

УДК 553.72 (575.3)

Е.С. Казак¹, Е.Г. Лебедева², Н.А. Харитонов³, Г.А. Челноков⁴, Е.В. Еловский⁵**ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ И ИТТРИЯ В ВОДНЫХ СРЕДАХ: РОЛЬ ОРГАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ***ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,**119991, Москва, ГСП-1, Ленинские Горы, 1**ФГБУН Дальневосточный геологический институт Дальневосточного отделения РАН, 690022, Владивосток, пр-т 100-летия Владивостока, 159**ФГБУН Геологический институт РАН, 119017, Москва, Пыжевский пер, 7, стр. 1**Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, GSP-1, Leninskiye Gory, 1**Far East Geological Institute (FEGI FEB RAS), 690022, Vladivostok, Prospekt 100-letiya, 159**GIN RAS, 119017, Moscow, Pyzhevsky lane 7, bld. 1*

Представлены результаты экспериментального изучения фракционирования редкоземельных элементов (РЗЭ) и иттрия (вместе REY) в природных водах в присутствии живых и инактивированных органотрофных бактерий (*Curtobacterium* sp., *Ralstonia* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Microbacterium* sp.) при их различной концентрации и в разных условиях кислотности водной среды. Показано, что процесс фракционирования регулируется преимущественно двумя факторами: pH водного раствора и видом бактерий. Установлено значительное влияние кислотности воды на сорбционную емкость бактерий — для всех изученных штаммов выявлено снижение сорбции REY при увеличении pH, что обусловлено более низким поглощением REY на клеточных стенках бактерий. Отмечено, что процесс фракционирования (биосорбции) REY живыми бактериями протекает интенсивнее, чем в присутствии инактивированной биомассы микроорганизмов. При нейтральных значениях pH все изученные штаммы бактерий больше сорбируют легкие REY (лантан, празеодим, неодим), в более кислых растворах (pH 2) наблюдается увеличение значений K_d для тяжелых REY (лютеций, европий). Показано, влияние концентрации биомассы бактерий на процесс биосорбции REY. Сорбция REY снижается при увеличении концентрации как живых, так и инактивированных клеток бактерий.

Ключевые слова: редкоземельные элементы (РЗЭ), биосорбция, гетеротрофные бактерии, коэффициент сорбции, подземные воды, pH.

The paper presents the experimental results of the rare earth elements and yttrium (REY) biosorption in the natural surface waters and groundwater in the presence of living and inactivated organotrophic bacteria (*Curtobacterium* sp., *Ralstonia* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Microbacterium* sp.) under different environmental pH conditions. We find that the biosorption process is mainly regulated by two factors: the aqueous solution's pH and the bacteria strains concertation. The water acidity significantly effects on the bacteria sorption capacity for all studied strains. We discover a decrease in REY sorption with an increase in pH due to lower absorption of REY on the cell walls of bacteria. The process of REY biosorption proceeds more intensively by living bacteria than in the presence of inactivated microorganisms. We observe that at neutral pH values all studied bacterial strains sorb light REY (lanthanum, praseodymium, neodymium), in more acidic solutions (pH 2) the heavy ones (lutetium, europium). The REY sorption decreased with an increase in the living and inactivated bacterial concentration.

Key words: rare earth elements (REE), biosorption, rare earth elements yttrium (REY), geterotrophic bacteria, sorption coefficient, groundwater, pH.

Введение. Во всем мире вот уже более 15 лет активно используют группу редкоземельных элементов (РЗЭ) и иттрий (вместе REY) в качестве маркеров для выявления областей питания подземных вод, для реконструкции процессов взаимодействия вода–порода, при определении

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, геологический факультет, кафедра гидрогеологии, ст. науч. с., канд. геол.-минер. н.; *e-mail:* Kanigu@mail.ru

² Дальневосточный геологический институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, лаборатория геохимии гипергенных процессов, ст. науч. с., канд. геол.-минер. н.; *e-mail:* microbiol@mail.ru

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, геологический факультет кафедра гидрогеологии, Дальневосточный геологический институт Дальневосточного отделения РАН, докт. геол.-минер. н., профессор, гл. науч. с.; *e-mail:* tchenat@mail.ru

⁴ ГИН РАН, лаборатория тепломассопереноса, вед. науч. с., канд. геол.-минер. н.; *e-mail:* geowater@mail.ru

⁵ Дальневосточный геологический институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, лаборатория аналитической химии, мл. науч. с.; *e-mail:* matri@list.ru

пропорций смешения вод различного химического типа и т.д.

На процесс фракционирования РЗЭ во время водной миграции влияют рН и Eh воды, ее химический и газовый состав, температура раствора, а также присутствие взвесей (коллоидов) и микроорганизмов. Многие микроорганизмы, преимущественно бактерии, обладают способностью аккумулировать REY, что приводит к изменению содержания этих элементов в процессе их транспортировки водными потоками [Takahashi et al., 2005, 2007; Казак и др., 2018].

Обладая небольшими размерами, бактерии имеют очень высокую площадь поверхности на единицу массы и практически все эффективно адсорбируют растворенные ионы металлов из водных растворов посредством реализации различных механизмов (ионный обмен, комплексообразование, окислительно-восстановительные процессы и формирование нерастворимых соединений с ковалентными связями) [Beveridge, Doyle, 1989; Salton, Kim, 1994; Бузалева и др., 2006]. Не являются исключением редкоземельные элементы, на распределение которых в природных водах влияет не только их адсорбция на неорганических и органических веществах, образование растворимых комплексов с различными лигандами, но и биосорбция микроорганизмами [Балашов, 1976]. К сожалению, до сих пор, мало данных об адсорбции всех элементов группы (от La до Lu) на чистых культурах бактерий и, следовательно, нет четкого понимания потенциальной роли бактерий в процессах фракционирования REY. В ряде работ [Ferris, Beveridge, 1984; Markai et al., 2003; Merroun et al., 2003; Mullen et al., 1989; Ozaki et al., 2002; Texier et al., 2000; Корневский и др., 1997] изучалась сорбция отдельных редкоземельных элементов (Sc, Sm, Y, Eu, La, Yb, Cm) на различных видах бактерий. В работе [Brantley et al., 2001] отмечена способность почвенной бактерии *Arthrobacter* sp. поглощать все REE, однако в силу низкой растворенной концентрации REE рассмотреть их распределение между бактериальной и водной фазами не удалось.

Первые результаты исследования адсорбции всех элементов группы REY на 5 видах бактерий (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Alcaligenes faecali*, *Shewanella putrefaciens*, и *Pseudomonas fluorescens*) представлены в работах [Takahashi et al., 2005, 2007]. В ранней работе авторов [Казак и др., 2018] впервые были представлены результаты экспериментального исследования влияния гетеротрофных бактерий, широко распространенных в природных и техногенных водах Дальнего Востока, на фракционирование REY в условиях кислой среды (рН 2–4).

Цель нашей работы — продолжение экспериментального изучения биосорбции REY в природных водах чистыми культурами живых и

инактивированных органотрофных бактерий при разной концентрации биомассы и разной кислотности воды (рН 2, 4 и 7).

Материалы и методы исследований. Для изучения биосорбции REY из различных природных и техногенных вод Дальневосточного региона выделено 6 штаммов органотрофных бактерий, проявляющих устойчивость к REY. Выделенные чистые культуры микроорганизмов формировали круглые, выпуклые колонии желтого (*Microbacterium* sp., *Brevibacterium* sp.), розового (*Curtobacterium* sp.), молочного (*Bacillus* sp.) и бежевого цвета (*Pseudomonas* sp., *Ralstonia* sp.) и были представлены грамположительными и грамотрицательными палочками разной длины (0,40–5,14 мкм) (табл. 1, рис. 1). Морфологию и подвижность бактерий определяли на оптическом микроскопе «Axio Lab. A1» («Carl Zeiss»).

Дифференцирование бактерий по биохимическим свойствам их клеточной стенки проводили с помощью метода Грама [Руководство..., 1995]. Бактерии выращивали на питательной среде YK, указанной ранее в [Казак и др., 2018]. Предварительно чистые культуры бактерий засеивали в чашки Петри с питательной средой и инкубировали при 30 °С в течение 24 час. Затем бактериальные суспензии в количестве 0,1 мл вносили в предварительно стерилизованные колбы с питательной средой объемом 500 мл (засеивали две колбы одной бактерией) и культивировали в термостате при 25 °С (48 час), с целью накопления максимальной биомассы. По прошествии этого времени культивирования биомассу бактерий в первой колбе подвергали автоклавированию (15 мин, при 121 °С) с целью их инактивации, затем охлаждали. Бактерии из первой и второй колбы отделяли от питательной среды центрифугированием при 3000 об/мин в течение 15 мин, супернатант сливали и осадок промывали 5 раз раствором 1,0 мМ NaCl. Затем определяли сухой вес бактерий с помощью дегидратации суспензии (5 мл) в сушильном шкафу при 50 °С.

Сорбционные эксперименты проводили в полипропиленовых колбах объемом 50 мл. В колбы наливали 0,01 М раствор NaCl, куда вводили раствор REY, концентрация которого составляла 10 ppb (или 1 мкг/л). В стандартный раствор REY были добавлены бактериальные суспензии с различной концентрацией (0,005, 0,02 и 0,1 г/л) разных культур микроорганизмов (табл. 1). Исследовали сорбцию REY живыми и инактивированными культурами бактерий при разных условиях кислотности растворов (рН 2, 4, 7) и разном времени взаимодействия бактерий с REY (5 мин, 120 мин и 1 сут). После внесения биомассы образцы осторожно встряхивали на качалке при режиме 100 об/мин и через 5 мин, 120 мин и 1 сут, водную фазу отделяли от бактерий путем фильтрации с использованием стерильных мембранных

Исходные данные эксперимента

№ п/п	Тип бактерий	Источник микроорганизмов	Род, вид выделенных бактерий	Начальная концентрация бактерий, г/л		
				pH 2	pH 4	pH 7
1		горячие источники влк. Мутновский, Камчатка	Curtobacterium sp.	0,005	0,005	0,005
				0,02	0,02	0,02
				0,1	0,1	0,1
2	Грамотрицательные гетеротрофные бактерии	нейтральные воды хвостохранилищ Краснореченской обогатительной фабрики, Приморский край	Pseudomonas sp.	0,005	0,005	0,005
				0,02	0,02	0,02
				0,1	0,1	0,1
3		термальные воды Горячий ключ, Приморский край	Ralstonia sp.	0,005	0,005	0,005
				0,02	0,02	0,02
				0,1	0,1	0,1
4		термальные воды Кульдур	Brevibacterium sp.	0,005	0,005	0,005
				0,02	0,02	0,02
				0,1	0,1	0,1
5	Грамположительные гетеротрофные бактерии	подземные рассолы, Приморский край	Microbacterium sp.	0,005	0,005	0,005
				0,02	0,02	0,02
				0,1	0,1	0,1
6		кислые техногенные воды хвостохранилищ Краснореченской обогатительной фабрики, Приморский край	Bacillus sp.	0,005	0,005	0,005
				0,02	0,02	0,02
				0,1	0,1	0,1

нитроцеллюлозных фильтров (25 мм, 0,22 мкм, Sartorius). Фильтрат подкисляли высокочистой концентрированной 5%-ной HNO₃ и хранили до анализа при 4 °С. Первая процедура обеспечила отделение растворенных форм изучаемых элементов от сорбированных на клеточных стенках бактерий, а вторая — консервацию раствора и стабилизацию элементов в нем до непосредственных инструментальных испытаний.

Идентификацию выделенных бактерий осуществляли с использованием молекулярно-генетических методов 16S РНК в ТИБОХ ДВО РАН (г. Владивосток). Геномную ДНК выделяли с использованием набора AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit («Axygen», США). ПЦР-амплификацию 16SrDNA проводили с использованием праймеров BF-20 (5'-AGAGTTTGATCA/CTGGCTCAG-3') и BR2/22 (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Поиск гомологичных последовательностей осуществляли на серверах NCBI (URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) и EMBL-EBI (URL: <http://www.ebi.ac.uk/ena>). Сборку последовательностей генов, множественные выравнивания и расчет генетических дистанций проводили с использованием программы MEGA v.6.

Для определения концентрации элементов в подкисленных фильтратах использовали квадрупольный масс-спектрометр с индуктивно связанной плазмой «Agilent 7700x» с фторопластовой системой введения образца в режиме анализа низкоминерализованных растворов. Корректировка дрейфа прибора и матричного эффекта осуществлялась по внутреннему стандарту In. Добавление In из его раствора с концентрацией 50 мкг/л в

анализуемый раствор было автоматизировано и реализовано непосредственно в системе ввода образца посредством смешивания двух потоков из двух трубок в один при направлении последнего напрямую в распылитель. Смешение потоков происходило таким образом, что разбавление по In составляло около 20 раз.

Доведение образца до распылителя осуществлялось в течение 10 с (длина передающих раствор трансмиссионных трубок была подобрана для обеспечения такого времени) с использованием блока автоматической подачи и перистальтического насоса, вращающегося со скоростью 0,5 об/с. На стабилизацию облака аэрозоля в распылительной камере и транспортировку аналитов и внутреннего стандарта до квадрупольного отвода было отведено 5 с. При этом скорость перистальтического насоса снижалась до 6 об/мин и сохранялась постоянной при проведении всей следующей стадии и этапа ополаскивания носика капилляра, отбирающего раствор.

Детектирование Y, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu и Th происходило без использования режима с гелием по следующим аналитическим массам (Да) и в течение следующих периодов времени (с) соответственно: 89–0,26; 139–0,26; 140–0,29; 141–0,24; 146–1,5; 147–1,7; 151–0,54; 157–1,5; 159–0,24; 163–1,1; 165–0,26; 166–0,82; 169–0,25; 172–1,2; 175–0,26 и 232–0,48, а детектирование Sc — с использованием режима с гелием (основные параметры режима: скорость потока гелия через ячейку столкновений — 4,3 мл/мин; потенциальный барьер между октополем и квадруполем — 3 В) в течение 9,2 с (масса 45). На стабилизацию процесса столкновения гелия с веществом ионного пучка было отведено 5 с. Пере-

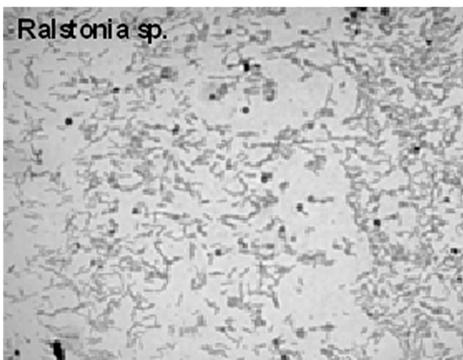
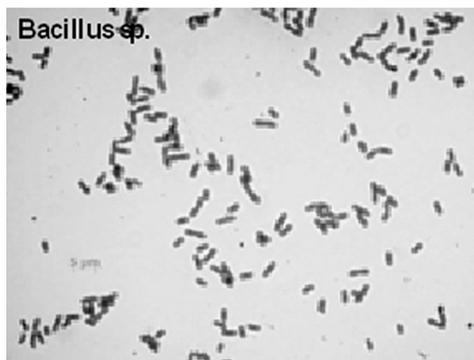
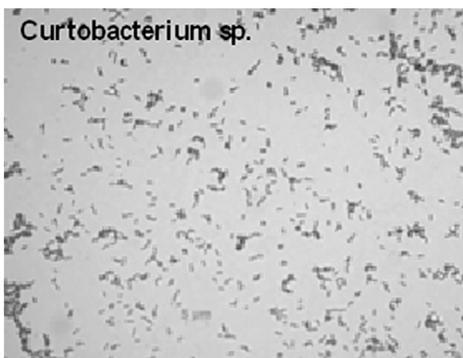


Рис. 1. Морфологические формы бактерий, выделенных из техногенных и природных вод Дальнего Востока: *Microbacterium* sp., *Curtobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Ralstonia* sp., *Pseudomonas* sp., *Brevibacterium* sp.

ход в такой режим обоснован интенсивными мешающими влияниями на этой массе в режиме без использования активной октопольной системы.

Значительные интерференции на массе 45 вызваны содержащимся как в рабочем аргоне, так и в воздухе углекислым газом, дающем в условиях плазмы индуктивно связанного разряда при пневматическом распылении водных растворов следующие образования: $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^{1}\text{H}$, $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$. Эти наложения в режиме с столкновением с гелием эффективно устраняются. Результирующее образование оксидных и гидроксидных ионов Се (точнее отношение масс 156/140 и 157/140 соответственно) было 0,935 и 0,0986% для режима без гелия и 0,325 и 0,0439% для режима с гелием. Время интегрирования подобрано таким образом, чтобы все аналиты детектировались с приблизительно одинаковыми импульсами, это правильный шаг на пути к определению всех изучаемых элементов с близкой ошибкой. Детектирование In проходило по 115 аналитическим массам в течение 0,35 и 1,6 с в режимах с пассивной и активной

ячейкой столкновений соответственно. Детектирование и аналитов, и внутреннего стандарта шло по одной точке на массу. Число повторов составляло 3 раза. В рамках времени интегрирования число сканирований (повторов) составляло 100. Таким образом, общее время сбора информации составило 82,85 с.

Функционирование блока автоматической подачи образцов было запрограммировано таким образом, чтобы за 30 с до конца этапа сбора информации конец отбирающего капилляра отправился в пункт своего прополаскивания 5%-ным раствором HNO_3 . В этом растворе носик находился в течение 35 с (30 с — это время, эквивалентное находящемуся в трансмиссионных трубках количеству аналитического раствора, необходимого для анализа при 6 оборотах вращения перистальтического насоса в минуту). Положительный эффект от этого мероприятия — сокращение общего времени анализа, сокращение количества аналитического раствора и увеличение количества промывающего раствора, проходящего через распылительную

камеру, что в итоге снижает действие негативного эффекта памяти.

Заключительным этапом инструментального цикла стало промывание системы введения образца посредством подачи в течение 90 с при 0,5 оборотах/с 5%-ным раствором HNO_3 перистальтического насоса. Расчет концентрации REY выполнен методом внешнего калибровочного графика.

Для описания распределения REY между водным раствором и различными видами бактерий использовали коэффициент распределения K_d :

$$K_d = \frac{[\text{REY}]_{\text{sorb}}}{[\text{REY}]_{\text{dis}}} = \frac{[\text{REY}]_{\text{init}} - [\text{REY}]_{\text{dis}}}{[\text{REY}]_{\text{dis}}},$$

где $[\text{REY}]_{\text{sorb}}$ — содержание REY, адсорбированных на бактериях, мкг/кг; $[\text{REY}]_{\text{dis}}$ — содержание REY в растворе, мкг/кг; $[\text{REY}]_{\text{ini}}$ — начальная концентрация REY, мкг/кг.

Результаты эксперимента и их обсуждение.

В основе микробной биосорбции металлов лежат процессы взаимодействия ионов с поверхностями структуры клеток, а также их метаболитами и экзополимерами. Сорбция ионов металлов (в том числе REY) микроорганизмами может быть активной (аккумуляция) и пассивной. Аккумуляция — более сложный механизм и происходит за счет метаболических процессов включения металлов в структуры только живых клеток по механизмам ионного обмена, адсорбции, комплексо- и хелатообразования с функциональными группами на поверхности клеточных оболочек. Пассивная биосорбция может происходить как на поверхности живых, так и мертвых микроорганизмов в ходе физико-химических взаимодействий ионов с клеточными структурами и не зависит от метаболической активности клеток. Ее механизм обусловлен наличием специфических функциональных групп во внешней оболочке микроорганизма.

Эффективность биосорбции металлов и, соответственно, REY определяется различными факторами: жизнеспособностью и видом микроорганизмов, концентрацией их клеток и сорбируемого металла в растворе, температурой, pH среды и ее химическим составом, а также временем, в течение которого микроорганизмы контактируют с раствором, насыщенным REY. При оптимальном соотношении вышеперечисленных факторов возможно достижение максимальной эффективности микробной сорбции REY из водных сред.

Грамположительные и грамотрицательные бактерии устроены по-разному [Salton, Kim, 1994; Возная, 1979; Гусев, Минеева, 1992]. Грамположительные бактерии имеют клеточную стенку толщиной от 20 до 80 нм, состоящую преимущественно из множества слоев пептидогликана (до 90% ее сухой массы), а также тейхоевой кислоты, полисахаридов, белков и липидов (рис. 2).

У грамотрицательных бактерий строение клеточной стенки намного сложнее (рис. 2), чем у грамположительных, так как она многослойна, и в ее состав входит гораздо больше макромолекул разного химического типа. Внутренняя клеточная стенка грамотрицательных бактерий достаточно тонкая (2–3 нм) и состоит из пептидогликана. На пептидогликановом каркасе находится пластичный волнистый слой, толщина которого значительно превышает размеры монослоя пептидогликана (до 10 нм), на котором расположены полисахариды, липиды и фосфолипиды, липополисахариды (30–40% поверхности внешнего слоя), липопротеины и белки.

В ходе проведения эксперимента выявлено постоянное перераспределение содержания REY между всеми штаммами бактерий и раствором, а также установлено значительное влияние кислотности среды на сорбционную емкость бактерий (рис. 3–8). В большинстве случаев наибольшая сорбция REY бактериями выявлена в начале эксперимента, затем отмечается их десорбция с поверхности клетки и иногда снова сорбция.

Для всех рассматриваемых штаммов (как живых, так и инaktivированных) установлено увеличение сорбции с повышением pH воды. Наиболее эффективно процесс сорбции протекает при pH 7, в то время как в кислых условиях (pH 2) сорбируется меньшее количество REY (рис. 3–8). При дальнейшем повышении щелочности среды, скорее всего, следует ожидать дальнейшего увеличения эффективности биосорбции REY вплоть до достижения оптимальной величины pH среды, которая будет больше 7.

Снижение эффективности биосорбции ряда REY со снижением кислотности среды также отмечено в работе [Takahashi et al., 2007] для бактерий чистых культур (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Alcaligenes faecalis*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens*), а также для штаммов *Microbacterium sp.*, *Curtobacterium sp.*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus pumilis* в работе [Казак и др., 2018]. Снижение сорбции REY бактериями при увеличении кислотности среды связано с протонированием поверхности клеточных стенок бактерий при низких значениях pH и регулируется процессами приспособления микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды. При низких значениях pH (т.е. с высокой концентрацией протонов) положительно заряженные металлы и протоны конкурируют за сорбционные места на клеточных стенках бактерий, что приводит к более низкому поглощению REY [Châtellier, Fortin, 2004; Doyle et al., 1980; Fein et al., 2001; Takahashi et al., 2007]. Ряд исследователей [Harris, Ramelow, 1990; Zhou, Kiff, 1991] считают, что снижение поглощения металлов при снижении pH до 2, вероятно, является результатом увеличения концентрации иона H_3O^+ , который может прочно связываться

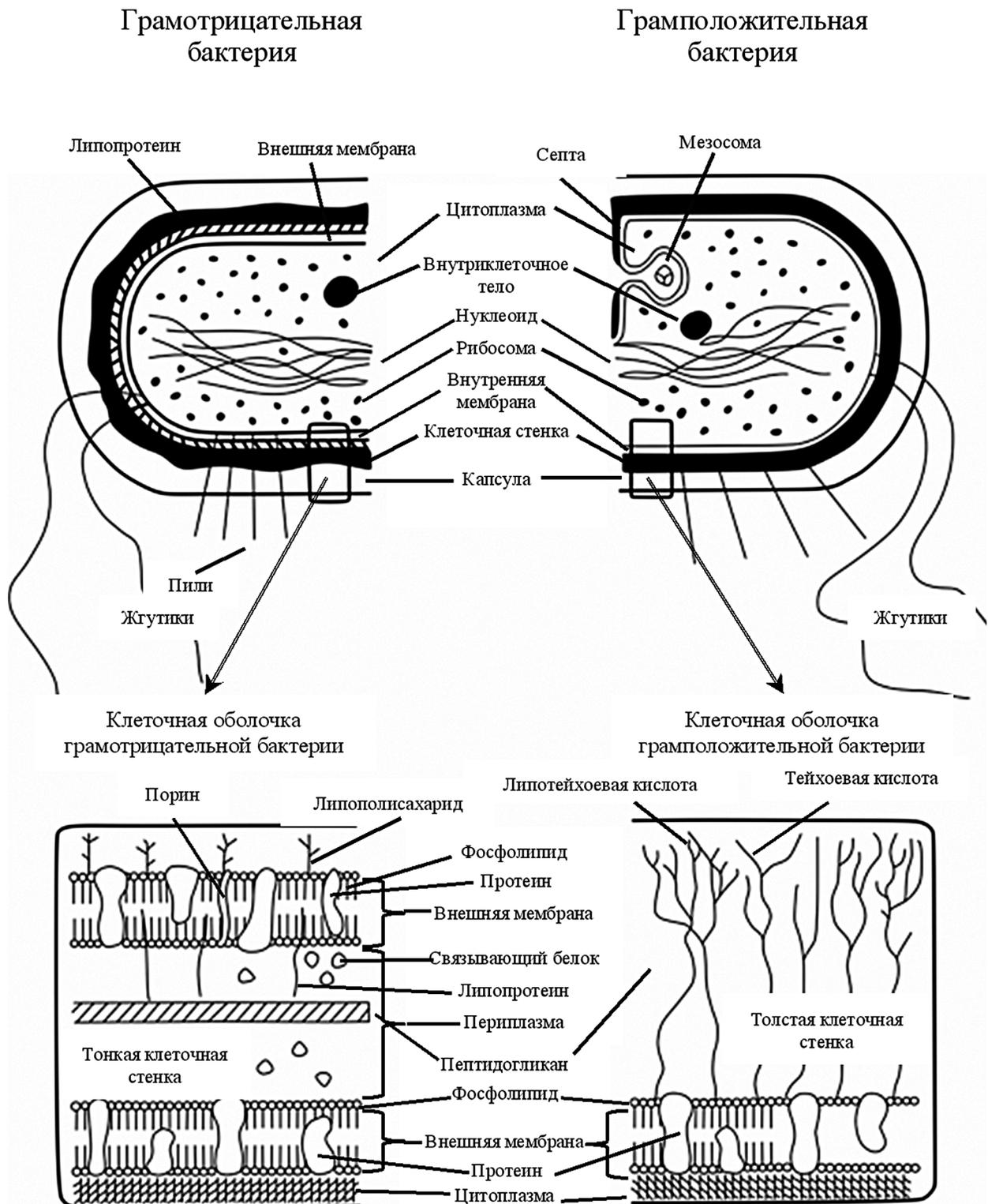


Рис. 2. Строение грамположительной и грамотрицательной бактерии, по [Salton, Kim, 1994]

с лигандами клеточной стенки бактерий. Ионы металлов должны конкурировать с H_3O^+ в ходе сорбции, что приводит к их более низкому поглощению, чем при околонейтральных величинах pH.

При изучении влияния концентрации бактерий на эффективность биосорбции REY установлено, что чем выше концентрация микроорганизмов, тем ниже значения коэффициента сорбции

REY как для инактивированных, так и для живых культур (рис. 3–5; рис. 6, а, б, в, д, е; рис. 7–8), за исключением значений K_d на мертвых культурах *Microbacterium* sp. при pH 7, где при концентрации микроорганизмов 0,02 г/л наблюдается увеличение K_d (рис. 6, з).

В ходе проделанной работы выявлена разная скорость биосорбции REY в зависимости от усло-

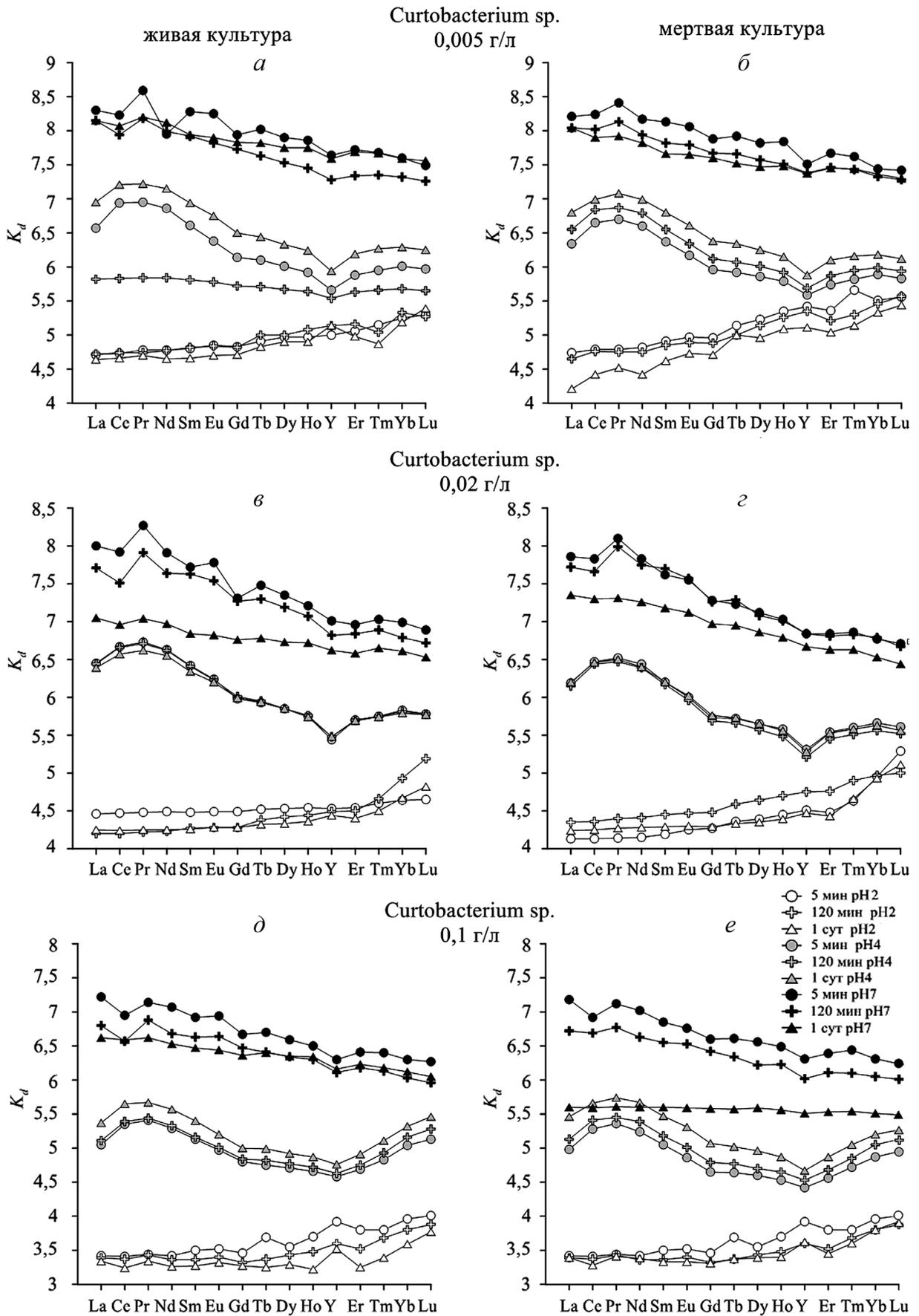


Рис. 3. Изменение коэффициента сорбции REY (K_d) на живых (*а, в, д*) и мертвых (*б, г, е*) клетках *Curtobacterium sp.* при разных значениях pH среды (2, 4 и 7) и для разной начальной концентрации бактерий (0,005, 0,02 и 0,1 г/л) через 5 мин, 120 мин и 1 сут с начала эксперимента

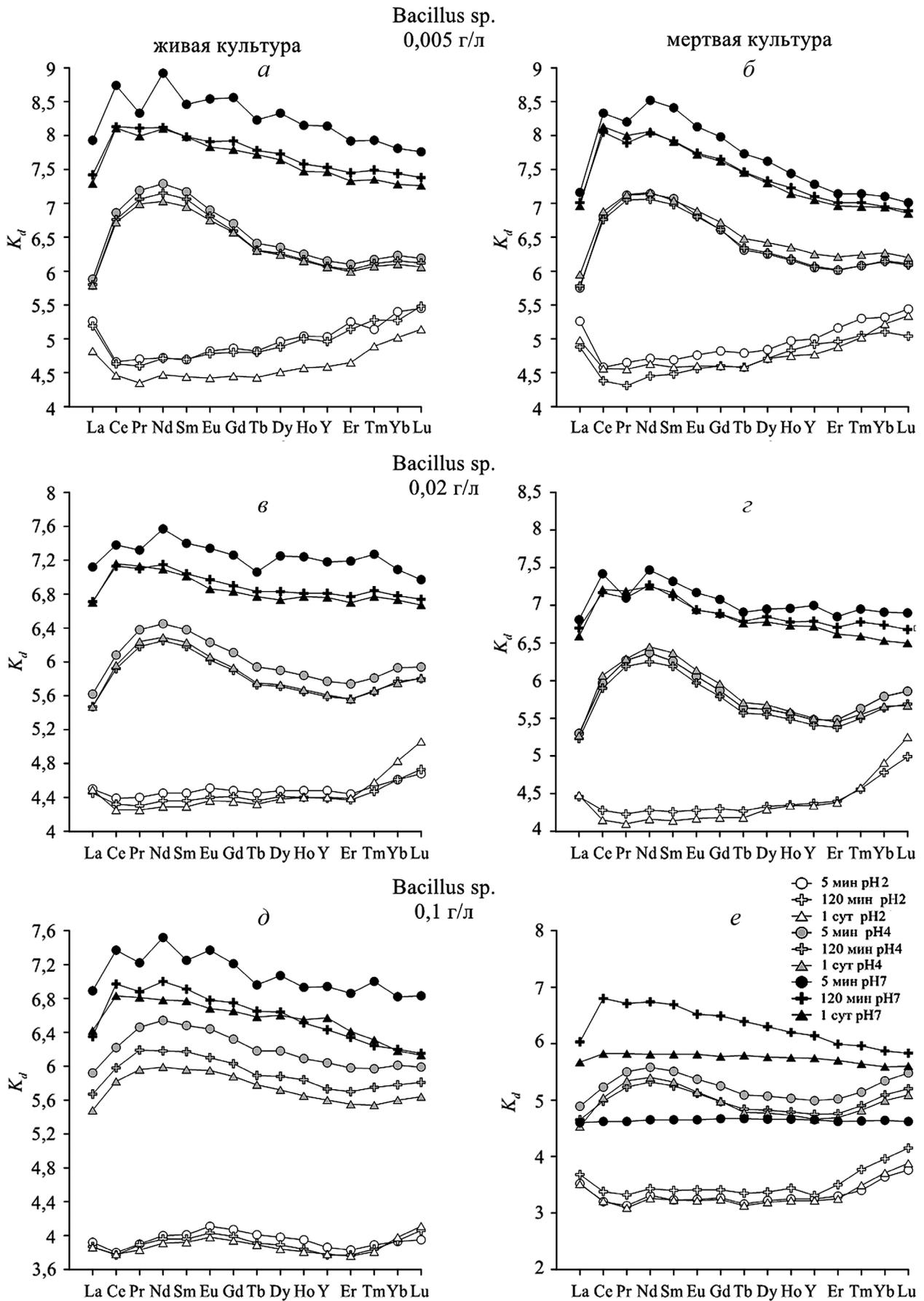


Рис. 4. Изменение коэффициента сорбции REY (K_d) на живых (*а, в, д*) и мертвых (*б, г, е*) клетках *Bacillus sp.* при разных значениях pH среды (2, 4 и 7) и для разной начальной концентрации бактерий (0,005, 0,02 и 0,1 г/л) через 5 мин, 120 мин и 1 сут с начала эксперимента

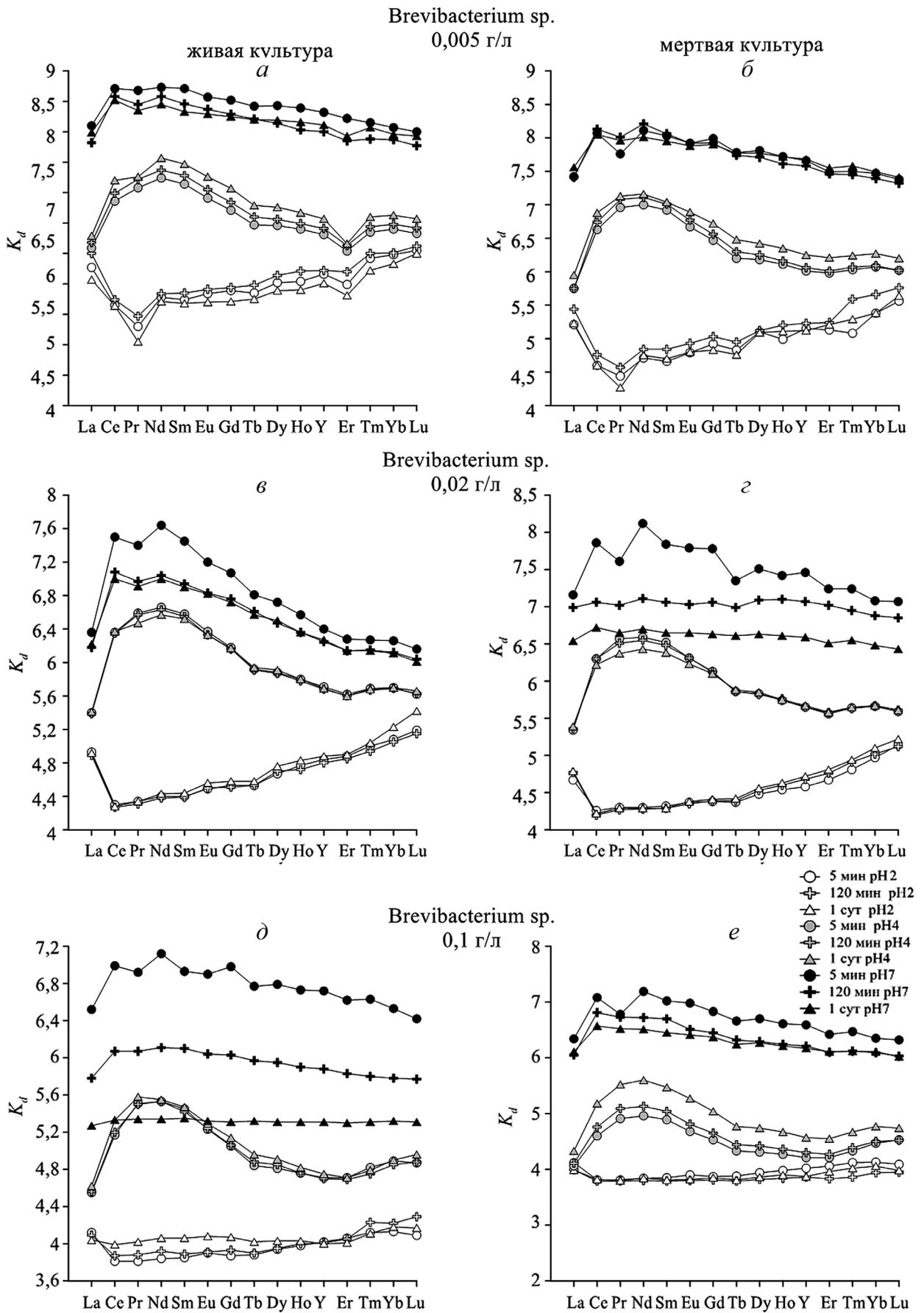


Рис. 5. Изменение коэффициента сорбции REY (K_d) на живых (*а, в, д*) и мертвых (*б, г, е*) клетках *Brevibacterium sp.* при разных значениях pH среды (2, 4 и 7) и для разной начальной концентрации бактерий (0,005, 0,02 и 0,1 г/л) через 5 мин, 120 мин и 1 сут с начала эксперимента

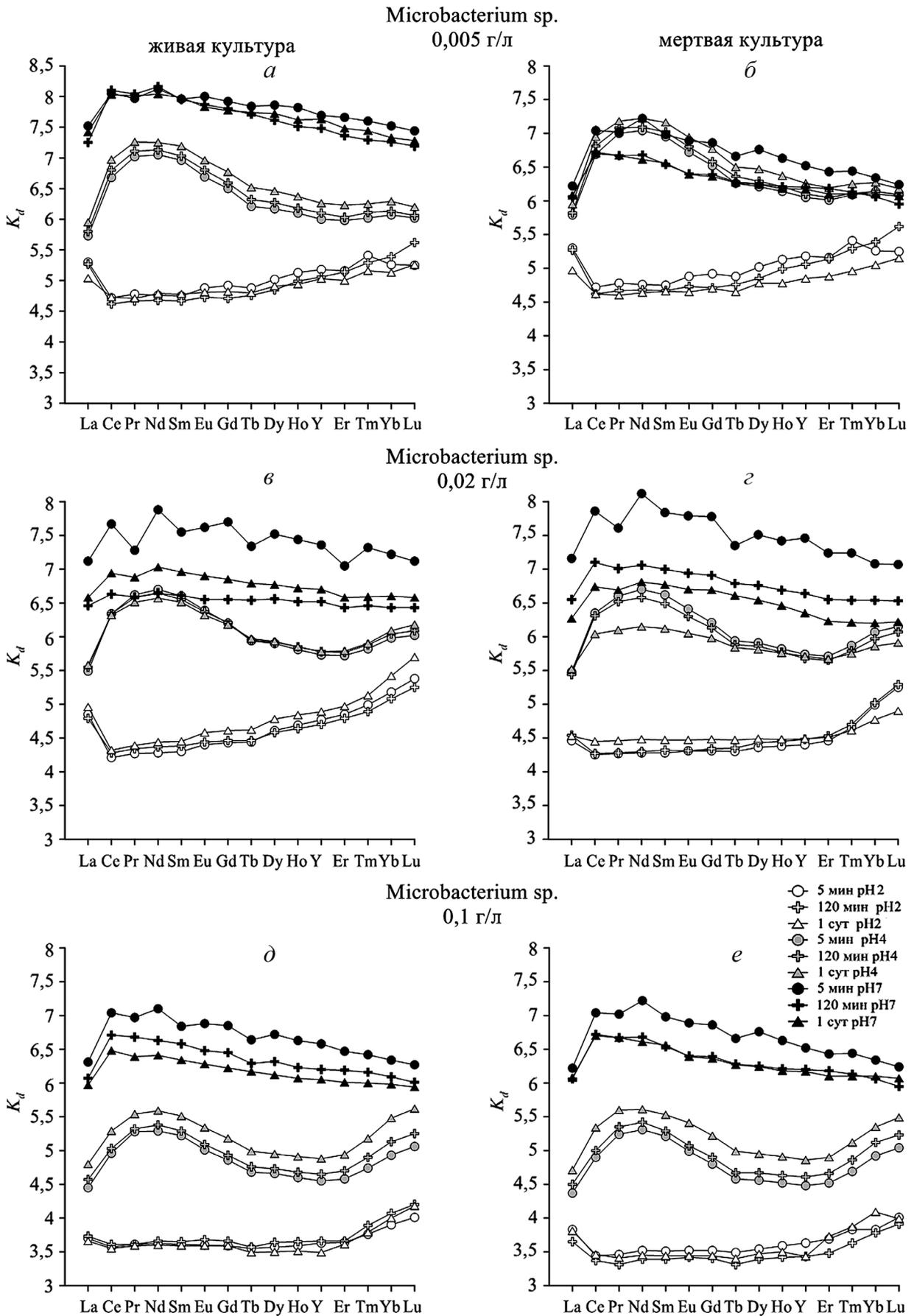


Рис. 6. Изменение коэффициента сорбции REY (K_d) на живых (*а, в, д*) и мертвых (*б, г, е*) клетках *Microbacterium sp.* при разных значениях pH среды (2, 4 и 7) и для разной начальной концентрации бактерий (0,005, 0,02 и 0,1 г/л) через 5 мин, 120 мин и 1 сут с начала эксперимента

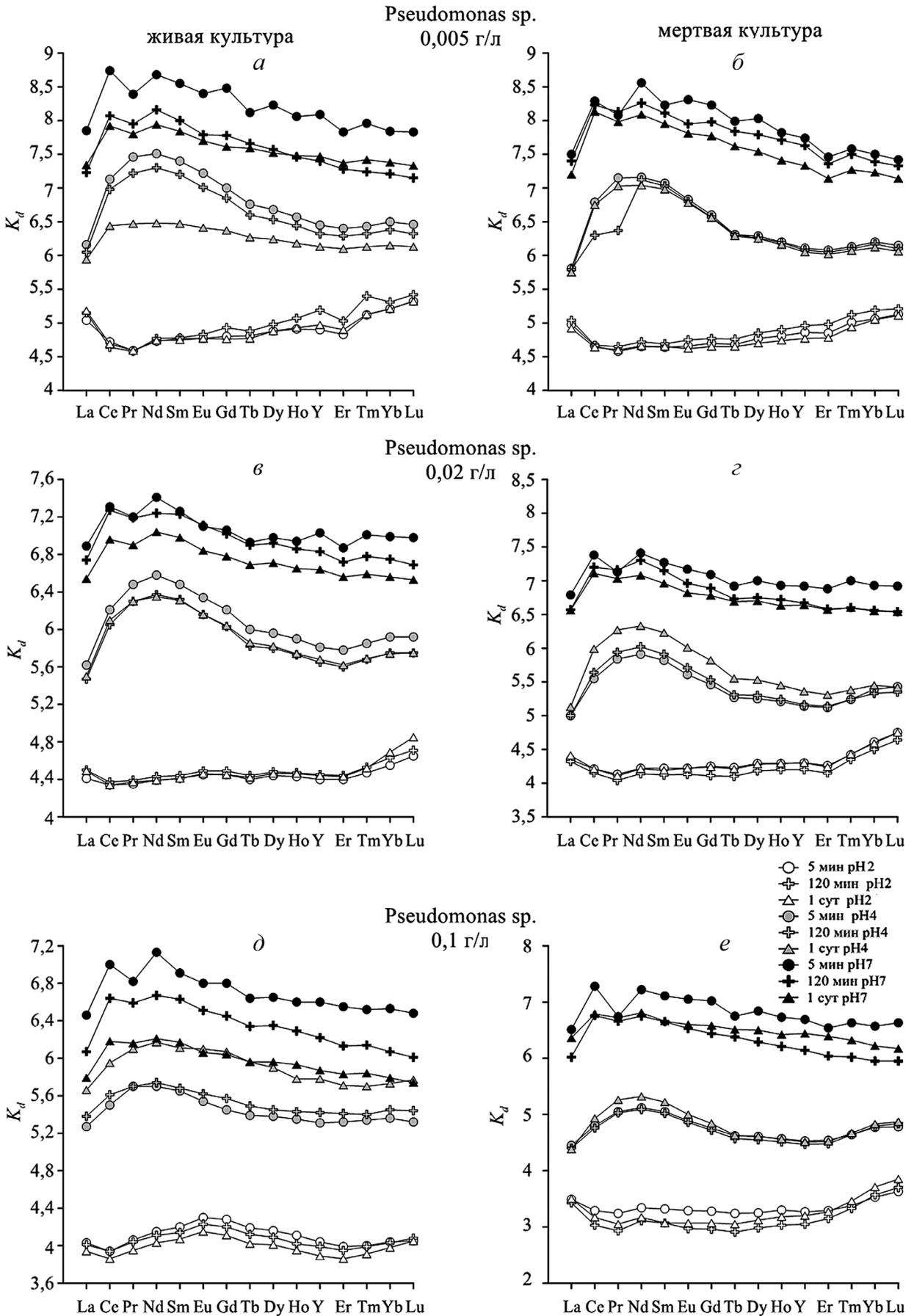


Рис. 7. Изменение коэффициента сорбции REY (K_d) на живых (*a, в, д*) и мертвых (*б, г, е*) клетках *Pseudomonas sp.* при разных значениях pH среды (2, 4 и 7) и для разной начальной концентрации бактерий (0,005, 0,02 и 0,1 г/л) через 5 мин, 120 мин и 1 сут с начала эксперимента

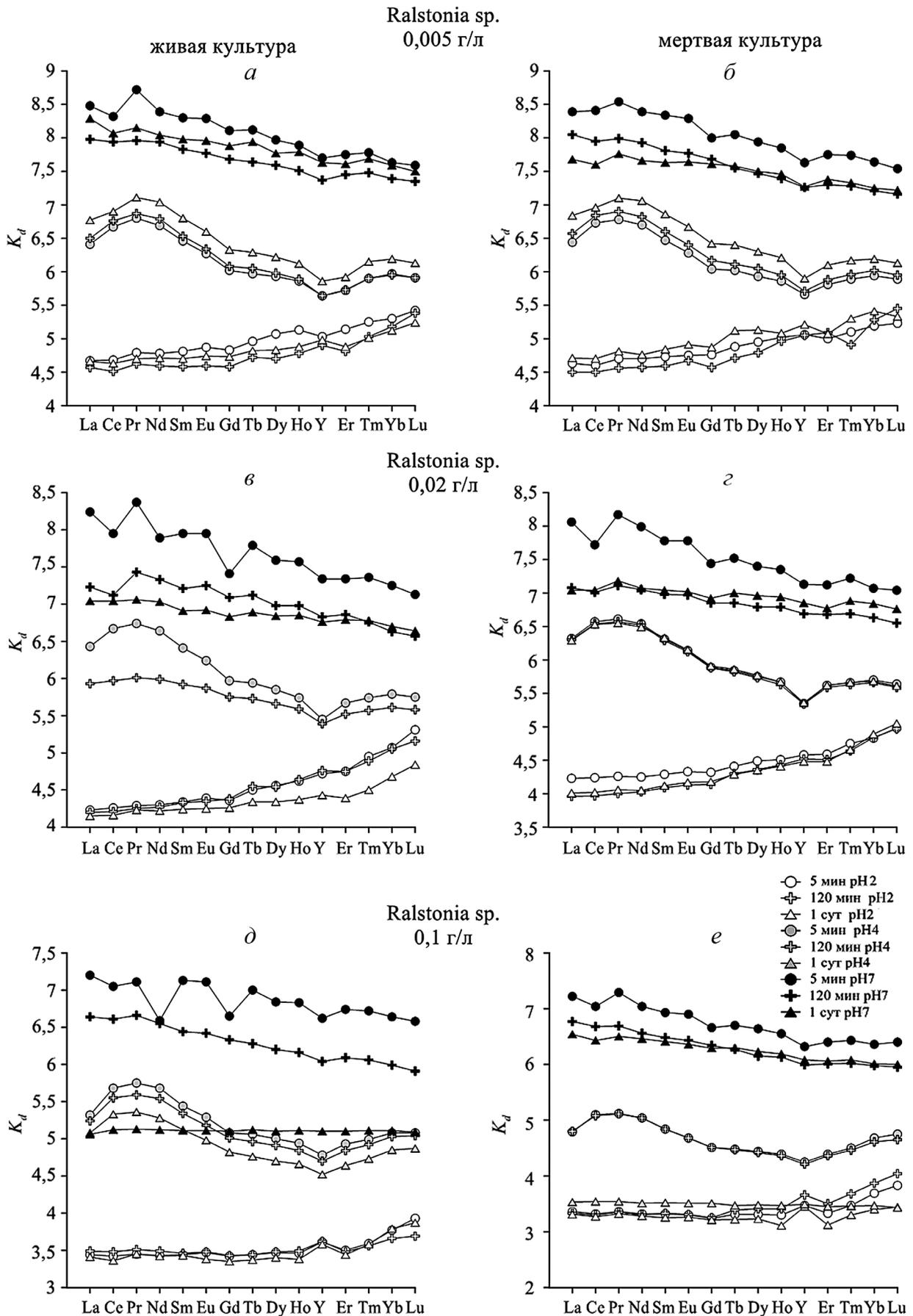


Рис. 8. Изменение коэффициента сорбции REY (K_d) на живых (*а, в, д*) и мертвых (*б, г, е*) клетках *Ralstonia sp.* разных значений pH среды (2, 4 и 7) и для разной начальной концентрации бактерий (0,005, 0,02 и 0,1 г/л) через 5 мин, 120 мин и 1 сут с начала эксперимента

вией среды. Максимальные значения коэффициента сорбции для большинства REY как на живых, так и на инактивированных клетках *Curtobacterium* sp., независимо от их начальной концентрации, достигнуты после 5 мин эксперимента при pH 7 (рис. 3) и pH 2 (рис. 3, а–в, д, е). При pH 4 сорбция происходила медленнее, максимальные величины K_d были получены на 1 сут (рис. 3). Максимальные значения K_d на мертвых культурах бактерий *Bacillus* sp. для большинства REY при pH 2 были достигнуты только на 120-й мин эксперимента (рис. 4, з, е), при pH 4 — на 1 сут (рис. 4, б, в), в остальных случаях, как для живых, так и для мертвых клеток, — через 5 мин (рис. 4). В случае сорбции на живых и мертвых культурах *Brevibacterium* sp. со снижением pH увеличивалось время достижения максимальных величин K_d REY: при pH 7 — через 5 мин (рис. 5), при pH 4 — через 1 сут (рис. 5, а, б, д, е), при pH 2 — через 120 мин (рис. 5, а, б) и через 1 сут (рис. 5, в–д).

Для бактерий *Microbacterium* sp. при pH 4 (рис. 6, а, б, д, е) и pH 2 (рис. 6, в, з) максимальные значения K_d для большинства REY были достигнуты на 1 сут эксперимента, при pH 7 — через 5 мин для всех случаев (рис. 6).

Максимальная сорбция REY на живых и мертвых клетках *Pseudomonas* sp. достигнута быстро — через 5 мин при pH 7 (рис. 7) и в ряде случаев при pH 4 (рис. 7, а–в) и pH 2 (рис. 7, з–е). В остальных случаях для достижения эффективной биосорбции понадобилось больше времени (1 сут при pH 4 (рис. 7, з–е) и 120 мин при pH 2 (рис. 7, а–в)).

Наибольшие величины коэффициента сорбции для большинства REY на бактерии *Ralstonia* sp. были зафиксированы только через 1 сут на живых и мертвых клетках при содержании 0,005 г/л при pH 4 (рис. 8, а, б) и на мертвых клетках при pH 2 (рис. 8, б). Во всех остальных случаях максимальные величины K_d измерены через 5 мин (рис. 8).

Экспериментально установлено, что скорость обменной реакции определяется видом бактерий и величиной pH: чем больше pH среды, тем быстрее биосорбция REY на микроорганизмах. Так, во всех случаях, когда pH 7, максимальные значения K_d REY измерены уже через 5 мин от начала эксперимента. При подкислении среды происходит снижение сорбционной способности биомассы поразному у каждого вида бактерий, однако общую закономерность установить не удалось. Хотя на основании результатов предыдущих исследований [Казак и др., 2018] ожидалось, что грамотрицательные бактерии с защитной внешней мембраной в клеточной стенке будут более устойчивы к изменению кислотно-щелочных условий среды и, соответственно, будут иметь больший потенциал для биосорбции в кислых растворах. Кроме того, какая-либо закономерность в изменении скорости биосорбции в зависимости от концентрации бактерий также не отмечена.

В ходе эксперимента установлена селективность биосорбции REY в зависимости от pH и вида бактерии. С уменьшением pH наблюдается увеличение K_d для тяжелых редкоземельных элементов (HREE) на всех рассматриваемых бактериальных штаммах. При pH 7 значения K_d легких редкоземельных элементов (LREE) значительно превышают K_d для HREE. Наибольшее фракционирование отдельных REY наблюдается в момент максимальной эффективности сорбции, при этом больше всего сорбируется:

- при pH 7 — Pr (*Curtobacterium* sp., *Ralstonia* sp.), La (*Curtobacterium* sp.), Nd (*Bacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Pseudomonas* sp.);

- при pH 4 — Pr (*Curtobacterium* sp., *Ralstonia* sp.) и Nd (*Bacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Pseudomonas* sp.);

- при pH 2 — Lu (*Curtobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Ralstonia* sp.) и Eu (*Pseudomonas* sp.).

Наименьшими значениями K_d характеризуются:

- при pH 7 — Lu (*Curtobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Ralstonia* sp.) и La (*Brevibacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Pseudomonas* sp.);

- при pH 4 — Y (*Curtobacterium* sp., *Ralstonia* sp.), La (*Bacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Pseudomonas* sp.);

- при pH 2 — La (*Curtobacterium* sp., *Ralstonia* sp.), Ce (*Bacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Pseudomonas* sp.), Pr (*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp.) и Y (*Bacillus* sp.).

Однозначная зависимость селективной сорбции REY от типа клеточной стенки бактерий не выявлена. В целом полученные результаты согласуются с результатами предыдущих исследований [Казак и др., 2018]. Селективность биосорбции REY бактериями чистых культур (*B. subtilis*, *E. coli*, *A. faecalis*, *S. putrefaciens*, *P. fluorescens*) отмечена в работах [Takahashi et al., 2005, 2007], где обнаружено, что максимальной сорбции среди REY подвергаются Sm и Eu, а активными сорбционными центрами на стенках бактерий служат фосфорильные и другие соединения.

Наиболее вероятный механизм биосорбции REY, скорее всего, заключается в быстром поглощении REY из раствора клетками бактерий за счет хемосорбции. В работах [Takahashi et al., 2005, 2007; Корневский и др., 1997] представлены данные о взаимосвязи сорбции REY с фосфатсодержащими соединениями микробных клеток, таких, как фосфаты, полифосфаты, нуклеиновые кислоты, фосфолипиды, фосфорилированные полисахариды (рис. 2). Колебания процессов сорбции–десорбции REY на микроорганизмах, наблюдаемые в процессе эксперимента (рис. 3–8), могут быть связаны, скорее всего, с выделением ферментов или трансфераз, которые способствуют

частичному извлечению REY из клеточных стенок. Более того, трансферазы обладают способностью перемещать функциональные группы от одной молекулы к другой, в том числе перемещать фосфатные группы между соединениями и, таким образом, колебать процесс сорбции.

Заключение. Экспериментально установлено, что скорость и эффективность биосорбции REY в большей степени определяются кислотно-щелочными условиями среды по сравнению с видом микроорганизмов и их начальной концентрацией в растворе: чем больше pH, тем быстрее и эффективнее протекает процесс биосорбции REY. Для всех видов бактерий при pH 7 максимальные значения K_d REY достигнуты уже через 5 мин после начала эксперимента. Снижение эффективности сорбции REY бактериями при увеличении кислотности среды, скорее всего, связано с протонированием поверхности стенок бактерий при низких значениях pH и регулируется процессами приспособления микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Балашов Ю.А.* Геохимия редкоземельных элементов. М.: Наука, 1976. 267 с.
- Бузолева Л.С., Безвербная И.П., Журавель Е.В., Калитина Е.Г.* Микробиологический мониторинг качества морской среды окраинных морей Российского Дальнего Востока // *Океанология*. 2006. Т. 46. С. 55–62.
- Возная Н.Ф.* Химия воды и микробиология: Учеб. пособие для вузов. М.: Высшая школа, 1979. 340 с.
- Гусев М.В., Минеева Л.В.* Микробиология. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1992. 464 с.
- Егоров Н.С.* Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1995. 224 с.
- Казак Е.С., Калитина Е.Г., Харитоновна Н.А.* и др. Биосорбция редкоземельных элементов и иттрия в водной среде гетеротрофными бактериями // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 4. Геология*. 2018. № 2. С. 73–80.
- Кореневский А.А., Сорокин В.В., Каравайко Г.И.* Взаимодействие ионов РЗЭ с клетками *Candida utilis* // *Микробиология*. 1997. Т. 66. С. 198–205.
- Beveridge T.J., Doyle R.J.* Metal ions and bacteria. N.Y.: Wiley, 1989. 461 p.
- Brantley S.L., Liermann L., Bau M., Wu S.* Uptake of trace metals and rare earth elements from hornblende by a soil bacterium // *Geomicrobiol. J.* 2001. Vol. 18. P. 37–61.
- Châtellier X., Fortin D.* Adsorption of ferrous ions onto *Bacillus subtilis* cells // *Chem. Geol.* 2004. Vol. 212. P. 209–228.
- Doyle R.J., Matthews T.H., Streips U.N.* Chemical basis for selectivity of metal ions by the *Bacillus subtilis* cell wall // *J. Bacteriology*. 1980. Vol. 143. P. 471–480.
- Fein J.B., Martin A.M., Wightman P.G.* Metal adsorption onto bacterial surfaces: development of a predictive approach // *Geochim. et Cosmochim. Acta*. 2001. Vol. 65. P. 4267–4273.
- Ferris F.G., Beveridge T.J.* Binding of a paramagnetic metal cation to *Escherichia coli* K-12 outer-membrane vesicles // *FEMS Microbiol. Lett.* 1984. Vol. 24. P. 43–46.
- Harris P.O., Ramelow G.J.* Binding of metal ions by particulate biomass derived from *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* // *Environm. Sci. & Technol.* 1990. Vol. 24. P. 220–228.
- Markai S., Andrès Y., Montavon G., Grambow B.* Study of the interaction between europium (III) and *Bacillus subtilis*: fixation sites, biosorption modeling and reversibility // *J. Colloid and Interface Sci.* 2003. Vol. 262. P. 351–361.
- Merroun M.L., Ben Chekroun K., Arias J.M., González-Muñoz M.T.* Lanthanum fixation by *Mycobacterium xanthus*: cellular location and extracellular polysaccharide observation // *Chemosphere*. 2003. Vol. 52. P. 113–120.
- Mullen M.D., Wolf D.C., Ferris F.G.* et al. Bacterial sorption of heavy metals // *Appl. and Environm. Microbiology*. 1989. Vol. 55. P. 3143–3149.
- Ozaki T., Gillow J., Francis A.* et al. Association of Eu(III) and Cm(III) with *Bacillus subtilis* and *Halobacterium salinarum* // *J. Nuclear Sci. and Technol.* 2002. Vol. 39. P. 950–953.
- Salton M.R.J., Kim K.-S.* Medical Microbiology. Chpt. 2. Structure. Texas, Univ. of Texas Medical Branch, 1994. 1273 p.
- Takahashi Y., Châtellier X., Hattori K.H.* et al. Adsorption of rare earth elements onto bacterial cell walls and its implication for REE sorption onto natural microbial mats // *Chem. Geol.*, 2005. Vol. 219. P. 53–67.
- Takahashi Y., Hirata T., Shimizu H.* et al. A rare earth element signature of bacteria in natural waters // *Chem. Geol.* 2007. Vol. 244. P. 569–583.
- Texier A.-C., Andrès Y., Illemassene M., Le Cloirec P.* Characterization of lanthanide ions binding sites in the cell wall of *pseudomonas aeruginosa* // *Environm. Sci. & Technol.* 2000. Vol. 34. P. 610–615.
- Zhou J.L., Kiff R. J.* The uptake of copper from aqueous solution by immobilized fungal biomass // *Chem. Technol. and Biotechnol.* 1991. Vol. 52. P. 317–330.

Поступила в редакцию 20.01.2021

Поступила с доработки 28.01.2021

Принята к публикации 28.01.2021