %), chlorintus junginius ir kt. [72] Šiame darbe naudojamas 1 % kalcio hipochlorito tirpalas (chlorkalkės arba $\text{Ca}(\text{OCl})_2$). Grybelio (sporų) panaikinimui įprastai naudojamas 0,5 % kalcio hipochlorito tirpalas [73]. Naikinant bakterijas, 0,6 % tirpalas panaikina 83,29 % bakterijų, 1,2 % – 98,60 %, 10 % – 100 %, po valandos kontakto [74]. Toksiškumo tyrimai su *Tetrahymena thermophila* šiame darbe parodė, kad 1 % $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ tirpalas sukelia 100 % mirtingumą po vienos minutės kontakto. Dėl darbo pobūdžio, bakterinio užterštumo rizika labai maža, o grybelinio užterštumo rizika gana didelė, tad 1 % tirpalas pasižymi pakankama sterilizacine geba. Pagal šiuos duomenis, priimtas sprendimas, kad 1 % chlorkalkių tirpalas tinkamas pakankamai efektyvus naudojimui, kaip sterilizuojantį reagentą.

Visi stikliniai ir plastmasiniai indai (mėgintuvėliai, jų dangteliai, stiklinės) nedarbo metu laikomi 1 % $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ tirpale. Prieš darbą indai plaunami du kartus sterilizuotu šepetėliu ir steriliu distiliuotu vandeniu, o po to skalaujami 2–3 kartus sterilizuotu vandeniu, siekiant pašalinti chlorkalkių liekanas. Darbo metu, ilgainiui atsiranda pastovių chlorkalkių pėdsakų ant mėgintuvėlio sienų, nes susidaro kalcio hidroksidas dėl hidrolizės su vandeniu. Taip pat gali susidaryti gipsas ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), dėka sulfato jonų, kylančių iš maistinių medžiagų, todėl, po 5 plovimo ciklų, indai praplaunami 20 % HCl rūgštimi.

Smulkioji laboratorinė įranga (pipetės, švirkštai) taip pat nedarbo metu laikoma chlorkalkių tirpale, o prieš naudojimą praplaunama 20 % HCl tirpalu ir praskalaujama 2 – 3 kartus steriliu distiliuotu vandeniu. Įranga plaunama kas kartą paėmus mėginį ir laikoma sterilizaciniame tirpale bent 5 minutes, prieš kitą plovimo ciklą. Naudojama daugelis pipečių ir švirkštų darbui pagreitinti.

Darbo metu paviršiai sterilizuojami užpilant 1 % chlorkalkių tirpalą, palaukiant ne trumpiau kaip penkias minutes ir vėliau nusausinant popieriniu rankšluosčiu. Šis valymo procesas sukuria toksišką mikroklimatą, nes nusausinant paliekama chlorkalkių pėdsakų. Paviršių sterilizacija atliekama visuomet prieš pradedant darbą laboratorijoje. Ilgainiui gali susidaryti kalcio pėdsakų. Tuo atveju paviršiai nuvalomi naudojant sterilų 0,5 % HCl tirpalą ir nuplaunami steriliu distiliuotu vandeniu.

Baigus darbus rankos sterilizuojamos alkoholinio pagrindo sterilizaciniu purškikliu *ADK-611*. Darbo apranga užterštumo metu sterilizuojama tuo pačiu purškikliu, skalbiama naudojant muilo pagrindo skalbiklį.

2.3. Ląstelių skaičiavimas

Ląstelių koncentracijai nustatyti taikoma tiesioginio skaičiavimo metodika, pagrįsta optinio mikroskopo ir Neubauerio pagerintos skaičiavimo kameros (hemocitometro) panaudojimu. Naudojamas standartinis tinklelis – dydis 1/400 mm, gylis 0,1 mm. Skaičiuojama ląstelės didžiausio kvadrato (1 mm²) zonoje ir skaičius dauginamas 1000 kartų, siekiant gauti vertę viename mililitre. Kraštiniuose laukuose esančių ląstelių skaičius sudedamas ir padalijamas iš dviejų pagal naujausias rekomendacijas [75]. Senesnės metodikos skaičiuoja ląsteles tik viršutinėje ir kairiojoje kraštinėje [76].

Ląstelių skaičiavimui gali būti naudojama fiksavimo ir nefiksavimo metodika. Ląstelės gali būti fiksuojamos liepsna kaitinant skaičiavimo kamerą. Šio metodo trūkumas, tai kad ląstelės žūsta ir negalima stebėti ląstelių fiziologinių savybių, tad šio darbo matavimuose naudojama nefiksavimo metodika. Skaičiuojamos gyvos ląstelės ir naudojama laiku paremta vidurkio metodika per 30 sekundžių. Pavyzdžiui, per 30 sekundžių 7 ląstelės pateko į kvadratą, jame išbuvo šias trukmes: 4 s, 9 s, 3 s, 23 s, 7 s, 12 s, 2 s. Kraštinėse išbuvo: 0,25 s, 0,5 s ir kitos ląstelės mažiau kaip 0,25 s, tad yra ignoruojamos. Šiuo atveju, vidutinis ląstelių kiekis apskaičiuojamas taip:

$$n = 1000 \left(\frac{\sum n_t}{t \cdot n_{sk}} + \frac{\sum kr_t}{2 \cdot t \cdot kr_{sk}} \right) = 1000 \left(\frac{4 + 9 + 23 + 2 + 7 + 12 + 2}{30 \cdot 7} + \frac{0,25 + 0,5}{2 \cdot 30 \cdot 2} \right) =$$

$$= 1000(0,281 + 0,006) = 287 \text{ vnt./mL} \quad (2.1)$$

čia – $\sum n_t$ visų kvadrato ląstelių išbūto laiko suma, t skaičiavimo trukmė, n_{sk} kvadrato išbūtų ląstelių skaičius, $\sum kr_t$ visų kraštinėse išbūtų ląstelių laiko suma, kr_{sk} kraštinėse išbūtų ląstelių skaičius.

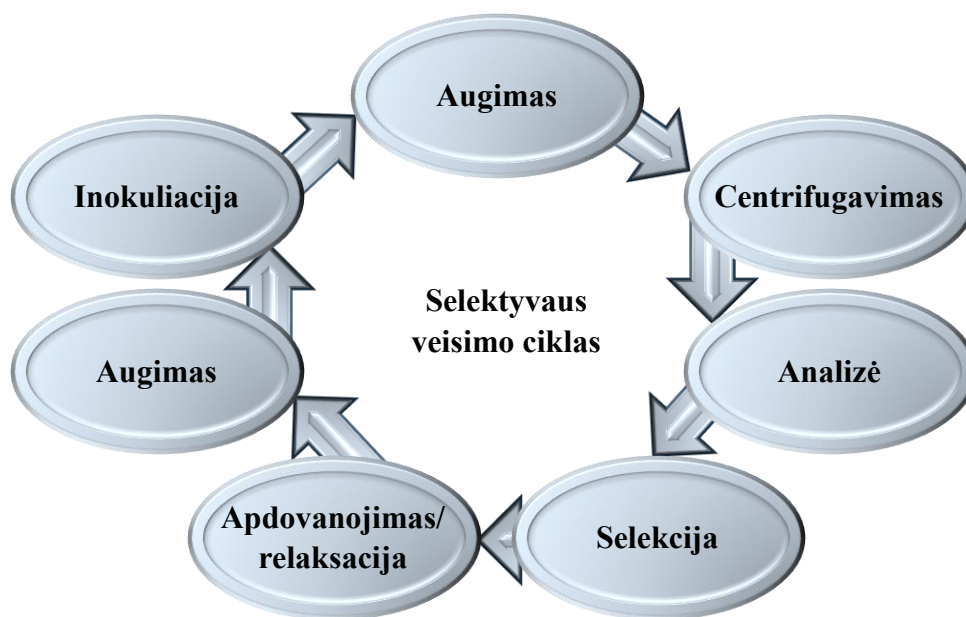
Kadangi pirmuonių judėjimo greitis didelis, ląstelių būvimo trukmė kraštinėse labai maža, tad šis skaičiavimo etapas gali būti praleidžiamas, neprarantant daug tikslumo ir gali būti skaičiuojama tik į kvadratą patekusių ląstelių būvimo trukmė $\left(\frac{\sum kr_t}{2 \cdot t \cdot kr_{sk}} \approx 0 \right)$. Ši metodika taip pat leidžia stebėti ląstelių gyvybingumą, atskirti gyvas ir negyvas ląsteles bei atpažinti tiriamąsias ląsteles nuo kitų organizmų (pvz., *Spirulinos*).

Be tiesioginio skaičiavimo, ląstelių koncentracijai nustatyti gali būti naudojama srautinė (tėkmės) citometrija, kuri remiasi šviesos skleidimo ir sklaidymo parametrais. Ląstelių suspensija teka pro lazerio spindulį, o kompiuterinė sistema automatiškai fiksuoja pratekėjusių ląstelių skaičių ir jas skirsto pagal fizinę, morfologinę bei fluorescencinę sandarą. Modernios sistemos, pagal šiuos bruožus, geba atskirti skirtingas ląsteles ir šiuo metodu ženkliai pagreitinamas skaičiavimo procesas ir reikalaujama mažiau žmogiškųjų pastangų [77].

2.4. Sunkiųjų metalų analizė

Sunkiųjų metalų kiekio nustatymui taikoma induktyviai susietos plazmos optinės emisijos spektrometrija (*angl. ICP-OES*), kuri leidžia tuo pačiu metu atlikti kokybinę ir kiekybinę analizę. Metodas grindžiamas argono plazma (~10000 K temperatūra), kurioje metalų atomai pereina į aukštesnius energijos lygmenis. Grįždami į pusiausvyros būseną išspinduliuojama specifinė elektromagnetinė spinduliuotė, kurios intensyvumas tiesiogiai proporcingas atitinkamo elemento koncentracijai mėginyje. Šis metodas leidžia analizuoti elementus be papildomo cheminių reagentų naudojimo ir trumpas analizės laikas suteikia galimybę analizuoti daugelį mėginių [79].

2.5. Efektyvių pirmuonių kūrimas



6 pav. Selektivaus veisimo ciklo schema

Efektyvių *Tetrahymena thermophila* pirmuonių kūrimas remiasi selektyvaus veisimo ciklu, kurio metu pirmuoniai:

1. inokuliuojami į sunkiųjų metalų turintį tirpalą, kuriame metalų koncentracija subalansuota moduluoti ląstelių metabolizmą,
2. auga vieną dauginimosi periodą iki maksimalaus tankio. Šiame procese galima papildomai vykdyti mutagenę, apšviesti UV spinduliuote ar naudoti kitus genus keičiančius procesus. Lygiagrečiai auginama 10 kultūrų kiekvienam iš 5 metalų (iš viso 50 skirtingų kultūrų),
3. užaugusi biomasė centrifuguojama 5 minutes, 3000 aps./min greičiu, ir šiuo metodu atskiriama nuo supernatanto,

4. tiriama sunkiojo metalo koncentracija supernatante. Lyginama su kontrole ir tokiu būdu sužinomas bioakumuliuotas metalo kiekis,
5. selektyviai atrenkama viena, pati efektyviausia, kultūra kiekvienam metalui. Pirminis efektyvumo matas – bioakumuliuotas metalo kiekis, antrinis matas – gyvų ląstelių skaičius,
6. išrinkta kultūra centrifuguojama ir biomasė apdovanojama švaria, sunkiųjų metalų neturinčia terpe. Joje auginama vieną dauginimosi periodą, kad ląstelės atsipalaiduotų (relaksuotų) ir prarastų perteklius jonus,
7. ląstelės vėl inokuliuojamos į sunkiųjų metalų tirpalą ir ciklas iš naujo kartojamas.

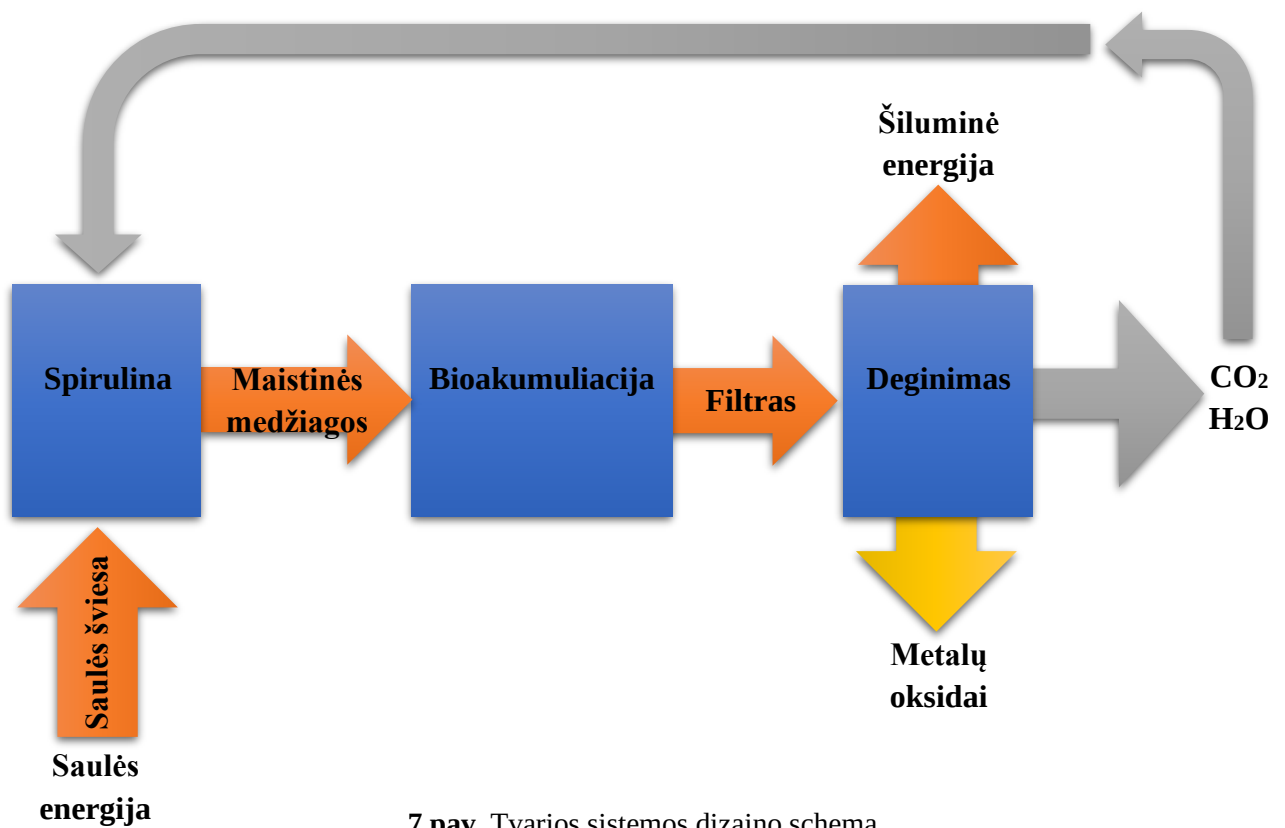
Po 10 kartojimų turėtų būti pastebimas nedidelis bioakumuliacijos pajėgumo padidėjimas, o po 30–50 kartojimų tikimasi gauti aiškų, nuo pradinio lygio išsiskiriantį, efektyvumo šuolį.

Tetrahymena thermophila metabolizmas gali būti modifikuojamas keliais būdais. Teigiami rezultatai gali pasireikšti: didėjančia metalotioneinių sinteze, aktyvios pernašos transporterių skatinimu, didėjančia jonų surišimo geba, gyvų ląstelių skaičiaus padidėjimu, geresne jonų atpalaidavimo geba. Taip pat modifikuojant metabolizmą gali pasireikšti ir neigiami aspektai, kurie taip pat padeda ląstelėms išgyventi toksines sąlygas: sumažinta baltymų sinteze, suprastėjusia jonų surišimo geba, bendru metabolizmo apykaitos sumažėjimu. Dėl šių priežasčių būtina tikslinga selekcija norint gauti kokybiškus rezultatus. Augimo rodiklių įvertinimo procese privaloma nuosekli rezultatų analizė ir pakankama specialisto kompetencija.

Mėginių ir kultūrų ruošimo metu naudojami persotinti tirpalai. Sumaišius, jie praskiedžiami ir pasiekiamos pageidaujamos koncentracijos. Visi analizuojami mėginiai ruošiami standartizuota metodika ir tais pačiais kiekiais: 6,2 mL maistinių medžiagų, 1,20 mL sunkiojo metalo, 0,20 mL koncentruoto *Tetrahymena thermophila* inokuliacinio tirpalo. Mėginių ruošimui naudojami sterilūs dozavimo švirkštai, pipetės ir mėginiai ruošiami naudojant sterilius ir sandariai uždarytus 50 mL mėgintuvėlius. Didelis mėgintuvėlio tūris ir mažas skystosios fazės kiekis užtikrina pakankamą deguonies koncentraciją mėgintuvėlyje ir neleidžia grybelinei taršai patekti į mėginio vidų.

2.6. Tvarios sistemos dizainas ir utilizacija

Tvari sistema pagrįsta energiniu ekvivalentiškumu: pagrindinis energijos šaltinis – fototropinis dumbulis *Spirulina*. Augimo metu, praktiškai visa reikalinga energija gaunama iš saulės spinduliuotės. Bioakumuliacijos etape *Tetrahymena thermophila* pirmuoniai minta *Spirulina*, kaip pagrindiniu energijos šaltiniu. Kadangi bioakumuliacija yra negrįžtamas metalų surišimo procesas, pabaigus eksperimentą mikroorganizmai utilizuojami deginant. Šiuo metodu susidaro metalų oksidai, kurie lengvai atskiriami, o išsiskirianti šiluminė energija teoriškai ekvivalentinė dumbliams sugertai energijai fotosintezės metu ir gali būti panaudota atlikti darbą. Papildomai, deginimo metu išskiriamos dujos (CO₂ ir H₂O garai) atitinkamai suvartojamos dumblių augimo metu. Ši sistema veikia analogiškai biokuro ciklui – kaupia ir panaudoja saulės energiją naudojant biologines sistemas. Visas sunkiųjų metalų surišimo procesas teoriškai varomas tik saulės šviesos energija.



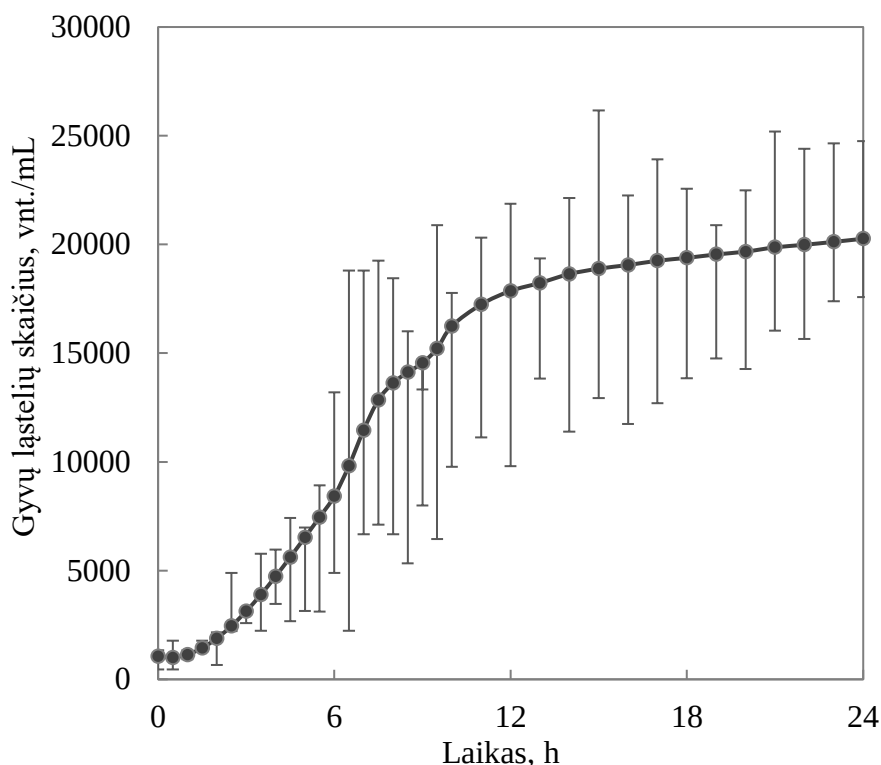
2.7. Tvaraus filtro dizainas

Tvarus filtras turi atitikti tiek ekologinius, tiek tvarumo, tiek techninius reikalavimus: jis turi būti pagamintas iš atsinaujinančių, aplinkai nekenksmingų medžiagų, o naudojimo pabaigoje – lengvai ir saugiai perdirbamas arba biologiškai skaidomas. Be to, filtras privalo ekonomiškai bei efektyviai sulaikyti pirmuonius ir maistines medžiagas savo tūryje per visą eksploatacijos laikotarpį.

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

3.1. *Tetrahymena thermophila* augimo greičio analizė

Atliekant *Tetrahymena thermophila* augimo greičio tyrimą, nustatyta charakteringa priklausomybė tarp gyvų ląstelių skaičiaus ir inkubacijos trukmės. Inokuliuavus mitybinę terpę, kultūra pasiekia augimo piką po 8–14 valandų. Tai atitinka literatūros duomenis [44, 53, 54]. Šis didelis dauginimosi greitis pagrindžia *Tetrahymena thermophila* pasirinkimą tolimesniems tyrimams. Ši augimo kreivė taip pat patvirtina mitybinės terpės pasirinkimą ir įrodo auginimo sąlygų efektyvumą. Viena diena pasirinkta kaip vienas dauginimosi periodas tolimesnėms analizėms.



8 pav. *Tetrahymena thermophila* augimo kreivė bandymo sąlygomis. Paklaida žymi 95 % patikimumo intervalą

3.2. *Tetrahymena thermophila* judėjimo analizė

Optiniu mikroskopu atliekant *Tetrahymena thermophila* ląstelių skaičiavimą kartu vertinamas ir jų judėjimo pobūdis, kuriuo remiantis išskiriamos trys pagrindinės judėjimo kategorijos: zigziginis, spiralinis ir ašinis.

Zigziginis judėjimas yra labiausiai būdinga *Tetrahymena thermophila* judėjimo forma. Blakstienėlių pagalba generuojamos aplink ląstelę lokalizuotos vandens srovės, kryptingai nešančios ląstelę į vieną kryptį ir leidžiančios jai orientuotis trimatėje erdvėje. Taip pat pati ląstelė išlenkia savo kūną į vieną ar kitą pusę, aktyviai padidinant judėjimo greitį, todėl judesys atrodo zigziginis. *Tetrahymena thermophila* taip pat naudoja aplinkoje vyraujančias sroves savo judėjimui pagreitinti. Zigziginis judėjimas pasireiškia biologiškai tinkamose aplinkos sąlygose, žymi normalią, sveiką pirmuonių būseną.



8 pav. *Tetrahymena thermophila* judėjimo formos: kairėje – normalus (zigzaginis) judėjimas, viduryje – spiralinis judėjimas, dešinėje – ašinis judėjimas

Spiralinis judėjimas pastebimas toksinės aplinkos metu, pavyzdžiui po kontakto su sunkiųjų metalų jonais. Judėjimas charakterizuojamas ląstelės sukimusi aplink vieną koordinacinę ašį ir kryptingu tiesiniu judėjimu. Panašūs, bet mažiau išreikšti, judesiai pastebimi bado metu. Spėjama, kad šį judėjimą nulemia sutrikusi blakstienėlių veikla.

Ašinis judėjimas pasireiškia šalčio atsako ($<10\text{ }^{\circ}\text{C}$) metu. Ląstelės intensyviai sukasi aplink savo ašį 360° geba, tampa stacionarios, dingsta kryptingas judėjimas. Pirmuoniams sušilus, šis judėjimas dingsta. Spėjama, kad tai vyksta, nes sumažinus kontakto plotį su terpe sumažėja šiluminė pernaša į aplinką. Tuo pačiu metu, ląstelės naudoja visas turimas kinetines struktūras šiluminei energijai generuoti, tam, kad ląstelė nesusaltų į ledą, todėl atrodo, kad ląstelė sukasi vietoje.

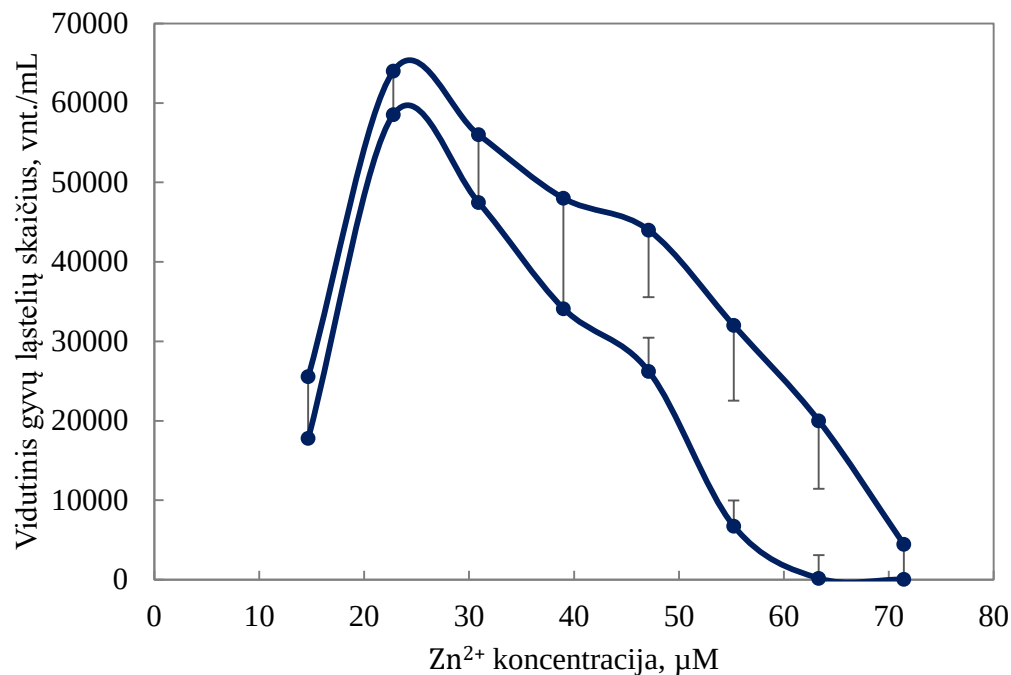
3.3. *Tetrahymena thermophila* atsparumas sunkiesiems metalams

Atsparumas sunkiesiems metalams gali būti analizuojamas dviem metodais:

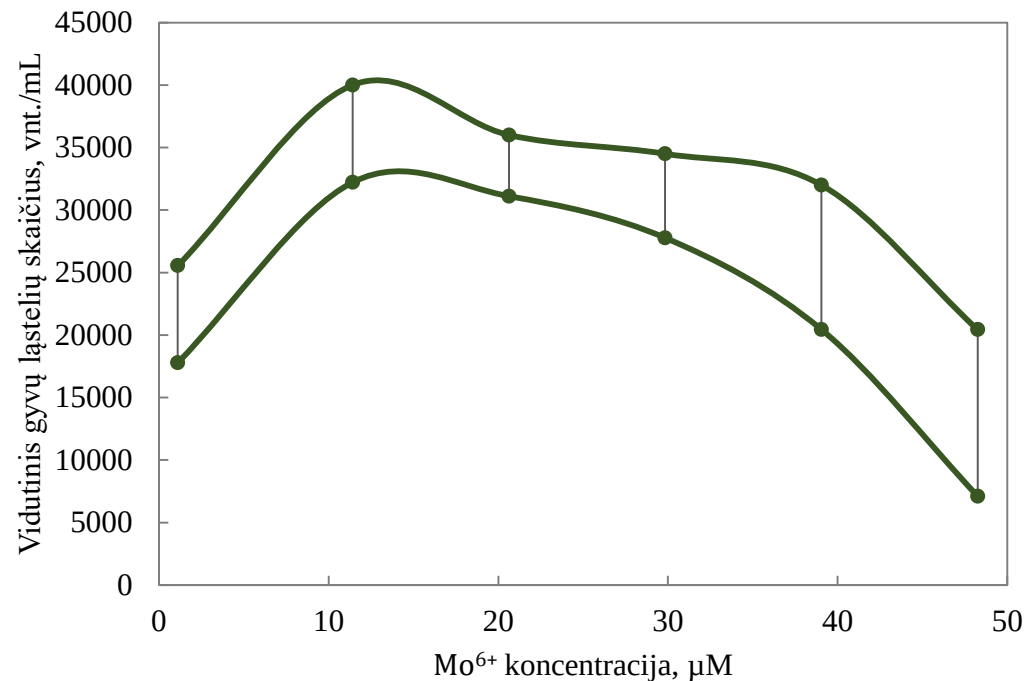
- sunkusis metalas įpilamas į maksimalų augimą pasiekusią kultūrą,
- inokuliuojama sunkiųjų metalų turinti mitybinė terpė, naudojant nedidelį ląstelių kiekį.

Pirmuoju metodu, nustatyta, kad augantys pirmuoniai turėjo 100 % ($n = 47/47$) tikimybę pasiekti maksimalų ar beveik maksimalų vidutinį ląstelių skaičių atitinkamoje sunkiųjų metalų koncentracijoje. Antruoju metodu nustatyta tik 68 % ($n = 38/56$) tikimybę pasiekti maksimalią augimo vertę atitinkamoje koncentracijoje. Visuose bandiniuose pasireiškė binarinis atsakas – arba kultūra siekė didžiausią ląstelių skaičių, arba ląstelių tankis liko panašus į pradinį inokuliacijos lygį. Pagal tai, galima iškelti prielaidą, kad abejais atvejais ląstelės turi modifikuoti savo metabolizmą, kad išgyventų sunkiųjų metalų kuriamą stresą, tačiau pirmuoju atveju didesnė populiacijos dinamika ir platesnė fenotipų įvairovė sukuria daugiau galimybių ląstelėms modifikuoti savo metabolizmą. Analizuojant sunkiųjų metalų atsparumą buvo naudoti abu metodai. Vykdam selektyvų veisimą ir analizuojant bioakumuliacinę gebą pasirinktas antrasis metodas, nes griežtesnė aplinka, nors ir mažina sėkmingų kultūrų skaičių, užtikrina intensyvesnį genų pokytį sunkiųjų metalų adaptacijai ir skatina bioakumuliacinius mechanizmus.

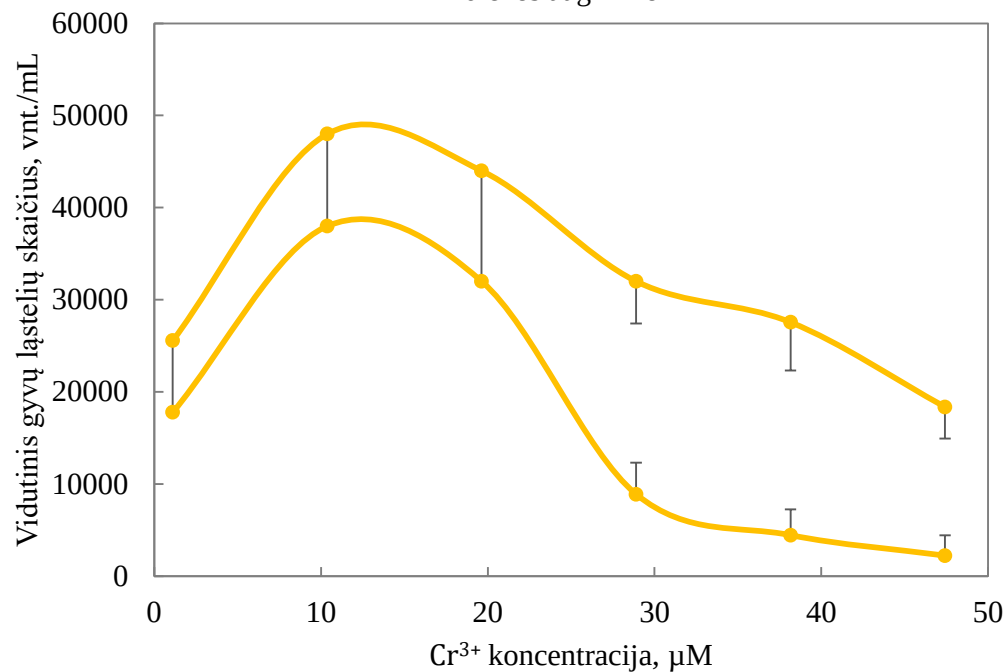
Atsparumo analizės metu su švinu, kadmiu ir nikeliu nustatyta, kad esant $10\text{ }\mu\text{M}$ jonų koncentracijai žūsta visos ląstelės per 1 dienos periodą ir bioakumuliacijos procesas nevykdomas. Todėl šie sunkieji metalai toliau neanalizuoti.



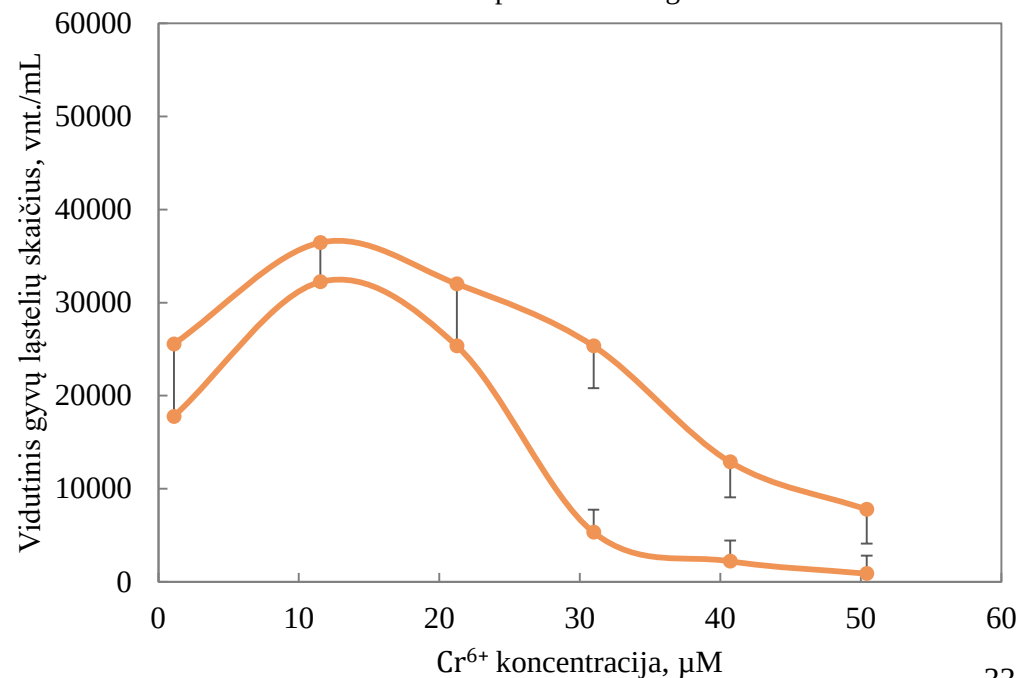
9 pav. *Tetrahymena thermophila* minimalus ir maksimalus atsparumas cinkui po 1 dienos auginimo



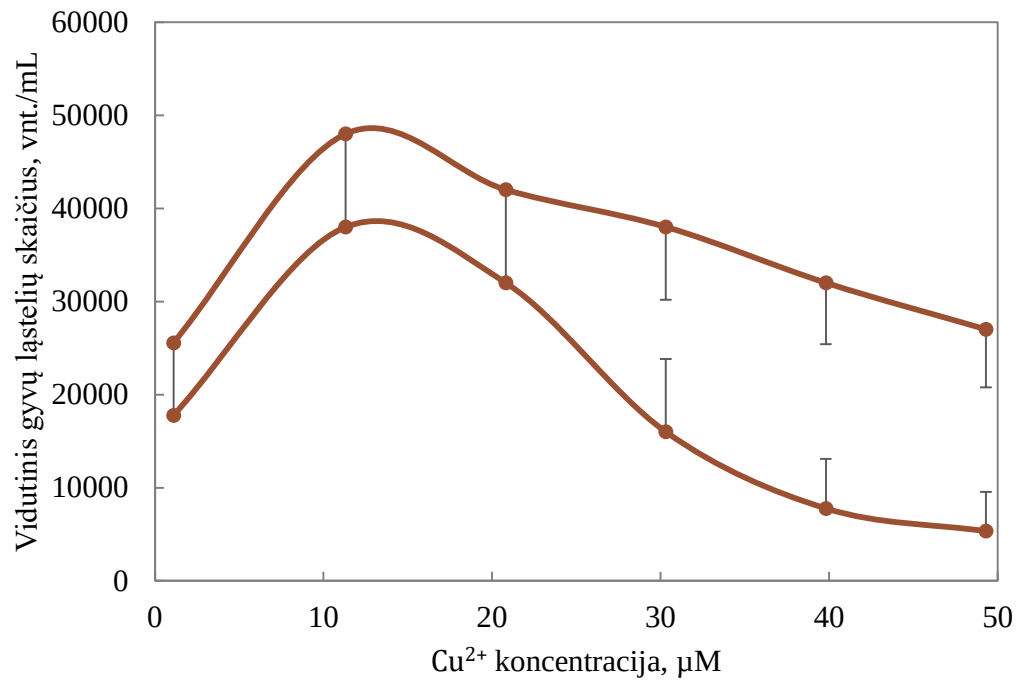
10 pav. *Tetrahymena thermophila* minimalus ir maksimalus atsparumas molibdenui po 1 dienos auginimo



11 pav. *Tetrahymena thermophila* minimalus ir maksimalus atsparumas chromui (III) po 1 dienos auginimo



12 pav. *Tetrahymena thermophila* minimalus ir maksimalus atsparumas chromui (VI) po 1 dienos auginimo



13 pav. *Tetrahymena thermophila* minimalus ir maksimalus atsparumas variui po 1 dienos auginimo

3.4. Sunkiųjų metalų bioakumuliacinė geba

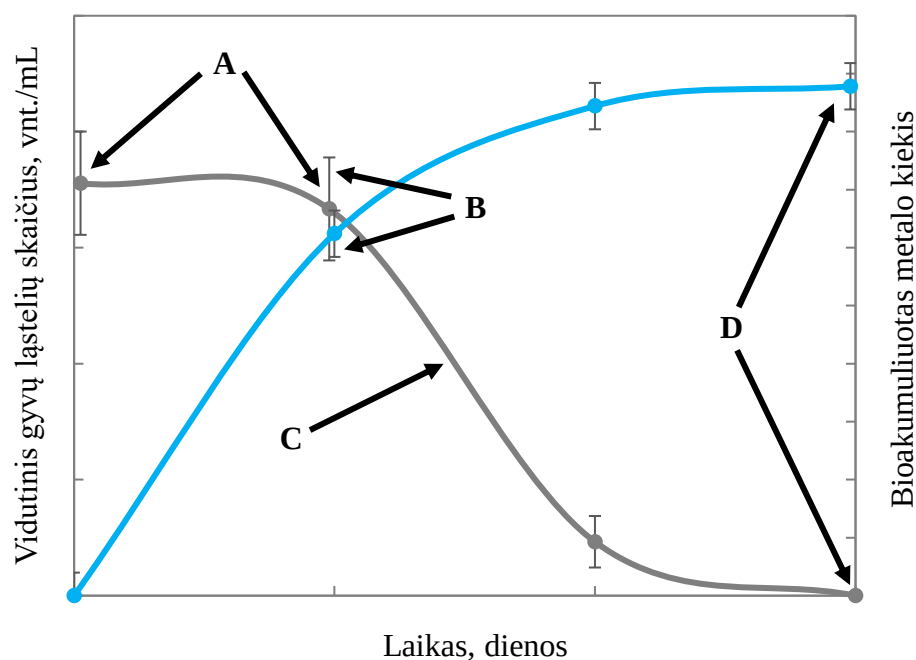
Analizuojant sunkiųjų metalų bioakumuliacinę gebą, visų pirma būtina parinkti optimalią metalų koncentraciją. Per didelė koncentracija spartina ląstelių žūtį ir riboja galutinį bioakumuluoto metalo kiekį, o per maža – nepakankamai išnaudoja bioakumuliacijos mechanizmą. Todėl tiriamojoje sistemoje koncentraciją renkame remiantis 3.3 rezultatais ir šiais kriterijais:

- po vieno dauginimosi periodo, gyvų ląstelių vidutinis skaičius nesiskiria nuo kontrolinės kultūros, neturinčios sunkiojo metalo,
- koncentracija turėtų būti pakankamai toksiška, kad indukuotų ryškų metabolizmo pokytį,
- taikomos vertės turėtų būti patogios chemikalų ruošimui.

Pagal šiuos parametrus pasirinktos vertės: Zn²⁺ 70 µM, Mo⁶⁺ 50 µM, Cu²⁺ 50 µM, Cr³⁺ 40 µM. Cr⁶⁺ vertė pasirinkta tokia pati, kaip ir Cr³⁺, kad būtų galima jas lyginti tarpusavyje.

Paruošus metalų tirpalus pagal pastarąsias vertes, jų faktinės koncentracijos, nustatytos 2.4 punkte aprašytu ICP-OES metodu, buvo šiek tiek kitokios: Zn²⁺ 63,3 µM, Mo⁶⁺ 46,0 µM, Cu²⁺ 47,5 µM, Cr³⁺ 37,0 µM, Cr⁶⁺ 38,8 µM. Šiems nukrypimams įtakos turėjo reagentų grynumo laipsnis, naudojamos laboratorinės įrangos matavimo tikslumas bei dalinis metalų jonų hidrolizės efektas, vykstantis su vandeniu ant mėgintuvėlių sienelių.

3.4.1. Ideali metalo bioakumuliacinė geba



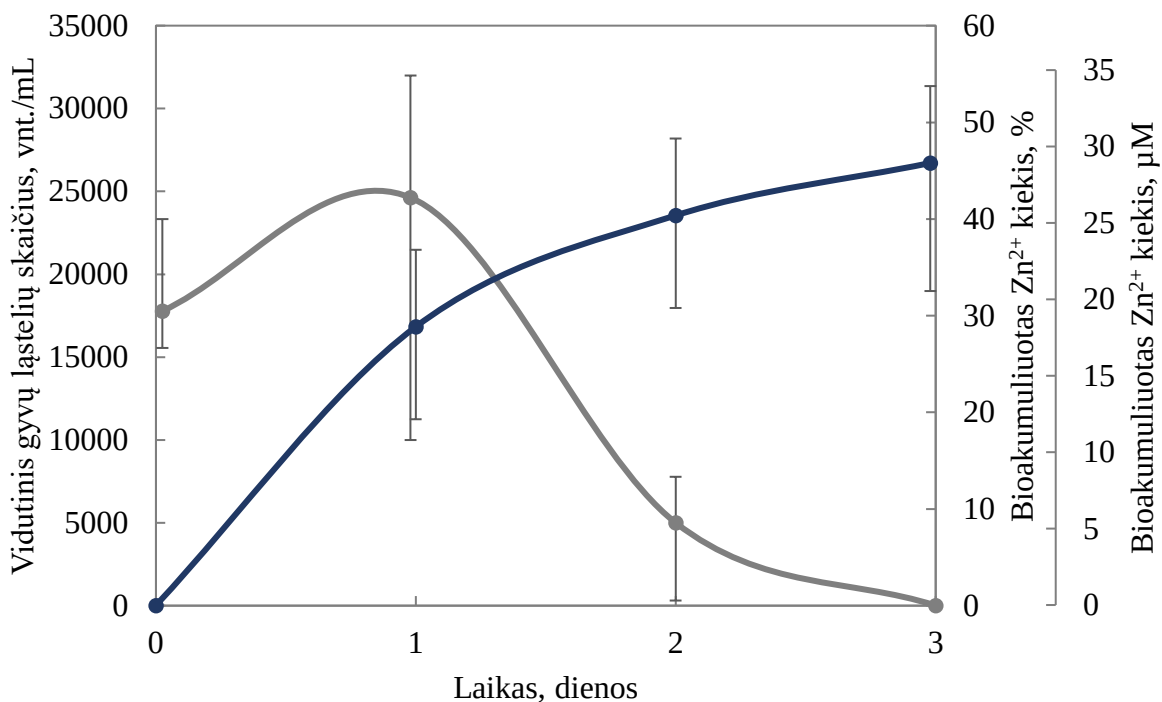
14 pav. Idealus *Tetrahymena thermophila* sunkiojo metalo bioakumuliacijos grafikas. Ženklینimas paaiškintas po paveikslu

- A – vidutinis ląstelių skaičius turėtų būti toks pat, kaip nulinę inokuliacijos dieną. Tuo atveju galima taikyti paprastą bioakumuliacijos skaičiavimo metodiką – dalijant bioakumuliuotą metalo kiekį iš viso ląstelių skaičiaus. Jei laikui bėgant vidutinis ląstelių skaičius viršija pradinį, tai reiškia, kad metalų koncentracija buvo per menka ir bioakumuliuotas metalo kiekis skaičiuojamas, naudojant šio padidėjimo vidurkį. Jei vidutinis ląstelių skaičius nukrinta žemiau nulinės dienos reikšmės, teigiama, kad sunkiojo metalo kiekis buvo per didelis ir sukėlė ląstelių mirtį. Tuo atveju, bioakumuliuotą metalo kiekis vertinamas, dalijant iš nulinės dienos užfiksuoto vidutinio ląstelių skaičiaus;
- B – idealiai bioakumuliacijos ir vidutinio ląstelių skaičiaus matavimų paklaida turėtų būti kuo mažesnė. Jei pastebima didelė paklaida, ji rodo, kad kinta ląstelių metabolizmas ir ląstelės bando prisprasti prie aplinkos sąlygų;
- C – ilgai turi pasireikšti ląstelių mirtis vidutiniu gyvų ląstelių skaičiaus sumažėjimu. Jei ląstelės nežūsta arba mirtis indukuojama maistinių medžiagų trūkumu, tada akivaizdžiai naudojama nepakankamai sunkiojo metalo;
- D – bioakumuliuotas metalo kiekis turi būti tiesiogiai proporcingas gyvų ląstelių skaičiui, kadangi tik gyvos ląstelės aktyviai perneša ir kaupia metalų jonus. Jei pastebimas bioakumuliuoto metalo kiekio sumažėjimas, tada reiškia, kad metalas buvo surištas su gyva ląstele biosorbcijos būdu, o ne bioakumuliacijos metodu.

Maistinės medžiagos bioakumuliacijos ir biosorbcijos procesų nevykdo. Priešingai – iš jų papildomai kyla sunkiųjų metalų, kurie apibūdinami, kaip maistinių medžiagų mikroelementai.

3.4.2. Cinko bioakumuliacinė geba

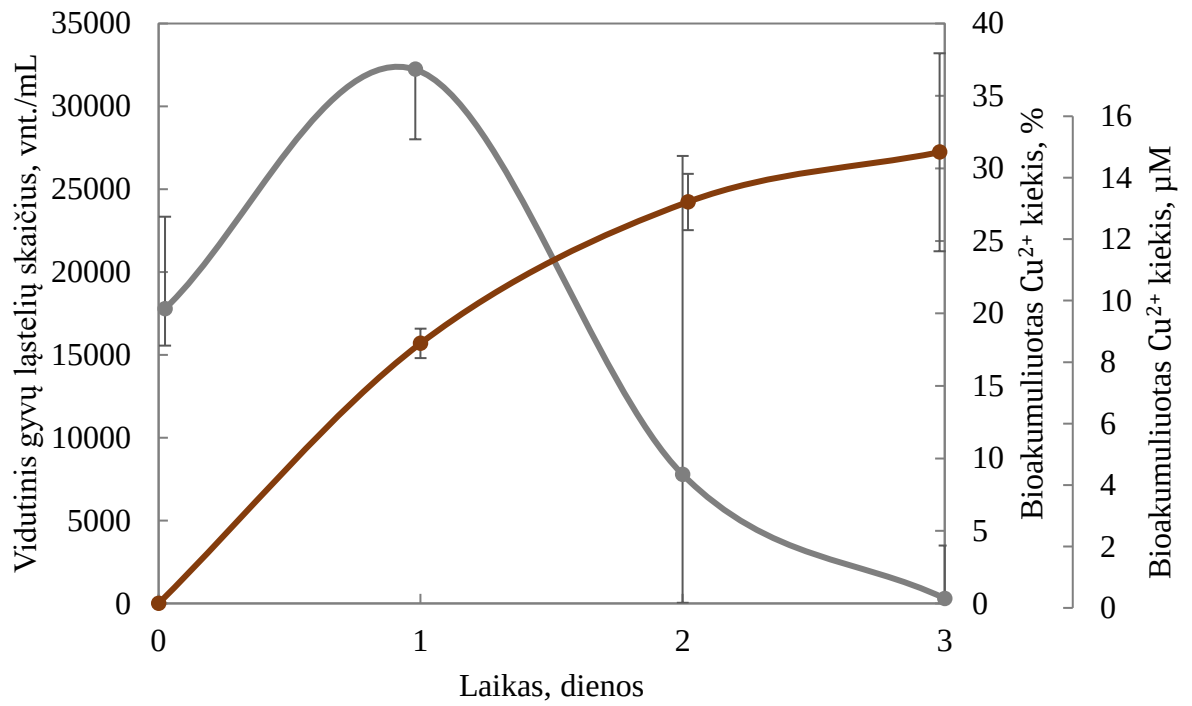
Cinko jonų poveikis *Tetrahymena thermophila* bioakumuliacijai ir gyvybingumui nustatytas trijų dienų inkubacijos periodu. Per pirmąją dieną kultūroje pasireiškia pirmieji toksinio poveikio požymiai: ląstelės vykdo tik spiralinį judėjimą, negyvų individų neaptinkama. Pirmą dieną vidutinė cinko bioakumuliacinė geba siekia 0,07 – 0,13 ng/ląstelei. Antrą dieną dauguma ląstelių žūsta, o matuojama bioakumuliacija padidėja iki 0,11 – 0,17 ng/ląstelei. Trečią dieną stebima visiška kultūros mirtis ir bioakumuliacijos procesas sustoja. Vidutinė bioakumuliacinė geba: 0,13 – 0,19 ng/ląstelei. Biosorbcija nepastebima.



15 pav. Zn²⁺ jonų bioakumuliacinė talpa *Tetrahymena thermophila* pirmuoniuose laiko atžvilgiu, kai pradinė Zn²⁺ jonų koncentracija – 63,3 μM ir mėginio tūris – 7,6 mL

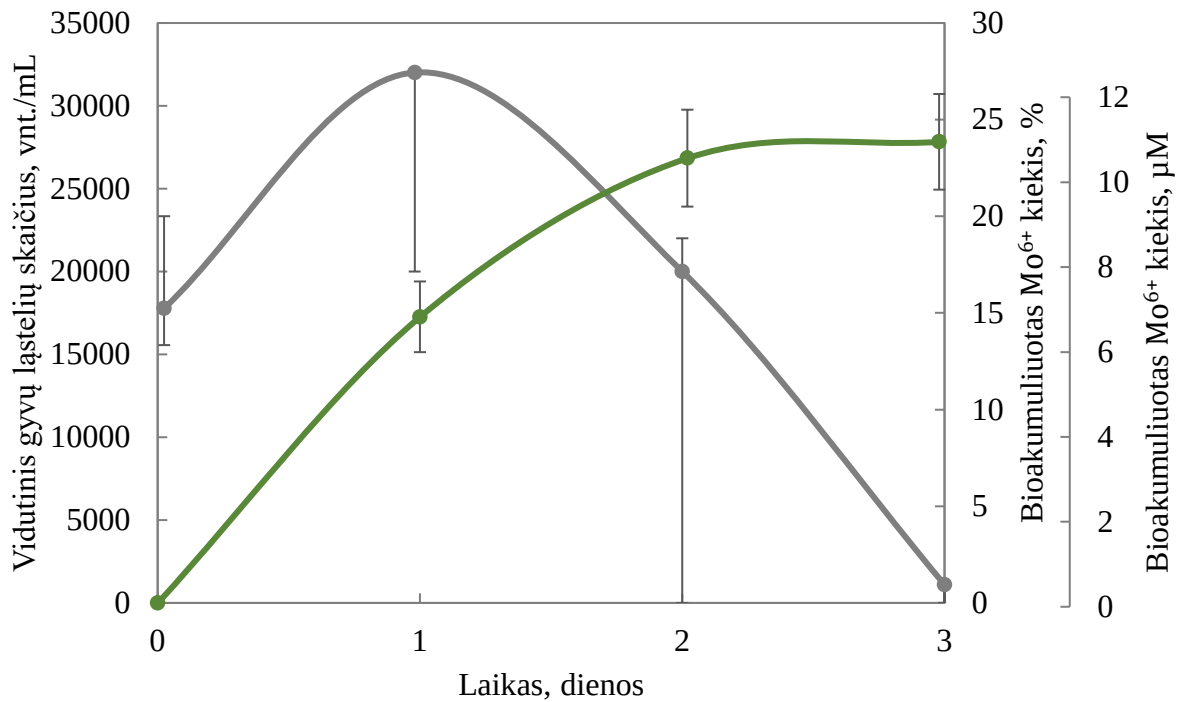
3.4.3. Vario bioakumuliacinė geba

Analizuojant vario bioakumuliacinę gebą, pirmą dieną siekia 0,04 ng/ląstelei. Antrą dieną bioakumuliacija padidėja iki 0,05 – 0,06 ng/ląstelei, o trečią dieną, žūstant ląstelėms, bioakumuliacinė geba siekia 0,05 – 0,08 ng/ląstelei ir pastebimas biosorbcijos procesas, neviršijantis 0,01 ng/ląstelei. Vidutinis ląstelių skaičius truputį per didelis, tad rekomenduojama naudoti apie 10 μM daugiau vario jonų, nei naudota šioje analizėje.



15 pav. Cu²⁺ jonų bioakumuliacinė talpa *Tetrahymena thermophila* pirmuoniuose laiko atžvilgiu, kai pradinė Cu²⁺ jonų koncentraciją – 47,5 μM ir mėginio tūris – 7,6 mL

3.4.4. Molibdeno bioakumuliacinė geba

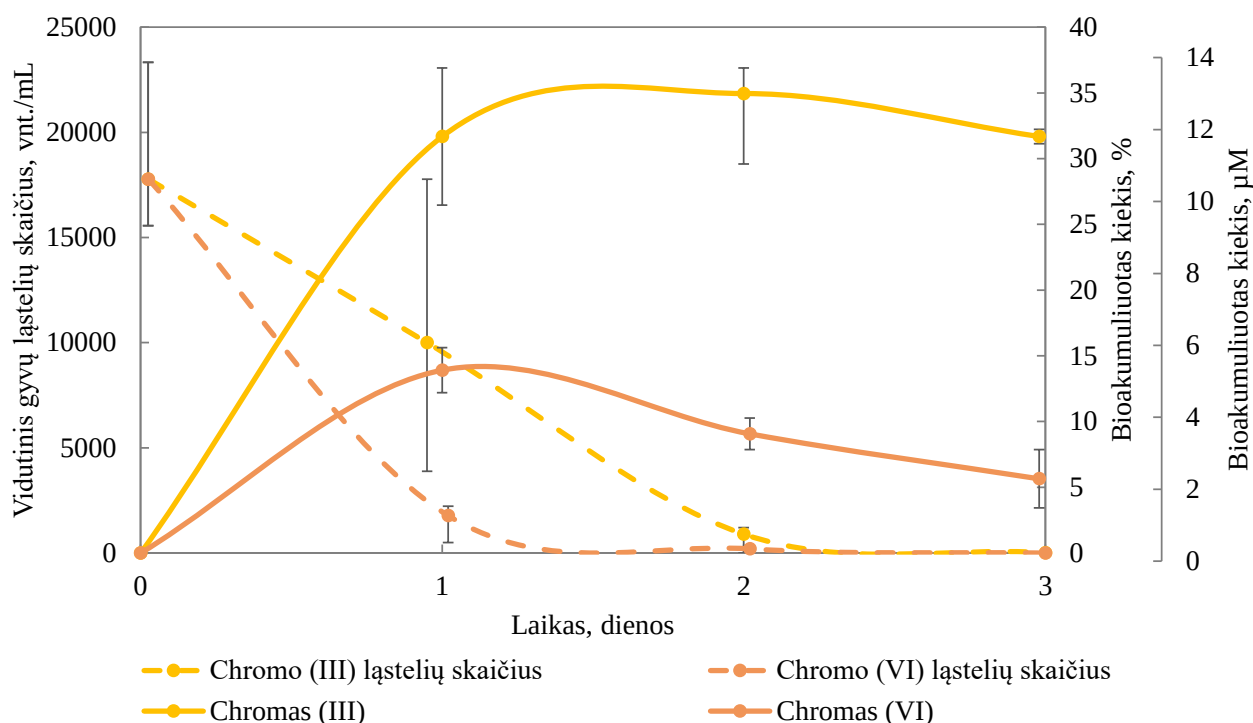


16 pav. Mo⁶⁺ jonų bioakumuliacinė talpa *Tetrahymena thermophila* pirmuoniuose laiko atžvilgiu, kai pradinė Mo⁶⁺ jonų koncentraciją – 46,0 μM ir mėginio tūris – 7,6 mL

Pirmą dieną molibdeno bioakumuliacija siekė 0,02 – 0,03 ng/ląstelei, antrą – 0,04 – 0,05 ng/ląstelei, o trečiąją – 0,04 – 0,05 ng/ląstelei. Biosorbcijos procesas nepastebimas.

3.4.5. Chromo (III) ir chromo (VI) bioakumuliacinė geba

Nėra žinomas $\text{Cr}^{3+} \leftrightarrow \text{Cr}^{6+}$ interkonversijos kiekis. Mitybinės medžiagos ir organika geba oksiduoti Cr^{6+} į Cr^{3+} , tad gali nežinomais kiekiais pasikeisti šių jonų koncentracija. Sunkiųjų metalų analizės metu nustatomas bendras metalų kiekis ir neskirstomi kiekiai pagal jonus. Tradicinis jonų atskyrimo metodas remiasi chromo (VI) oksidavimu iki chromo (III) ir elementinio jodo susidarymu, taip pat egzistuoja daugelis kitų chemikalų šiai oksidacijai atlikti [80]. Šios analizės nepavyko atlikti, nes maistinės medžiagos trukdo susidaryti elementiniui jodui. Stebėdami toksiškumą ir bioakumuliacinę gebą, pastebime, kad naudojant heksavalentę chromo druską, ji apie 5 kartus labiau toksiška ir jos biakumuliuojama apie 5 kartus mažesnė, tad galima teigti, kad druskos išlaiko savo oksidacijos laipsnį tirpale ir Cr^{6+} nelikęs oksiduotis iki Cr^{3+} mūsų eksperimentinėse sąlygose.



16 pav. Cr^{3+} ir Cr^{6+} jonų bioakumuliacinė talpa *Tetrahymena thermophila* pirmuoniuose laiko atžvilgiu, kai pradinė Cr^{3+} jonų koncentraciją – 37,0 μM , pradinė Cr^{6+} jonų koncentraciją – 38,8 μM ir mėginio tūris – 7,6 mL

Analizuojant bioakumuliacinę gebą pastebimas stiprus biosorbcijos procesas. Tikėtina, kad analizę vykdant ilgiau bioakumuliuotas metalo kiekis sumažės, ir dėl šios priežasties padidės biosorbuotas metalo kiekis. Kaip bioakumuliuotas laikomas tik tas metalo kiekis, kuris prie ląstelės prijungiamas negrįžtamai.

4 lentelė. Cr³⁺ ir Cr⁶⁺ jonų *Tetrahymena thermophila* bioakumuliacinė ir biosorbcinė geba, ng/ląstelei

	Cr ³⁺ bioakumuliacinė geba	Cr ³⁺ biosorbcinė geba	Cr ⁶⁺ bioakumuliacinė geba	Cr ⁶⁺ biosorbcinė geba
Pirma diena	0,07 – 0,09	0,01	0,01	0,02
Antra diena	0,08 – 0,09	0,01	0,01	0,01
Trečia diena	0,08 – 0,09	0,00	0,01	0,00

3.5. Selektivaus veisimo rezultatai

Taikant 2.5 punkte aprašytą selektivaus veisimo protokolą nepavyko sukurti efektyvių, bioakumuliacijos procesą vykdančių pirmuonių. Apdovanojimo (relaksacijos) etape surinkti metalų jonai lieka fiksuoti biomasėje ir neatsipalaiduoja net švarioje, metalų neturinčioje mitybinėje terpėje. Priešingai nei bakterijos ar grybai, kurie geba sporuliacijos ar endosporų mechanizmais efektyviai atskirti surištuosius metalus nuo gyvų ląstelių, *Tetrahymena thermophila* dauginasi binariniu skilimu ir šiuo atveju perduodamos bioakumuluotos metalų dalelės iš motininių ląstelių į dukterines.

3.4 punkte atlikta analizė patvirtino, kad sunkiųjų metalų jonų bioakumuliacija yra praktiškai negrįžtamas procesas, o biosorbcijos procesas praktiškai nevyksta. Po kontakto su metalais, analizuojant judėjimą visada pastebimas spiralinis judėjimas. Mėginius inokuliuavus į švarią terpę, dukterinėse ląstelėse toliau pastebimas spiralinis judėjimas iki pat ląstelių mirties. Tai labai akivaizdus ženklas, kad metalo toksiskumas nepradingsta.

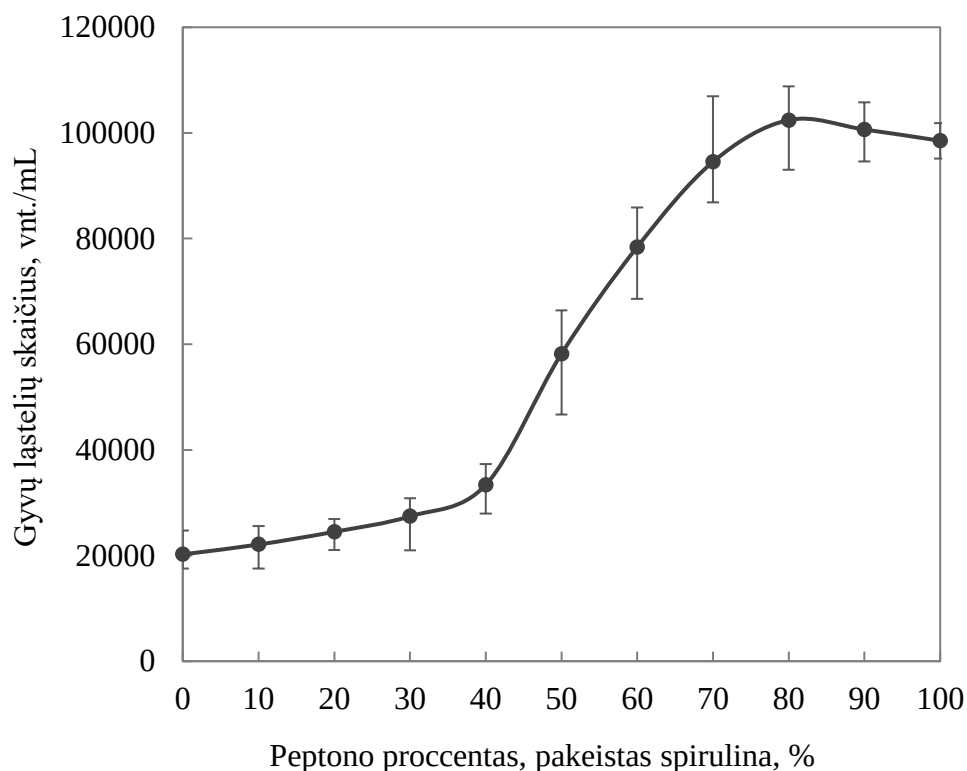
Įprasta strategija būtų sumažinti taikomo sunkiųjų metalų kiekį, tačiau tokio veiksmo pasekmė – *Tetrahymena thermophila* elgtusi su metalų jonais kaip su naudingaisiais mikroelementais, o ne toksinas. Todėl išnyktų kuriamas metabolinis stresas, skatinantis genetinius pokyčius. Be to, šių pirmuonių populiacijoje nevyksta tarpusavio konkurencija, todėl selektivaus veisimo ciklų efektyvumas mažose sunkiųjų metalų koncentracijose gerokai suprastėtų. Reikėtų atlikti maždaug 100 – 200 ciklų, norint gauti efektyvius rezultatus (3 – 5 kartus daugiau nei dabartiniu protokolu). Atsižvelgiant į tai, nuspręsta toliau selektivaus veisimo nevykdyti ir išnaudoti standartinių *Tetrahymena thermophila* ląstelių savybes. Norint padidinti bioakumuliacinį efektyvumą, siūloma pereiti prie genetinės inžinerijos: tikslingo metalotioneinų ar aktyviųjų transporterų genų modifikavimo.

3.6. Peptono pakeitimas spirulina

Peptono kiekis mitybinėje terpėje palaipsniui keičiamas spirulinos milteliais santykiu 1 g peptono : 1 g spirulinos, didinant koncentraciją kas 2 g/L (10 %) iki visiško peptono pakeitimo (20 g/L). Nustatyta netiesioginė priklausomybė tarp peptono pakeitimo laipsnio ir *Tetrahymena thermophila* ląstelių tankio: kai spirulinos koncentracija mažesnė nei 40 %, pirmuoniai naudojami peptonu kaip pirminiu maistiniu šaltiniu ir spirulinos ląstelės praktiškai ignoruojamos. Jos turi storą ląstelės sienelę ir, kadangi *Tetrahymena thermophila* gali lengviau pasisavinti maistines medžiagas iš mitybinės terpės, amino rūgštys, vitaminai ir mikroelementai lengviau pasiekiami iš tirpios peptono frakcijos. Pakeitus peptoną daugiau nei 40 %, stebimas ženklus gyvų ląstelių koncentracijos padidėjimas, tikėtina dėl metabolinių pokyčių, kurie skatina augalinių medžiagų skaidymą, kaip pirminį maisto šaltinį. Spirulina taip pat energetiškai tankesnė, tad vidutinis ląstelių

skaičius padidėja. Tačiau pasiekus 80 % peptono pakeitimo ribą, augimo greitis pradeda mažėti, o tai susiję su mikroelementų, gaunamų iš peptono, koncentracijos mažėjimu.

Ši analizė įrodo, kad spirulina yra efektyvus maistinių medžiagų šaltinis pirmuonims ir ją galima neproblematiškai naudoti kaip pirminį energijos šaltinį.



17 pav. *Tetrahymena thermophila* ląstelių tankis, kai peptonas pakeičiamas spirulina, santykiu 1:1

3.7. Tvarus sunkiųjų metalų filtras

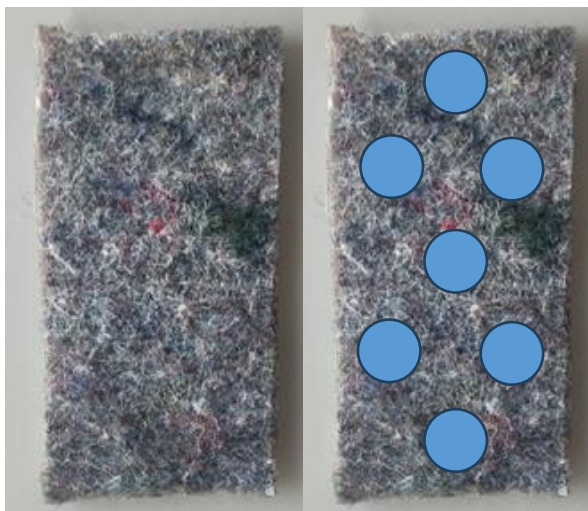
Darbai pasirinktas tekstilės atliekų pagrindo filtras. Utilizacijos procesas remiasi medžiagos deginimu pasibaigus eksploatacijos periodui. Nors filtras nėra pagamintas iš tiesiogiai atsinaujinančių ar lengvai biologiškai skaidomų medžiagų, tačiau šio filtro pritaikymas suteikia antrinį panaudojimą tekstilės atliekoms, kurios bet koku atveju būtų deginamos ir šiuo metodu minimizuojamas atliekų kiekis.

Filtras (18 pav.) gautas iš nežinomos tekstilės įmonės, sudarytas iš suslėgtų audinių skaidulų, sujungtų tarpusavyje nenustatytos cheminės sudėties rišamąja medžiaga. Jo matmenys: 5,0 cm × 2,5 cm × 0,25 cm (ilgis × plotis × aukštis). Į filtrą inokuliuoti *Tetrahymena thermophila* pirmuonys buvo paruošti tokiu būdu:

- užaugintas didelis kiekis kultūros, naudojant tik spiruliną kaip pagrindinį energijos šaltinį,
- biomasė nucentrifuguota ir surinkta naudojant sterilų švirkštą,
- filtrą užpildo 0,5 mL koncentruota biomasė, suleidžiant ją švirkštu po filtro paviršiumi,
- taškavimas vykdomas pagal 18 pav. ir kiekviename taške suleidžiama po 0,07 mL.

Dėka šio proceso, galutinis ląstelių skaičius filtre siekia 250 000 – 400 000 vienetų arba 20 000 – 32 000 vnt./cm² ir ląstelės turi pakankamai maistinių medžiagų biologiniams procesams atlikti.

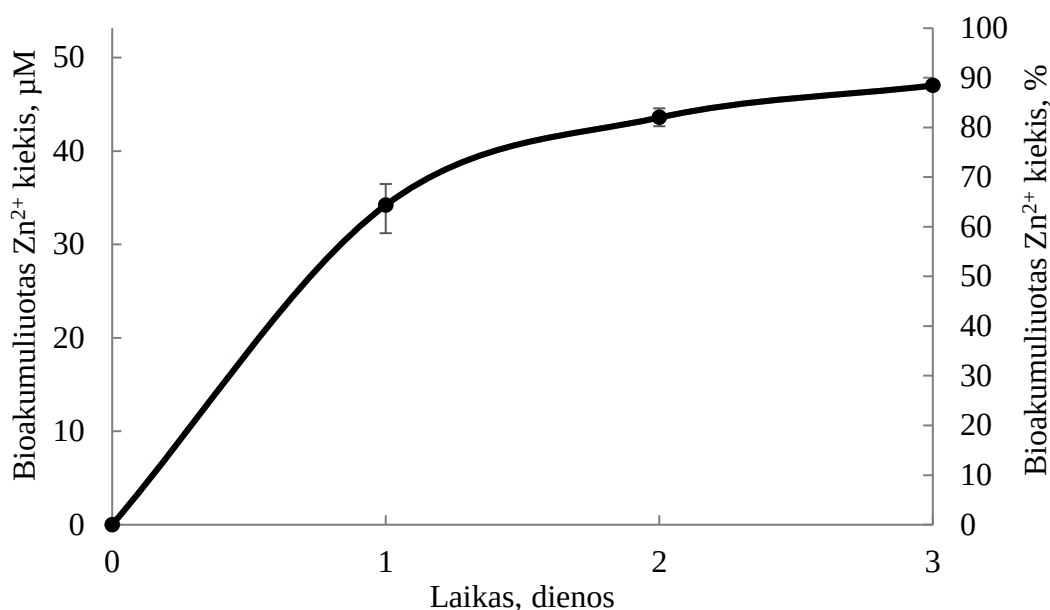
Atlikus ląstelių skaičiavimą, nustatyta, kad >95 % visų ląstelių išliko filtro viduje, analizuojamame 3 dienų periode.



18 pav. Filtro substratas, pagamintas iš tekstilės atliekų. Taškavimas žymi vietas, kuriose buvo įdėti pirmuonys

3.8. Tvarus filtro bioakumuliacinė geba

Filtru buvo naudojamas siekiant išvalyti vandens atliekas, kuriose sunkiojo metalo koncentracija buvo panaši į koncentraciją, naudotą bioakumuliacijos gebos nustatyme. Analizė buvo atlikta tik su cinku. Nustatyta cinko jonų koncentracija tiriamajame tirpale – 53,2 μM.



19 pav. Nagrinėjamo tvaraus filtro Zn²⁺ jonų bioakumuliacinė talpa laiko atžvilgiu, kai pradinė Zn²⁺ jonų koncentraciją – 53,2 μM ir filtre esančių ląstelių skaičius 250 000 – 400 000

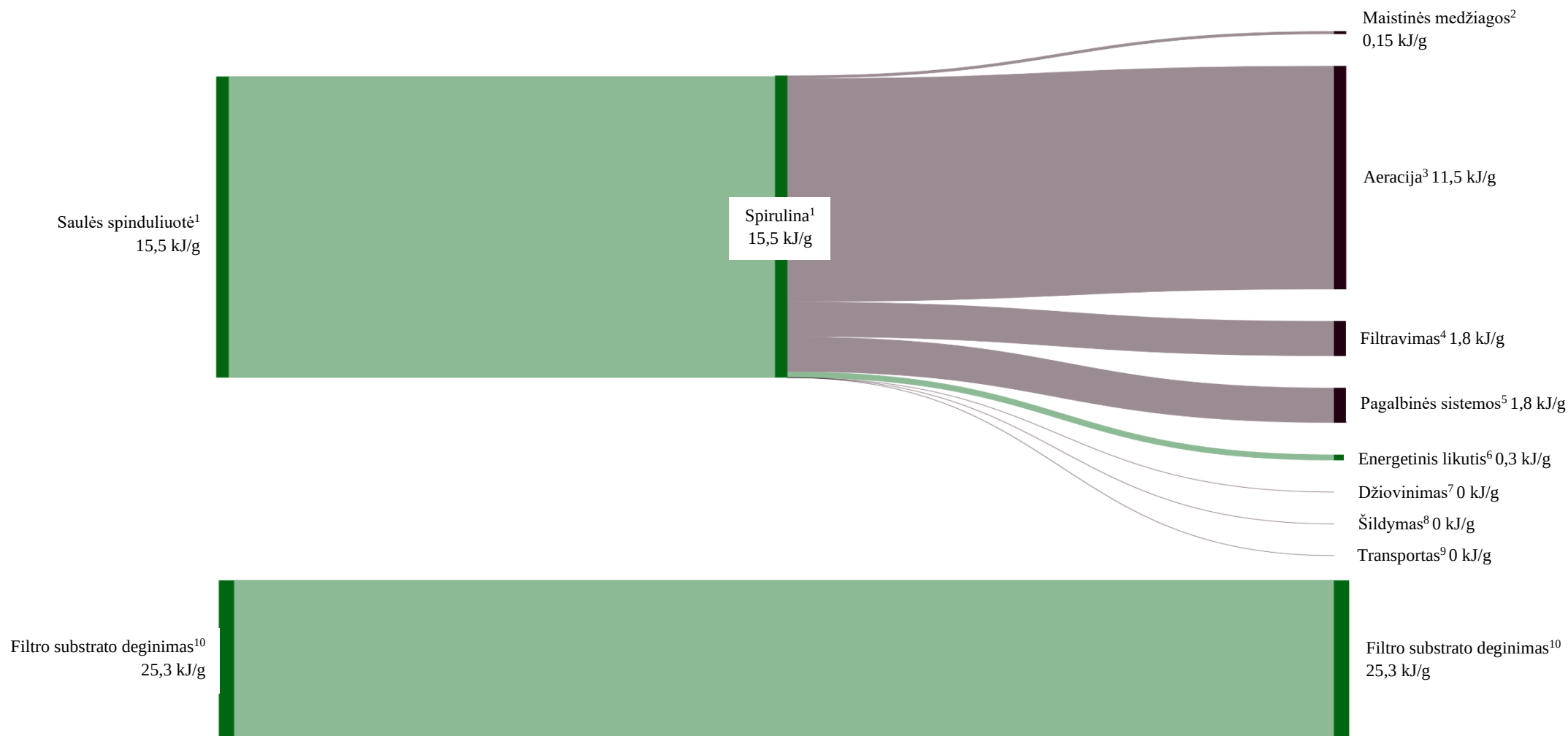
5 lentelė. Tvaraus biologinio filtro bioakumuliacinė Zn^{2+} jonų geba. Filtro storis 0,25 cm

	3.4.2 skyriuje nustatyta cinko bioakumuliacinė Zn^{2+} jonų geba, ng/ląstelei	Tvaraus biologinio filtro bioakumuliacinė Zn^{2+} jonų geba, ng/ląstelei	Tvaraus biologinio filtro bioakumuliacinė Zn^{2+} jonų geba, g/m²
Pirma diena	0,07 – 0,13	0,09 – 0,14	1,71 – 4,38
Antra diena	0,11 – 0,17	0,11 – 0,17	2,18 – 5,58
Trečia diena	0,13 – 0,19	0,12 – 0,19	2,35 – 6,02

Šios vertės įrodo, kad filtras pasižymi dideliu sunkiųjų metalų surišimo efektyvumu ir toliau vykdoma energetinė analizė, siekiant patvirtinti visą proceso tvarumą.

3.9. Tvarus filtro energetinė analizė

Proceso tvarumas paremtas faktu, kad išskiriama naudinga šiluminė energija, atitinka energiją, sunaudotą užauginti spiruliną. Daugelis aprašytų literatūros šaltinių aprašo komercinės paskirties spiruliną, auginamą kaip maisto papildą. Dėl šios priežasties, analizuojant energetines išlaidas imamos mažesnės vertės, nes auginama spirulina neprivalo atitikti maisto pramonėje keliamų reikalavimų. Energetinė analizės schema pavaizduota 20 pav. ir joje pastebima, kad procesas pakankamai tvarus ir gaunama energetinė nauda į plusinę pusę. Tačiau reikia pabrėžti, kad šios vertės nėra griežtos ir priklauso nuo visapusiško sistemos integravimo.



20 pav. Tvaraus filtro energetinė schema. Vertėsė įvertinami procesų nuostoliai. Numeravimas paaiškintas po paveikslu

1. Nustatyta eksperimentiškai, naudojant bombos kalorimetrą. Nustatyta aukštutinė degimo šiluma. Medžiaga buvo džiovinama 2 dienas 70 °C temperatūroje. Visoje analizėje naudojama sausos masės analizė;
2. pagrindinis energijos šaltinis yra pateikiamas amonio nitrato pavidalu ir nitratas sudaro apie 10 % sausos spirulinos masės. Teigiama, kad nitratas yra biologinės kilmės [80, 81]. Kiti mikroelementai, pavyzdžiui fosfatai, kalis, natris, kalcis magnis sunaudojami labai mažais kiekiais arba jų gavimas energetiškai labai paprastas, tad yra ignoruojami;
3. egzistuoja auginimo procesai, nenaudojantys aeracijos [82]. Daugelis gamintojų ją naudoja, siekdami maksimalios išeigos ir kokybės, tačiau mūsų atveju šie faktoriai nereikšmingi. Vertė gauta atlikus literatūros analizę ir gali labai kisti, priklausomai nuo procesų optimizavimo [83, 84];
4. vertė nustatyta naudojant literatūros šaltinį [85]. Tai pagrindinis metodas spirulinos koncentravimui;
5. vertė nustatyta atlikus literatūros šaltinių analizę ir gali skirtis, priklausomai nuo sistemos integravimo laipsnio [80, 81];
6. energetinė nauda, gaunama deginant biomasę;
7. džiovinimo procesas nebūtinus. Džiovinimas vykdomas tam, kad būtų galima sandėliuoti spiruliną, ir, kad ji užimtų mažesnę tūrį. Mūsų atveju galima ją naudoti iš karto. Optimizuoti procesai gali naudoti saulės šviesą šiam etapui atlikti ir nereikalauja papildomos energijos;
8. teigiama, kad spirulina auginama pakankamai optimizuotoje sistemoje ir auginimui reikalinga šiluma kyla tiesiogiai iš saulės spinduliuotės.;
9. su transportu susiję energetiniai nuostoliai priklauso nuo sistemos integracijos. Jei sistema vertikaliai integruota, transportas nebūtinus ir su juo susijusių energetinių išlaidų nebus;
10. nustatyta eksperimentiškai naudojant bombos kalorimetrą. Vertė gali skirtis, priklausomai nuo naudojamo filtro substrato.

3.10. Priešgrybelinis protokolas

Darbo metu susidurta su grybelinio užterštumo problema. *Tetrahymena thermophila* mėginiai užsiteršė ore esančiu grybeliu, tad buvo sukurta ir praktiškai išbandyta procedūra, remiantis *thermophila* temperatūros atsparumu, grybelio šalinimui iš mišinio:

- užkrėstas mėginys šaldomas 3 valandas šaldytuve
- atšaldžius, mėginys šildomas 35°C temperatūroje vieną valandą
- tada vėl kartojamas šaldymo ir šildymo procesas. Šis metodas remiasi faktu, kad *Tetrahymena thermophila* pasižymi didesne augimo geba plačiam temperatūros diapazone, nei iš oro kilęs grybelis. *Tetrahymena thermophila*, kartojant šį ciklą, ilgainiui nukonkuruoja grybelio gyvasias ląsteles jas suvalgydamos dėka heterotrofinės mitybos, tačiau nesugeba pašalinti sporų
- periodiškai (~ 12 valandų) įpilamas labai nedidelis kiekis (~ 0,05 mL) 1 % Ca(OCl)₂ tirpalo. Grybelio endosporos reaguoja labiau į chlorkalkių tirpalą, tad sunaikinamos pirmiau, o pirmuonių ląstelės gali toliau vykdyti metaboline funkcijas

Išvados

1. Eksperimentiškai nustatyta *Tetrahymena thermophila* bioakumuliacinė talpa cinko, vario, molibdeno, heksavalenčio ir trivalenčio chromo jonams.
2. Bioakumuliacinės talpos didinimas, naudojant selektyvaus veisimo metodiką, nepavyko dėl per didelio sunkiųjų metalų toksiškumo ir energetiškai stabilios bioakumuliacijos. Sunkiojo metalo koncentracijos mažinimas nerekomenduojamas ir vietoj to siūloma atlikti tiesioginę genų modifikaciją.
3. Sėkmingai sukurtas tvarus sunkiųjų metalų filtras, naudojantis *Tetrahymena thermophila* bioakumuliacines savybes ir tvarią maistinę medžiagą – spiruliną. Įvertintos ir aprašytos jo bioakumuliacinės savybės.
4. Įvertintas ir įrodytas biofiltro tvarumas. Naudojant augalinės kilmės medžiagas ir tekstilės atliekas, pastebėta, kad energetiniai nuostoliai atitinka energetines pajamas.

Rekomendacijos

Ateities tyrimams rekomenduojama pasirinkti organizmus, kurie tuo pačiu metu atliktų ir bioakumuliacijos ir biosorbcijos ar bionusodinimo funkcijas. Šiuo atveju efektyvus būtų dar didesnis.

Rekomenduojama ateities tyrimams kurti dvigubąsias ekosistemas su kitais mikroorganizmais (pvz. bacilomis), kurie naudotų negyvas *Tetrahymena thermophila* ląsteles ir aplinkoje esančius sunkiuosius metalus savo metabolizmo procesuose. Tokiu būdu galima didinti sistemos našumą, suteikiant antrą panaudojimo šaltinį maistinėms medžiagoms.

Rekomenduojama bioakumuliacinę gebą didinti naudojant tiesioginę genų modifikaciją vietoj selektyvaus veisimo metodo.

Pramoniniuose ar laboratoriniuose eksperimentuose rekomenduojama naudoti aseptines sąlygas, kadangi šiame darbe kilo daug sterilumo problemų, ir naudojami toksiški chemikalai, žudantys organizmus ir sukeliantys idealias sąlygas užkratui vystytis.

Literatūros sąrašas

1. VIKAS K. Heavy Metal Ions in Wastewater: Review on Detection and Toxicity. Indija: Malaviya National Institute of Technology. *SciMed Central, Chemical Engineering & Process Techniques*. 2023, vol. 8, no. 3, p. 1082. Doi: 10.47739/2333-6633/1082.
2. QASEM A. A. Naef, Mohammed H. RAMY ir Lawal U. DAHIRU. Removal of heavy metal ions from wastewater: a comprehensive and critical review. *npj Clean Water* 2021, vol. 4, no. 36. Doi: 10.1038/s41545-021-00127-0.
3. SREEDEVI R. P., K. SURESH ir Jiang GUANGMING. Bacterial bioremediation of heavy metals in wastewater: A review of processes and applications. Indija: Bharathiar University. *Journal of Water Process Engineering*. 2022, vol. 48, no. 102884. ISSN: 2214-7144. Doi: 10.1016/j.jwpe.2022.102884.
4. ZABOCHNICKA-ŚWIĄTEK Magdelana ir KRZYZWONOS Malgorzata. Potentials of Biosorption and Bioaccumulation Processes for Heavy Metal Removal. Czestochawa: Czestochawa University of Technology. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2014, vol 23 No. 2.
5. DUFFUS H. John. "Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure Appl.Chem*. 2009, vol. 74, no. 5, p. 793–807. IUPAC ©2002
6. VAREDA P. João, Artur J. M. VALENTE ir Luisa Durães. Heavy metals in Iberian soils: Removal by current adsorbents/amendments and prospective for aerogels. Coimbra. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2016, Vol. 237, P. 28-42. ISSN: 0001-8686. Doi: 10.1016/j.cis.2016.08.009. PMID: 27586126.
7. OJOVAN M. I. ir Lee W. E. Chapter 4 - Heavy Metals, An Introduction to Nuclear Waste Immobilisation. *Elsevier*. 2005, P. 35-41. ISBN: 9780080444628. Doi: 10.1016/B978-008044462-8/50006-5.
8. ARIF Namira, et al. Influence of High and Low Levels of Plant-Beneficial Heavy Metal Ions on Plant Growth and Development. Allahabad: University of Allahabad. *Front. Environ. Sci*. 2016, vol. 4. Doi: 10.3389/fenvs.2016.00069.
9. YOUZE Xu, et al. Novel Materials for Heavy Metal Removal in Capacitive Deionization. Changsha: Hunan Research Academy of Environmental Sciences. *Applied Sciences*. 2023, vol. 13, no. 9. Doi: 10.3390/app13095635.
10. BIRINIWA Haruna Abdullahi, Shehu HABIBU, Shehu Sa'ad ADBULLAHI, Rania Edrees Adam MOHAMMAD, Abdulmalik HUSSAINI, Hamza MAGAJI, Baker Nasser Saleh AL-DHAWI, Azmatullah NOOR ir Ahmad Hussaini JAGABA. Membrane technologies for heavy metals removal from water and wastewater: A mini review. Jigawa: Sule Lamido University Kafin-Hausa. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering, Elsevier*. 2024, vol. 9, no. 100538. ISSN: 2666-0164. Doi: 10.1016/j.cscee.2023.100538.
11. HONGLIN Zhu, Chen SUNNI ir Luo YANGCHAO. Adsorption mechanisms of hydrogels for heavy metal and organic dyes removal: A short review. Storrs: University of Connecticut. *Journal of Agriculture and Food Research*. 2023, vol. 12, no. 100552. ISSN: 2666-1543. Doi: 10.1016/j.jafr.2023.100552.
12. CHENXI Zhao, Liu GUANGYANG, Tan QIYUE, Gao MINGKUN, Chen GE, Huang XIAODONG, Xu XIAOMIN, Li LINGYUN, Wang JING, Zhang YAOWEI ir Xu DONGHUI. Polysaccharide-based biopolymer hydrogels for heavy metal detection and adsorption. Beijing:

- Ministry of Agriculture of China. *Journal of Advanced Research*. 2023, vol. 44, p. 53-70. ISSN: 2090-1232. Doi: 10.1016/j.jare.2022.04.005.
13. GAO X. ir X. MENG. Photocatalysis for Heavy Metal Treatment: A Review. Qingdao: Ocean University of China. *Processes*. 2021, vol. 9, no. 1729. Doi: 10.3390/pr9101729.
 14. ANSAM Qays Jasim ir Kathum Ajjam SATA. Removal of heavy metal ions from wastewater using ion exchange resin in a batch process with kinetic isotherm. *South African Journal of Chemical Engineering*. 2024 vol. 49, p. 43-54. ISSN: 1026-9185. Doi: 10.1016/j.sajce.2024.04.002 .
 15. How ion exchange process works in water treatment [interaktyvus, žiūrėta 2025-05]. Prieiga per internetą: <https://ionexchangeglobal.com/how-ion-exchange-process-works-in-water-treatment/>
 16. ZHENG-JUN Fu, Jiang SHANG-KUN, Chao XIN-YI, Zhang CHUN-XU, Shi QIXUN, Wang ZHEN-YUAN, Liu MEI-LING ir Sun SHI-PENG. Removing miscellaneous heavy metals by all-in-one ion exchange-nanofiltration membrane. Nanjing: Nanjing Tech University. *Water Research*. 2022, vol. 222, no. 118888. ISSN: 0043-1354. Doi: 10.1016/j.watres.2022.118888.
 17. PHANIENDRA Alugoju, Dinesh Baby JESTADI ir Latha PERIYASAMY. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. Pondicherry: Pondicherry University. *Indian J Clin Biochem*. 2015 , vol. 30, no. 1, p. 11-26. doi: 10.1007/s12291-014-0446-0. PMID: 25646037. PMCID: PMC4310837.
 18. SEIFAN Mostafa ir Aydin BERENJIAN. Microbially induced calcium carbonate precipitation: a widespread phenomenon in the biological world. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019, vol. 103, no. 12, p. 4693-4708. Doi: 10.1007/s00253-019-09861-5. PMID: 31076835.
 19. DHAMI K. Navdeep, M. Sudhakara REDDY ir Abhijit MUKHERJEE. Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. Patiala: Thapar University. *Terrestrial Microbiology*. 2013, vol. 4. Doi: 10.3389/fmicb.2013.00314.
 20. MANOJ Kumar, Nandi MOUMITA ir Pakshirajan KANNAN. Recent advances in heavy metal recovery from wastewater by biogenic sulfide precipitation. Guwahati: Indian Institute of Technology Guwahati. *Journal of Environmental Management*. 2021, vol. 278, part 2, no. 111555. ISSN: 0301-4797. Doi: 10.1016/j.jenvman.2020.111555.
 21. SREEDEVI P. R., K. SURESH ir Jiang GUANGMING. Bacterial bioremediation of heavy metals in wastewater: A review of processes and applications. Tamil Nadu: Bharathiar University. *Journal of Water Process Engineering*. 2022, vol. 48, no. 102884. ISSN: 2214-7144. Doi: 10.1016/j.jwpe.2022.102884.
 22. KARNWAL Arun. Unveiling the promise of biosorption for heavy metal removal from water sources. Phagwara: Lovely Professional University. *Desalination and Water Treatment*. 2024, vol. 319, no. 100523. ISSN: 1944-3986. Doi: 10.1016/j.dwt.2024.100523.
 23. NNABUEZE Darlington Nnaji, Helen ONYEAKA, Taghi MIRI ir Chinenye UGWA. Bioaccumulation for heavy metal removal: a review. *SN Applied Sciences*. 2013, vol. 5, no. 125. Doi: 10.1007/s42452-023-05351-6.
 24. BRADLEY B. Phillip. Chapter 2 - Factors affecting responses to drugs. *Introduction to Neuropharmacology*. Butterworth-Heinemann. 1989, P. 17-24. ISBN: 9780723612711,
 25. YANSHUANG Yu et al. A brief history of metal recruitment in protozoan predation. Fujian: Fujian Agriculture and Forestry University. *Trends in Microbiology*. 2024, vol. 32, issue 5, p. 465-476. Doi: 10.1016/j.tim.2023.11.008.

26. ARGÜELLO M. José, Daniel RAIMUNDA ir Manuel GONZÁLES-GUERRERO. Metal transport across biomembranes: emerging models for a distinct chemistry. Worcester: Worcester Polytechnic Institute. *J Biol Chem*. 2012, vol. 287, no. 17. Doi: 10.1074/jbc.R111.319343. PMID: 22389499. PMCID: PMC3340188.
27. MA Zhen, Faith E. JACOBSEN ir David P. GIEDROC. Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. College Station: Texas A&M University. *Chem Rev*. 2009, vol. 109, issue 10. Doi: <https://doi.org/10.1021/cr900077w>.
28. DENG Shiping. Chapter 19 - Phosphorus and selected metals and metalloids. Stillwater: Oklahoma State University. *Principles and Applications of Soil Microbiology (Third Edition)*, Elsevier. 2021, p. 523-555. Doi: 10.1016/B978-0-12-820202-9.00019-8.
29. KELLY Duncan. Metallothioneins and Related Chelators. Cambridge, England: Royal Society of Chemistry. *Metal Ions in Life Sciences*. 2009, vol. 5. ISBN: 978-1-84755-899-2.
30. FOWLER B. A., et al. Nomenclature of Metallothionein. Kagi, J.H.R., Kojima, Y. (eds) *Metallothionein II. Experientia Supplementum*, vol 52. 1987, vol. 52. Doi: 10.1007/978-3-0348-6784-9_2
31. RUOQIU Yang, Dumila ROSHANI, Gao BOYA, Li PINGLAN ir Shang NAN. Metallothionein: A Comprehensive Review of Its Classification, Structure, Biological Functions, and Applications. Haidian District, Beijing: China Agricultural University. *Antioxidants (Basel)*. 2024, vol. 9, no 13. Doi: 10.3390/antiox13070825. PMID: 39061894. PMCID: PMC11273490.
32. UniProt protein knowledgebase. Metallothionein databasa collection. Geneva: Swiss Institute of Bioinformatics. [interaktyvus, žiūrėta 2025-05]. Prieiga per internetą: <https://ftp.uniprot.org/pub/databases/uniprot/knowledgebase/complete/docs/metallo.txt>
33. GLAVIČ Peter. Updated Principles of Sustainable Engineering. Maribor: University of Maribor. *Processes*. 2022, vol. 10, no 10., p. 870. Doi: 10. 870. 10.3390/pr10050870.
34. CORONADO-APODACA G. Karina, Celestino GARCIA-GOME, David A. BUENTELLO-MONTOYA ir Manuel MARINEZ-RUIZ. Chapter 45 - Algal bioreactors as strategies for heavy metal phycoremediation. *Woodhead Series in Bioenergy, Algal Bioreactors*. Elsevier Science Ltd. 2025, p. 695-709. ISBN: 9780443140587. Doi: 10.1016/B978-0-443-14058-7.00012-9.
35. AGRAWAL Pooja, Virinedra KUSHWAHA, Vipul SHUKLA ir Anuj KUMAR. ANIMAL RESEARCH ETHICS: AN OVERVIEW. *Ejbps*. 2023, vol. 10, issue 7, p. 78-87. ISSN: 2349-8870.
36. LANGE Lene, Gabriele BERG, et al. Microbiome ethics, guiding principles for microbiome research, use and knowledge management. *Environmental Microbiome*. 2022, vol. 17 no. 50. Doi: 10.1186/s40793-022-00444-y
37. MUKGERJEE P., S. ROY, D. GHOSH ir S. K. NANDI. Role of animal models in biomedical research: a review. *Laboratory Animal Research*. 2022 vol. 38, no. 18. Doi: 10.1186/s42826-022-00128-1.
38. HALL P. Richard. Protozoa – key concepts, morphology and nutrition. 2021 [interaktyvus, žiūrėta 2025-05]. Prieiga per internetą: https://www.accessscience.com/highwire_display/entity_view/node/385775/focus_view. Doi: 10.1036/1097-8542.551900
39. LYNN H. Denis, Paul F. Doerder. Chapter 2 - The Life and Times of Tetrahymena. *Methods in Cell Biology*, Academic Press. Vancouver: University of British Columbia. 2012, vol. 109, p.9-27. ISSN: 0091-679X. ISBN: 9780123859679. Doi: 10.1016/B978-0-12-385967-9.00002-5.

40. LYNN H. Denis. The ciliated protozoa: characterization, classification, and guide to the literature. 2008. Doi: 10.1007/978-1-4020-8239-9. ISBN: 9781402082382.
41. PHAM Cindy, Kattereta KENNEDY, Nicola POPPER ir Ravneet GHOTRA. The Effect of Temperature on Food Vacuole Formation in *Tetrahymena thermophila*. [interaktyvus, žiūrėta 2025-05]. Prieiga per internetą: <https://scispace.com/pdf/the-effect-of-temperature-on-food-vacuole-formation-in-55xmnnk3jl.pdf>
42. CAPUTO L. Tony, Stephanie A. MRAKOVICH, Gursharn K. SANDHAR ir Ramandeep K. SANDHAR. The effect of changes in temperature on the doubling time of wild-type *Tetrahymena thermophila*. *The Expedition*. 2014, vol. 4. [interaktyvus, žiūrėta 2025-05]. Prieiga per internetą: <https://ojs.library.ubc.ca/index.php/expedition/issue/view/182544>
43. COLE S. Eric. The *Tetrahymena* Conjugation Junction. *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*. Landes Bioscience. Minnesota: St. Olaf College. 2000-2013. [interaktyvus, žiūrėta 2025-05]. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6002/>
44. Pirkimo sertifikatas ir gamintojo informaciniai duomenys. *Culture collection of algae and protozoa (CCAP). Tetrahymena Thermofila purchase information*. 2024.
45. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC
46. WEIDE Thomas, Lutz HERRMANN, Ulrike BOCKAU, Nadine NIEBUR, Ingo ALDAG, Wouter LAROY, Roland CONTRERAS, Arno TIEDTKE ir Marcus W. W. HARTMANN. Secretion of functional human enzymes by *Tetrahymena thermophila*. *BMC Biotechnol*. 2006, vol. 6, no. 19. Doi: 10.1186/1472-6750-6-19. PMID: 16542419. PMCID: PMC1431531.
47. Classification of biological agents into Risk Groups. Federal institute for occupational safety and health (BAUA). [interaktyvus, žiūrėta 2025-05]. Prieiga per internetą: <https://www.baua.de/EN/Topics/Chemicals-biological-agents/Biological-agents-infection-control/Biological-agents/Classification>
48. CASSIDY-HANLEY M. Donna. *Tetrahymena* in the laboratory: strain resources, methods for culture, maintenance, and storage. *Methods Cell Biol*. Ithaca, New York: Cornell University. 2012, vol. 109, p. 237-76. Doi: 10.1016/B978-0-12-385967-9.00008-6. PMID: 22444147. PMCID: PMC3608402.
49. Dr. PAL S. MEDIA FORMULATION recommendations. National Collection of Industrial Microorganisms (NCIM). India: National Chemical Laboratory. 2014, Fourth Edition. [interaktyvus, žiūrėta 2025-05]. Prieiga per internetą: <https://www.nci-india.org/files/ncim/downloads/ncim01-catalogintro.pdf>
50. JING Li, Zhang XIAO-LU, Liu YONG-JIE ir Lu CHENG-PING. Development of an *Aeromonas hydrophila* infection model using the protozoan *Tetrahymena thermophila*. *FEMS Microbiology Letters*. 2011, vol. 316, issue 2, p. 160-168. Doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02208.x.
51. ORIAS E., E. P. HAMILTON ir J. D. ORIAS. *Tetrahymena* as a laboratory organism: Useful strains, cell culture, and cell line maintenance. University of California at Santa Barbara. *Methods in Cell Biology*. 2000, vol. 62, p. 189–211. Doi: 10.1016/s0091-679x(08)61530-7.
52. Growth Media Formula. *Tetrahymena* Stock Center. Washington University in St. Louis. Cornell University. [interaktyvus, žiūrėta 2025-04]. Prieiga per internetą: <https://sites.wustl.edu/tetrahymena/recipes.php>

53. CASSIDY-HANLEY D., J BOWEN, J. H. LEE, E. COLE, L. A. VERPLANK, J. GAERTIG, M. A. GOROVSKY ir P. J. Bruns. Germline and somatic transformation of mating tetrahymena thermophila by particle bombardment. *Genetics*. Ithaca: Cornell University. 1997, vol. 146, no. 1, p. 47-137. Doi: 10.1093/genetics/146.1.135.
54. ASAI D. L. ir J. D. FORNEY. Tetrahymena thermophila. methods in cell biology. *San Diego: Academic Pres*. Maryland: Harvey Mudd College. 2000, chapter 4. ISBN : 9786611023379.
55. PESCIOTTA M. Donna ir SATIR H. Birgit. Effect of Cerophylr growth medium on exocytosis in Tetrahymena thermophila. *J Cell Sci*. New York: Albert Einstein College of Medicine. 1985, vol. 78, no. 1, p. 23–48. Doi: 10.1242/jcs.78.1.23.
56. CABANTOG Ariene, Ian CHOK, Harmeet GILL ir Quinn H. STEWART. The Effect of Lowered pH on the Rate of Phagocytosis in Tetrahymena thermophila.
57. ORTEGA Ruth, Ana MARTIN-GONZALEZ ir Juan-Carlos GUITIRREZ. Tetrahymena thermophila glutathione-S-transferase superfamily: an eco-paralogs gene network differentially responding to various environmental abiotic stressors and an update on this gene family in ciliates. *Frontier Genetics*. Madrid: Complutense University of Madrid. 2025, vol. 16, no. 1538168. doi: 10.3389/fgene.2025.1538168. PMID: 40125531. PMCID: PMC11925944.
58. GRAY Ross, Andrew GRAY, Jessica L. FITE, Renee JORDAN, Sarah STARK ir Kari NAYLOR. A simple microscopy assay to teach the processes of phagocytosis and exocytosis. *CBE Life Sci Educ*. Conway: University of Central Arkansas. 2012, vol. 11, no. 2. doi: 10.1187/cbe.11-07-0060. PMID: 22665590. PMCID: PMC3366903.
59. BAYLESS A. Brian, Domenico F. GALATI ir Chad G. PEARSON. Tetrahymena basal bodies. *Cilia*. Colorado, Aurora: University of Colorado-Anschutz. 2015, vol. 5, no. 1. Doi: 10.1186/s13630-016-0022-8
60. CONNETT J. Richard ir J. J. BLUM. Metabolic pathways in Tetrahymena. Estimation of rates of the tricarboxylic acid cycle, glyoxylate cycle, lipid synthesis, and related pathways by use of multiple labeled substrates. *J Biol Chem*. Durham: Duke University. 1972, vol. 25, no. 247. Doi: 10.1016/S0021-9258(19)44957-0. PMID: 4626917.
61. ZIMMERMAN J. Jerry, Amelie von Saint ANDRE-VON ARNIM ir Jerry MCLAUGHLIN. Chapter 74 - Cellular Respiration. *Pediatric Critical Care (Fourth Edition)*, Mosby. 2011, p. 1058-1072. Doi: 10.1016/B978-0-323-07307-3.10074-6. ISBN: 9780323073073.
62. BOVERIS L. Dante ir Alberto BOVERIS. Oxygen delivery to the tissues and mitochondrial respiration. *Frontiers in Bioscience*. Buenos Aires: University of Buenos Aires. 2007, vol. 12, p. 1014-1023. Doi: 10.2741/2121. PMID: 17127356.
63. ORIAS Eduardo. Introduction to the Genetics of Tetrahymena. Santa Barbara: University of California. 1997. [interaktyvus, žiūrėta 2025-05]. Prieiga per internetą: <https://www.lifesci.ucsb.edu/genome/Tetrahymena/genetics.htm>
64. ZHANG L., M. D. CERVANTES, S. PAN, J. LINDSLEY, A. DABNEY ir G. M. KAPLER. Transcriptome analysis of the binucleate ciliate Tetrahymena thermophila with asynchronous nuclear cell cycles. *Mol Biol Cell*. 2023 , vol. 34, no. 2. Doi: 10.1091/mbc.E22-08-0326. PMID: 36475712. PMCID: PMC9930529.
65. STARK R. George ir William R. TAYLOR. Analyzing the G2/M checkpoint. *Methods Mol Biol*. Ohio: Lerner Research Institute. 2004, no. 280, p. 51-82. Doi: 10.1385/1-59259-788-2:051. PMID: 15187249.

66. ZUFALL A. Rebecca. Mating systems and reproductive strategies in Tetrahymena. *Biocommunication of ciliates*. Cham: Springer International Publishing. 2016, p. 221-233. Doi: 10.1007/978-3-319-32211-7_13
67. COLE S. Eric, Oleksandr DMYTRENKO, Mark LI, Neetij KRISHNAN, Josh THORP, LeeAnn HIGGINS, Todd MARKOWSKI, Garry MORGAN ir Eileen O'TOOLE. The Role of Membrane-Bound Extracellular Vesicles During Co-Stimulation and Conjugation in the Ciliate Tetrahymena thermophila. *Microorganisms*. Northfield: St. Olaf College. 2025, vol. 1, no. 13. doi: 10.3390/microorganisms13040803. PMID: 40284639. PMCID: PMC12029339.
68. HELLUNG-LARSEN P. ir A. P. ANDERSEN. Cell volume and dry weight of cultured Tetrahymena. *Company of Biologists J Cell Sci*. Copenhagen: University of Copenhagen. 1989, pt. 2. ISSN: 1477-9137. Print ISSN: 0021-9533. Doi: 10.1242/jcs.92.2.319.
69. YASUDA Tomoyoshi, Osamu NUMATA, Kazuo OHNISHI ir Yashio WATANABE. A contractile ring and cortical changes found in the dividing Tetrahymena pyriformis. *Experimental Cell Research*. Tokyo: National Institute of Health of Japan. 1980, vol. 128, issue 2, p. 407-417. ISSN 0014-4827. Doi: 10.1016/0014-4827(80)90076-2.
70. SIMON M. Ellen ir David L. NANNEY. Germinal aging in Tetrahymena thermophila. *Mechanisms of Ageing and Development*. Urbana: University of Illinois. 1979, vol. 11, issue 4, p. 253-268. ISSN 0047-6374. Doi: 10.1016/0047-6374(79)90005-8.
71. RODGERS F. Lindsay, Karen L. MARKLE ir Todd M. HENNESSEY. Responses of the Ciliates Tetrahymena and Paramecium to Vertebrate Odorants and Tastants. *J Eukaryot Microbiol*. Amherst, New York: University at Buffalo. 2007, vol. 55, p. 27-33. Doi: 10.1111/j.1550-7408.2007.00300.x. PMID: 18251800.
72. Chemical disinfectant overview. *Center for disease control*. Direction and sterilization guideline. [interaktyvus, žiūrėta 2025-05]. Prieiga per internetą: <https://www.cdc.gov/infection-control/hcp/disinfection-sterilization/chemical-disinfectants.html>
73. Calcium hypochlorite directions for use. *Environmental Protection Agency*. Westlake safety guidelines. [interaktyvus, žiūrėta 2025-05]. Prieiga per internetą: https://www.westlake.com/safety_guidelines/WTP_Safety_Guidelines/20181010%20748-295%20Accu-Tab%20SI%20Calcium%20Hypochlorite%20Tablets%20Service%20Bulletin.pdf
74. YUDIANTO Dian, Anjas WILAPANGGA, Errol Rakhmad NOORDAM, Bangun SUTYONO, Trisna PERMADI. Evaluation of Hypochlorite Effectiveness as a Disinfectant Against Aerobic Bacteria. *Natural Sciences Engineering and Technology Journal*. Jakarta: Universitas Ibnu Chaldun. 2025, vol. 5, no.1, p. 470-483. Doi: 10.37275/nasetjournal.v5i1.66.
75. MINGHAO Zhang, Gu LINGUI, Zheng PEIHUA, Chen ZHIXIN, Dou XINGQI, Qin QIZHONG ir Cai XIAOZHONG. Improvement of cell counting method for Neubauer counting chamber. *J Clin Lab Anal*. Chongqing: Chongqing Medical University. 2020, vol. 34, no. 1. doi: 10.1002/jcla.23024. PMID: 31471934. PMCID: PMC6977140.
76. BINNYPREET Kaur, Drahomira FAKTOROVA, Priscila PENA-DIAZ ir Julius LUKEŠ. Cell Counting using a haemocytometer (Neubauer cell chamber) with fixer. *Protocols.io*. University of South Bohemia. 2018. Doi: 10.17504/protocols.io.hfxb3pn.
77. SHENKIN Mark, Ramesh BABU ir Russell MAIESE. Accurate assessment of cell count and viability with a flow cytometer. *Cytometry B Clin Cytom*. Orlando: AmeriPath Inc. 2007, vol. 72 no. 5. doi: 10.1002/cyto.b.20179. PMID: 17266154.

78. An Introduction to the Principles of Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES). *Agilent technologies*. [interaktyvus, žiūrėta 2025-05]. Prieiga per internetą: <https://www.agilent.com/en/support/atomic-spectroscopy/inductively-coupled-plasma-optical-emission-spectroscopy-icp-oes/icp-oes-faq>.
79. FERRARI Gercia-Miranda Alejandro, Robert CRAPNELL, Prashanth Shivappa ADARAKATTI, Suma B. PATRI, et al. Electroanalytical overview: The detection of chromium. *Sensors and Actuators Reports*. 2022, vol. 4, no. 100116. ISSN: 2666-0539. Doi: 10.1016/j.snr.2022.100116.
80. AHLGREN Serina, Andreas BAKY, Sven BERNESSON, Ke NORDBERG, Olle NOREN ir Per-Anders HANSSON. Ammonium nitrate fertiliser production based on biomass - environmental effects from a life cycle perspective. *Bioresour Technol*. Uppsala: Department of Energy and Technology. 2008, vol. 99 no. 17. doi: 10.1016/j.biortech.2008.03.041. PMID: 18440225.
81. EL-SAYED El-Khair Abo ir Mostafa EL-SHEEKH. Outdoor Cultivation of *Spirulina platensis* for Mass Production. *Notulae Scientia Biologicae*. 2018, vol. 10, no. 1. Doi: 10.15835/nsb10110177.
82. ISMAIL Insyirahm Kiki Adi KURNIA, Shafirah SAMSURI, Muhammad Roil BILAD, Lisendra MARBELIA, Noor Maizura ISMAIL, Asmin Laeeq KHAN, Arief BUDIMAN ir Susilawati SUSILAWATI. Energy efficient harvesting of *Spirulina* sp. from the growth medium using a tilted panel membrane filtration. *Bioresource Technology Reports*. 2021, vol. 15, no. 100697. Doi: 10.1016/j.biteb.2021.100697.
83. NORSKER Niels-Henrik, Maria J. BARBOSA, Marian H. Vermuë ir Rene H WIJFFELS. Microalgal production-a close look at the economics. *Biotechnol Adv*. Wageningen: Wageningen University. 2011, vol. 29, no. 1. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.08.005. PMID: 20728528.
84. TZACHOR Asaf, Catherine E. RICHARDS, Asger SMIDTH-JENSEN, Arnar Þor SKÚLASON, Alfons RAMEL, Margret GEIRSDOTTIR. The Potential Role of Iceland in Northern Europe's Protein Self-Sufficiency: Feasibility Study of Large-Scale Production of *Spirulina* in a Novel Energy-Food System. *Foods*. Cambridge: University of Cambridge. 2022, vol. 12, no. 1. Doi: 10.3390/foods12010038. PMID: 36613252. PMCID: PMC9818573.
85. GUIDI Flavio, Zivan GOJKOVIC, Marianna VENULEO, Patricia Alexandra CLEMENTE, Janeiro ASSUNCAO ir Eduardo PORTILLO. Long-Term Cultivation of a Native *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) Strain in Pozo Izquierdo (Gran Canaria, Spain): Technical Evidence for a Viable Production of Food-Grade Biomass. *Processes*. Instituto Tecnológico de Canarias. 2021, vol. 9, no. 1333. Doi: 10.3390/pr9081333.

Publikacijų sąrašas

STRAIPSNIAI RECENZUOJAMUOSE PERIODINIUOSE MOKSLO LEIDINIUOSE

1. TiFEC 2025 – Sustainable bioaccumulation-based Filter for Heavy Metal Remediations Using Protozoan Tetrahymena Thermophila. ISSN 3030-2242.

MOKSLINIŲ TYRIMŲ REZULTATŲ SKELBIMAS KONFERENCIJOSE

1. CCT (Chemija ir chemija technologija) 2025 – BIOLOGICAL HEAVY METAL FILTER UTILIZING TETRAHYMENA THERMOPHILA BIOACCUMULATION PROPERTIES.
2. VNS (Vital Nature Science) 2025 – PROTOZOAN-BASED SUSTAINABLE BIOFILTER FOR HEAVY METAL REMEDIATION
3. Open Readings 2025 – HEAVY METAL BIOACCUMULATION CAPACITY IN PROTOZOAN TETRAHYMENA THERMOPHILA
4. CYSENI 2025 – PROTOZOAN TETRAHYMENA THERMOPHILA MODIFICATION VIA SELECTIVE BREEDING IN ORDER TO ACQUIRE RESISTANCE TO HEAVY METALS