

Д14-2004-35

Л. М. Мосулишвили*, А. И. Белокобыльский*,
А. И. Хизанишвили*, М. В. Фронтасьева,
Е. И. Киркесали, Н. Г. Аксенова

ПРИМЕНЕНИЕ НЕЙТРОННОГО
АКТИВАЦИОННОГО АНАЛИЗА В ИССЛЕДОВАНИИ
АККУМУЛЯЦИИ И АДсорбЦИИ РТУТИ
БИОМАССОЙ *SPIRULINA PLATENSIS*

Направлено в «Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry»

*Институт физики им. Э. Л. Андроникашвили АН Грузии, Тбилиси

Мосулишвили Л. М. и др.

Д14-2004-35

Применение нейтронного активационного анализа
в исследовании аккумуляции и адсорбции ртути
биомассой *Spirulina platensis*

Метод эпитеплового нейтронного активационного анализа использован в исследовании особенностей взаимодействия сине-зеленой микроводоросли *Spirulina platensis* с токсичным металлом — ртутью. Эксперименты проводились в условиях естественного роста клеток при различных концентрациях ионов Hg(II) в питательной среде. Изучена аккумуляция Hg при культивации биомассы *Spirulina platensis* в течение нескольких суток. Установлен характер динамики накопления ртути биомассой спирулины, а также характер роста ее биомассы при различных концентрациях Hg. В кратковременных экспериментах исследован процесс адсорбции ртути биомассой *Spirulina platensis*. Построена изотерма адсорбции в координатах Фрейндлиха. Установлено, что естественная биомасса спирулины может быть использована для очистки сточных вод от ртути при концентрациях порядка 100 мкг/л.

Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики им. И. М. Франка ОИЯИ и Институте физики им. Э. Л. Андроникашвили АН Грузии.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2004

Перевод авторов

Mosulishvili L. M. et al.

D14-2004-35

Application of Epithermal Neutron Activation Analysis
to Investigate Accumulation and Adsorption of Mercury
by *Spirulina platensis* Biomass

Epithermal neutron activation analysis was used to study interaction of blue-green alga *Spirulina platensis* with toxic metal mercury. Various concentrations of Hg(II) were added to cell cultures in a nutrient medium. The dynamics of accumulation of Hg was investigated over several days in relation to *Spirulina* biomass growth. The process of Hg adsorption by *Spirulina* biomass was studied in short-time experiments. The isotherm of adsorption was carried out in Freundlich coordinates. Natural *Spirulina* biomass has potential to be used in the remediation of sewage waters at Hg concentrations ~100 µg/l.

The investigation has been performed at the Frank Laboratory of Neutron Physics, JINR, and at the E. Andronikashvili Institute of Physics of GAS, Tbilisi.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 2004

ВВЕДЕНИЕ

Ртуть и ее соединения широко используются в различных отраслях промышленности, сельском хозяйстве и медицине, в той или иной мере попадая в окружающую среду. Значительную долю в загрязнение окружающей среды Hg вносят пирометаллургия ртути, цветная металлургия, производство хлора и каустической соды, сжигание топлива и мусора и т.д. Кроме того, в некотором количестве ртуть присутствует почти в любом рудном или горючем сырье, что обуславливает ее неконтролируемое вовлечение в разнообразные технологические процессы.

Ртуть относится к рассеянным элементам. Среднее ее содержание в земной коре составляет $8 \cdot 10^{-6} \%$. Общее количество ртути в земной атмосфере 10^{-9} г/м^3 , в почве $1 \cdot 10^{-6} \%$, в сухой массе растений $25 \cdot 10^{-6} \%$ [1–3].

По токсичности ртуть стоит на первом месте среди других тяжелых металлов и по принятой классификации относится к I классу опасности (сильнодействующим ядовитым веществам). Даже в очень малых дозах она вызывает гонадотоксический, мутагенный, нейротоксический и эмбриотоксический эффекты. Накапливаясь преимущественно в почках, печени, селезенке, ртуть блокирует биохимическую активность белковых молекул и низкомолекулярных соединений. Наиболее токсичны органические соединения ртути, обладающие высокой липидорастворимостью, которая способствует их проникновению через мембраны и накоплению в жизненно важных органах.

Характер распространения ртути в окружающей среде способствует ее токсичному влиянию не только на персонал соответствующих отраслей производства, но зачастую и на население в целом. Медико-биологические исследования последних десятилетий показали всю серьезность «ртутной опасности», связанную с переходом хронических отравлений парами ртути из разряда профессиональных заболеваний в болезнь популяции.

Таким образом, совершенно очевидна необходимость исследований особенностей взаимодействия ртути с живыми системами, а также изучения биологических цепочек ее миграции, вследствие которых она может оказаться в пищевых продуктах и кормах для животных. В настоящей работе в качестве живой системы рассматривается сине-зеленая микроводоросль *Spirulina platensis* (далее *S. platensis*), широко используемая как в качестве основы для медицинских препаратов, так и в качестве биодобавки для человека и животных.

Концентрация Hg 0,1 мкг/л подавляет жизнедеятельность морских водорослей, а при концентрации 1 мкг/л нарушаются обменные процессы и фотосинтез [4].

В процессе производства большого количества биомассы *S. platensis* часто культивируется в открытых водоемах на большой площади. При этом вероятность попадания Hg в питательную среду как с атмосферными выпадениями, так и с воздухом достаточно велика, поэтому обеспечение чистоты биомассы спирулины во время ее производства является очень важной задачей.

С другой стороны, водоросли часто используются для очистки вод от тяжелых металлов [5–7]. При этом методы связывания металлов и других токсичных элементов могут быть различны в зависимости от вида водорослей, условий культивации, вида токсикантов и т. д. В одних случаях используется сухая биомасса водорослей, в других — взаимодействие с металлами идет в процессе их культивации *in vivo*. Одной из обширных и разнообразных групп водорослей являются цианобактерии, к которым относится и *S. platensis*. Цианобактерии отличаются высокой степенью толерантности и могут существовать в различных экстремальных условиях: в горячих источниках, в снегу, в воде с высоким содержанием солей и т. д. В тоже время они очень чувствительны к загрязнениям тяжелыми металлами [8]. Возможность использования сухой биомассы *S. platensis* для очистки сточных вод от кадмия показана в [9].

Цель настоящей работы — изучение зависимости процессов аккумуляции и адсорбции ртути биомассой *S. platensis* от концентрации Hg в среде, где происходит рост клеток спирулины. Научный и практический интерес поставленной задачи связан как с оценкой качества биомассы спирулины для пищевых и фармацевтических целей, так и с возможностью ее использования для очистки сточных вод от ртути.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты. В исследовании использовался штамм сине-зеленой микроводоросли *S. platensis* IPPAS В-256 Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН. Культивация проводилась в стандартной щелочной водно-солевой среде Заруха при температуре +34 °С, освещенности ~ 5000 лк, начальном рН 8,7 и при постоянном перемешивании. Поскольку ионы Hg(II) в щелочной среде образуют нерастворимый осадок (гидроксид ртути), во избежание выпадения ртути в осадок в качестве нагрузки питательной среды использовался глицинат ртути (HgNCH₂COOH).

Были проведены предварительные эксперименты для выбора интервала нагрузочных концентраций щелочной среды глицинатом ртути, при котором

клетки *S. platensis* (по данным микроскопии и спектрометрии) сохраняли свою жизнеспособность. Эксперименты показали, что при концентрациях 16 мг Hg/л клетки *S. platensis* полностью разрушались через 1 ч, а при концентрациях 1,6 мг Hg/л — через 4 ч и т. д. При низких концентрациях ртути клетки спирулины не разрушались, но их рост, состояние, pH и спектральные характеристики существенно менялись.

Исходя из результатов этих экспериментов были определены значения доз глицината ртути, использованные в дальнейшем исследовании.

В первой серии экспериментов по изучению аккумуляции Hg клетками *S. platensis* концентрации нагрузки питательной среды ртутью составляли 100, 50, 5, 1, 0,1 мкг Hg/л. Начальная концентрация суспензии *S. platensis* во всех экспериментах этой серии составляла 260 мг/л. Культивация клеток *S. platensis* проводилась в течение 6 сут. Пробы во всех сериях отбирались каждые 24 ч. Одновременно исследовался рост биомассы *S. platensis*, проводился микроскопический контроль за цитологическим состоянием клеток и отбирались образцы для проведения гель-электрофореза.

Во второй, кратковременной серии экспериментов по изучению адсорбции Hg клетками *S. platensis* начальная плотность суспензии *S. platensis* была сравнительно более высокой и составляла 1 г/л. Концентрация нагрузки питательной среды ртутью составляла 500 мкг Hg/л. Динамика процессов адсорбции, протекающих обычно 1–2 ч, исследовалась в течение 1 ч. Пробы отбирались через 2, 10, 20, 40 и 60 мин после начала культивации.

Во всех случаях биомасса из отобранных проб отделялась фильтрованием с последующим промыванием проб бидистиллированной водой до pH 6,5.

Полученные образцы лиофильно высушивались [10], а затем из них готовились таблетки массой около 0,5 г, предназначенные для нейтронного активационного анализа.

Анализ. Содержание ртути в образцах определялось методом эпитеплового нейтронного активационного анализа (ЭНАА) на импульсном быстром реакторе ИБР-2 в ЛНФ ОИЯИ (Дубна). Описание каналов облучения и пневмотранспортной системы на ИБР-2 представлено в работе [11]. Методика ЭНАА образцов *S. platensis* использовалась нами ранее как для определения фонового элементного состава спирулины, так и при изучении процессов аккумуляции некоторых следовых элементов [12,13]. В связи с тем, что ртуть является летучим элементом, существенное значение имела температура в канале облучения образцов. В [14] показано, что при определении ртути желательнее облучать биологические образцы при температуре не выше 90–100 °С. Этому требованию полностью соответствует один из каналов ИБР-2 с кадмиевым экраном, температура в котором не превышает 60–70 °С.

Образцы облучались в течение 5 сут, затем их активность измерялась дважды: через 4 и 20 сут.

Содержание ртути определялось по γ -линии изотопа ^{203}Hg с энергией 279,1 кэВ. При этом учитывалось влияние интерферирующих линий ^{75}Se и ^{182}Ta .

Контроль качества аналитических измерений проводился с помощью аттестованных стандартов, предназначенных для биологических образцов — лишайника (IAEA, Lichen 366), донных отложений (IAEA SDM-2Т) и датского мха (ДК-1).

Обработка данных ЭНАА и определение концентраций Hg проводились с помощью программ, используемых в ЛНФ ОИЯИ [15].

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты аккумуляции ртути. Результаты исследования аккумуляции Hg из питательной среды биомассой *S. platensis* при культивации клеток в течение 6 сут при различных концентрациях Hg показаны на рис. 1. Во всех случаях наблюдается экспоненциальный характер уменьшения содержания ртути. Кривые хорошо аппроксимируются функцией вида $y = y_0 + A e^{-x/t}$, соответствующие параметры приводятся в таблице.

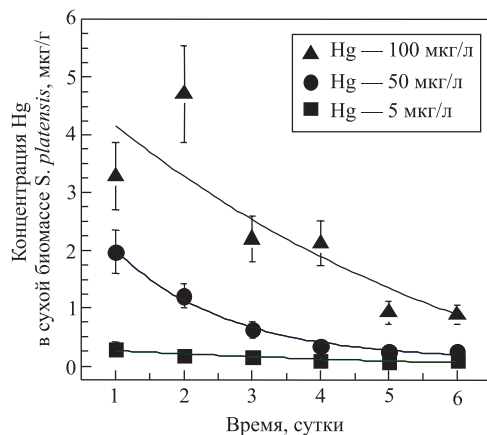


Рис. 1. Аккумуляция Hg из питательной среды биомассой *S. platensis* при различных нагрузках в течение 6 сут

представленных кривых, ртуть начинает существенно тормозить рост клеток *S. platensis* по прошествии более 60 ч с начала культивации, причем влияние Hg сказывается сильнее при высоких концентрациях. Эти результаты согласуются с данными работы [16].

Такой характер зависимости представляется понятным, так как по мере экспоненциального роста числа клеток *S. platensis* число мест связывания ионов Hg(II) значительно превосходит число ионов Hg(II) в питательной среде. В результате этого происходит блокировка токсичных ионов ртути и удаление их из питательной среды. Такой механизм может служить одним из важных путей «самоочистки» биосферы от тяжелых металлов с помощью микроорганизмов.

Динамика роста биомассы спирулины при тех же концентрациях Hg в питательной среде показана на рис. 2. Как видно из

Параметры аппроксимации экспоненциальной функции

Нагрузка, мкг Hg/л	100	50	5
χ^2	0,8	0,00578	0,00082
r^2	0,7	0,99	0,9
y_0	$-1,7 \pm 1,4$	$0,10 \pm 0,09$	$-0,12 \pm 0,04$
A	$6,9 \pm 2,2$	$3,5 \pm 0,3$	$0,45 \pm 0,07$
t	$6,2 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,2$	$6,2 \pm 0,2$

Ионы металлов взаимодействуют либо с отрицательно заряженными карбоксильными и фосфатными группами клеточной поверхности и мембраны, либо проникают в клетку по специфическим транспортным каналам проводимости, таким как каналы Mg^{2+} , Mn^{2+} и Ca^{2+} . Металлы, проникшие в клетку, обнаруживаются в составе различных клеточных структур, ДНК и рибосом.

Ртуть, даже при незначительных концентрациях, оказывает токсичное воздействие на процессы фотосинтеза *S. platensis*, что прежде всего проявляется в изменении флуоресценции хлорофилла [17]. Это подтверждается также и нашими исследованиями спектров поглощения хлорофилла *a* и С-фикоцианина в области 680 и 620 нм.

Механизмы нейтрализации и выведения токсикантов из клеток специфичны для различных металлов, сложны и недостаточно хорошо изучены. Это может быть образование металлотионеиноподобных белков, индуцированное металлами, образование инертных соединений типа HgS , выделение в питательную среду веществ, образующих комплексы с металлами при подавлении их токсичного воздействия. Восстановление и улетучивание Hg как в среде культивации, так и в клетках наблюдалось для культур из родов *Chlorella* и *Dunaliella* [18].

Результаты адсорбции ртути. Результаты исследования процесса адсорбции ртути клетками *S. platensis* показаны на рис. 3. Экспериментальные данные, полученные методом ЭНАА, хорошо аппроксимируются полиномом тре-

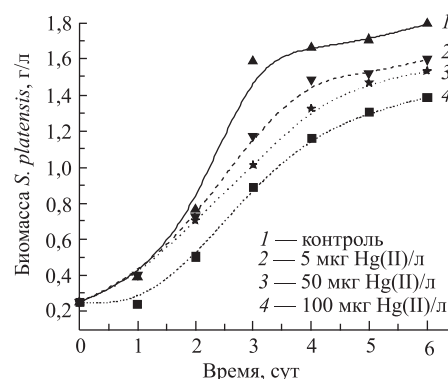


Рис. 2. Динамика роста биомассы *S. platensis* при разных нагрузках ртути

того порядка вида $y = 0,3586 - 0,02286x + 0,00332x^2 - 0,0000406482x^3$. Как видно из полученной кривой, максимальное количество ртути адсорбируется

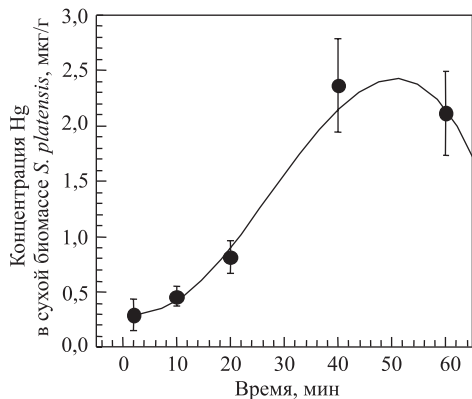


Рис. 3. Адсорбция Hg(II) клетками *S. platensis*

биомассой *S. platensis* приблизительно через 50 мин, а затем наблюдается уменьшение концентрации. Подобный характер зависимости накопления Hg(II) был получен и в работе [19] при изучении биосорбции в других микроорганизмах.

Теоретические расчеты изотермы адсорбции по имеющимся экспериментальным данным были выполнены на основании модели Фрейндлиха, учитывающей как физическую адсорбцию, так и хемосорбцию [20,21]. Для различных концентраций Hg(II) при длительности культивации 24 ч в координатах Фрейндлиха была получена зависимость вида

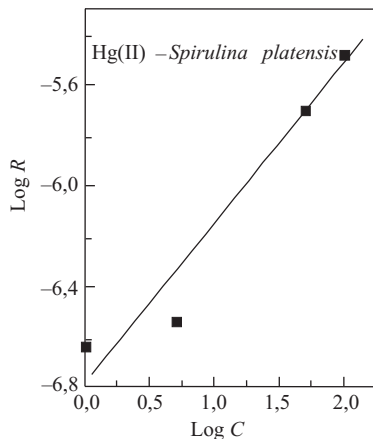


Рис. 4. График Фрейндлиха. Линейная аппроксимация методом наименьших квадратов

Эта зависимость представляет собой прямую (см. рис. 4), отсекающую на оси ординат отрезок, равный $\log K$, где K — константа биосорбции. В данном случае $\log K = -6,77$ и $K = 0,17 \cdot 10^{-6}$. Коэффициент корреляции $r^2 = 0,97$. Полученный результат можно считать подтверждением преобладания биосорбционных процессов на начальной стадии культивации клеток *S. platensis*.

$$\log R = -6,77 + 0,62 \log C,$$

Если учесть, что содержание Hg в контрольных образцах составляло около 0,007 мкг/г, то получается, что за 50 мин биомасса *S. platensis* накапливает ртути примерно в 300 раз больше. Таким образом, при сравнительно небольших концентрациях Hg (порядка 100 мкг/л) в среде *S. platensis* может быть использована для очистки промышленных и сточных вод от ртути.

Если учесть, что содержание Hg в контрольных образцах составляло около 0,007 мкг/г, то получается, что за 50 мин биомасса *S. platensis* накапливает ртути примерно в 300 раз больше. Таким образом, при сравнительно небольших концентрациях Hg (порядка 100 мкг/л) в среде *S. platensis* может быть использована для очистки промышленных и сточных вод от ртути.

Здесь следует также отметить, что биомасса *S. platensis*, состоящая из длинных трихомов, легко собирается фильтрацией, что значительно удешевляет и упрощает технологический процесс.

ВЫВОДЫ

1. С помощью метода ЭНАА возможно контролировать степень усвоения Hg из питательной среды биомассой *S. platensis* в ходе ее культивации в открытых водоемах.

2. При концентрациях Hg порядка 100 мкг/л биомасса *S. platensis* в естественном состоянии может быть использована для аккумуляции ионов Hg(II) с целью их выведения из среды культивации.

3. Биомасса *S. platensis* пригодна для быстрого очищения промышленных и сточных вод от ртути путем биосорбции и последующего отделения с помощью фильтрации.

Авторы выражают благодарность Э. Н. Гинтури, Н. Е. Кучава за помощь в проведении экспериментов и Э. С. Гелагуташивили, И. Г. Мурусидзе за участие в обработке результатов. Работа выполнена при поддержке гранта G-408 МНТЦ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Химия: Большой энцикл. слов. М., 1998.
2. Москалев Ю. И. Минеральный обмен. М.: Медицина, 1985.
3. Брукс Р. Р. Химия окружающей среды. М., 1982.
4. Трахтенберг И. М., Коршун М. Н. Вредные химические вещества. Неорганические соединения элементов I–IV групп: Справ. Л.: Химия, 1988. 170 с.
5. Brower J. B., Ryan R. L., Pozirandeh M. Comparison of ion-exchange resin and biosorbents for removal of heavy metals from plating factory wastewater // *Envir. Sci. Technol.* 1997. V. 31. P. 2910–2914.
6. Schmitt D. et al. The adsorption kinetics of metal ions on to different microalgae and silicene earth // *Wat. Res.* 2001. V. 35, No. 3. P. 779–785.
7. Darnall D. W. et al. Recovery of heavy metals by immobilized algae // *Trace Metal Removal from Aqueous Solution*. Whitstable Lito Ltd., 1986. P. 1–24.
8. Companella L. et al. An algae biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments // *Wat. Res.* 2000. V. 35, No. 1. P. 69–76.
9. Rangsayatorn N. et al. Phytoremediation potential of *Spirulina (Arthrospira) platensis*: biosorbition and toxicity studies of cadmium // *Envir. Pollut.* 2002. V. 119. P. 45–53.
10. Mosulishvili L. M. et al. Facility for lyophilization of biological preparation. Patent USSR No. 779765, Bull. No. 42. 1980.

11. *Frontasyeva M.V., Pavlov S.S.* Analytical investigations at the IBR-2 reactor in Dubna. JINR Preprint E14-2000-177. Dubna, 2000.
12. *Mosulishvili L.M. et al.* Epithermal neutron activation analysis of blue-green algae *Spirulina platensis* as a matrix for selenium-containing pharmaceuticals // *J. Rad. Nucl. Chem.* 2002. V. 252, No. 1. P. 15–20.
13. *Mosulishvili L.M. et al.* Experimental substantiation of the possibility of developing selenium- and iodine-containing pharmaceuticals based on blue-green algae *Spirulina Platensis* // *J. Pharm. Biomed. Analysis.* 2002. V. 30. P. 87–97.
14. *Mosulishvili L.M., Kuchava N.E., Shonia N.I.* Investigation of the thermostability of Synthetic Standards for instrumental neutron activation analysis of biological samples. // *Proc. Georg. As. Biol. Ser.* 1982. V. 107, No. 2. P. 501–504.
15. *Ostrovnaya T.M. et al.* Software for INAA on the basis of relative and absolute methods using nuclear database // *Activation Analysis in Environment Protection.* Dubna, 1993. P. 319–326.
16. *Disyawongs G.* Accumulation of copper, mercury and lead in spirulina platensis studied in Zarrouk's medium // *J. KMITNB.* 2002. V. 12. P. 4.
17. *Lu C.M., Chau C.W., Zhang J.H.* Acute toxicity of excess mercury on the photosynthetic performance of cyanobacterium *S. platensis*-assessment by chlorophyll fluorescence analysis // *Chemosphere.* 2000. V. 41. P. 191–196.
18. *Сенцова О. Ю., Максимов В. Н.* Действие тяжелых металлов на микроорганизмы // *Успехи микробиологии.* 1985. Т. 20. С. 227–252.
19. *Kaçar Y. et al.* Biosorption of Hg(II) and Cd(II) from aqueous solutions: comparison of biosorptive capacity of alginate and immobilized live and heat inactivated *Phanerochaete chrysosporium* // *Process Biochem.* 2002. V. 37. P. 601–610.
20. *Getman F.H., Daniels F.* Theoretical Chemistry. N. Y.: J. Wiley, 1937.
21. *Schiewer S., Volesky B.* Modeling of the proton-metal ion exchange in biosorption // *Envir. Sci. Technol.* 1995. V. 29. P. 3049–3058.

Получено 24 марта 2004 г.

Редактор *О. Г. Андреева*
Макет *Е. В. Сабатовой*

Подписано в печать 17.06.2004.
Формат 60 × 90/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 0,63. Уч.-изд. л. 0,76. Тираж 200 экз. Заказ № 54414.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований
141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6.
E-mail: publish@pds.jinr.ru
www.jinr.ru/publish/