

B. KŁAPCINSKA, J. CHMIEŁOWSKI

Zakład Biochemii, Uniwersytet Śląski, Katowice

TRANSPORT I LOKALIZACJA GERMANU W KOMÓRKACH
PSEUDOMONAS PUTIDA AKUMULUJĄCYCH TEN PIERWIASTEK

W badaniach wcześniejszych [7,8,10,18] stwierdzono, że mieszan populacje drobnoustrojów i czyste kultury Pseudomonas sp., przystosowane drogą indukcji enzymatycznej do biodegradacji struktury aromatycznej, posiadały zdolność akumulowania germanu w obecności substratów ortodwuhydroksyfenolowych, tworzących połączenie kompleksowe z germanem.

Badania niniejsze zmierzały do wyjaśnienia mechanizmu bioakumulacji i transportu germanu do komórek bakterii Pseudomonas putida w obecności pirokatechiny łatwo kompleksującej german [5] lub octanu sodu, będącego substratem nie tworzącym połączeń kompleksowych z tym pierwiastkiem. Interesująca też była obserwacja nagromadzenia germanu przez te bakterie w warunkach bezsubstratowych. Podjęto również próbę identyfikacji germanu we frakcjach komórkowych Pseudomonas putida akumulujących ten pierwiastek.

Materiały i metody

Szczepły bakteryjne i warunki prowadzenia hodowli

Badania akumulacji germanu prowadzono stosując dziki szczep Pseudomonas putida ATCC 33015 otrzymany od WILLIAMSa [20]. Był to szczep zawierający plazmid TOL. W celu przystosowania bakterii do rozkładu substratu aromatycznego drogą indukcji enzymatycznej, prowadzono hodowlę ciągłą w chemostacie typu Biostal firmy Braun, Melsungen. Stosowano stałą szybkość przepływu pożywki zawierającej pirokatechinę w stężeniu zmienianym progresywnie od 0,45 do 3,6 mM (od 50 do 400 mg/l).

Po adaptowaniu bakterii do biodegradacji pirokatechiny w stężeniu 3,6 mM stopniowo zmniejszano czas retencji w reaktorze chemostatu z 10 do 7 godzin. Hodowlę Pseudomonas putida i badania transportu germanu prowadzono w temperaturze 30°C.

Część doświadczeń wykonano posługując się plazmidowym szczepem Pseudomonas putida ATCC 33015 poddanym 21-dniowej represji enzymatycznej. W tym celu hodowlę bakterii prowadzono w warunkach stacjonarnych z napowietrzaniem przez wytrząsanie, stosując octan sodu w stężeniu 10 mM jako substrat wzrostowy. Główne badania bioakumulacji i transportu germanu do komórek Pseudomonas putida prowadzono w warunkach hodowli stacjonarnej z napowietrzaniem przez wytrząsanie w temperaturze 30°C.

Bakterie do badań pobierano z odpływu z chemostatu, odwirowywano przez 15 minut przy 4500 obrotów na minutę i przenoszono do kolby zawierającej równą objętość pożywki mineralnej oraz pirokatechinę w stężeniu 3,6 mM. Kolbę umieszczano w wytrząsarce i po 4 godzinnej inkubacji bakterie ponownie odwirowywano. Oddzieloną biomasę bakterii zawieszano następnie w równej objętości pożywki mineralnej bez ekstraktu drożdżowego zawierającej 3,6 mM pirokatechiny lub 10 mM octanu oraz german dodawany w postaci dwutlenku germanu w stężeniu 0,1 do 2 mM. W takich warunkach german w środowisku bezsubstratowym lub zawierającym octan sodu, występował w postaci anionu $[\text{GeO}_3\text{H}]^-$ [13]. W przypadku, gdy w środowisku hodowlanym znajdowała się pirokatechina, german tworzył spontanicznie związek kompleksowy, w którym stosunek dwutlenku germanu do liganda organicznego odpowiadał 1:2 [5]. Samorzutnie tworzenie się kompleksu germanu z pirokatechiną w środowisku wodnym wykazano spektrofotometrycznie. Zawartość pirokatechiny w środowisku hodowlanym oznaczono kolometrycznie metodą EVANSA [12].

Pożywki

W hodowli ciągłej bakterii Pseudomonas putida ATCC 33015 prowadzonej w chemostacie. Stosowano pożywkę używaną przez KOJIMA i innych [15] w badaniach nad indukcją enzymów biorących udział w biodegradacji pirokatechiny. Pożywka ta zawierała w 1 litrze roztworu Na_2HPO_4 - 1,5 g; KH_2PO_4 - 0,5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2 g; ekstrakt drożdżowy - 1,0 g oraz pirokatechinę. Odczyn pożywki odpowiadał pH 7,3. W badaniach bioakumulacji i transportu germanu stosowano tę pożywkę mineralną bez ekstraktu drożdżowego.

Hodowlę periodyczną Pseudomonas putida z użyciem octanu sodu

jako jedyne źródła węgla prowadzono stosując pożywkę mineralną PRA-KASAM-DONDERO [19] o pH 7,3 zawierającą w 1 l roztworu: K_2HPO_4 - 1,0 g; $(NH_4)_3PO_4 \cdot 3H_2O$ - 0,325 g; NaCl - 0,05 g; $CaCl_2$ - 0,098 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,05 g; $FeCl_3$ - 0,01.

Równocześnie z badaniami bioakumulacji germanu wyznaczono krzywe wzrostu bakterii. Mętność kultury oznaczano nefelometrycznie przy długości fali 550 nm.

Oznaczanie zawartości germanu w biomasie drobnoustrojowej i w supernatancie

German wprowadzono do środowiska hodowlanego w postaci dwutlenku germanu. Wszystkie roztwory germanu używane w badaniach bioakumulacji tego pierwiastka przez bakterie Pseudomonas putida były znakowane przy pomocy ^{71}Ge . W tym celu dodawano do hodowli, zawierającej nieznakowany german, roztwór $^{71}GeO_2$ w ilości uzależnionej od aktywności preparatu. Znakowany dwutlenek germanu ($^{71}GeO_2$, półokres rozpadu 11,4 dni, aktywność wyjściowa 3,7 MBq) był wyprodukowany w OPIDI w Świerku metodą napromieniowywania GeO_2 w strumieniu neutronów.

Zawartość germanu w biomasie bakteryjnej i supernatancie oznaczano metodą radiometryczną opracowaną przez CHWISTKA [9] wykorzystując technikę scyntylacji cieczowej. Pobraną zawiesinę bakteryjną przemywano równą objętością pożywki mineralnej KOJIMA bez ekstraktu drożdżowego, zawieszano w 4 ml wody destylowanej, sonikowano 4 razy po 15 sekund w dezyntegratorze ultradźwiękowym Labsonic 1510 firmy Braun, Melsungen stosując częstotliwość ultradźwięków 20 kHz. Dodawano następnie 8 ml scyntylatora żelującego Insta-gel (Packard) i poddawano zliczaniu w liczniku scyntylacyjnym.

W celu przeliczenia ilości impulsów (cpm) na ilość germanu, przeprowadzano każdorazowo postępowanie kalibracyjne stosując metodę porównania z wzorcem opisaną przez CHWISTKA [9]. Kalibracja uwzględniała zjawisko gaszenia scyntylacji wywołane przez zawiesinę drobnoustrojową i supernatant.

Wyniki zawartości germanu w biomasie drobnoustrojowej wyrażano w $\mu H Ge$ na 1-g suchej masy bakterii, którą oznaczano wagowo za pomocą ultrafiltrów membranowych [11]. Posługując się metodą płomieniowej spektrofotometrii absorpcji atomowej wykazano nieobecność germanu w przemytej wyjściowej biomasie bakteryjnej oraz stosowanych odczynnikach.

Izolacja frakcji komórkowych *P. putida* i DNA bakteryjnego

Izolację frakcji komórkowych przeprowadzano opierając się na metodyce opisanej przez HORITSU i innych [14] dla *Pseudomonas oleovorans* akumulujących rtęć. Do izolacji pobierano bakterie *P. putida* poddane wcześniejszej 24 godzinnej inkubacji w środowisku zawierającym 3,6 mM pirokatechiny w pożywce mineralnej KOJIMA o pH 7,3 oraz 0,5 mM germanu znakowanego ^{71}Ge . Z izolowanych frakcji pobierano po 1 ml lub 4 ml próby do naczynek scyntylicyjnych. Dodawano 8 ml scyntylatora Insta-gel i poddawano zliczeniu w liczniku scyntylicyjnym. Równocześnie w celu kalibracji prowadzono równolegle izolację frakcji komórkowych bakterii po 24 godzinach inkubacji z pirokatechiną (3,6 mM) i nieznakowanym germanem (0,5 mM).

Izolację DNA przeprowadzono posługując się metodą opisaną przez MARMURA [17]. Do izolacji użyto bakterii, które po 24 godzinnej preinkubacji z pirokatechiną (3,6 mM) i germanem (0,5 mM) znakowanym ^{71}Ge , odwirowaniu i ponownej inkubacji w świeżym środowisku hodowlanym i identycznym składzie, osiągnęły eksponencjalną fazę wzrostu. Z poszczególnych frakcji uzyskanych w trakcie izolacji DNA pobierano 1 ml próby do naczynek scyntylicyjnych, dodawano scyntylatora Insta-gel i poddawano zliczaniu w naczynku scyntylicyjnym. Równocześnie w celu kalibracji prowadzono izolację DNA z bakterii *P. putida* poddanych analogicznej preinkubacji z pirokatechiną i nieznakowanym germanem.

Wyniki i dyskusja

Bioakumulacja i transport germanu w obecności
substratu organicznego i w układzie bezsubstratowym

Badania bioakumulacji i transportu germanu do komórek *Pseudomonas putida* prowadzono metodą obserwacji zmian zawartości germanu w biomasie bakterii. Rozstrzygnięcia wymagało stwierdzenie wpływu substratu organicznego o różnej zdolności kompleksowania germanu na przebieg procesów transportowych i poziom bioakumulacji tego pierwiastka w komórkach bakteryjnych. Interesujące również było wykazanie przebiegu bioakumulacji germanu w środowisku pozbawionym substratu energetycznego w warunkach bezwzrostowych.

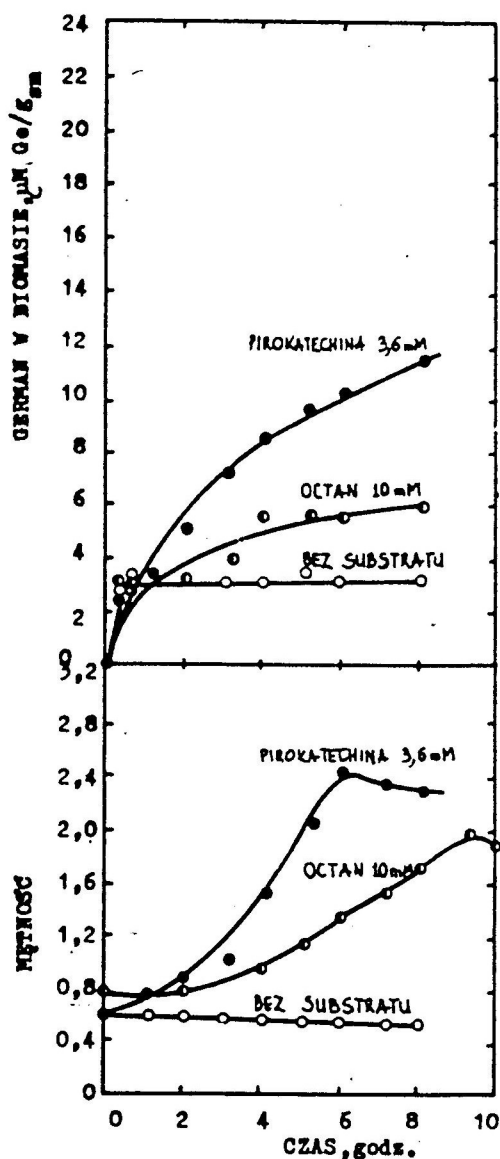
Przeprowadzono więc obserwacje bioakumulacji germanu w warunkach aerobowych ze środowiska zawierającego german w stężeniu 0,5 mM oraz pirokatechinę (3,6 mM) lub octan (10 mM) jako substraty organiczne.

Ponadto prowadzono obserwacje zmian poziomu bioakumulacji germanu w trakcie napowietrzania w środowisku zawierającym german, lecz pozbawionym substratu organicznego. Obserwacje takie przeprowadzono stosując biomase bakterii uzyskaną z chemostatu w warunkach hodowli ciągłej o 7 godz. czasie retencji, przystosowanych do biodegradacji 3,6 mM pirokatechiny. Wyniki tych doświadczeń przedstawiono na rys. 1, na którym podano również krzywe wzrostu bakterii, wyznaczone równocześnie z prowadzonymi obserwacjami bioakumulacji germanu. We wszystkich przypadkach poziom bioakumulacji osiągnął wartość maksymalną w w późnej eksponencjalnej fazie wzrostu.

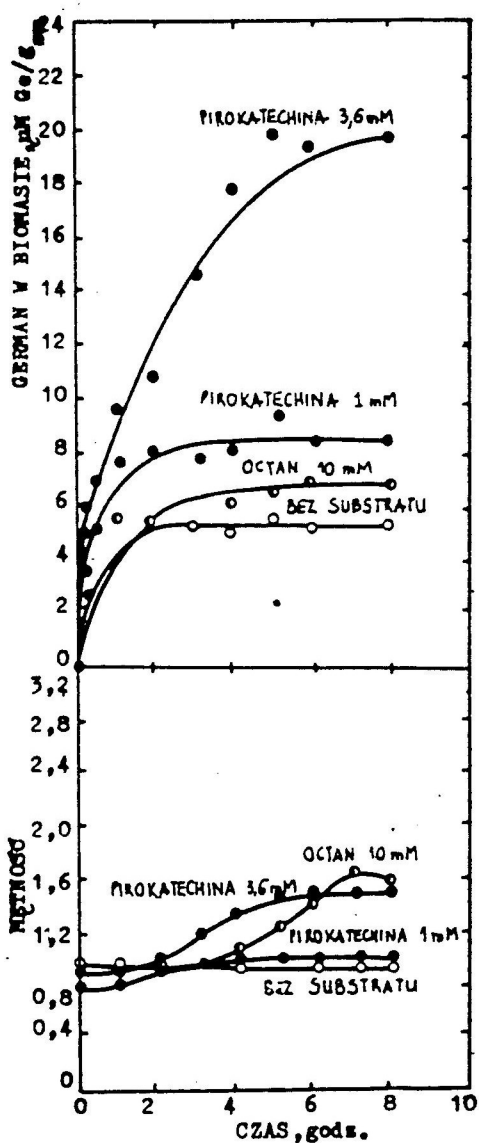
Octan sodu jest związkiem łatwo przyswajalnym przez bakterie *Pseudomonas sp.*. Nie tworzy on połączeń kompleksowych z germanem. Wyjściowe stężenie octanu sodu użyte w tych doświadczeniach (10 mM) w przybliżeniu odpowiadało stężeniu pirokatechiny 3,6 mM w przeliczeniu na ilość substratowego węgla w środowisku hodowlanym. Ponadto krzywe wzrostu szczepu *P. putida* w pożywce mineralnej KOJIMA z dodatkiem 3,6 mM pirokatechiny lub 10 mM octanu miały przebieg zbliżony (rys. 1 i 2). Mogło to wskazywać na dobranie w przybliżeniu porównywalnych warunków przebiegu wzrostu populacji bakterii w obecności każdego z tych substratów. W przeprowadzonych badaniach octan okazał się substratem znacznie mniej efektywnym z punktu widzenia procesu bioakumulacji germanu. Wyraźnie niższy poziom bioakumulacji tego pierwiastka po inkubacji bakterii z germanem w środowisku zawierającym octan sodu mógł być związany z występowaniem różnych mechanizmów transportu germanu w obecności octanu i pirokatechiny.

Podobnie wyraźne różnice poziomu bioakumulacji germanu sprawdzono w doświadczeniach, w których śledzono nagromadzenie germanu w komórkach *P. putida* w środowisku o wyższym, 2 mM stężeniu tego pierwiastka w obecności pirokatechiny lub octanu oraz w nieobecności substratu organicznego. Wyniki tych obserwacji przedstawiono na rys. 2. Stwierdzono, że najwyższy poziom bioakumulacji wynoszący 20 μM Ge na g suchej masy osiągnęto, gdy do środowiska hodowlanego na początku doświadczenia wprowadzono 3,6 mM pirokatechiny. W przypadku, gdy początkowo stężenie pirokatechiny wynosiło 1 mM, maksymalny poziom bioakumulacji był niższy i wynosił około 10 μM Ge na g suchej masy. Przebieg krzywych nagromadzenia germanu wskazywał, że w obu przypadkach osiągnięto poziom nasycenia. Również w tym doświadczeniu octan sodu okazał się substratem mniej efektywnym, a osiągnięty poziom bioakumulacji wynosił tylko około 7 μM Ge na g suchej masy.

Porównując wyniki uzyskane w tych doświadczeniach (rys. 1, 2) można zauważyć, że poziom bioakumulacji germanu w przypadku użycia octanu



Rys. 1. Bioakumulacja germanu przez *Pseudomonas putida* w czasie biodegradacji pirokatechiny, octanu lub w warunkach bezsubstratowych oraz krzywe wzrostu bakterii. Początkowe stężenie germanu 0,5 mM. Bakterie indukowane do biodegradacji 3,6 mM pirokatechiny.



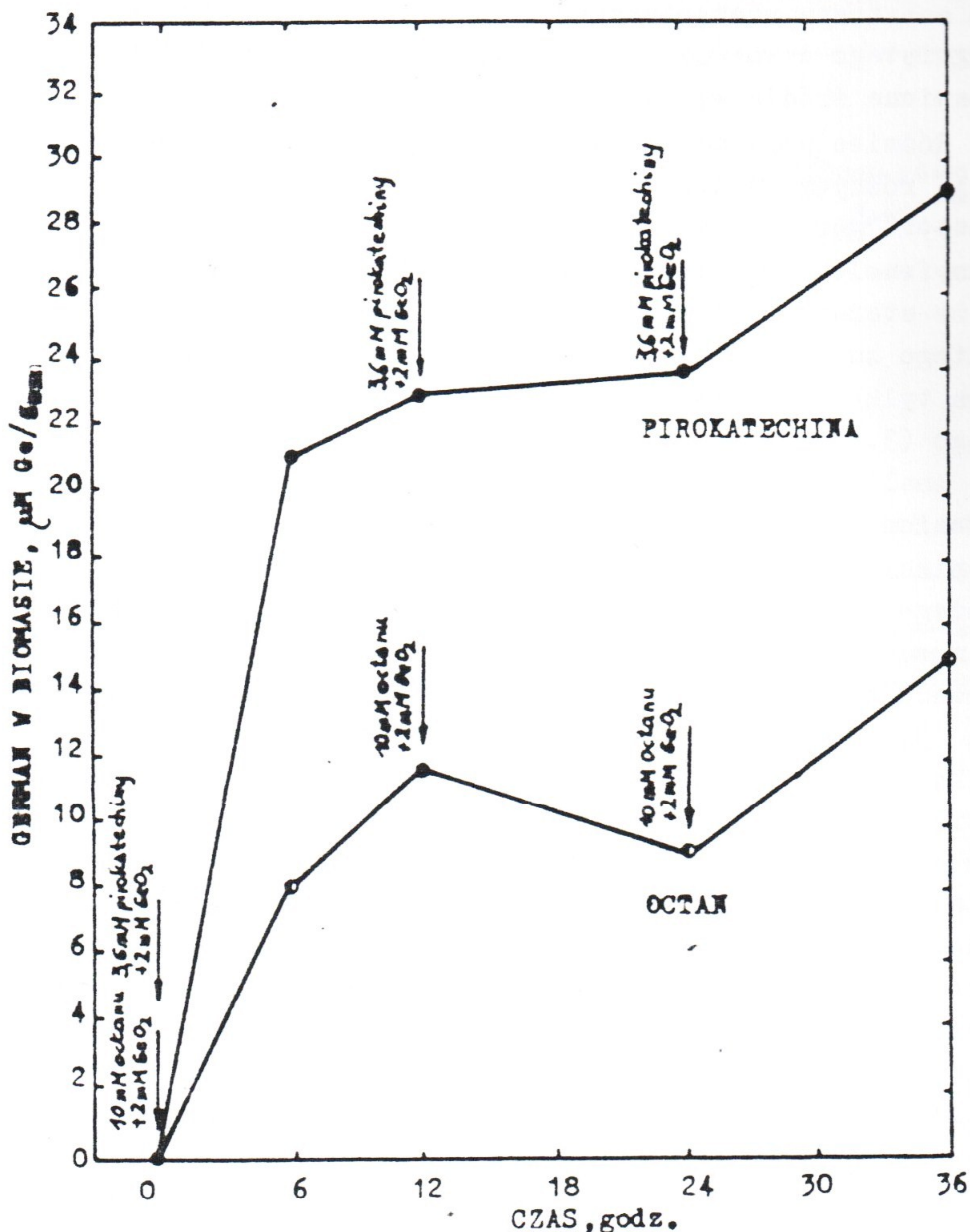
Rys. 2. Bioakumulacja germanu przez *Pseudomonas putida* w czasie biodegradacji pirokatechiny, octanu lub w warunkach bezsubstratowych oraz krzywe wzrostu bakterii. Początkowe stężenie germanu 2 mM. Bakterie indukowane do biodegradacji 3,6 mM pirokatechiny.

jako substratu energetycznego był tylko nieznacznie wyższy od poziomu osiągniętego w warunkach bezwzrostowych, gdy środowisko hodowlane było pozbawione źródeł węgla i energii.

Różnice poziomu bioakumulacji germanu obserwowane w przypadku użycia różnych wyjściowych stężeń pirokatechiny mogą sugerować, że transport germanu zależał od ilości kompleksującego substratu dwuhydroksyfenolowego wprowadzanego do środowiska (rys.2). Biorąc pod uwagę, że stężenie germanu w tym środowisku wynosiło 2 mM, możliwość całkowitego związania przez pirokatechinę w związek kompleksowy zachodziła tylko w środowisku o wyższym stężeniu tego substratu aromatycznego (3,6 mM).

Analizując wyniki poprzednich doświadczeń można było przypuszczać, że poziom bioakumulacji germanu w komórkach można zwiększyć przez przeniesienie bakterii wstępnie "naładowanych" tym pierwiastkiem, do świeżego środowiska hodowlanego z substratem organicznym i germanem. W tym celu wykonano następujące doświadczenie. Odwirowane bakterie wprowadzano do środowiska zawierającego 2 mM germanu znakowanego ^{71}Ge oraz 3,6 mM pirokatechiny lub 10 mM octanu sodu w pożywce mineralnej KOJIMA o pH 7,3. Kolby zawierające 0,5 l zawiesiny bakteryjnej napowietrzano w wytrząsarce. Próby pobierano po 6, 12, 24 i 36 godzinach inkubacji. Po 12 i 24 godzinach od momentu startu doświadczenia, po zostaniu po pobraniu prób zawiesinę bakteryjną w całości odwirowywano i zawieszano w świeżym środowisku hodowlanym o identycznym składzie. Równocześnie, w celu umożliwienia postępowania kalibracyjnego, prowadzono dokładnie w ten sam sposób dwie analogiczne hodowle z pirokatechiną lub octanem w charakterze substratów organicznych, przy czym w środowisku hodowlanym znajdował się wyłącznie german nieznakowany w stężeniu 2 mM. Wyniki przedstawiono na rys. 3.

Stwierdzono, że poziom bioakumulacji germanu obserwowany w przypadku użycia pirokatechiny jako substratu wzrostowego był wyraźnie wyższy od poziomu uzyskanego w obecności octanu. Nie obserwowano jednak, aby poziom bioakumulacji tego pierwiastka znacznie wzrastał w wyniku powtarzanego wprowadzenia bakterii "naładowanych" germanem do świeżego środowiska inkubacyjnego z substratem organicznym i germanem. Nie udawało się więc przez wprowadzenie do środowiska kolejnych porcji substratu organicznego i dwutlenku germanu doprowadzić do znacznego podwyższenia akumulacji tego pierwiastka w komórkach bakteryjnych. Mogłoby to sugerować, że w komórce bakteryjnej istnieje ograniczona ilość miejsc, które mogą wiązać german i nawet dostarczenie organizmowi energii pochodzącej z metabolizmu substratu nie mogło tej ilości zwiększyć. Wydaje się prawdopodobne, że german może być wiązany



Rys. 3. Bioakumulacja germanu przez *Pseudomonas nutida* w czasie biodegradacji 3,6 mM pirokatechiny lub 10 mM octanu w obecności 2 mM germanu. Hodowla periodyczna przenoszona do świeżego środowiska hodowlanego w odstępach 12 godzinnych.

w większości w obrębie ściany komórkowej tak jak to wykazano w przypadku *Bacillus subtilis* [2, 3, 4] lub *Citrobacter sp.* [1] akumulujących różne metale.

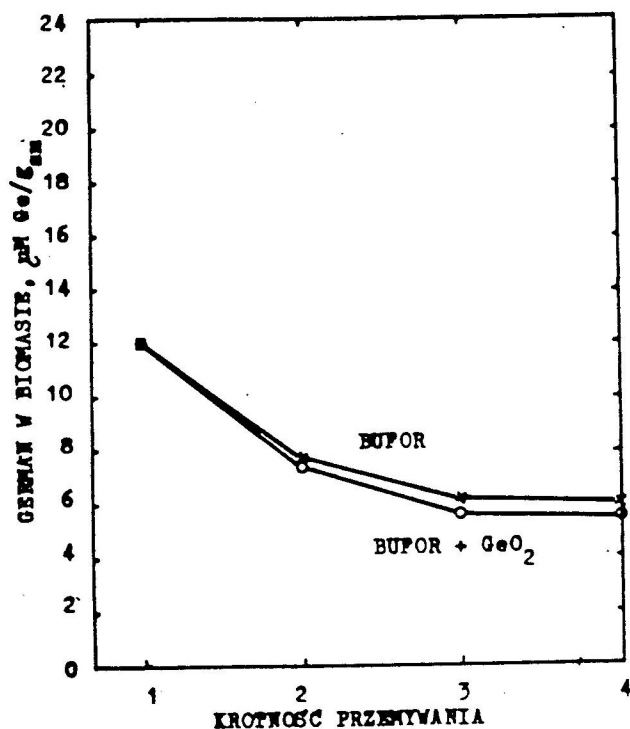
Można również przypuszczać, że miejsca wiązania i transportu germanu mogły w jakiś sposób być związane z metabolizmem pirokatechiny. Wydaje się prawdopodobne, że pewna część germanu wchodzi do wnętrza komórki bakterii, przy czym wchodzenie to ułatwione jest przez tworzenie połączenia kompleksowego z pirokatechiną. Trudno byłoby bowiem

wytłumaczyć istnienie różnic poziomu bioakumulacji germanu w przypadku użycia pirokatechiny i octanu przez różnicę wielkości energii metabolicznej uzyskanej w wyniku biodegradacji substratu i wykorzystanej w procesie transportu germanu. Wyższy jednak poziom bioakumulacji obserwowany w obecności substratu organicznego w porównaniu z poziomem stwierdzonym w warunkach substratowych mógł wskazywać na to, że część germanu wchodziła do komórki bakteryjnej kosztem energii metabolicznej mimo, iż w nieobecności substratu nie można pominąć roli metabolizmu endogennego. Transport germanu w warunkach bezsubstratowych mógł przebiegać przede wszystkim wskutek różnicy energii swobodnej związanej z gradientem stężeń.

Nie można również wykluczyć przypuszczenia, że miejsca wiązania germanu w komórce bakterii mogą być indukowane pod wpływem pirokatechiny. Problemu tego nie da się w obecnym etapie badań rozstrzygnąć bez wykonania mikroanalizy rentgenowskiej lub badań z preparatami izolowanych ścian komórkowych, tak jak to uczynili BEVERIDGE i MURRAY [4] w badaniu akumulacji różnych metali przez Bacillus subtilis.

Zbadania wymagało stwierdzenie wiązania się germanu z powierzchnią komórki bakteryjnej. W tym celu szczep Pseudomonas putida inkubowano przez 6 godz. w pożywce mineralnej KOJIMA z dodatkiem germanu znakowanego ^{71}Ge (0,5 mM) i pirokatechiny (3,6 mM). Następnie bakterie przemywano równą objętością pożywki mineralnej (bez ekstraktu drożdżowego) i oznaczono radioaktywność przemytej próby biomasy metodą scyntylacyjną. Pomijano oznaczenia radioaktywności odwirowanych nieprzemytych bakterii ze względu na możliwość znacznych błędów związanych z okludowaniem supernatantu o wysokiej radioaktywności pochodzącej od rozpuszczonego izotopu germanu. Bakterie poddawano następnie serii 3 kolejnych przemywań równą objętością mineralnej pożywki KOJIMA (bez ekstraktu drożdżowego) lub równą objętością pożywki KOJIMA zawierającej nieznakowany german w stężeniu 0,5 mM. Wyniki przedstawiono na rysunku 4.

Przemywanie roztworem pożywki mineralnej powodowało wymywanie części germanu luźniej związanego z komórką bakteryjną. Wielkość ta wynosiła około 5 do 6 μM germanu na g suchej masy. Był to prawdopodobnie german związany z powierzchnią komórki wskutek oddziaływań fizykochemicznych. Nieco więcej germanu wypłukiwano, gdy w roztworze przemywającym znajdował się german nieznakowany. Wymywanie to zachodziło prawdopodobnie wskutek dodatkowego udziału wymiany izotopowej germanu znakowanego na nieznakowany. Dalsze kolejne przemywania nie powodowały już istniejących zmian stężenia germanu. Należało więc uznać, że był on trwale związany w komórce bakteryjnej. Podobne zachowanie ob-



Rys.4. Zmiany zawartości germanu w komórkach *Pseudomonas putida* w trakcie przemywania buforem mineralnym lub buforem z dodatkiem 0,5 mM niezakwaszanego nośnikowego GeO₂.

serwowali BUCHEDER i BRODA [6] w swoich badaniach nad transportem cynku u *E. coli*.

Interesującym problemem było również stwierdzenie przebiegu bioakumulacji germanu przez bakterie nieindukowane do rozkładu pirokatechiny, uprzednio poddane represji enzymatycznej przez 3 tygodniową hodowlę w środowisku zawierającym octan sodu jako jedyne źródło węgla. W tym celu przeprowadzono obserwacje nagromadzenia germanu w komórkach bakteryjnych w przypadku, gdy w środowisku hodowlanym występował german w stężeniu 2 mM oraz pirokatechina 1 lub (3,6 mM) lub octan sodu (10 mM). Ponadto ślędzono zmiany poziomu bioakumulacji germanu w trakcie napowietrzania w środowisku zawierającym 2 mM germanu, lecz pozbawionym substratu organicznego. Wyniki tych obserwacji przedstawiono na rys. 5.

W przypadku użycia pirokatechiny jako substratu energetycznego bakterie wykazywały dość długą, prawie 3 godz. fazę zastoju (lag). Substrat ten został rozłożony po 4 lub 7 godzinach inkubacji w zależności od użytego stężenia pirokatechiny (1 lub 3,6 mM).

Poziom akumulacji germanu osiągnięty w przypadku użycia piroka-

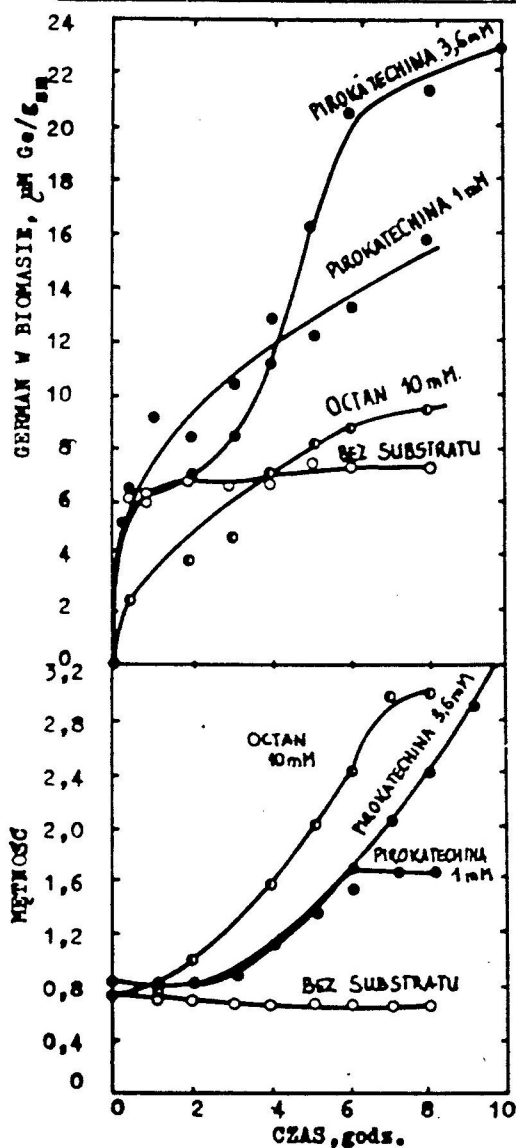
techiny i octanu oraz w warunkach bezsubstratowych w przypadku użycia dokładnie poziomowi stwierdzonemu poprzednio w przypadku użycia bakterii wstępnie indukcyjnie przystosowanych do rozkładu pirokatechiny. Bakterie P. putida w jednym cyklu wzrostowym indukowały aparat enzymatyczny zaangażowany w rozkładzie substratu o strukturze aromatycznej. Można więc było stwierdzić bezpośredni związek bioakumulacji germanu z metabolizmem pirokatechiny. Potwierdziło to przypuszczenie, że transport germanu był ułatwiony przez tworzenie kompleksu z pirokatechiną jako substratem. Akumulację germanu w fazie zastoju można więc było łączyć z przewagą wiązania tego pierwiastka w powierzchniowej warstwie komórki oraz z nasileniem wewnątrzkomórkowej bioakumulacji w logarytmicznej fazie wzrostu bakterii (rys. 5).

Wpływ stężenia germanu na poziom bioakumulacji
tego pierwiastka w komórkach bakteryjnych

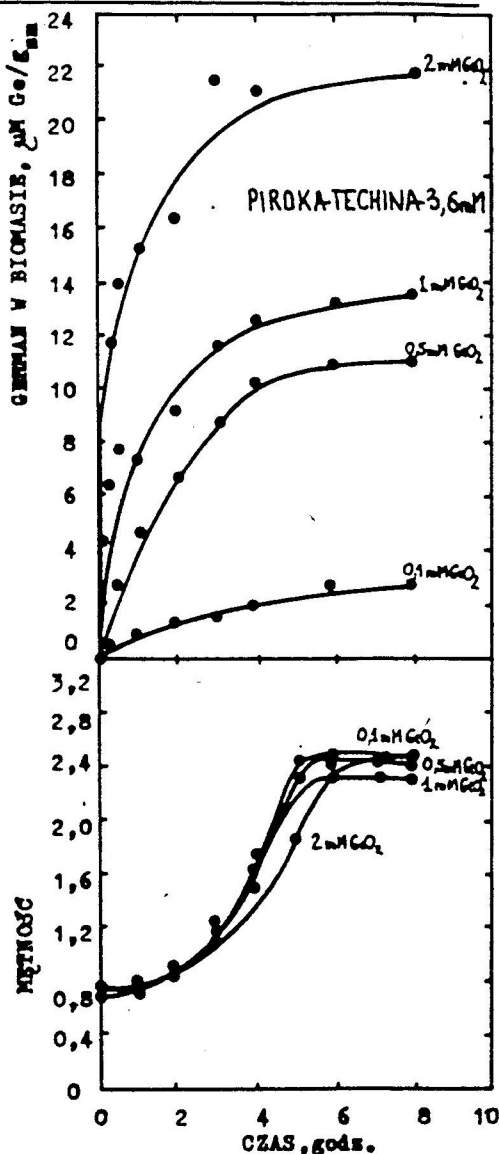
Interesujące było stwierdzenie wpływu stężenia germanu w środowisku hodowlanym na poziom bioakumulacji tego pierwiastka w komórkach badanego szczepu P. putida. Przeprowadzono więc obserwacje zmian poziomu bioakumulacji germanu w komórkach tych bakterii w trakcie ich 8 godzinnej inkubacji w środowisku, do którego wprowadzono german w stężeniu 2, 1; 0,5 i 0,1 mM oraz 3,6 mM pirokatechiny lub 10mM octanu sodu. Wyniki zebrano na rys. 6 i 7.

Również w tej serii badań stwierdzono, że w obecności pirokatechiny ilość germanu nagromadzonego w komórkach bakterii była około 2 do 3 krotnie wyższa od ilości germanu akumulowanego w obecności octanu. Niezależnie od rodzaju substratu organicznego przebieg bioakumulacji germanu wykazywał charakter krzywej nacyenia. Poziom tej bioakumulacji osiągnął wartość maksymalną w późnej eksponencjalnej fazie wzrostu podobnie jak w doświadczeniach poprzednich. Okazało się ponadto, że poziom bioakumulacji germanu w komórkach P. putida zależał od stężenia tego pierwiastka w środowisku hodowlanym i rósł ze wzrostem tego stężenia. Obniżenie stężenia germanu w tym środowisku po 8 godzinnej inkubacji z zawiesiną bakterii w wyniku związania części tego pierwiastka z biomasą bakteryjną było jednak niewielkie.

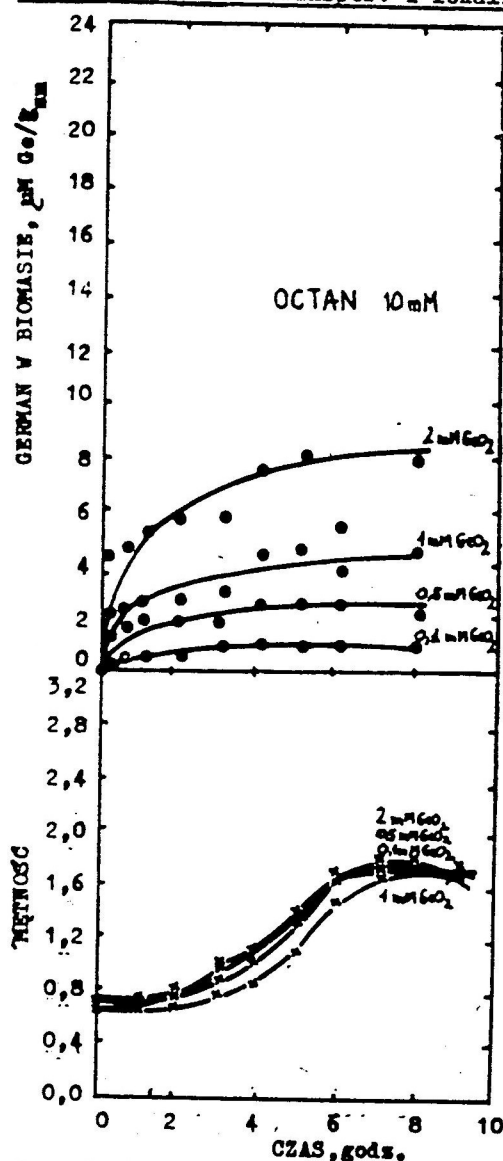
Ciekawych informacji dostarczyło badanie zależności początkowej szybkości wnoszenia germanu do komórek drobnoustrojowych od wyjściowego stężenia tego pierwiastka w środowisku hodowlanym. Początkowa szybkość wnoszenia germanu obliczano dzieląc wielkość bioakumulacji germanu stwierdzoną po 15 min. inkubacji przez czas (15 minut) i wyraża-



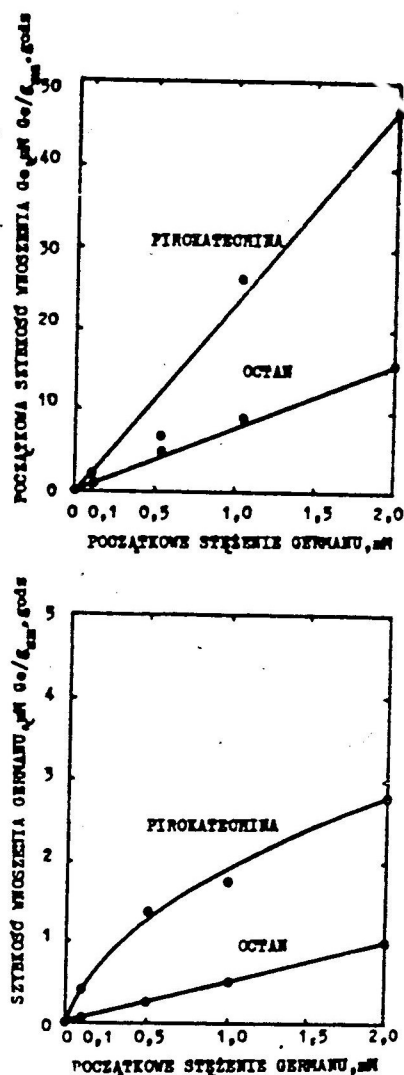
Rys. 5. Bioakumulacja germanu przez *Pseudomonas putida* w czasie biodegradacji pirokatechiny, octanu lub w warunkach bezsubstratowych oraz krzywe wzrostu bakterii. Początkowe stężenie germanu 2 mM. Bakterie poddane uprzedniej 21-dniowej represji enzymatycznej przez hodowlę w obecności octanu jako jedynego źródła węgla.



Rys. 6. Wpływ wyjściowego stężenia germanu na przebieg bioakumulacji tego pierwiastka przez *Pseudomonas putida* w czasie biodegradacji 3,6 mM pirokatechiny oraz krzywe wzrostu bakterii. Bakterie indukowane do biodegradacji 3,6 mM pirokatechiny oraz krzywe wzrostu bakterii. Bakterie indukowane do biodegradacji 3,6 mM pirokatechiny.



Rys. 7. Wpływ wyjściowego stężenia germanu na przebieg bioakumulacji tego pierwiastka przez *Pseudomonas putida* w czasie biodegradacji 10 mM octanu oraz krzywe wzrostu bakterii. Bakterie indukowane do biodegradacji 3,6 mM pirokatechiny.



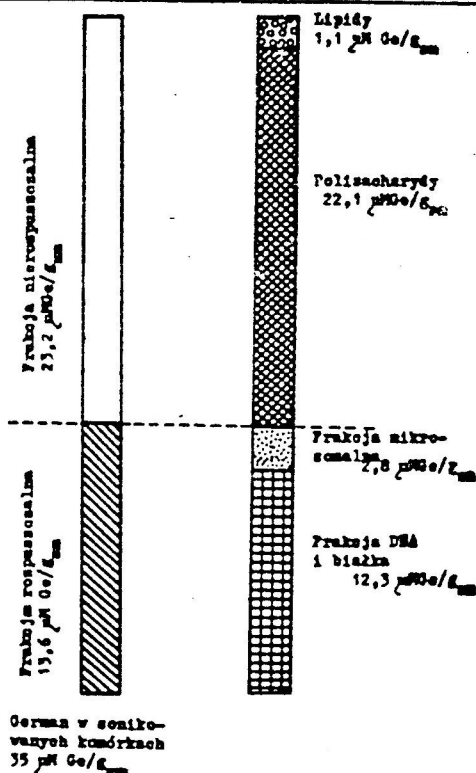
Rys. 8. Wpływ wyjściowego stężenia germanu na szybkość wnoszenia tego pierwiastka do komórek *Pseudomonas putida* w czasie biodegradacji 3,6 mM pirokatechiny lub 10 mM octanu. A-szybkość początkowa wnoszenia germanu obliczona dla 15 min. inkubacji, B-szybkość wnoszenia germanu obliczona dla 8 godz. inkubacji.

no w μM Ge na g suchej masy na godzinę. Zależność ta, przedstawiona na rys. 8A wykazała charakter liniowy w przypadku obu substratów organicznych: pirokatechiny i octanu. Szybkość wnoszenia germanu przez octan była jednak prawie trzykrotnie niższa. Na podstawie takiego przebiegu zależności v od S można wnioskować, że transport germanu w badanym zakresie stężeń ograniczonym rozpuszczalnością dwutlenku germanu, przebiegał na drodze dyfuzyjnej.

Ciekawych informacji dostarczyło badanie tej samej zależności szybkości wnoszenia germanu od jego wyjściowego stężenia w środowisku w przypadku, gdy prędkość wnoszenia obliczono dzieląc uzyskany poziom nasycenia (po 8 godz. inkubacji) przez czas (8 godz.). Zależność tę przedstawiono na rys. 8B. Okazało się, że w przypadku użycia octanu jako substratu wzrostowego zależność ta nie uległa zmianie i w dalszym ciągu miała przebieg liniowy. W przypadku zaś, gdy substratem wzrostowym była pirokatechina zależność v od S wykazywała charakter nasycenia. Zdając sobie sprawę z ograniczeń związanych z przyjęciem za podstawę obliczeń tak długiego czasu inkubacji stwierdza się jednak wyraźną różnicę w przebiegu tych krzywych w zależności od użytego substratu. Wydaje się, że różnice te można tłumaczyć przyjmując, że transport miał charakter złożony. Był to transport głównie dyfuzyjny oraz w mniejszym stopniu substratowo specyficzny związany z wnoszeniem germanu w postaci kompleksu germanopirokatechinowego. Charakter dyfuzyjny ujawniał się szczególnie w pierwszej fazie transportu w krótkim czasie inkubacji oraz w przypadku użycia octanu jako substratu wzrostowego. W obecności pirokatechiny transport germanu miał charakter złożony.

German w izolowanych frakcjach komórkowych
i DNA szczepu Pseudomonas putida

W celu wyjaśnienia lokalizacji germanu w strukturach komórkowych szczepu Pseudomonas putida ATCC 33015 akumulujących ten pierwiastek przeprowadzono izolację poszczególnych frakcji komórkowych posługując się metodyką opisaną przez HORITSU i innych [14]. Uzyskano dwie podstawowe frakcje. Frakcja rozpuszczalna zawierała elementy mikrosomalne, białka i kwasy nukleinowe. Frakcja nierozpuszczalna składa się z lipidów i polisacharydów. Zawartość germanu w poszczególnych izolowanych frakcjach komórkowych przedstawiono na rys. 9. German występował w tych frakcjach w różnej ilości. Znaczne ilości, wynoszące około 22 μM Ge na g suchej masy bakterii wziętych do izolacji znaleziono we

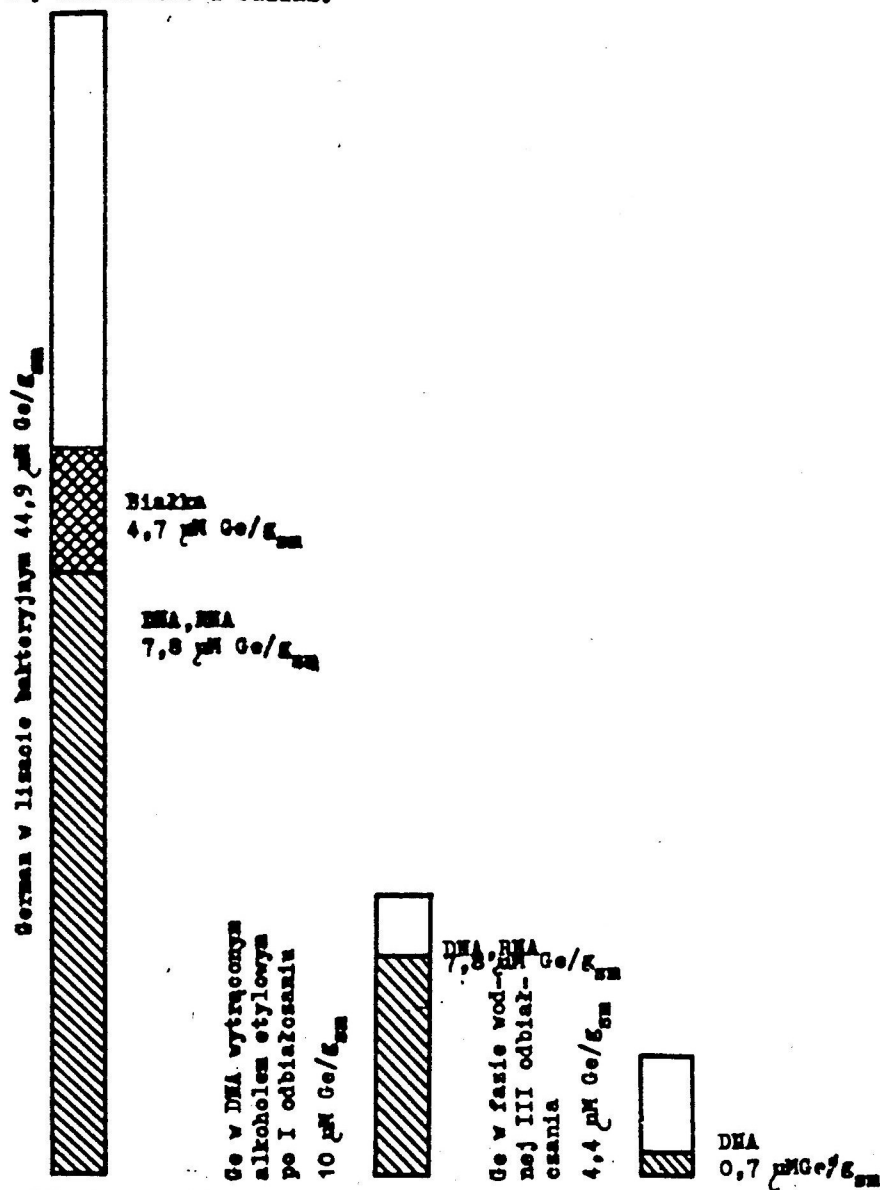


Rys. 9. Zawartość germanu we frakcjach komórkowych *Pseudomonas putida* izolowanych według metody HORITSU [14]. Wartości obliczone na 1 g suchej masy bakterii.

frakcji polisacharydów. Stanowiło to ponad 60% całej zawartości germanu stwierdzonej w obu głównych frakcjach: rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej. Mogło by to wskazywać na związanie większości germanu w obrębie ściany komórkowej bogatej w polisacharydy. Mniejsze ilości germanu wynoszące około 12 $\mu\text{M Ge}$ na g suchej masy bakterii znaleziono we frakcji zawierającej DNA i białka. Stanowiło to ponad 30% akumulowanego germanu.

Wyniki wcześniejszych badań MARCZYŃSKIEGO [16] udowodniły możliwość tworzenia związków kompleksowych germanu z kwasami nukleinowymi w warunkach *in vitro*. Celem sprawozdania, czy w warunkach *in vivo* german wiąże się z kwasami nukleinowymi bakterii *P. putida* akumulujących ten pierwiastek, przeprowadzono izolację DNA bakteryjnego posługując się metodą izolacji opisaną przez MARMURĄ [17]. Wyniki tej izolacji przedstawiono na rys. 10. Stwierdzono obecność germanu we wszystkich frakcjach zawierających DNA. W trakcie jednak odbiżczania preparatu ilość ta zmniejszyła się. Zawartość germanu w należycie odbiżczonym

DNA wynosiła około $1 \mu\text{M Ge}$ na g suchej masy bakterii użytych do izolacji. Uzyskane wyniki wskazują, że pewna część tego pierwiastka po wejściu do wnętrza komórek bakteryjnych może podlegać wiązaniu przez kwasy nukleinowe i białka.



Rys. 10. Zawartość germanu we frakcjach komórkowych *Pseudomonas putida* izolowanych według metody MARLURA 17. Białe pola oznaczają straty preparatywne.

Literatura

1. Aickin R.M., Dean A.C.R., Cheetham A.K., Skarņulis A.J., *Microbios Letters*, 9, 1979, 7.
2. Beveridge T.J., Murray R.G.E., *J. Bacteriol.*, 127, 1976, 1502.
3. Beveridge T.J., *Can. J. Microbiol.*, 24, 1978, 89.
4. Beveridge T.J., Murray R.G.E., *J. Bacteriol.*, 141, 1980, 876.
5. Bevilard P., *Bull. Soc. Chim. France*, 21, 1954, 304.
6. Bucheder F., Broda E., *Eur. J. Biochem.*, 45, 1974, 555.
7. Chmielowski J., Olczak Cz., *FEBS Meeting, Paris, 1975, Abstract No. 1119*.
8. Chmielowski J., Danch A., Kłapcińska B., *12th FEBS Meeting, Dresden, 1978, Abstract No. 3940*.
9. Chwistek M., Chmielowski J., Danch A., Kłapcińska B., *Chemia Analityczna w druku*.
10. Danch A., *Biochemiczna akumulacja germanu z kompleksów germanoorganicznych, praca doktorska, Uniwersytet Śląski, Katowice, 1976*.
11. Engelbrecht R.S., McKinney R.E., *Sew. Ind. Wastes*, 28, 1956, 1321.
12. Evans W.C., *Biochem. J.*, 41, 1974, 373.
13. Glockling P., *The Chemistry of Germanium*, Academic Press, London, New York, 1969.
14. Horitsu H., Takagaki M., Tomoyeda M., *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 5, 1978, 279.
15. Kojima Y., Itada N., Hayaishi O., *Biochem. J.*, 236, 1961, 2223.
16. Marczyński B., Knapik B., Chmielowski J., *12th FEBS Meeting, Dresden, 1978, Abstract No 3646*.
17. Marmur J., *J. Molec. Biol.*, 3, 1961, 208.
18. Olczak Cz., *Badania nad bioakumulacją germanu przez drobnoustroje w procesie degradacji fenoli wód koksowniczych, praca doktorska, Uniwersytet Śląski, Katowice, 1974*.
19. Prakasam T.B.S., Dordero N.C., *Appl. Microbiol.*, 19, 1970, 663.
20. Williams P., Murray K., *J. Bacteriol.*, 120, 1974, 416.

TRANSPORT AND DISTRIBUTION OF GERMANIUM IN
Pseudomonas putida CELIS ACCUMULATING THIS ELEMENT

The bioaccumulation was studied of germanium by a wild strain of Pseudomonas putida ATCC 33015 growing in the presence of two selected substrates: catechol or sodium acetate. In aqueous solution catechol formed spontaneously a complex compound with germanium. Accumulation

of germanium in the medium without growth substrate was investigated for comparison. The study was performed by following the changes in the bioaccumulation level of germanium labelled with ^{71}Ge in bacterial cells.

The highest bioaccumulation and rate of transport of this element was observed when catechol as sole carbon source was present in the medium. Germanium content obtained in such conditions was about 3 times higher than that observed in the cells growing in the presence of acetate or in the absence of the growth substrate. The germanium uptake reached its maximum value late in the logarithmic phase of growth cycle. The uptake curve exhibited a saturation character irrespective of whether catechol or acetate was used as growth substrate.

The rate of transport and bioaccumulation level of germanium in Pseudomonas putida cells depended upon the initial concentration of this element in the medium and grew proportionally to the concentration. It seems that transport of germanium into Pseudomonas putida cells was driven mainly by diffusion and it was, to a less extent, substrate-specific and connected with the uptake of germanium in the of germanium-catechol complex.

The observations of the germanium distribution in the cells showed that a majority of this element was bound within the cell wall. Germanium was also found in the nucleic acid- and protein fraction. It was evidenced that a part of germanium entering inside of the cell was bound by nucleic acids.