

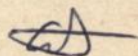
АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОКОЛОЇДНОЇ ХІМІЇ

На правах рукопису

СКЛЯРОВ Андрій Георгійович

СОРЕЦІЯ ЙОННОГО ВОЛОСТА КЛІТИНАМИ
ЗЕЛЕНОЇ ВОДОРОСТІ *Chlorella vulgaris*

Спеціальність: 02.00.11 - колоїдна та мембранна хімія



АВТОРЕСЕРАТ

дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата хімічних наук

Київ - 1994

Робота виконана в Інституті біоколоїдної хімії
НАН України

Науковий керівник: доктор хімічних наук,
професор Ульберг З.Р.

Офіційні опоненти:

Доктор хімічних наук,
академік РАН, професор Перцов М.В.

Доктор біологічних наук,
професор Рибальченко В.К.

Провідна установа: Київський державний університет
ім. Т.Г.Шевченка

Захист відбудеться *24.12.1994 р. о 14 год.*
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 02.41.01
в Інституті біоколоїдної хімії НАН України за адресою:
254080, Київ, вул. Фрунзе, 85.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці
Інституту біоколоїдної хімії НАН України.

Автореферат розісланий *24.11* 1994 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради *Прокопенко* Прокопенко В.А.

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00777233 (Т)

м. В. Стефаніка
НАН України

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність роботи. У теперішній час рішення проблеми переробки мінеральної сировини, зокрема сировини, яка містить в собі золото, а також багатьох екологічних проблем цієї галузі пов'язують з розробкою ефективних біотехнологічних процесів. У зв'язку з цим концентрування металів та їх сполук за допомогою гетерокоагуляції колоїдних мінеральних частинок клітинами мікроорганізмів або сорбції останніми йонів металів стає науковою основою цього важливого для науки та промисловості напрямку. Об'єкт цього напрямку - мікроби, які одержали назву металофільних (Овчаренко та інш., 1985). До цієї групи умовно відносять мікроорганізми, які мають принаймні одну із перелічених нижче якостей: а) здатність функціонувати тільки у присутності певних металів та їх сполук у середовищі мешкання; б) стійкість до підвищеної концентрації важких металів у середовищі; в) здатність ефективно сорбувати та/або трансформувати метали та їх сполуки. Дана робота уперше розглядає колоїдно-хімічні та біохімічні закономірності сорбції йонів металів інтактними клітинами металофільних водоростей та бактерій. При цьому особливу увагу приділено впливу фізіологічної активності клітини. У більш загальному плані з'ясування механізму взаємодії мікроорганізмів з важкими металами, що не відносяться до "біофільних", необхідно для розуміння фундаментальних процесів функціонування живої клітини у нормальних та екстремальних умовах. Може бути плідним практичне використання цього явища у різноманітних сферах людської діяльності. Розуміння названих процесів необхідне при створенні фармакологічних препаратів, що містять метали, при розробці засобів захисту живої клітини від агентів, які містять метали. Нарешті, найбільш очевидним і добре розробленим є використання мікроорганізмів для очищення водних середовищ від важких металів та їх видобування із рудної сировини.

Здатність мікроорганізмів ефективно сорбувати важкі метали

стала основою для розробки технологій, які зумили скласти конкуренцію традиційним методам видобування важких металів. В останній час з'явилися повідомлення про розробки комерційних біосорбентів на основі біомаси інактивованих водоростей та їх ефективне використання у різних технологічних схемах (Volesky, 1987). Виявлені штами водоростей, сорбційні властивості інактивованої біомаси котрих до ряду металів близькі до найбільш ефективних штучних сорбентів (Kuyucak, Volesky, 1988). У той же час інтактні водорості ряду штамів здатні сорбувати важкі метали значно інтенсивніше, ніж інактивована біомаса (Gadd, 1988). Дослідження взаємодії різних мікроорганізмів з металами, що виконуються в Інституті біологічної хімії АН України, також свідчать про значну різницю між сорбційними характеристиками інтактних та інактивованих клітин водоростей та бактерій по відношенню до багатьох металів, у тому числі і до золота. З'ясування причин цієї різниці здійснюється у кількох напрямках, що обумовлено комплексним характером процесу сорбції, який вміщує взаємодії різного роду. До них відносяться і такі взаємодії між йонами металів та клітинною поверхнею, які обумовлені електроповерхневими явищами.

Відомо, що колоїдно-хімічні властивості живих та інактивованих мікробних клітин істотно відрізняються і ця обставина не може не відобразитися на ході електроповерхневих явищ у клітинних суспензіях (Овчаренко та інш., 1991). Виходячи з цього, урахування колоїдно-хімічних факторів, таких як динамічний стан і гетерогенний розподіл поверхневого потенціалу, при дослідженні сорбції йонів металів клітинами мікроорганізмів може дозволити не тільки з'ясувати основні причини цього явища, але й розробити засоби управління такими процесами для їх практичного використання.

Ця робота є частиною досліджень, які виконуються в Інституті біологічної хімії у відповідності з проектом "Біотехнологія видобування золота у дисперсному та йонному стані (біоаккумуляція) з одночасним знешкодженням відходів золотовидобувних підприємств" (затверджено ДКНТ 16.01.1989 р.), який є складовою частиною Державної науково-технічної програми "Новітні методи біоінженерії" (завдання 01.01.Н).

Мета і задачі дисертаційної роботи. Метою даної роботи було вивчення основних колоїдно-біохімічних закономірностей сорбції йонів металів на прикладі сорбції Au(III) і Cu(II) клітинами мікроводоростей (*Chlorella vulgaris*) і бактерій (*Bacillus cereus*). Для досягнення поставленої мети вирішувались такі задачі:

1. Установлення основних кінетичних та концентраційних закономірностей сорбції йонів золота і міді інтактними та інактивованими клітинами.
2. Визначення ролі метаболічних процесів у концентруванні металів інтактними клітинами.
3. Установлення та вивчення хімічних і фізичних факторів, що впливають на процес сорбції металів клітинами.
4. Розробка механізмів та засобів регулювання процесів сорбції/десорбції клітинами йонів металів.

Наукова новина. В даній роботі уперше проведено комплексне дослідження колоїдно-біохімічних закономірностей сорбції металів (Au(III) і Cu(II)) клітинами мікроводоростей та бактерій. Виявлено значне перевищення величини сорбції металів у випадку інтактних клітин в порівнянні з інактивованими. Запропоновано та теоретично обгрунтовано можливий механізм цього явища.

Одержані залежності сорбції металів від концентрації взаємодіючих компонентів (метал/біомаса), часу взаємодії, складу, концентрації та pH фонового електроліту.

За допомогою інгібіторів метаболізму цілеспрямованої дії виявлена залежність процесу сорбції йонного золота інтактними клітинами від функціонування генераторів трансмембранного потенціалу на плазматичній мембрані.

Виявлено, що зв'язування йонного золота інтактними клітинами хлорели відбувається у два ступені. На підставі аналізу впливу світла та інгібіторів метаболізму запропоновані засоби десорбції зв'язаного клітинами золота.

Змодельовано циклічний процес сорбції/десорбції золота, в якому у якості сорбента йонів золота використовувались інтактні клітини хлорели.

Практична цінність роботи. Результати даної роботи значно розширяють уяву про механізми сорбції тяжких металів мікроорга-

нізмами. Виявлені закономірності можуть бути використані при вирішенні різних прикладних задач біотехнології. Зокрема, результати дослідження сорбції йонів золота та міді інтактними клітинами *Chlorella vulgaris* використовуються при виконанні в Інституті біологічної хімії АН України робіт по створенню ефективних селективних процесів зв'язування тяжких металів при очищенні техногенних вод, видобування із них цінних компонентів та процесів збагачення мінеральної сировини, що містить золото.

Автор захищає:

1. Результати дослідження дії фізичних та хімічних факторів на сорбцію йонів золота та міді інтактними та інактивованими клітинами хлорели.

2. Експериментальні дані, одержані при визченні впливу йонного золота на процес вирощування клітин хлорели.

3. Дані про залежність сорбції йонного золота інтактними клітинами хлорели від функціонування генераторів трансмембранного потенціалу на плазматичній мембрані.

4. Модель циклічного регульованого процесу сорбції/десорбції йонного золота інтактними клітинами хлорели.

Апробація роботи. Матеріали дисертаційної роботи апробовані на Всесоюзному семінарі з електроповерхневих явищ та мембранних процесів / Київ, 1988 /, II Всесоюзному симпозіумі "Біотехнологічні та хімічні методи захисту навколишнього середовища" / Самарканд, 1988 /, Нараді з колоїдної технології та геохімії благородних металів / Київ, 1988 /, IV республіканській конференції молодих вчених та фахівців мікробіологів / Ташкент, 1989 /, VIII конференції зі спорових рослин Середньої Азії та Казахстану / Ташкент, 1989 /, VIII Міжнародній нараді "Властивості рідини у малих об'ємах" / Київ, 1990 /, 4-му Міжнародному симпозіумі з гірничої хімії MinChem'92 / Київ, 1992 /.

За темою дисертації опубліковано три статті та три тез.

Обсяг та структура роботи. Дисертація викладена на 116-х сторінках машинописного тексту, містить список літератури із 101-го найменування, 3 таблиці та 16 малюнків. Робота складається із вступу, п'яти глав та висновків.

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У даній роботі досліджені сорбційні властивості клітин мікродоростей (*Chlorella vulgaris* Beijer., штами УА-1-1 та А-10) та бактерій (*Bacillus cereus* В-4368). Водорості вирощували у судинах об'ємом до 500 мл. на мінеральному поживному середовищі 04 (Таубаєв, Бурієв, 1980) при періодичному освітленні та продуванні повітря. Бактерії вирощували на рідких поживних середовищах, приготуваних на основі м'ясо-пептоного бульйону.

Перед дослідом клітини відділяли від поживного середовища за допомогою центрифугування та ресуспендували у невеликому об'ємі середовища певного складу. При дослідженні сорбційних властивостей мікроорганізмів до клітинної суспензії вносили розчин солі золота або міді (до кінцевої концентрації 30 і 100 мкМ відповідно), через деякий час біомасу відділяли за допомогою центрифугування або пропускання крізь фільтри, що затримують клітини. Кількість зв'язаного біомасою металу визначали за різницею між початковою та залишковою кількістю металу у середовищі інкубування. Визначення Au(III) та Cu(II) в розчині проводили спектроскопічним методом з використанням п-диметиламінобензилдіенгидроданіну у випадку золота (Sandell, 1948, Бусев, Іванов, 1978) та диетилдитіокарбамату натрію у випадку міді (Васко та інш., 1968).

При інгібіторному аналізі використовували інгібітори окислювального фосфорилування 2,4-динітрофенол (ДНФ), пентахлорфенол (ПХФ) та дициклогексилкарбодіімід (ДПКД), інгібітор дикального ланцюгу клітини азид натрію (NaN_3). Крім того, в експериментах використовувався аденозинтрифосфат (АТФ).

Модифікування поверхневого заряду клітин здійснювали за допомогою поверхнево-активних речовин катіонного (цетилтриметиламоній бромистий - цетавлон), аніонного (додецилсульфат натрію) та неіоногенного (третон Х-100) типу.

Інактивацію клітин проводили за допомогою інкубації посудини з клітинною суспензією на водяній бані при температурі 85-95°С на протязі 10-15-ти хвилин. Потім клітини за допомогою центрифугування вилучали із розчину та ресуспендували у середо-

вищі певного складу. У деяких випадках інактивація клітин проводилась за допомогою інгібіторів метаболізму (у цих випадках умови інактивації вказані при наведенні відповідних даних).

ЗМІСТ РОБОТИ

Дослідження сорбції Au(III) та Cu(II) клітинами мікроорганізмів

Проведені колоїдно-хімічні та біохімічні дослідження сорбції золота та міді із розчинів інтактними та інактивованими клітинами металофільних мікроводоростей та бактерій дозволили визначити ряд важливих закономірностей:

1) інтактні клітини мікроводоростей сорбують вказані метали значно ефективніше, ніж інактивовані; це обумовлено тим, що інтактні клітини використаних мікроорганізмів виявились здатними концентрувати метали не тільки за рахунок метаболізм-незалежних фізико-хімічних взаємодій, але й у наслідок залежної від метаболізму сорбції;

2) концентрування металів інтактними клітинами може супроводжуватися олігодинамічним ефектом;

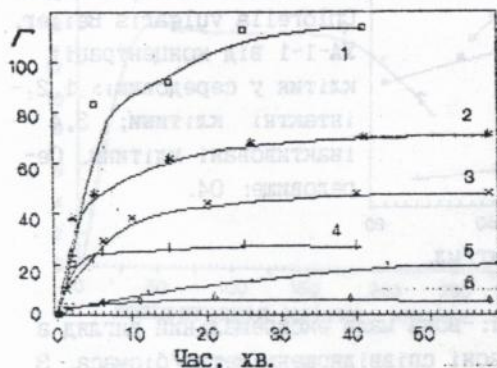
3) за визначених умов сорбція металів мікробними клітинами може бути оборотним процесом, тобто таким, що здатен йти у зворотньому напрямку; цей процес можливо регулювати за допомогою цілеспрямованої дії на клітинний метаболізм;

4) виявлений ефект зафіксовано як при використанні бактерій (прокаріоти), так і при використанні зелених мікроводоростей (еукаріоти).

Вказані закономірності не є універсальними: більшість протестованих мугейних та диких штамів бактерій та мікроводоростей відрізнялись повною індиферентністю до йонного золота і тільки деякі мали здатність сорбувати його. Аналіз реакцій на метали клітин саме таких металофільних штамів містяться у наступних розділах.

Дві важливі властивості характеризують дослідженні біосорбенти: висока сорбційна ємкість, що сягає для золота та міді

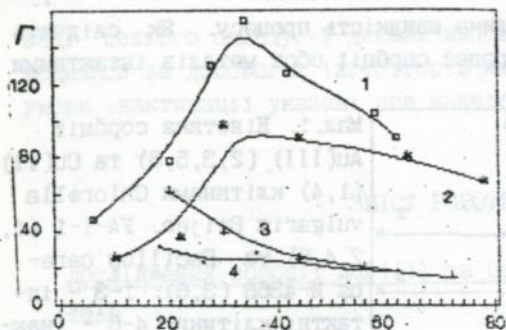
значення 80-250 мг/г, та велика швидкість процесу. Як свідчать дані, приведені на мал.1, процес сорбції обох металів інтактними



Мал. 1. Кінетика сорбції Au(III) (2,3,5,6) та Cu(II) (1,4) клітинами *Chlorella vulgaris* Beijer. YA-1-1 (1, 2,4,5) та *Bacillus cereus* И-4368 (3,6): 1-3 - інтактні клітини; 4-6 - інактивовані клітини. Концентрація клітин: 72 (1,3), 40 (2), 32 (4) та 117 мг/мл (5,6). Середовище: 0,04 (1-4), 10мМ NaCl (5), 10мМ NaCl, 0,1мМ дінитрофенол (6). Г - величина сорбції, мг металу / г клітин.

клітинами завершується практично повністю за 30-40 хв. При зміні співвідношення метал/біомаса як у більшу, так і у меншу сторону час досягнення рівноважного стану практично не змінюється. На підставі цих результатів були вибрані умови проведення подальших експериментів. Порівняння сорбційних характеристик інтактних та інактивованих клітин *Ch. vulgaris* дозволяє впевнитися у тому, що останні здатні сорбувати значно меншу кількість золота та міді. Якісно аналогічна картина зафіксована нами і при вивченні кінетичних характеристик сорбційного процесу, коли роль біосорбента грали бактерії *Bacillus cereus* (шт. В-4368) (мал. 1).

Іншим важливим параметром є концентрації взаємодіючих компонентів. Для інактивованих клітин при зменшенні їх вмісту у середовищі величина Г (кількість металу, зв'язаного одиницею ваги біомаси) мала тенденцію до збільшення (мал. 2). Це зрозуміло, оскільки при постійній концентрації золота та зменшенні концентрації клітин вагове співвідношення метал/біомаса зростає. В той же час для інтактних клітин спостерігалась залежність, що різко



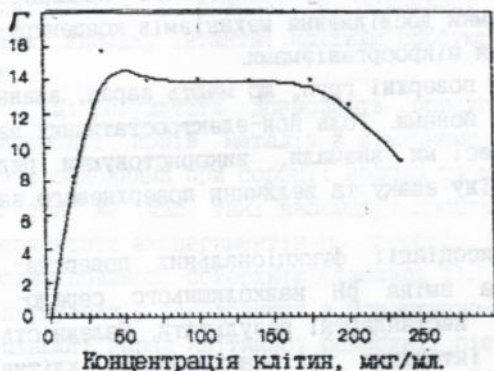
Мал. 2. Залежність величини сорбції (Г) Au(III) (1,3) та Cu(II) (2,4) клітинами *Chlorella vulgaris* Beijer. UA-1-1 від концентрації клітин у середовищі: 1,2 - інтактні клітини; 3,4 - інактивовані клітини. Середовище: 04.

Концентрація клітин, мкг/мл.

відрізнялась від попередньої: вона мала екстремальний вигляд з максимумом у вузькому діапазоні співвідношень метал/біомаса. З підвищенням концентрації клітин у середовищі (при постійній концентрації золота) зменшення величини Г, очевидно, було пов'язано із зменшенням зазначеного співвідношення. За низьких концентрацій клітин зменшення величини Г, напевне, мало інші причини. Суттєва різниця між сорбційною активністю інтактних та інактивованих водоростей ясно вказує на важливу роль у цьому процесі взаємодій, обумовлених метаболізмом. Але сильний окисник Au(III) та блокатор ряду ферментів Cu(II) не можуть створювати сприятливі умови для перебігу таких взаємодій. При зменшенні концентрації клітин токсичний вплив іонів Cu(II) та Au(III) безумовно буде посилюватися. Таким чином фізіологічна активність клітин пригнічується і, можливо, саме тому ми спостерігали зниження сорбційної активності біосорбента. Ще раз підкреслимо, що поведінка клітин хлорели дуже схожа на поведінку бактерій (мал. 3), а криві, що відображають сорбцію Au(III) та Cu(II), зовні адекватні (мал. 2).

Те, що Au(III) та Cu(II) є інгібіторами метаболізму водоростей, підтверджено спеціальними експериментами. Детальне дослідження впливу Au(III) на ріст та розвиток клітин *Ch. vulgaris* виявило таку картину.

Підвищення кількості металу в середовищі росту при постійній величині засівної дози клітин приводило до уповільнення росту клітин при низьких вагових співвідношеннях метал/біомаса та пов-



Мал. 3. Залежність величини сорбції Au(III) інтакними клітинами *Bacillus cereus* B-4368 від концентрації клітин у середовищі. Середовище: 5мМ трис-HCl, pH 7,8.

ного придушення росту та інактивації клітин при підвищенні цього співвідношення до 0,7-1,0. На підставі отриманих даних було вибрано діапазон співвідношень золота та клітин, при яких проводилися подальші експерименти. Ці співвідношення відповідали умові збереження клітинами життєдатності при частковому зниженні інтенсивності їх росту, що свідчило про наявність взаємодії клітин із золотом. При цьому помічено, що за певних умов у дослідних пробах а'являється золото у колоїдному стані. Співвідносяючи наші результати з даними, одержаними раніше (Овчаренко та інш., 1985), можна відзначити, що ще одною важливою особливістю поведіння клітини у якості сорбенту є її здатність переводити акумульовані йони металів у колоїдний стан з подальшим виділенням високодисперсних частинок металів або їх сполук на поверхні. Таким чином формуються біокосні агрегати, наслідком чого є більш високі показники сорбційної ємності біосорбентів. Як показали наші дослідження, утворення дисперсної фази не завжди іде за участю інтакних клітин. Відновлення золота до елементного стану з подальшим утворенням частинок колоїдного золота відбувається після внесення Au(III) у суспензію термоінактивованих клітин (клітини після термоінактивування залишались у тому ж середовищі). При цьому інтенсивність колоїдоутворення була вище, ніж у присутності інтакних клітин.

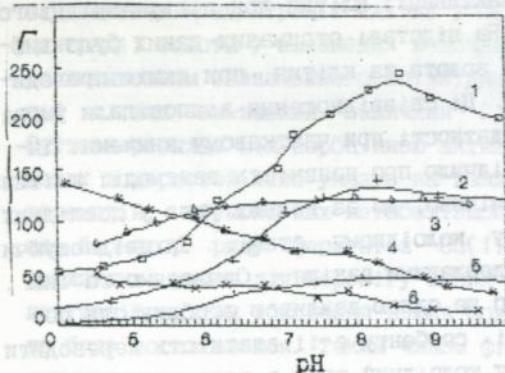
На підставі аналогічних експериментів були вибрані умови проведення подальших досліджень сорбції Cu(II) клітинами хлорели.

Наявність двох компонент сорбційного процесу - пасивного

фізико-хімічного зв'язування та метаболізм-залежного накопичення - визначила два напрямки дослідження механізмів концентрування металів металофільними мікроорганізмами.

Наявність на клітинній поверхні груп, що мають заряд, визначає характер її взаємодії з йонами. Роль йон-електростатичних взаємодій у біосорбційному процесі ми вивчали, використовуючи ряд підходів, спрямованих на зміну знаку та величини поверхневого заряду клітин.

Для зміни ступеню дисоціації функціональних поверхневих груп була використана зміна рН навколишнього середовища. При цьому одержані нестандартні результати. Залежність сорбції Au(III) від рН для інтактних та інактивованих клітин хлорели виявилась прямо протилежною (мал. 4). Оскільки з підвищен-



Мал. 4. рН-залежність величини сорбції (Г) Au(III) (1,3,4,6) та Cu(II) (2,5) клітинами *Chlorella vulgaris* Beijer. YA-1-1 (1,2,4,5) та *Bacillus cereus* B-4358 (3,6): 1-3 - інтактні клітини; 4-6 - інактивовані клітини. Концентрація клітин: 20 (1,2,4), 36 (5) та 40 мг/мл (3,6). Середовище: 0,4 (1,2,4,5), 5 мМ три-НСl, рН 7,8 (3,6).

ням рН середовища поверхня клітини несе усе більш негативний заряд, а Au(III) в умовах експерименту знаходиться у середовищі переважно у вигляді аніонних комплексів (Бусев, Іванов, 1973, Нечаєв, Звонарьов, 1983), можна очікувати зниження величини сорбції із збільшенням рН середовища. Такий результат і був отриман для інактивованих клітин. Для інтактних клітин максимальна величина зв'язування золота відповідає діапазону значень рН 8-9, а потім сорбція падає як при зниженні, так і при підвищенні рН. Залежність сорбції Cu(II) клітинами від рН для інтакт-

них клітин була аналогічною залежності для інактивованих клітин. Збільшення величини сорбції з ростом рН відповідає тому, що мідь знаходиться у розчині в основному у формі катіону. Однак і в цьому випадку інтактні клітини сорбують метал значно інтенсивніше.

Ці результати дозволяють припустити, що електростатичні взаємодії йонів металів з хімічними групами клітинної поверхні не є основними при сорбції золота та міді інтактними клітинами. В той же час такі взаємодії досить виражені, про що свідчать результати експериментів по сорбції цих металів клітинами з модифікованою поверхнею (таблиця 1). У ході модифікації клітини інкубували у середовищах з поверхнево-активними речовинами, що змінюють заряд клітинної поверхні, після чого проводилося відмивання клітин. Таким чином, зміна величини заряду поверхні клітини досягалася при постійному значенні рН середовища, у якому відбувалася взаємодія клітин з металами.

Як інтактні, так і інактивовані клітини, модифіковані аніонним детергентом додецилсульфатом натрію, сорбували меншу кількість $Au(III)$, ніж немодифіковані клітини. Модифікування клітин катіонним детергентом цетавлоном приводило до зворотнього ефекту. Обробка клітин неіоногенним детергентом тритоном X-100 не змінювала величину сорбції для інактивованих клітин, а для інтактних клітин приводила до її зменшення. Незарядженні молекули тритону X-100 не здатні до прямого впливу на заряд клітинної поверхні. Однак, треба враховувати, що детергенти здатні збільшувати проникність клітинних мембран, що призводить до порушення ходу метаболічних процесів (Helenius, Simons, 1978).

Реакції на $Cu(II)$ клітин, поверхня яких модифікована ПАРами, цілком передбачені: додецилсульфат стимулює зв'язування $Cu(II)$, а цетавлон йому перешкоджає.

Таким чином, можна зробити висновок про те, що електростатичні взаємодії хімічних груп клітинної поверхні з йонами $Au(III)$ та $Cu(II)$ є однією із складових, відповідальних за сорбцію цих йонів інтактними клітинами. При цьому вирішальну роль, напевне, грають взаємодії, обумовлені клітинним метаболізмом.

Аналіз даних з рН-залежності дозволив звернути увагу на одну важливу обставину. Максимум сорбції $Au(III)$ інтактними клі-

Вплив ПАР на сорбцію Au(III) та Cu(II) клітинами
Chlorella vulgaris Beijer. UA-1-1.

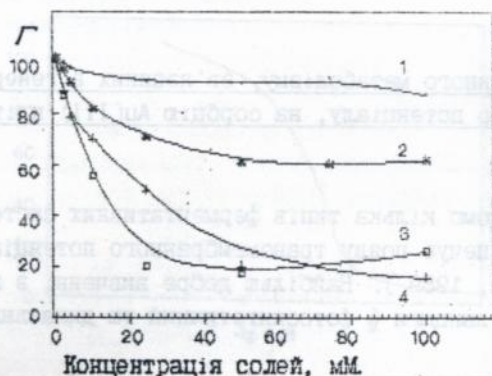
Реагент	Концентрація ПАР, %	Величина сорбції, мг металу/ г клітин					
		Інтактні клітини			Інактивовані клітини		
		Тритон X-100	Додецил- сульфат- натрію	Цета- влон	Тритон X-100	Додецил- сульфат натрію	Цета- влон
Тетрахло- роаурат, 30мкМ	-	56	56	56	17	17	17
	10^{-2}	35	8	77	17	9	35
Хлорид міді, 100мкМ	-	96	96	96	17	17	17
	10^{-4}	90	106	82	24	29	17
	10^{-3}	89	117	58	23	48	19
	10^{-2}	88	121	53	26	56	16

тинами знаходиться у тому інтервалі рН, де клітини хлорели мають максимальне значення трансмембранного потенціалу (ТП) на плазматичній мембрані (Комп'юг, Таппер, 1976). Аналогічно цьому, ефективність клітин *Bacillus cereus* у процесах концентрування Au(III) зростає у лужній області (мал.4), де спостерігається і максимальна величина ТП при рН 8-9 (Грінкс, 1986).

Поява ТП пов'язана з роботою електрогенних клітинних ферментів-насосів, а визволення енергії, необхідної для переносу кати-

онів у позаклітинний розчин, відбувається внаслідок окисно-відновних реакцій (при диханні, фотосинтезі), або при гідролізі макроергічних сполук (наприклад, аденозинтрифосфату - АТФ) (Mitchel, 1966). Формування ТП призводить до зміни електроповерхневих властивостей клітин (Dukhin et al., 1991), що може суттєво вплинути на їх взаємодію з йонами металів. Отже, можна припустити, що сорбція Au(III) інтактними клітинами хлорели залежить від наявності та величини ТП на плазматичній мембрані. З цим узгоджується зниження сорбції внаслідок модифікування клітин неіоногенним детергентом тритоном X-100, оскільки він збільшує проникність плазматичної мембрани, що має призводити до зменшення трансмембранного потенціалу.

На користь цього припущення свідчили і результати досліджень впливу на сорбцію йонної сили розчину. Йонна сила при цьому створювалася двома способами: внесенням у середовище NaCl або KCl. Вплив йонів Na^+ та K^+ виявився різним (мал. 5): при однакових



Мал. 5. Вплив йонної сили середовища на величину сорбції Au(III) клітинами *Chlorella vulgaris* Beijer. УА-1-1: 1 - NaCl, 2 - KCl, 3 - NaF, 4 - KF. Концентрація клітин 56 мкг/мл. Середовище: О4.

концентраціях йонів у середовищі величина сорбції зменшувалася значно сильніше в присутності K^+ . Але саме K^+ , а не Na^+ , є потенціалформуючим йоном для хлорели (Trombala, 1980) і збільшення його концентрації у середовищі повинно приводити до значно більш вираженого зменшення ТП.

Різницю у впливі на процес сорбції золота(III) клітинами хлорели було виявлено і для аніонів. Йони F^- значно сильніше зменшували величину сорбції, ніж йони Cl^- (мал. 5, криві 3, 4).

Але якщо за дією на подвійний електричний шар Cl^- та F^- близькі, то за впливом на клітинний метаболізм вони різко відрізняються: Cl^- є необхідним і найбільш розповсюдженим аніоном клітинного (та позаклітинного) середовища, у той час як фториди - сильні біологічні отрути. Аніони фтора інгібують різні біологічні процеси, у тому числі і пов'язані з генерацією ТП.

Таким чином, результати фізико-хімічної модифікації клітинної поверхні та умов середовища дозволяють припустити, що крім пасивної сорбції відбувається концентрування металів за механізмом, залежним від енергетичного метаболізму живої клітини. Результати дослідів, що непрямо свідчать про залежність процесу концентрування золота від наявності ТП на плазматичних мембранах клітин, послужили основою для більш детального дослідження цієї залежності. Оскільки пряма експериментальна перевірка такої залежності неможлива, ми вибрали шлях інгібіторного аналізу, який дозволяє вибірково блокувати конкретну метаболічну реакцію та реєструвати поведінку мікроорганізмів по відношенню до металу.

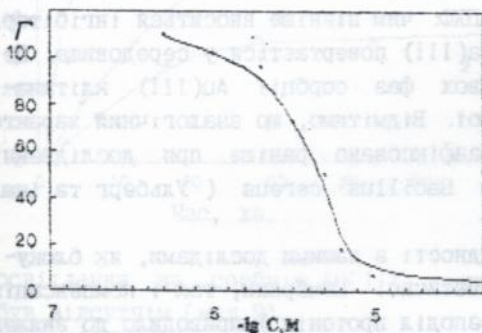
Вплив процесів клітинного метаболізму, зв'язаних з генерацією трансмембранного потенціалу, на сорбцію $Au(III)$ клітинами хлорели

У теперішній час відомо кілька типів ферментативних систем, функціонування яких забезпечує появу трансмембранного потенціалу (Грінус, 1986, Скулачов, 1989). Найбільш добре вивчені з них - окислювально-відновлюючі ланцюги (фотосинтетичний та дихальний) та мембранна АТФаза.

У залежності від умов АТФаза каталізує гідроліз або синтез одної з найбільш універсальних макроергічних сполук клітини - аденозинтрифосфату. АТФаза, що міститься у клітинній мембрані, пов'язує гідроліз АТФ з переносом йонів крізь мембрану, поділяя таким чином продукти реакції у просторі. Перенос йонів є електрогенним, тобто здійснюється проти градієнту електрохімічного потенціалу. В результаті за наявності достатньої кількості енергетичних ресурсів (АТФ) на мембрані з'являється різниця потенціалів біля 0,2 В, яка постійно підтримується. Порушити цей стан

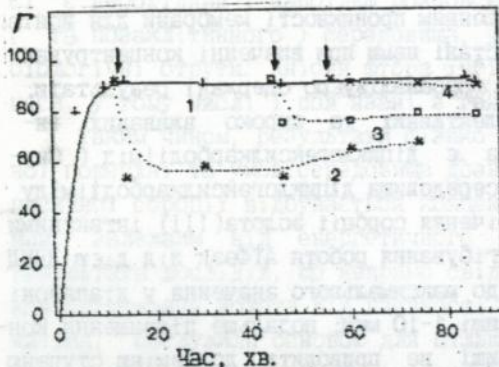
можливо трьома способами: інгібуванням роботи АТФази, блокуванням надходження АТФ та порушенням проникності мембрани для йонів. Саме ці способи були використані нами при вивченні концентрування золота клітинами хлорели. Проаналізуємо одержані результати.

Одним з найбільш селективних та широко вживаних інгібіторів мембранних АТФаз є діциклогексилкарбодіімід (Скулачов, 1989). Внесення до середовища діциклогексилкарбодіімиду (ДЦКД) приводило до пригнічення сорбції золота(III) інтактними клітинами хлорели. Ефект інгібування роботи АТФази під дією ДЦКД з'являється та посилюється до максимального значення у діапазоні концентрацій ДЦКД у середовищі 1-10 мкМ; подальше підвищення концентрації ДЦКД у середовищі не приводить до зміни ступеню вираження ефекту (Salioz, 1984, Beavis, Garlid, 1988). Саме у цьому концентраційному діапазоні спостерігався вплив ДЦКД на сорбцію (мал. 6).



Мал. 6. Залежність величини сорбції Au(III) клітинами *Chlorella vulgaris*-Beijer. UA-1-1 від концентрації діциклогексилкарбодіімиду у середовищі. Концентрація клітин 48 мг/мл. Середовище: 04.

До зменшення величини сорбції приводило також внесення у середовище пентахлорфенолу - протоннофорного роз'єднувача окислювального фосфорилування (мал. 7). Протоннофори підвищують проникність мембрани для протонів та деяких інших катіонів, що приводить до зменшення ТП (Ліберман, Топали, 1968, Маркін та інш., 1969). Інгібування сорбції спостерігалось при тій концентрації протоннофору, при якій він проявляє здатність суттєво впливати на проникність клітинних мембран (Яжунський та інш., 1973). У цих дослідях виявлено ще одну суттєву обставину: якщо



Мал. 7. Кінетика сорбції/десорбції Au(III) клітинами *Chlorella vulgaris* Beijer. А-10. Криві одержані на паралельних комірках. Концентрація клітин 60 мкг/мл. ↓ - внесення пентахлорфенолу у середовище до кінцевої концентрації 1 мМ. Середовище: 10 мМ трис-НС1, рН 7,6.

через деякий час після початку взаємодії клітин з золотом ввести у середовище пентахлорфенол (ПХФ), то спостерігається десорбція золота (мал. 7). При цьому ступінь вираження цього ефекту залежить від часу внесення ПХФ: чим пізніше вноситься інгібітор, тим менша кількість золота(III) повертається у середовище. Це свідчить про наявність двох фаз сорбції Au(III) клітинами - оборотної та необоротної. Відмітимо, що аналогічний характер впливу інгібіторів було зафіксовано раніше при дослідженні сорбції Au(III) клітинами *Bacillus cereus* (Ульберг та інш., 1990).

Таким чином, у відповідності з нашими дослідженнями, як блокування роботи АТФази плазматичної мембрани, так і компенсація наслідку її роботи (перерозподіл протонів) приводило до зниження величини сорбції. Це дозволяє припустити, що функціонування АТФази плазматичної мембрани є необхідною умовою прояву ітактичними клітинами хлорели підвищеної сорбційної активності по відношенню до золота(III) у порівнянні з інактивованими клітинами. Перевірка цього припущення проводилася у ході дослідження взаємозв'язку роботи АТФази плазматичної мембрани та сорбції золота(III) ітактичними клітинами хлорели.

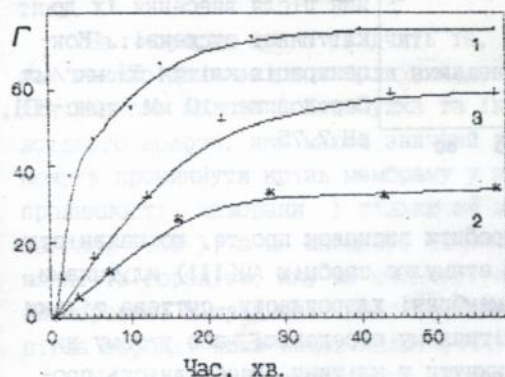
Функціонування АТФази, пов'язане з гідролізом АТФ, можливе за наявності останнього. АТФ може надходити у клітину зовні або синтезуватися усередині клітини.

Вище вже приводилися дані про пригнічення здатності клітин хлорели зв'язувати Au(III) у присутності фторидів (мал. 5). Але

Йони фтору інгібують процеси гліколізу, одним з продуктів якого є АТФ (Ленінджер, 1976).

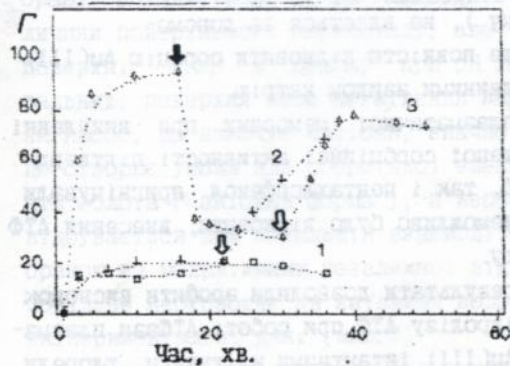
Одню з внутрішньоклітинних систем синтезу АТФ є АТФазин (АТФ-синтази), розміщені у мембранах хлоропластів. Необхідна для перебігу синтезу енергія створюється у результаті роботи електронтранспортних ланцюгів, що знаходяться там же. Функціонування електронтранспортних ланцюгів здійснюється за рахунок енергії фотосинтетичних реакцій, тобто при освітленні клітин.

Сорбція Au(III) інтактними клітинами хлорели виявилась залежною від освітлення, причому ефект затемнення частково компенсувався внесенням у середовище АТФ (мал. 8). У той же час вплив



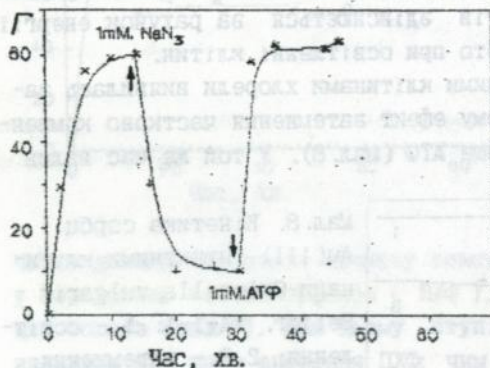
Мал. 8. Кінетика сорбції Au(III) інтактними клітинами *Chlorella vulgaris* Beijer. UA-1-1: 1 - освітлення; 2, 3 - затемнення; 3 - додано АТФ до кінцевої концентрації 1 мМ. Концентрація клітин 72 мг/мл. Середовище: С4.

освітлення на сорбцію Au(III) інактивованими клітинами хлорели був відсутнім (мал. 9).



Мал. 9. Вплив освітлення на сорбцію Au(III) клітинами *Chlorella vulgaris* Beijer. А-10: 1 - інактивовані клітини; 2, 3 - інтактні клітини; ↓ - затемнення; ⬆ - освітлення. Концентрація клітин 70 (1, 2) та 60 (3) мкг/мл. Середовище: 10 мМ трис-НСІ, рН 7,6.

Інгібітор електронтранспортних ланцюгів азид натрію (Miki et al., 1969, Гельман и др., 1972) чинив на сорбцію вплив, подібний до затемнення, причому і у цьому випадку внесення АТФ приводило до підвищення величини сорбції (мал.10).



Мал.10. Інгібування та активація сорбції Au(III) інтактними клітинами *Chlorella vulgaris* Beijer. A-10. Указані концентрації речовин після внесення їх до клітинної суспензії. Концентрація клітин 65 мкг/мл. Середовище: 10 мМ трис-НСІ, рН 7,75.

Таким чином, можна зробити висновок про те, що наявність АТФ у клітині є фактором, що стимулює сорбцію Au(III) клітинами, а роль АТФази, розміщеної у мембрані хлоропласту, суттєва тільки при відсутності АТФ у позаклітинному середовищі або у тому випадку, коли АТФ не може проникнути у клітину. Необхідність проникнення АТФ у клітину для стимулювання сорбції Au(III) підтверджується такими даними: у присутності карбоксиматрикулату, який інгібує мембранний транслокатор нуклеотидфосфатів (відповідальний за проникнення АТФ у клітину), не вдається за допомогою внесення АТФ у середовище повністю відновити сорбцію Au(III) клітинами, попередньо обробленими азидом натрію.

Оскільки роль АТФази плазматичної мембрани при визваленні інтактними клітинами підданої сорбції: активності підтверджують такі факти: як ДЦД, так і пентахлорфеніл пригнічували сорбцію таким чином, що її неможливо було відновити; внесення АТФ у середовище не давало ефекту.

Таким чином, отримані результати дозволили зробити висновок про зв'язок між процесами гідролізу АТФ при роботі АТФази плазматичної мембрани та сорбції Au(III) інтактними клітинами хлорели.

Мається на увазі сорбція, залежна від клітинного метаболізму, наявність якої приводить до значного перевищення величини сорбції для інтактних клітин у порівнянні з інактивованими.

Гідроліз АТФ пов'язаний з переносом йонів крізь мембрану проти електрохімічного градієнту. Як правило, транспортуються "фізіологічні" катіони - натрію, кальцію, калію, магнію. Золото належить до елементів, участь яких у біохімічних процесах не зафіксовано. Проте в екстремальних умовах існує можливість переносу йонів, що не належать до фізіологічних. У той же час експериментальні дані, які ми маємо, дозволяють припустити, що у процесі сорбції не відбувається проникнення йонів Au(III) у клітину.

На користь цього свідчить те, що в аналогічних експериментах з колоїдним золотом були виявлені ті ж закономірності, що і для йонного золота (Карамушка та інш., 1989). Але частинки колоїдного золота, які мають значний розмір (близько 20-ти нм.), можуть проникнути крізь мембрану у цитоплазму (без порушення проникності мембрани) тільки за механізмом піноцитозу (Кауе, Parras, 1962), а це набагато більш повільний процес у порівнянні із сорбцією, яку ми спостерігаємо. Крім цього, за допомогою електронної мікроскопії нами не виявлено золота усередині клітин після сорбції ними йонів золота(III).

На підставі приведених вище даних процес сорбції Au(III) інтактними клітинами можна уявити таким чином. У результаті функціонування АТФази плазматичної мембрани на мембрані з'являється ТП, що приводить не тільки до зміни величини поверхневого потенціалу, але і до перерозподілу його по поверхні: якщо в цілому при рН середовища, близьких до нейтральних, поверхня несе негативний заряд, то АТФаза, яка працює як насос, що викачує катіони, значно модифікує ділянки поверхні. Це створює умови для оборотної електростатичної локалізації йонів золота (аніонна форма), а необоротне зв'язування металу відбувається при подальшій взаємодії з клітинною стінкою або мембраною за механізмами незалежної від метаболізму сорбції. Про повільне необоротне зв'язування золота свідчать наведені раніше експериментальні дані (мал. 7).

Механізм зв'язування ферментативних процесів, що приводять

до генерації ТП на плазматичній мембрані, та локалізації йонів Au(III) на поверхні мембрани, потребує подальшого дослідження. Проте одержаних даних достатньо для того, щоб запропонувати способи управління процесом вилучення йонів Au(III) із розчинів за допомогою інтактних клітин хлорели.

Управління сорбцією йонного золота(III) інтактними клітинами хлорели

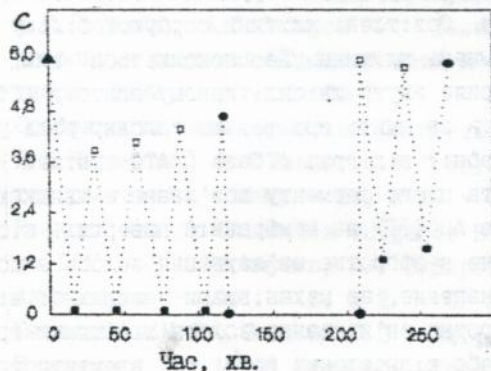
Одержані експериментальні дані дозволяють нам говорити про дві групи факторів, що впливають на сорбційний процес - фізичних та хімічних. Залежність реакції клітин хлорели на золото від освітлення (мал. 8) можна використати для управління процесом концентрування металу. При порівнянні кривих 2 та 3 (мал. 9), ми ще раз переконуємося, що при освітленні відбувається інтенсивне вилучення Au(III) із розчину, тоді як у темряві рівень акумуляції майже у чотири рази нижчий, ніж для освітлених клітин. У темряві інтактні клітини хлорели (мал. 9, крива 2) акумулюють золото приблизно з такою ж ефективністю, як і термоінактивовані клітини. Для останніх світло вже не грає ролі (мал. 9, крива 1), але якщо освітити розчин, який містить інтактні клітини та йони Au(III), то починається інтенсивна сорбція золота клітинами. У той же час якщо клітини помістити у темряву, вони не тільки втрачають здатність зв'язувати метал, але й повертають у середовище частину раніше зв'язаного, тоді як повторне освітлення клітин знову стимулює їх до акумуляції.

Світло можна віднести до фізичних факторів. Окрім цього має сенс виділити групу хімічних факторів, до яких ми відносимо речовини, здатні стимулювати або пригнічувати процес акумуляції металу. Про такі речовини мова йшла вище: всі вони є модифікаторами метаболічних процесів. При цьому речовини, що порушують проникність плазматичної мембрани, блокують синтез АТФ або пригнічують роботу генераторів ТП є інгібіторами взаємодії мікробних клітин з Au(III). Із активаторів для водоростей поки що відомо тільки АТФ, до того ж і він є стимулятором лише за певних умов.

Вище відзначалося, що АТФ може компенсувати вплив азиду.

Завдяки цьому комбінації додавань розчинів азиду та АТФ у суспензію клітин хлорели з Au(III) дозволили одержати картину, що відповідає процесу сорбції/десорбції (мал.10): золото(III) сорбувалося біомасою водоростей, додавання азиду приводило до десорбції, а внесення АТФ відновлювало сорбцію. На відміну від азиду натрію інгібуюча дія ДЦКД не може бути компенсована, тому використання його у якості агенту, що елює золото, не відповідає цілі. Очевидно, що для того, щоби повністю вилучити золото із середовища, а потім повністю десорбувати його, необхідно вибрати час додавання модифікатора: за невеликий час контакту метал буде сконцентровано не повністю, а за значний час метал буде зв'язано необоротно.

Якщо підтримувати ці умови та модифікувати саму процедуру (поперемінне витримування активних клітин у розчинах тетрахлоораурату, з АТФ та азидом натрію, відділення від середовища за допомогою короткочасового центрифугування), цикли сорбції/десорбції можна повторювати багаторазово, причому після періоду спокою у середовищі росту клітини зберігають здатність як сорбувати, так і десорбувати Au(III) (мал.11). Наведені дані ілюструють принципову можливість багаторазового використання живих клітин у якості біосорбенту для золота.



Мал. 11. Сорбція/десорбція Au(III) інтактними клітинами *Chlorella vulgaris* Beijer. А-10. Клітини вносили у середовище, яке містило: ▲ - HAUCl₄ (0,03ММ); ■ - NaN₃ (1ММ); □ - HAUCl₄ (0,03ММ), АТФ (1ММ); ● - без додавань (припинення експерименту). Концентрація клітин 290 мкг/мл. Середовище: 04. С - концентрація Au(III) у середовищі, мкг/мл.

В И С Н О В К И

1. У результаті проведених досліджень вивчені основні колоїдно-хімічні та біохімічні закономірності сорбції Au(III) та Cu(II) металофільними штамами мікроводоростей (*Chlorella vulgaris*, штами УА-1-1 і А-10) та бактерій (*Bacillus cereus* В-4368). Визначені основні кінетичні та концентраційні залежності.

2. Виявлено, що процес сорбції Au(III) та Cu(II) металофільними штамами складається із двох компонент: пасивної фізико-хімічної сорбції та активної метаболізм-залежної акумуляції. Внесок останньої значно вище, внаслідок чого живі активні клітини концентрують значно більше металу, ніж клітини, інактивовані високою температурою або інгібіторами метаболізму.

3. Визначено, що інтактні клітини металофільних штамів водоростей втрачають здатність концентрувати Au(III) у присутності інгібіторів метаболізму трьох напрямків дії: тих, що порушують проникність мембран (пентахлорфенол та інш.), тих, що інгібують роботу мембранного ферменту АТФази (діциклогексилкарбодіімід та інш.) та тих, що блокують надходження АТФ у клітину чи синтез його усередині клітини (карбокситрактинат, азид та інш.).

4. Виявлена залежність процесу концентрування золота(III) мікроводоростями від світла. Освітлені клітини сорбують більшу кількість Au(III), ніж затемнені клітини. Це пояснюється тим, що світло є фактором, що сприяє внутрішньоклітинному синтезу АТФ.

5. Інгібіторний аналіз свідчить про те, що головну роль у залежній від метаболізму сорбції відіграє АТФаза (АТФ-синтаза) плазматичної мембрани. Робота цього ферменту пов'язана з швидкою оборотною локалізацією іонів Au(III) на мембранній поверхні, після чого відбувається повільне необоротне зв'язування золота з поверхнею мембрани, яке іде, напевне, за механізмами незалежної від метаболізму сорбції (необоротне зв'язування золота хімічними групами клітинної поверхні та/або відновлення його до елементного стану). Внесення інгібіторів у суспензію клітин з Au(III) під час фази оборотного зв'язування призводить до десорбції Au(III),

який раніше був зв'язаний клітинами.

6. На підставі визначених закономірностей впливу світла та метаболічних інгібіторів/активаторів на водорості запропоновано засіб керування сорбцією Au(III), який дозволяє реалізувати декілька циклів сорбції/десорбції.

Основні результати дисертації
опубліковано у таких роботах:

1. О внешней функции трансмембранного потенциала в гетерогенной модели клеточной оболочки / В.И. Карамушка, А.С. Духин, Т.Г. Грузина, А.Г. Скляр, З.Р. Ульберг // В сб.: Физико-химическая механика и липофильность дисперсных систем. - 1989. - Вып. 20. - С. 60-66.
2. Скляр А. Г., Карамушка В. И. Влияние тетрахлоораурата на рост *Chlorella pyrenoidosa* // Тезисы IV Республиканской научно-теоретической конференции молодых ученых и специалистов-микробиологов "Биология культивирования и биотехнология микроорганизмов" (Ташкент, 24-26 мая, 1989 г.). - С. 60.
3. Механизм энергезависимого накопления тяжелых металлов зелеными микроводорослями / В.И. Карамушка, З.Р. Ульберг, С. Буриев, Т.Г. Грузина, А.Г. Скляр // Тезисы докладов VIII Конференции по спорным растениям Средней Азии и Казахстана (Ташкент, 4-6 сентября, 1989 г.). - С. 59.
4. Особенности взаимодействия *Chlorella vulgaris* с тетрахлоорауратом / В.И. Карамушка, З.Р. Ульберг, Т.Г. Грузина, А.Г. Скляр // Физиология растений. - 1990. - 37, N 2. - С. 342-347.
5. Реакции клеток *Chlorella vulgaris* Beijer. на медь(II) и золото(III) / В.И. Карамушка, А.Г. Скляр, Т.Г. Грузина, З.Р. Ульберг // Альгология. - 1991. - 1, N 2. - С. 27-31.
6. Karamushka V. I., Gruzina T. G., Skljarov A. G. Algal Biomass as a Biosorbent for Metal Recovery from Industrial Solutions. In: Proceedings of the 4th Symposium on Mining Chemistry. MinChem'92 (Kiev, October 6-9, 1992). P. 365-368.

455315

AB 31.554