

Jerzy CHMIEŁOWSKI\*, Mieczysław PYTLAK\*,  
Michał CHWISTEK\*, Andrzej WOŹNICA\*

## AKUMULACJA TORU PRZEZ SZCZEP DROŹDŹY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Wyniki badań nad akumulacją toru przez szczep drożdży *S. cerevisiae* umożliwiły ocenę mechanizmów tej akumulacji. Wykazano istotny udział sorpcji powierzchniowej i okludacji w wiązaniu toru. Sprzyjała temu łatwość hydrolizy związków toru oraz osadzanie się osadów na powierzchni komórek drożdży wykazane w obserwacjach mikroskopowo-elektronowych. Osady te oraz związki toru sorbowane na powierzchni komórek ulegały odmyciu przez kwas solny lub cytrynian w próbach elucyjnych. W obecności łatwo przyswajalnych substratów cukrowych: glukozy lub fruktozy w zwiększonej akumulacji ujawniło się również wewnątrzkomórkowe nagromadzenie toru. Wykazały to badania mikroskopowo-elektronowe oraz dystrybucja toru w frakcjach komórkowych drożdży. Można spodziewać się, że jeden z mechanizmów transportu i akumulacji wewnątrzkomórkowej w warunkach substratowych był związany z kompleksowaniem jonów toru przez cukry i ich pobieraniem w postaci chelatów torowo-cukrowych.

### 1. WSTĘP

Tor naturalny składa się głównie z jednego izotopu  $^{232}\text{Th}$ , który daje początek torowemu szeregowi promieniotwórczemu. Izotop ten ulega przemianie, a okres jego połowicznego rozpadu wynosi  $1,4 \cdot 10^{10}$  lat. Podobnie jak inne pierwiastki litofilne, jest rozpowszechniony w przyrodzie. Wskutek dużego rozproszenia tylko jego część występuje w rudach i minerałach (toryt i torianit). W złożach naturalnych towarzyszy uranowi i pierwiastkom ziem rzadkich. Otrzymuje się go z piasków monacytowych.

Tor-232 stanowi ważny surowiec do otrzymywania materiałów rozszczepialnych stosowanych w technice jądrowej. Pod działaniem neutronów ulega przemianie w  $^{232}\text{U}$ , który łącznie z  $^{235}\text{U}$  i  $^{239}\text{Pu}$  służy jako paliwo jądrowe. Zainteresowanie torem wzrasta wskutek możliwości zastosowania reaktorów wyposażonych w akcelerator neutronów. W związkach chemicznych występuje głównie na +4 stopniu utlenienia. W roztworach wodnych o pH wyższym od 3,5 ulega hydrolizie i tworzy się koloidalny wodorotlenek toru ( $\text{Th}(\text{OH})_4$ ), który wykazuje zdolność polimeryzacji.

Bioakumulacja radionuklidów, w tym toru, przez drobnoustroje (Chmielowski i in. 1993) stwarza możliwości koncentracji tych metali lub dekontaminacji środowisk skażonych.

---

\* Katedra Biochemii i Pracownia Izotopowa, Uniwersytet Śląski, Katowice.

Znaczący wkład w wyjaśnienie mechanizmów akumulacji toru przez drobnoustroje wnieśli Tsezos i Volesky (1981 i 1982). Prowadzili oni badania nad akumulacją tego nuklidu z użyciem grzybów strzępkowych *Rhizopus arrhizus*. Stwierdzili, że w akumulacji tej zaangażowane są dwa procesy.

Pierwszy z nich – to tworzenie się koordynacyjnego wiązania między torem a azotem acetylo-glukozaminy, która jest monomerem chityny budującej ścianę komórkową grzybów. W wiązaniu toru biorą też udział grupy hydroksylowe polisacharydów ściany komórkowej, które jednak kompleksują tor w mniejszym stopniu niż azot chityny. Na podstawie obserwacji wiązania toru przez czysty preparat chityny stwierdzono, że zachodzi niestechiometryczne wiązanie tego nuklidu. Jest to spowodowane konkurencyjnością jonów  $H_3O^+$ , które współzawodniczą z jonami toru w tworzeniu wiązań koordynacyjnych z azotem.

Proces drugi – to sorpcja toru w amorficznych strukturach chityny. Tor przy pH 4, wskutek hydrolizy, występuje w postaci cząsteczek  $Th(OH)_4$ , które łatwo ulegają sorpcji na powierzchni ściany komórkowej. Sorpcja produktów tej hydrolizy zachodzi na zewnętrznej części ściany komórkowej i nie jest związana z właściwym procesem wiązania toru przez chitynę.

Tor przy pH 2 występuje w roztworze w postaci jonów  $Th^{4+}$ . Obserwacje elektrownomikroskopowe, prowadzone w czasie badania akumulacji toru przez drobnoustroje, wykazały, że przy pH 2 zawartość tego metalu na zewnętrznej części ściany komórkowej była nieznaczna. Pojawiła się natomiast akumulacja wewnątrzkomórkowa. Jony  $Th^{4+}$  mają mały promień jonowy i mogą penetrować przez osłonę komórkową.

Obserwacje, dotyczące wiązania toru przez chitynę występującą w ścianie komórkowej grzybów, nie odnoszą się jednak do drożdży, których ściana komórkowa jest zbudowana głównie z polisacharydów: mannanu i glukanu.

Celem niniejszej pracy było zbadanie przebiegu akumulacji toru, dozowanego w postaci azotanu, przez szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Interesujący problem stanowiło określenie mechanizmów akumulacji oraz lokalizacji toru w strukturach komórkowych tych drobnoustrojów. Należało zatem wykazać udział hydrolizy i procesów sorpcyjnych w powierzchniowych, peryferyjnych, warstwach otoczkowych komórek oraz możliwości wewnątrzkomórkowej akumulacji toru. Wydawało się to możliwe w obecności cukrów: glukozy i fruktozy, które mogą tworzyć związki kompleksowe z różnymi metalami i podlegają degradacji przez drożdże. Pobór tych kompleksów mógł ułatwić niespecyficzną, wewnątrzkomórkową akumulację toru.

## 2. MATERIAŁY I METODYKA

Badania prowadzono przy użyciu szczepu *Saccharomyces cerevisiae*. Szczep ten jest genetycznie zbliżony do szczepu dzikiego. Posiada mutację auktotroficzną dotyczącą treoniny (Putrament i Baranowska 1971). Drożdże hodowano w kolbach płaskodennych, napowietrzanych przez wytrząsanie w temperaturze 30 °C. Skład pożywek był następujący: 1 g cukru (glukozy lub fruktozy), 0,25 g peptonu, 0,25 g ekstraktu

drożdżowego, 1000 ml wody destylowanej. Oznaczanie ilościowe cukrów glukozy i fruktozy prowadzono metodą antroniową.

Biomasę drożdży oznaczano metodą ultrafiltrów membranowych. Suchą masę drożdży podawano w gramach na litr. Niewielka zawartość związków nieorganicznych pozwalała na przyjęcie wielkości suchej masy (s.m.) za wartość biomasy drożdży.

Pomiary zmian zmętnienia zawiesiny hodowlanej dostarczały informacji o szybkości namnażania się drożdży. Hodowano je w kolbach Kletta, a mętność oznaczano za pomocą przystawki nefelometrycznej TR firmy Carl-Zeiss Jena przy długości fali 550 nm. Wartość transmisji  $T$  odczytywano przy wzmocnieniu  $W$ . Wartość zmętnienia  $M$  była ilorazem wartości  $T/W$ .

W badaniach akumulacji toru pobierano zawiesinę drożdży z komory hodowlanej i odwirowywano przy 4000 g. Osad biomasy zawieszano w wodzie redestylowanej w ilości 0,5 g s.m./l i dodawano azotan toru do stężenia 0,1 mM. W przypadku akumulacji toru, w obecności substratu cukrowego, do komory inkubacyjnej wprowadzano glukozę lub fruktozę w stężeniu 1 g/l (5,5 mM). Odczyn środowiska hodowlanego korygowano do pH 5 za pomocą 0,1 N roztworów NaOH lub HCl. Dynamikę akumulacji toru przez biomasę drożdży badano w cyklach dobowych w warunkach napowietrzania przez wytrząsanie.

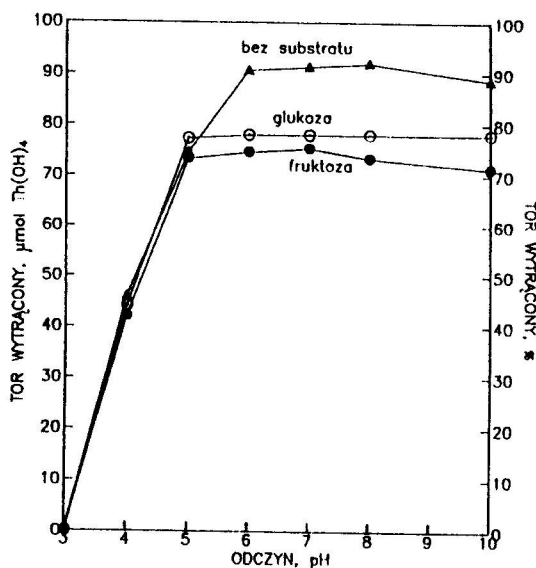
Do oznaczania toru w biomase drożdży stosowano metodę radiometryczną. Była to modyfikacja metody oznaczania uranu opracowanej przez Chwistka i innych (1988) polegająca na pomiarze scyntylacji pochodzących od cząstek  $\alpha$  emitowanych przez tor. Stosowano scyntylator żelujący o składzie: 667 ml toluenu, 333 ml tritonu, 5 g PPO, 0,1 g POPOP (Chandra i Appel 1978). Po określonym czasie inkubacji pobierano z komór doświadczalnych próby 20 ml zawiesiny drożdży i sączono na filtrach membranowych, osad zmywano 4 ml wody destylowanej do naczynka scyntylacyjnego i uzupełniano do objętości 10 ml scyntylatorem żelującym. Pomiary radiometryczne prowadzono z użyciem licznika scyntylacyjnego LKB 1219.

W celu zbadania rozmieszczenia toru akumulowanego w komórkach drożdży izolowano frakcje komórkowe zmodyfikowaną metodą Howella (1973). Komórki drożdży dezintegrowano homogenizatorem paluszkowym. Otrzymany homogenat poddawano serii wirowań w obecności sacharozy i  $\text{CaCl}_2$ , w wyniku których dokonano rozdziału na frakcje jądrową i cytoplazmatyczną. W izolowanych frakcjach komórkowych drożdży oznaczano radiometrycznie zawartość toru.

Tor akumulowany w strukturach komórkowych drożdży lokalizowano z użyciem transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Zastosowano metodę histologiczną Glauerta (1974) z modyfikacją dotyczącą utrwalania komórek drożdży. Utrwalano je 2,5% aldehydem glutarowym w buforze kakodylowym przez 48 godzin w temperaturze pokojowej. Aby zapobiec odmyciu toru akumulowanego na powierzchni komórek, stosowano zatapianie w agarze. Preparaty odwadniano etanolem. Do utwardzania próbek stosowano mieszaninę żywic eponowych. Preparaty cięto z użyciem ultramikrotomu Reichart OUM-3, a uzyskane ultracienkie skrawki obserwowano w mikroskopie elektronowym JEOL-JEN 100S.

## 3. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Do prawidłowej interpretacji przebiegu procesów akumulacyjnych ważne było zbadanie właściwości hydrolitycznych azotanu toru. W roztworach wodnych powyżej pH 3,6 tor ulega powolnej hydrolizie i tworzy koloidalny wodorotlenek toru mający zdolność polimeryzacji. Zbadano zatem zależność hydrolizy  $\text{Th}(\text{NO}_3)_4$  od pH środowiska w układach bez substratu organicznego, z glukozą lub fruktozą, w których zamierzano prowadzić badania bioakumulacyjne. Stężenie toru w komorach doświadczalnych wynosiło 0,1 mM, natomiast stężenie substratów organicznych (glukozy lub fruktozy), w obecności których przeprowadzano hydrolizę, odpowiadało 1 g/l (5,5 mM). Ustalono pH środowiska w zakresie od 3 do 10 za pomocą 0,1 N roztworów NaOH lub HCl. Stwierdzono, że przy pH od 3 do 5 ilość wytrąconego wodorotlenku toru rosła do około 93% (rys. 1.). Wartość stałej tworzenia osadu  $\text{Th}(\text{OH})_4$  jest wysoka i wynosi  $\log K_s = 44,9$  (Inczeedy 1979). W obecności glukozy lub fruktozy wytrąceniu ulegało natomiast odpowiednio 83 i 75% toru. Hamowanie hydrolizy toru w obecności cukrów mogło wskazywać, że część toru została związana w rozpuszczalnych kompleksach torowo-cukrowych.



Rys. 1. Przebieg hydrolizy toru w układzie bez substratu organicznego, z glukozą lub fruktozą w zależności od pH środowiska. Stężenie toru 0,1 mM, stężenie glukozy lub fruktozy 1 g/l (5,5 mM). Metoda wirowania wytrąconych osadów

Fig. 1. Course of the thorium hydrolysis in the system without organic substrate, with glucose or fructose depending on the pH of the medium. Concentration of thorium 0.1 mM, concentration of glucose or fructose 1 g/l (5.5 mM). Method of centrifugation of precipitated deposits

Równocześnie wykreślono krzywą wzrostu badanego szczepu drożdży w zależności od pH środowiska hodowlanego w obecności glukozy lub fruktozy. Komórki drożdży wykazywały maksymalny wzrost przy pH 6. Obniżenie odczynu hodowli poniżej pH 5 powodowało dość znaczny spadek biomasy drożdży. W badaniach akumulacyjnych stosowano więc pH 5 badanych układów, gdyż poniżej tej wartości rosła wprawdzie ilość wolnych jonów torowych, ale pogarszały się warunki wzrostowe.

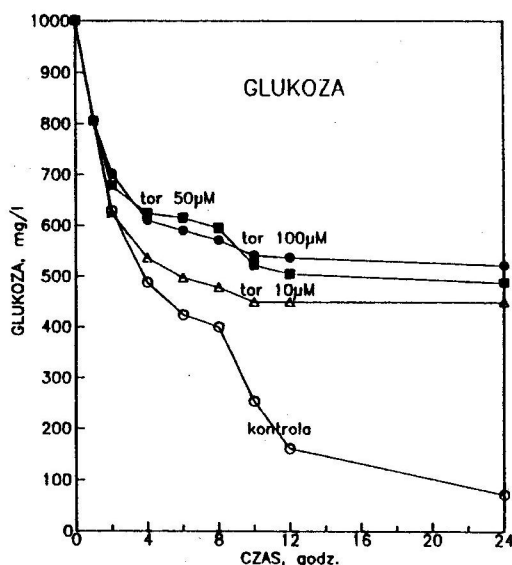
Tor, jako metal ciężki, mógł wpływać toksycznie na komórki drożdży, hamując ich aktywność metaboliczną. Celowe wydawało się zatem zbadanie wpływu obecności toru



w środowisku hodowlanym na przebieg rozkładu glukozy i fruktozy. Badania te wykazały, że tor w stężeniu 0,1 mM powodował początkowe opóźnienie, a po upływie kilku godzin zahamowanie rozkładu cukrów na przykład glukozy (rys. 2.). W dalszych badaniach akumulacyjnych należało więc stosować krótki czas kontaktu komórek drożdży z torem.

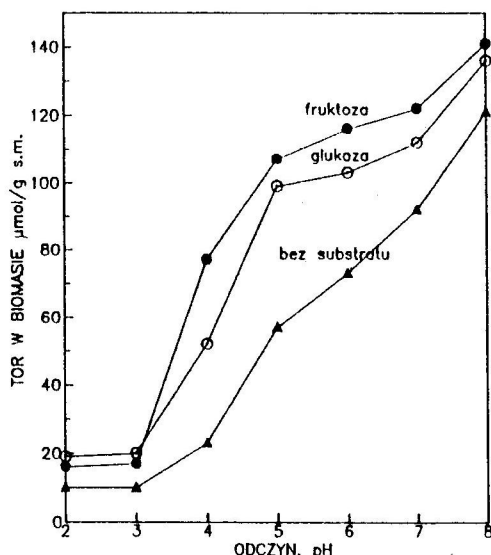
Rys. 2. Wpływ toru na rozkład glukozy przez *S. cerevisiae*. Stężenie biomasy 0,5 g/l, początkowe stężenie glukozy 1 g/l (5,5 mM), odczyn środowiska pH 5

Fig. 2. Influence of thorium on decomposition of glucose by *S. cerevisiae*. Concentration of biomass 0.5 g/l, initial concentration of glucose 1 g/l (5.5 mM), reaction of the medium pH 5



Akumulację toru przez drożdże śledzono w zakresie pH od 2 do 9 (rys. 3.). Okazało się, że przy pH 2–3 nagromadzenie toru w biomacie było nieznaczne i wynosiło od 10 do 20  $\mu\text{mol/g}$  s.m. Przy niskim pH środowiska inkubacyjnego tor występował w postaci wolnych jonów, które prawdopodobnie wykazywały niewielkie powinowactwo do ligandów ściany komórkowej drożdży. Obserwacje te były analogiczne do wyników badań nad akumulacją uranu uzyskanych przez Nakajima i in. (1979). Dalszy przebieg poboru toru różnił się jednak w sposób zasadniczy od dynamiki akumulacji uranu. Wraz ze wzrostem odczynu do pH 9 ilość toru w biomacie sukcesywnie rosła do wartości 120, 135 i 140  $\mu\text{mol/g}$  s.m. odpowiednio dla układu bezsubstratowego oraz w obecności glukozy lub fruktozy. Trudno jednak stwierdzić, czy ta ilość toru pochodziła od toru akumulowanego przez komórki drożdży, czy też była następstwem wytrącania się toru w postaci wodorotlenku wskutek hydrolizy. Możliwa była okładacja wodorotlenku toru na powierzchni komórek drożdży. Mogło także, niezależnie od biomasy, zachodzić tworzenie się aglomeratów spolimeryzowanego wodorotlenku toru. Interesujące było, że zarówno przy wysokim i niskim pH różnice między ilością toru akumulowanego w warunkach substratowych (w obecności cukrów) i bezsubstratowych były niewielkie. W środkowym natomiast zakresie badanego odczynu inkubacji ilość akumulowanego toru w obecności cukrów była znacznie większa niż w środowisku bezsubstratowym. Przy pH 5 dla warunków bezsubstratowych, z glukozą i z fruktozą wynosiła odpowiednio 57, 98, 107  $\mu\text{mol/g}$  s.m. (rys. 3.).

Ze względu na procesy zachodzące podczas akumulacji toru, do dalszych badań właściwe wydawało się przyjęcie pH 5 roztworów inkubacyjnych. Tsezos i Volesky (1982), prowadząc badania akumulacji toru przez *Rhizopus arrhizus* przy pH 2 i 5, stwierdzili większą akumulację toru przy wyższym pH, przy pH 2 natomiast znaczna ilość toru pozostawała w roztworze.



Rys. 3. Zależność akumulacji toru przez szczep *S. cerevisiae* od pH w układzie bezsubstratowym, z glukozą lub fruktozą po trzech godzinach inkubacji. Sucha masa drożdży 0,5 g/l, stężenie początkowe toru 0,1 mM, stężenie początkowe glukozy lub fruktozy 1 g/l (5,5 mM)

Fig. 3. Dependence of thorium accumulation by *S. cerevisiae* on pH in the non-substrate system, with glucose or fructose after three hours of incubation. Dry yeast mass 0.5 g/l, initial concentration of thorium 0.1 mM, initial concentration of glucose or fructose 1 g/l (5.5 mM)

Interesujące obserwacje poczynili Gadd i White (1989) śledząc przebieg akumulacji toru przez *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium italicum* i *Aspergillus niger* w warunkach silnie kwaśnego odczynu środowiska ( $\text{pH} < 1$ ). Obecność jonów  $\text{Al}^{3+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$  w środowisku inkubacyjnym prowadziła do spadku akumulacji toru, jony  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  nie wpływały natomiast na wielkość poboru tego metalu przez badane drobnoustroje. Dodanie detergentu powodowało zwiększenie akumulacji toru. Środek wpływający na zmianę napięcia powierzchniowego powodował prawdopodobnie rozluźnienie struktury ściany komórkowej i zwiększał przepuszczalność błony dla jonów toru ulegających akumulacji wewnątrzkomórkowej.

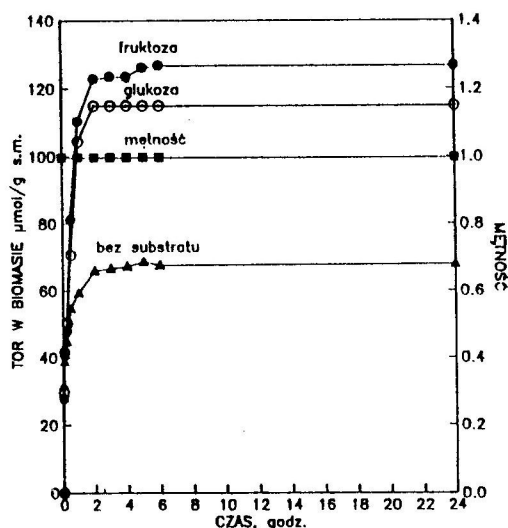
Dynamikę akumulacji toru badano w komórkach drożdży w czasie inkubacji zawiesiny 0,5 g/l biomasy w środowisku o pH 5 w warunkach napowietrzania przez wytrząsanie w temperaturze 30 °C. Początkowe stężenie azotanu toru wynosiło 0,1 mM. Badaniu poddano układ bezsubstratowy oraz zawiesinę drożdży w obecności glukozy lub fruktozy w stężeniu 1 g/l (5,5 mM) (rys. 4.). W początkowym okresie kontaktu jonów toru z komórkami drożdży poziom akumulacji tego metalu był dość znaczny i wynosił po 5 minutach około 30  $\mu\text{mol/g s.m.}$  Dalszy szybki wzrost akumulacji toru w biomacie drożdży zachodził w czasie ok. 1-godzinnej inkubacji, po czym następowała powolna stabilizacja nagromadzania nuklidu.

Proces szybkiego nagromadzania toru w komórkach drożdży był związany z mechanizmem powierzchniowego, sorpcyjnego wiązania toru przez biopolimery ściany

komórkowej drożdży. Na podobny mechanizm akumulacyjny wskazuje praca Tsezosa i Voleskyego (1982) omawiająca akumulację toru przez *Rhizopus arrhizus*, w której stwierdzono, że całkowite nasycenie biomasy grzybni torem następowało w przeciągu kilku minut. Również prace Horikoshi i in. (1981) nad poborem uranu przez niektóre drobnoustroje wskazują na głównie sorpcyjny charakter tego procesu.

Rys. 4. Dynamika akumulacji toru przez *S. cerevisiae* przy pH 5, w układzie bez substratu, z glukozą lub fruktozą. Sucha masa drożdży 0,5 g/l, stężenie początkowe toru 0,1 mM, stężenie początkowe glukozy lub fruktozy 1 g/l (5,5 mM). Zmiany mętności hodowli wyznaczone w układzie z glukozą lub fruktozą

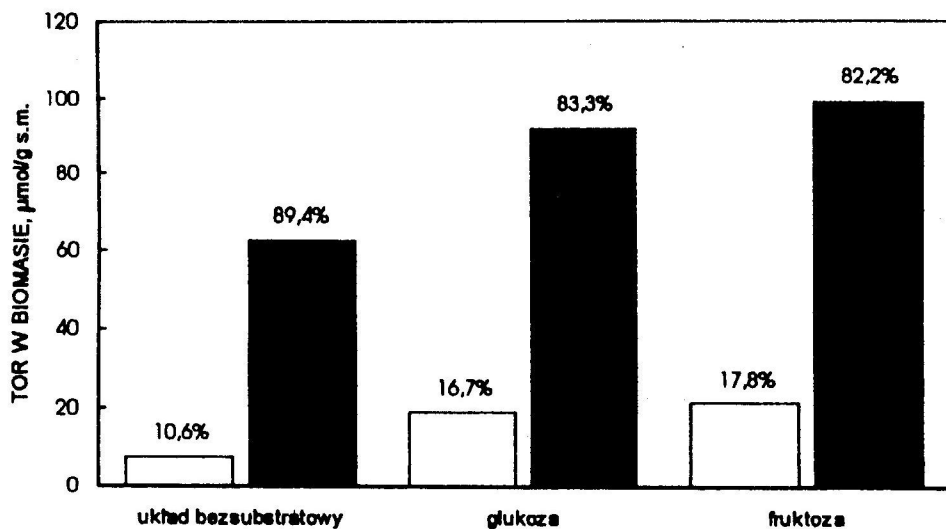
Fig. 4. Accumulation dynamics of thorium by *S. cerevisiae* at pH 5, in the system without substrate, with glucose or fructose. Dry mass of yeast 0.5 g/l, initial concentration of thorium 0.1 mM, initial concentration of glucose or fructose 1 g/l (5.5 mM). Changes in culture turbidity determined in the system with glucose or fructose



Poziom akumulacji toru przez drożdże, po trzech godzinach inkubacji w układzie bezsubstratowym, z glukozą lub fruktozą, wynosił odpowiednio 67, 115 i 123  $\mu\text{mol/g}$  s.m. co odpowiadało poborowi 33,5, 57,5 i 61,0% toru zawartego w roztworze. W przypadku obecności glukozy lub fruktozy, w środowisku inkubacyjnym obserwowano znacznie wyższy poziom nagromadzenia toru w biomacie. Wydaje się, że ten układ substratowy tworzył warunki do wystąpienia mechanizmów akumulacji niespecyficznej, w której część toru akumulowanego wewnątrzkomórkowo mogła być wnoszona w postaci kompleksu cukrowo-torowego. Na możliwość występowania takiego poboru jonów metalu wskazują prace Chmielowskiego i Kłapcińskiej (1986) oraz Kłapcińskiej i Chmielowskiego (1986). Umożliwiły one opracowanie modelu niespecyficznej akumulacji jonów metali skomplexowanych z substratem przyswajalnym przez drobnoustroje z wykorzystaniem mechanizmu transportu tego substratu (Chmielowski 1990 i 1991). Obserwacje wzrostu hodowli drożdży w czasie badania dynamiki akumulacji toru wykazywały stałość wielkości biomasy (rys. 4). Procesy akumulacyjne omawiane w niniejszej pracy, również w obecności cukrów, przebiegały w warunkach bezwzrostowych. Zwiększona akumulacja toru w tych warunkach nie była więc związana z pobieraniem tego nuklidu przez nowe komórki.

Istotne z punktu widzenia poznawczego wydawało się stwierdzenie rozmieszczenia toru w frakcjach komórkowych drożdży. W tym celu zastosowano metodę Howella (1973) polegającą na izolacji frakcji jądrowej i cytoplazmatycznej (pozajądrowej) komórek drożdży. Stwierdzono, że dystrybucja toru w tych frakcjach zależała od warunków akumulacji (rys. 5). W obecności glukozy lub fruktozy frakcja jądrowa wiązała tor

w ilości odpowiednio 19,1 oraz 22,5  $\mu\text{mol/g}$  s.m. Stanowiło to 16,7 i 17,8% ogólnej zawartości toru w biomacie drożdży. Komórki inkubowane w warunkach bezsubstratowych wykazywały obecność toru w frakcji jądrowej w ilości 7,7  $\mu\text{mol/g}$  s.m., co odpowiadało 10,6% ogólnej akumulacji tego nuklidu. Otrzymane rezultaty pozwalają stwierdzić, że tor w stosowanych warunkach 3-godzinnej inkubacji w pH 5 podlegał również poborowi wewnątrzkomórkowemu, a jego część wiązała się z chromatyną jądra komórkowego. Ilości te ulegały zwiększeniu w obecności glukozy lub fruktozy, co mogło być związane z ułatwionym niespecyficznym transportem toru w postaci kompleksów torowo-cukrowych do komórek drożdży.



Rys. 5. Dystrybucja toru w frakcji jądrowej (A) oraz w frakcji cytoplazmatycznej (B).

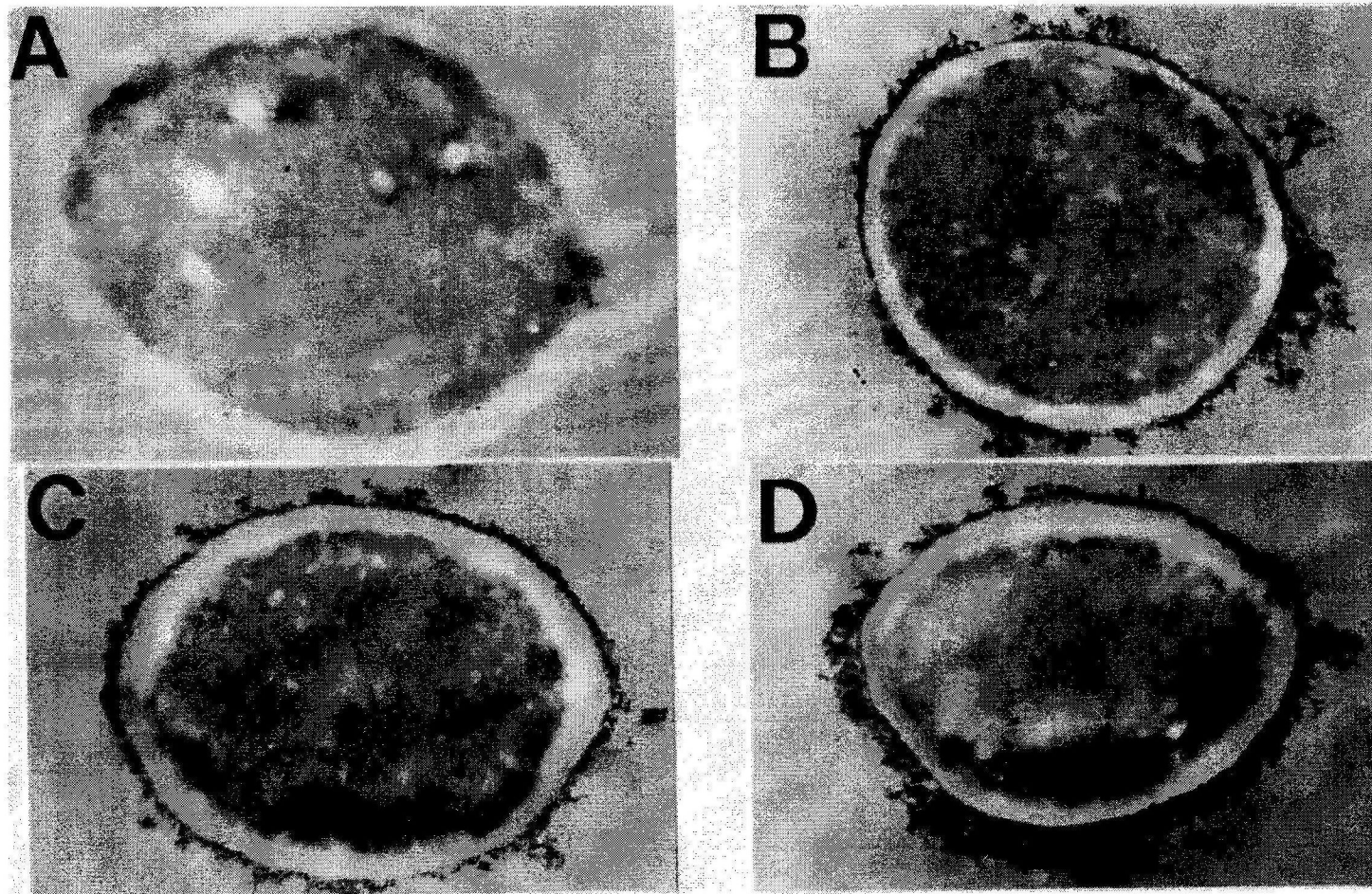
*S. cerevisiae* po akumulacji toru w układzie bezsubstratowym oraz w obecności glukozy lub fruktozy

Fig. 5. Distribution of thorium in nuclear fraction (A) and in the cytoplasmatic fraction (B).

*S. cerevisiae* after accumulation of thorium in the non-substrate system and in the presence of glucose or fructose

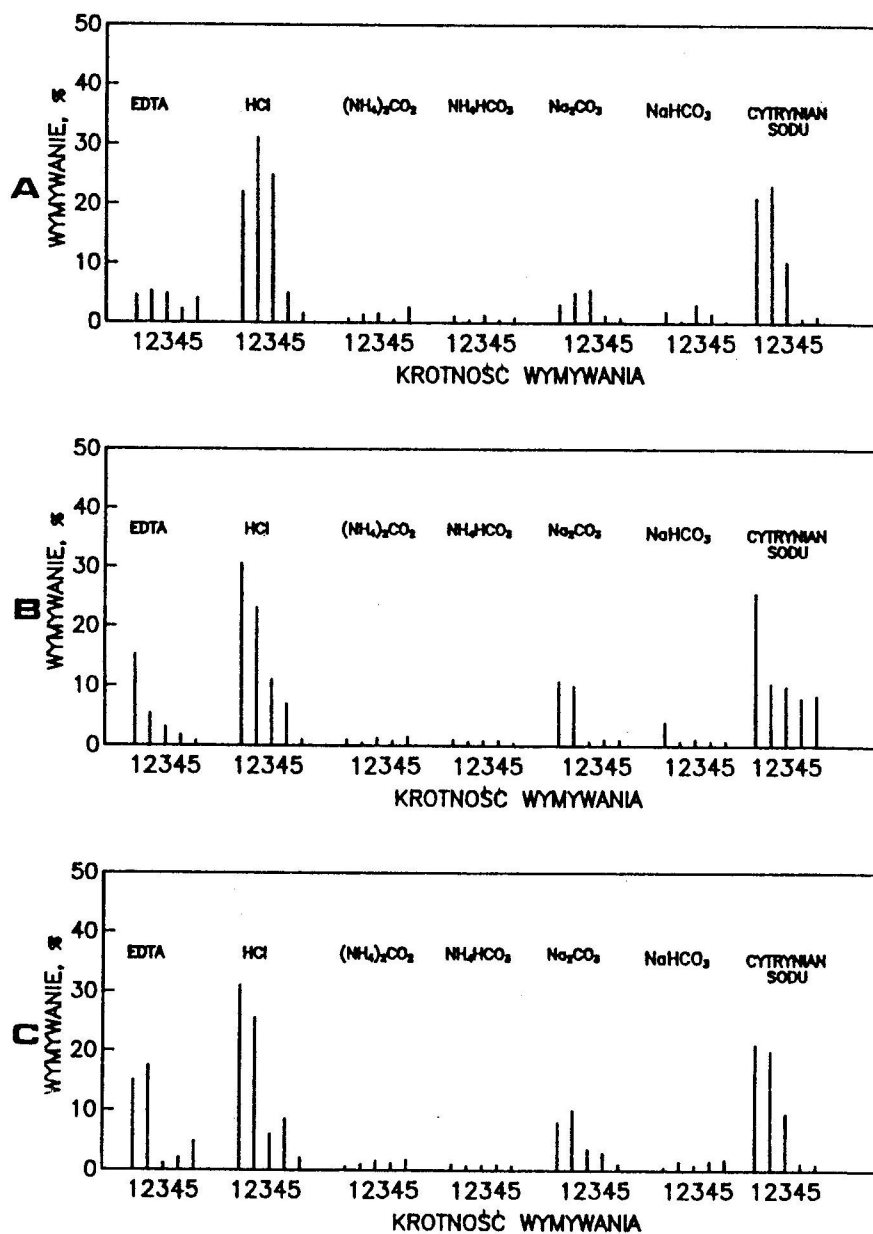
Badania lokalizacji toru w strukturach komórkowych drożdży prowadzono z zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (rys. 6). Wykazano wiązanie się toru głównie na powierzchni komórek oraz w osłonie komórkowej drożdży. W obecności fruktozy lub glukozy obserwowano również zwiększoną akumulację wewnątrzkomórkową tego nuklidu.

W celu wykazania złożonego charakteru mechanizmów akumulacji toru przez komórki drożdży, w warunkach bezsubstratowych i w obecności cukrów, zastosowano wycinanie nagromadzonego toru. Interesujące było również stwierdzenie możliwości odzysku toru akumulowanego przez komórki drożdży. Wycinanie toru prowadzono 10 mM roztworami EDTA, kwasu solnego, węglanu i kwaśnego węglanu amonu, węglanu i kwaśnego węglanu sodu oraz cytrynianu sodowego (rys. 7). Stosowano przy tym 5-krotne przemywanie biomasy odpowiednim roztworem wycimującym.



Rys. 6. Mikroskopia elektronowa ultracienkich skrawków komórek *S. cerevisiae*. Komórki kontrolne (A), komórki po akumulacji toru w warunkach bezsubstratowych (B) oraz w obecności glukozy (C) lub fruktozy (D). Powiększenie 16 000 ×

Fig. 6. Electron microscopy of ultrathin strips of *S. cerevisiae* cells. Control cells (A), cells after accumulation of thorium in non substrate conditions (B) and in the presence of glucose (C) or fructose (D). Magnification  $\times 16\,000$



Rys. 7. Zdolność różnych roztworów do wymywania toru akumulowanego przez *S. cerevisiae* w układzie bezsubstratowym (A), z glukozą (B) lub fruktozą (C), wyrażona w procentach wymywanego toru

Fig. 7. Ability of different solutions to wash out thorium accumulated by *S. cerevisiae* in the non-substrate system (A), with glucose (B) or fructose (C), expressed in the per cent of washed out thorium



Stwierdzono, że roztwory węglanów miały słabe zdolności wymywania toru z biomasy drożdży, przeciwnie niż w przypadku wymywania uranu tworzącego rozpuszczalne kompleksy uranylu z węglanem (Horikoshi i in. 1979).

Całkowita wielkość wymywania toru (po 5-krotnej elucji) przez węglany była rzędu kilku procent, z wyjątkiem węglanu sodu, który uwalniał nieco więcej akumulowanego toru. Również niewielki procent odzysku toru uzyskiwano w przypadku stosowania EDTA jako czynnika kompleksującego. Należało spodziewać się, że jeśli tor ulegał w procesie inkubacji wytrąceniu wskutek hydrolizy i okłudacji na komórkach drożdży, utrudnione było jego wiązanie przez czynniki kompleksujące. Wodorotlenek toru wytrącony podczas hydrolizy mógł także stanowić barierę utrudniającą penetrację ligandów kompleksujących do wnętrza komórki.

Lepsze rezultaty wymywania toru z biomasy drożdży udało się uzyskać po zastosowaniu roztworów wymywaczy zakwaszających. Całkowite wymycie toru roztworem cytrynianu sodu kształtowało się w granicach 60%. Najlepszy jednak efekt wymycia obserwowano po użyciu roztworu HCl, który uwalniał tor w ogólnej ilości odpowiednio 83,5, 72,7 i 72,7% dla układu bezsubstratowego, z glukozą lub fruktozą.

W procesie wymywania toru z biomasy drożdży istotne znaczenie ma odczyn roztworu wymywającego. Niskie wartości tego odczynu powodowały, że tor wytrącony w komórkach drożdży w postaci  $\text{Th}(\text{OH})_4$  ulegał roztworzeniu i przechodził w formę jonową. Na taką możliwość wskazują stałe trwałości tworzenia kompleksów toru (Sillen i in. 1971) wynoszące dla cytrynianów  $\log K = 1,11$ ; dla HCl  $\log K = 1,71$  w porównaniu ze znacznie większą wartością dla EDTA  $\log K = 30,2$  (Inczedy 1979). Uzyskane wyniki pozwalają też stwierdzić, że jedynie odzysk toru z biomasy drożdży za pomocą roztworu HCl mógłby wykazywać pewien aspekt praktyczny.

Szczep *S. cerevisiae* wykazał istotny udział sorpcji powierzchniowej w wiązaniu toru oraz osadzenie się produktów hydrolizy na powierzchni komórek drożdży. Obecność łatwo przyswajalnych cukrów: glukozy i fruktozy sprzyjała akumulacji wewnątrzkomórkowej, w której mógł brać udział niespecyficzny transport toru w postaci kompleksów torowo-cukrowych.

#### LITERATURA

- CHANDRA P., APPEL W. (1978), *Metody badawcze stosowane w biologii molekularnej*, Warszawa, PWN.
- CHMIEŁOWSKI J., KŁAPCĨNSKA B. (1986), *Bioaccumulation of germanium by Pseudomonas putida in the presence of two selected substrates*, Appl. Environ. Microbiol. **51**, s.1099.
- CHMIEŁOWSKI J. (1990), *Extraction and concentration of metals by microorganisms*, Wiss. Zeitschr. THLM, **32**, s. 364.
- CHMIEŁOWSKI J. (1991), *Mechanizmy ługowania i akumulacji metali przez drobnoustroje*. Biotechnologia; **13-14**; s. 63.
- CHMIEŁOWSKI J., WOŹNICA A., PYTLAK M. (1993), *Akumulacja i ługowanie radionuklidów przez drobnoustroje*, Fizykochemiczne Problemy Mineralurgii, **27**, s. 227.
- CHWISTEK M., CHMIEŁOWSKI J., TOMZA I. (1988), *Radiometric determination of uranium accumulated in bacterial cells*. Talanta **35**, s. 227.



- GADD G.M., WHITE C. (1989), *Removal of thorium from simulated acid process streams by fungal biomass*. Biotechnol. Bioeng., **33**, s. 592.
- GLAUERT I.M. (1974), *Practical methods in electron microscopy*, Amsterdam, North-Holland.
- HORIKOSHI T., NAKIJAMA A., SAKAGUCHI T. (1979), *Uptake of uranium by Chlorella regularis*. Agric. Biol. Chem., **43**, s. 617.
- HORIKOSHI T., NAKIJAMA A., SAKAGUCHI T. (1981), *Studies on accumulation of heavy metal elements in biological systems*. XIX Accumulation of uranium by microorganisms, Appl. Microbiol. and Biotechnol., **12**, s. 90.
- HOWELL S.H. (1973), *The isolation and analysis of DNA from eucaryotic cells*, w: Nuclear techniques and approaches in developmental biology, New York, J. Willey.
- INCZEDY J. (1979), *Równowagi kompleksowania w chemii analitycznej*, Warszawa, PWN.
- KLAPCIŃSKA B., CHMIEŁOWSKI J. (1986), *Binding of germanium to Pseudomonas putida cells*, Appl. Environ. Microbiol. **51**, s. 1144.
- NAKAJIMA A., HORIKOSHI T., SAKAGUCHI T. (1979), *Ion effects on the uptake of uranium by Chlorella regularis*, Agric. Biol. Chem., **43**, s. 625.
- PUTRAMENT A., BARANOWSKA H. (1971), *Induction of intragenic mitotic recombination in yeast by hydroxylamine and its mutagenic specificity*, Molec. Gen., **111**, s. 89.
- SILLEN L.G., MARTELL A.E. (1971), *Stability constants of metal ion complex*, London, The Chemical Society, (1964), Supplement.
- TSEZOS M., VOLESKY B. (1982), *The mechanisms of thorium biosorption by Rhizopus arrhizus*. Biotechnol. Bioeng., **24**, s. 955.
- TSEZOS M., VOLESKY B. (1981), *Biosorption of uranium and thorium*. Biotechnol. Bioeng., **23**, s. 583.

**Chmielowski J., Pytlak M., Chwistek M., Woźnica A., (1994), Accumulation of thorium by yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Physicochemical Problems of Mineral Processing, 28, 125–136 (Polish text)**

The research on the accumulation of thorium by yeast *Saccharomyces cerevisiae* enabled the evaluation of mechanisms of this process. A significant contribution of surface sorption and occlusion phenomena into thorium binding was evidenced. This was facilitated by an aptitude of thorium compounds for hydrolysis and deposition of the precipitates at the surface of yeast cells, as it was revealed in electron-microscope observations. These precipitates as well as thorium compounds sorbed at the cell surface could be washed out by hydrochloric acid or citrate. In the presence of readily assimilated sugar substrates: glucose or fructose, an enhanced thorium uptake was observed mainly due to its intracellular accumulation. This was revealed by observations under electron microscope and in the study of thorium distribution among isolated cell fractions of yeast. It was presumed that one of the mechanisms of thorium transport and intracellular accumulation in the presence of sugar substrates consisted in chelation of thorium ions by sugars and uptake of thorium-sugar chelates by the cells.