

A. DANCH
A. KASPRZAK
J. CHMIELEWSKI

Zakład Biochemii, Uniwersytet Śląski, Katowice

BIOAKUMULACJA MIEDZIOWCÓW PRZEZ DROBNOUSTROJE

Badania wcześniejsze [1, 2] wykazały zdolność mieszanych populacji drobnoustrojów oraz czystego szczepu Pseudomonas putida do bioakumulacji niektórych metali i metaloidów w biomasie komórkowej. Stwierdzono zależność przebiegu oraz maksymalnego poziomu tej akumulacji od substratu organicznego hodowli drobnoustrojowej oraz od położenia cięższych pierwiastków w IV okresie układu okresowego. Wykazano, że substraty organiczne posiadające zdolność tworzenia kompleksów z metalami (na przykład pirokatechina) wpływają na zwiększony poziom akumulacji pierwiastka w biomasie. Można więc spodziewać się, że tak związane metale w postaci kompleksów metaloorganicznych przechodzą przez błonę komórkową drobnoustrojów drogą niespecyficznego transportu wraz z substratem [3].

Interesująca była obserwacja zachowania się miedziowców w warunkach umożliwiających drobnoustrojową akumulację obecności substratów organicznych o różnych zdolnościach kompleksowania. Dotychczas było wiadomo, że miedź łatwo ulega akumulacji w komórkach niektórych mikroorganizmów wodnych [4]. Obserwowano również zdolność drożdży [5] i glonów [6] do bioakumulacji miedzi. CHARLEY i BULL [7] wykazali możliwość bioakumulacji srebra przez Pseudomonas moltophilia oraz kultury wielobakteryjne.

Bardziej ograniczone są informacje o bioakumulacji złota przez drobnoustroje.

Celem niniejszej pracy było poznanie przebiegu bioakumulacji miedziowców w biomasie mieszanej populacji drobnoustrojów w obecności różnych substratów organicznych; pirokatechiny, fenolu, sacharozy i octanu.

Materiały i metody

Mieszana populacja drobnoustrojów

Drobnoustroje populacji mieszanej uzyskiwano przez przetworzenie osadów organicznych po fermentacji metanowej w aglomeraty osadu czynnego. Drobnoustroje zasiedlające te aglomeraty poddawano indukcji enzymatycznej w celu przystosowania do rozkładu wybranych związków organicznych. Stosowano intensywne napowietrzanie zawiesiny drobnoustrojów. Aeracja zapewniała dopływ tlenu oraz pełne wymieszanie zawiesiny drobnoustrojów i cieczy w komorze hodowlanej. Indukcję enzymatyczną drobnoustrojów populacji mieszanej prowadzono w warunkach aeracji periodycznej w temperaturze około 20° C. W odstępach dobowych dodawano do komory hodowlanej progresywnie wzrastające dawki substratu organicznego w zakresie od 50 do 500 mg/l (0,45 do 4,8 mM). Deficyt pierwiastków biogennych pokrywano przez codzienne dawkowanie fosforanu i siarczanu amonu. Stężenie substratu organicznego zwiększano po stwierdzeniu całkowitego rozkładu poprzedniej dawki w ciągu 24 godzinnej aeracji. Środowisko odświeżano przez codzienne dekantowanie masy drobnoustrojów i zastępowania cieczy nadosadowej wodą wodociągową. Mieszaną populację drobnoustrojów przystosowywano do rozkładu substratowej pirokatechiny, fenolu i sacharozy.

Odczynniki

Do sporządzenia krzywych wzorcowych oznaczeń analitycznych oraz w badaniach bioakumulacji stosowano $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, AgNO_3 oraz HAuCl_4 .

Pożywka hodowlana stosowana w badaniach bioakumulacji zawierała jeden z substratów organicznych (pirokatechinę, fenol, sacharozę) w stężeniu około 3,6 mM lub octan (10 mM) oraz fosforan i siarczan amonu w takiej ilości by zachować w podłożu hodowlanym stosunek C:N:P wynoszący około 100:10:1. Woda wodociągowa stosowana w hodowlach była źródłem pierwiastków śladowych.

Oznaczanie substratów organicznych

Stężenie pirokatechiny w cieczy nadosadowej oznaczano kolorymetrycznie metodą EVANSA [8]. Fenol oznaczano również metodą kolorymetryczną. W metodzie tej wykorzystywano zdolność fenoli jednowodorotlenowych do tworzenia związków barwnych w reakcji sprzęgania ze zdwuazowaną p-nitroaniliną [9]. Oznaczenia te wykonywano posługując się spektrokolorymetrem Specol firmy Carl-Zeiss, Jena.

Oznaczanie suchej masy i biomasy
drobnoustrojów populacji mieszanej

Oznaczanie suchej masy i biomasy drobnoustrojów przeprowadzano metodą ultrafiltrów membranowych. Badaną próbkę zawiesziny drobnoustrojów o objętości 25 ml sączone przez zważony filtr membranowy Co-5, następnie filtr z masą drobnoustrojów suszono w temperaturze 105° C do stałej wagi. Różnicy ciężarów obliczano suchą masę drobnoustrojów wyrażoną w mg/l cieczy w komorze hodowlanej. Filtr z suchą masą spalano następnie w piecu mufowym w temperaturze 600° C. Z różnicy ciężarów suchej masy osadu i pozostałości po spaleniu próby wyznaczano wartość po prażeniu. Wartość tę utożsamiano z biomasą drobnoustrojów populacji mieszanej, którą wyrażano w mg/l cieczy w komorze hodowlanej.

Oznaczanie zawartości metali metodą spektrofotometrii
absorpcji atomowej

W celu oznaczenia miedzi, srebra i złota w cieczy nadosadowej oraz w biomasie drobnoustrojów populacji mieszanej posługiwano się metodą spektrofotometrii absorpcji atomowej. Oznaczenia te prowadzono przy pomocy spektrofotometru absorpcji atomowej firmy Varian typ AA6.

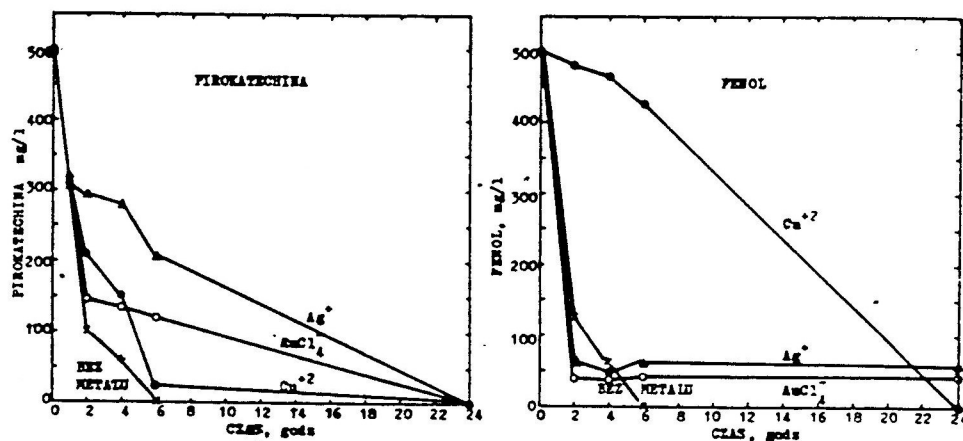
Do oznaczania metali w cieczy nadosadowej pobierano 25 ml zawiesziny bakteryjnej. Po odwirowaniu w wirówce typu K-70, przez 15 minut przy 5000 obr./min. stężenie metali oznaczano bezpośrednio w supernatancie przy pomocy spektrofotometru absorpcji atomowej.

W celu oznaczenia metali w biomasie prowadzono mineralizację masy drobnoustrojowej na mokro. Osad po odwirowaniu przenoszono niewielką ilością wody 10 ml H₂O i 10 ml HNO₃ stęż. do kolb Kjejdahla i mineralizowano, po czym zawartość kolb przenoszono do próbek i uzupełniano wodą do 10 ml. Zmineralizowane próby zawierające złoto uzupełniano do 10 ml stężonym HCl w celu uzyskania klarownego roztworu zawierającego złoto w postaci HAuCl₄. Wielkość akumulacji metali wyrażano w μM na gram biomasy (straty po prażeniu suchej masy drobnoustrojów).

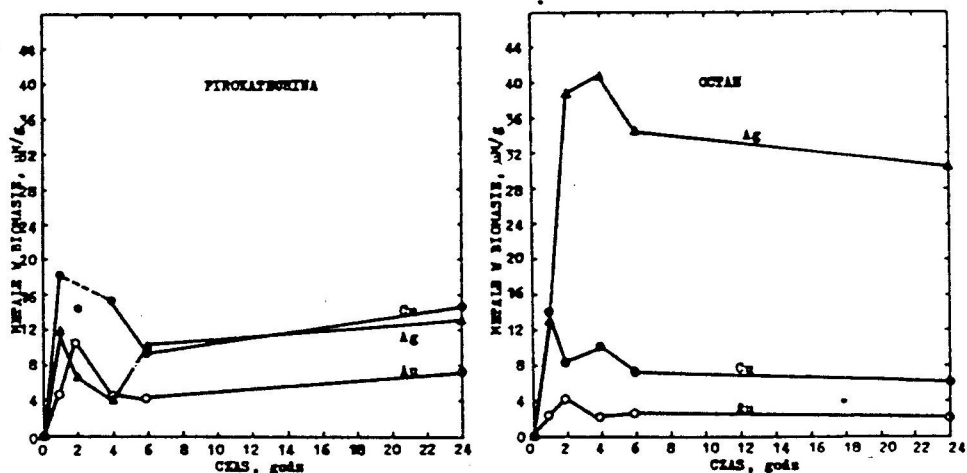
Wyniki

Badania przebiegu bioakumulacji miedziowców w procesie biodegradacji substratów organicznych prowadzono posługując się mieszaną populacją drobnoustrojów przystosowaną do rozkładu tych substratów. Obserwacje prowadzono w napowietrzanych komorach szklanych o pojemności 1 l w warunkach hodowli statycznej w temperaturze około 20 °C w czasie 24 godzin-

nej aeracji. W pobieranych próbach oznaczano w cieczy nadosadowej stężenie substratu organicznego, w biomacie natomiast określano zawartość skumulowanego metalu.



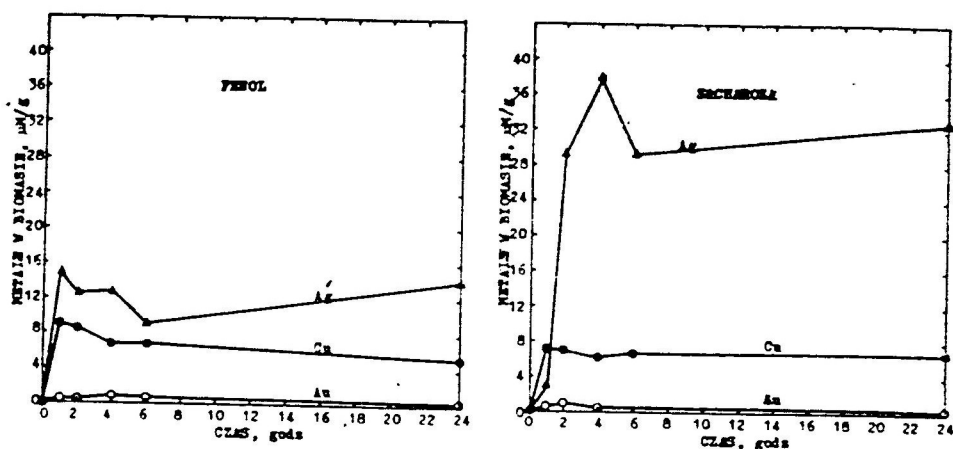
Rys. 1. Wpływ miedziowców w stężeniu 0,1 mM na przebieg biodegradacji fenoli o stężeniu wyjściowym 500 mg/l (4,8 mM). Biomasa drobnoustrojów około 2 g/l



Rys. 2. Dynamika bioakumulacji miedziowców z roztworów o stężeniu 0,1 mM w biomacie drobnoustrojów populacji mieszanej w obecności pirokatechiny o wyjściowym stężeniu 3,6 mM lub octanu 10 mM. Biomasa drobnoustrojów około 2 g/l

Stwierdzono zależność przebiegu biodegradacji substratów o strukturze aromatycznej (pirokatechiny i fenolu) od rodzaju miedziowca; jonów miedzi, srebra i złota w stężeniu 0,1 mM (rys. 1). Ujawnił się

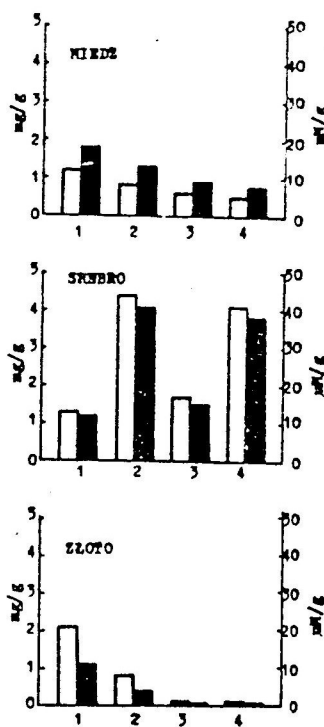
szczególnie wyraźny wpływ inhibycyjny jonów miedzi na degradację fenolu przez drobnoustroje.



Rys. 3. Dynamika bioakumulacji miedziowców z roztworów o stężeniu 0,1 mM w biomase drobnoustrojów populacji mieszanej w obecności fenolu o wyjściowym stężeniu 3,6 mM lub sacharozy 3,6 mM. Biomasa drobnoustrojów około 2 g/l

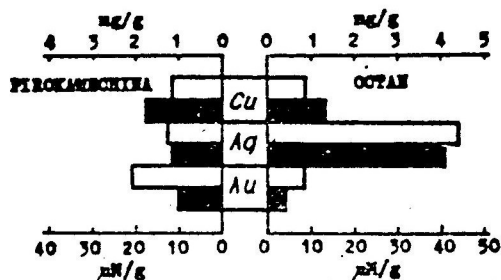
Wykazano zdolność miedziowców wprowadzanych w postaci jonów Cu^{+2} , Ag^{+} i $(\text{AuCl}_4)^{-}$ w stężeniu 0,1 mM do bioakumulacji w biomase drobnoustrojów populacji mieszanej w obecności pirokatechiny (3,6 mM) octanu (10 mM), sacharozy (3,6 mM) i fenolu (3,6 mM) (rys. 2 i 3). W obecności pirokatechiny obserwowano zbliżony przebieg bioakumulacji wszystkich miedziowców. W obecności pozostałych substratów energetycznych wyraźnie lepiej akumulacji podlegało srebro.

Porównanie maksymalnych poziomów bioakumulacji pozwoliło na próbę określenia

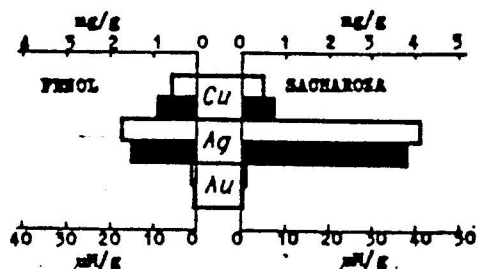


Rys. 4. Poziom bioakumulacji miedziowców w biomase drobnoustrojów populacji mieszanej w zależności od rodzaju substratu energetycznego; 1-pirokatechyna, 2-octan, 3-fenol, 4-sacharoza. Pola białe określają wielkość bioakumulacji wyrażonej w mg/g zaś zaciemnione w $\mu\text{M/g}$ biomasy

zależności wielkości akumulacji miedzi, srebra i złota w biomase od substratu organicznego hodowli drobnoustrojowej (rys. 4) oraz od położenia metalu w podgrupie miedziowców (rys. 5). Akumulacja miedzi i złota lepiej przebiegała w obecności pirokatechiny, srebro natomiast zdecydowanie lepiej ulegało akumulacji w hodowlach z octanem i sacharozą.



Wyższy poziom złota w biomacie drobnoustrojów w obecności pirokatechiny oraz zmiana barwy kompleksu chlorozłotowego w jej obecności pozwalały przypuszczać, że złoto daje połączenia kompleksowe z tym związkiem.



Rys. 5. Poziom bioakumulacji miedziowców w biomacie drobnoustrojów populacji mieszanej w zależności położenia pierwiastka w grupie. Pola białe określają wielkość bioakumulacji wyrażonej w mg/g zaś zaciemnione w µM/g biomasy

Dyskusja

W literaturze znajduje się wiele przykładów akumulacji miedziowców przez drobnoustroje [4, 7]. Wcześniejsze badania [1, 2] wykazały zdolność drobnoustrojów do podwyższonej bioakumulacji niektórych pierwiastków (Zn, Ga, Ge, As, Se, Sn, Pb) w obecności substratów energetycznych, które mogą w sposób samorzutny tworzyć kompleksy z tymi metalami. Pobór tak skompleksowanych jonów metali może następować wskutek niespecyficznego transportu z wykorzystaniem mechanizmów przenoszenia substratów energetycznych do komórki drobnoustrojowej [3].

Interesujące było stwierdzenie możliwości zwiększonej akumulacji miedzi, srebra i złota przez drobnoustroje w obecności substratów organicznych o różnej zdolności kompleksowania. Na uwagę zasługiwała pirokatechina, która łatwo tworzy kompleksy z wieloma metalami oraz octan, który cechuje się ograniczoną zdolnością tworzenia kompleksów. Obserwacje te uzupełniały badania bioakumulacji miedziowców w obecności degradowanej sacharozy lub fenolu.

Badania bioakumulacji miedziowców należało poprzedzić przez stwierdzenie wpływu jonów miedzi, srebra i złota w stężeniu 0,1 mM na prze-

bieg biodegradacji wybranych substratów energetycznych o stężeniu 500 mg/l / 4,8 mM. Wykazano silniejszy wpływ hamujący jonów srebra na biodegradację pirokatechiny zaś miedzi na biochemiczny rozkład fenolu (rysunek 1).

Proces bioakumulacji jonów miedzi, srebra i złota przez drobnoustroje populacji mieszanej obserwowano w czasie dobowej aeracji w obecności małych stężeń tych metali wynoszących 0,1 mM. Wyniki tak przeprowadzonych badań dawały niższe zawartości metali w biomacie niż podane w literaturze na przykład dla miedzi [4]. Stwierdzono, że z pośród miedziowców szczególnie łatwo podlegało akumulacji srebro przez mieszaną populację drobnoustrojów w czasie rozkładu octanu (4,4 mg Ag/g biomasy) i sacharozy (4,1 mg Ag/g biomasy). Na możliwość akumulacji srebra przez bakterie rodzaju *Pseudomonas* zwraca też uwagę praca Charley'a i Bull'a [7].

W nieco mniejszych ilościach w porównaniu ze srebrem bioakumulacji podlegała miedź. Pirokatechina i octan, które mogą z jonem miedzi tworzyć związki kompleksowe, umożliwiały nieco większą akumulację tego metalu (około 1 mg/g biomasy) niż fenol i sachroza (około 0,5 mg Cu/g biomasy) (rys. 2-5).

Złoto wprowadzane do hodowli w postaci anionu chlorozłotowego podlegało widocznej bioakumulacji tylko w obecności pirokatechiny (2 mg Au/g biomasy) i octanu (0,8 mg Au/g biomasy) (rys. 2-5). Jednak zawartość tego pierwiastka w biomacie drobnoustrojów w hodowli z pirokatechiną była ponad dwukrotnie wyższa niż w hodowli z octanem. Pozwalało to wnioskować, że pirokatechina jest szczególnie dogodnym substratem umożliwiającym akumulację złota przez drobnoustroje populacji mieszanej.

Wydaje się więc prawdopodobne, że złoto i pozostałe metale grupy miedziowców podlegały akumulacji w postaci kompleksów metaloorganicznych z substratami energetycznymi, tworzącymi się samoistnie w środowisku hodowlanym drobnoustrojów.

LITERATURA

- [1] Chmielowski J., Olczak Cz., "Accumulation of germanium by microorganisms during the biochemical degradation of phenolic compounds" - 10th FEBS Meeting, Paris, Abstract No 1119 (1975).
- [2] Chmielowski J., Danch A., Kłapciński B., "Bioaccumulation of some heavier elements of IV period by microorganisms" - 12th FEBS Meeting Dresden, Abstract No 3940 (1978).
- [3] Chmielowski J., "Bioaccumulation of germanium as a model for the nonspecific uptake of some metals by microorganisms" - 14th FEBS

- Meeting, Edinburgh (1981).
- [4] Pawlaczyk-Szpilowa K., *Postępy Mikrobiologii* 15, (1976), 17.
 - [5] Wakatsuki T., Imahara H., Kitamura T., Tanaka H., *Agric. Biol. Chem.* 43, (1979), 1687.
 - [6] Nakajima A., Horikoshi T., Sakagouchi T., *Agric. Biol. Chem.* 43, (1979), 1455.
 - [7] Cherley R.C., Bull A.T., *Arch. Microbiol.* 123 (1979) 239.
 - [8] Evans W.C., *Biochem. J.* 41 (1947), 373.
 - [9] Lurie J.I., Rybnikova A.J., "Chemiczeskij analiz proizvodstviennykh stocznykh wod" - Goschimizdat, Moskwa (1968).

BIOACCUMULATION OF COPPER GROUP METALS BY MICROORGANISMS

The aim of this investigation was to study the bioaccumulation of copper group metals by mixed population of microorganisms in the presence of different organic substrates. A mixed population of microorganisms induced to the biodegradation of the aromatic structure of catechol or phenol was used. The medium contained four selected substrates; catechol (3,6 mM), sucrose (3,6 mM), phenol (3,6 mM) or acetate (10 mM) as sole carbon source. Catechol and sucrose had a significant ability to form the complex compounds with metals under study. These metals were introduced into the medium as free or complexed ion (Ag^+ , Cu^{+2} , $(\text{AuCl}_4)^-$). Marked inhibitory effect of the copper family metals on biodegradation of the aromatic structure of phenol and catechol was observed. This phenomenon was especially visible during the degradation of phenol in the presence of copper. It was also found that copper group metals could be accumulated in the biomass of the mixed population of microorganisms and that this process depended upon the organic substrate used. The substrates having several hydroxyl groups, like catechol and sucrose and exhibiting an ability to form easily the complex compounds enabled the intensive bioaccumulation of the copper family metals in the biomass. Acetate which gave no complex compounds with a majority of elements appeared to be a good ligand for copper and silver. Gold, forming a spontaneous complex with catechol, was accumulated in the presence of this substrate.