

УДК 57.088.55

**ВИКОРИСТАННЯ МАГНІТОКЕРОВАНИХ ДРІЖДЖІВ *S. CEREVISIAE*
ДЛЯ ВИЛУЧЕННЯ ІОНІВ МІДІ**

*С.В.Горобець, Ю.В.Карпенко, Л.В.Маринченко,
Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»*

Вступ. Швидкий розвиток різних галузей промисловості, які використовують водні ресурси, вимагає вдосконалення методів очищення стічних вод, забруднених важкими металами, які несуть загрозу навколишньому середовищу. Магнітна фільтрація (сепарація) розвивалась для процесів видалення і контролю шкідливих речовин у навколишньому середовищі і промисловості, таких як: обробка радіоактивної і стічної води, очистка та фільтрація питної води, сепарація металевих руд, які видобуваються.

Використання магнітокерованих біосорбентів для біосорбції важких металів є надзвичайно привабливим. Це викликано, насамперед, тим, що магнітна фільтрація забезпечує видалення забрудників у швидкісному режимі. До того ж, існує можливість обирати серед великої різноманітності мікробних біосорбентів для вилучення іонів важких металів найбільш доцільний, зокрема за сорбційною здатністю.

В нашій роботі для процесу біосорбції іонів міді Cu^{2+} із стічних вод обрано дріжджі *S. cerevisiae*, що мають значний потенціал з акумуляції широкого діапазону металевих катіонів і з різною ефективністю можуть вилучати токсичні метали, відновлювати дорогоцінні метали й очищати від радіонуклідів водні розчини. Brady et al. (1994) довели, що клітини дріжджів *S. cerevisiae*, оброблені лугом, здатні акумулювати широкий діапазон катіонів важких металів (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ag^{+} , Ni^{2+} й Fe^{2+}). Іншими дослідниками встановлено величину поглинання іонів Cu^{2+} *S. cerevisiae*, що склала менше, ніж 20 мг Cu на 1 г сухої ваги дріжджів [1].

Водночас, дріжджі *S. cerevisiae* мають ряд переваг серед інших культур, такі як: 1) біомаса може бути легко вирощена за відомими методиками з великим виходом на недорогому середовищі, 2) біомаса може бути отримана від різних галузей харчової промисловості як надлишкова 3) дріжджі *S. cerevisiae* є непатогенними для людей мікроорганізмами, що здавна широко застосовуються у біотехнологічних процесах приготування харчових продуктів.

Для визначення максимальної сорбційної здатності біосорбенту зазвичай використовують модель сорбції Ленгмюра (Langmuir, 1918), що засновано на рівноважному стані сорбційної системи. Використовуючи різноманітні способи інтенсифікації процесу біосорбції, можна зменшити час, протягом якого система буде досягати стану сорбційної рівноваги, коли процес сорбції врівноважений із процесом десорбції. Найчастіше використовують механічне перемішування розчину, за якого рівноважний стан встановлюється у діапазоні від півгодини до декількох годин перемішування. Використання методу магнітогідродинамічного перемішування значно впливає на реологічний стан системи та на стехіометрію процесу біосорбції і приводить систему до рівноваги вже через 10 хвилин [2] за значно менших енергетичних витрат порівняно з механічним перемішуванням. Водночас, з огляду на магнітні властивості речовин, можна модифікувати метод магнітогідродинамічного перемішування для кожного конкретного випадку.

Тому для досліджень обрано процес біосорбції іонів міді Cu^{2+} із робочих середовищ клітинами дріжджів *S. cerevisiae*, яким надано магнітних властивостей завдяки прикріпленню наномагнетиту Fe_3O_4 методом багатовихрового магнітогідродинамічного перемішування і подальшого видалення використаного біосорбенту магнітним сепаратором.

Також відомі дослідження [3], які показали, що немагнітний біосорбент мав найбільшу сорбційну здатність для Cu^{2+} порівняно з магнітним сорбентом. Тому актуальною є також задача створення умов для одержання ефективного магнітного біосорбенту із середовища іонів міді Cu^{2+} і для його швидкого видалення в магнітному полі.

Таким чином, метою цієї роботи є одержання за допомогою методу багатовихрового магнітного перемішування магнітокерованого біокомплексу [магнітні наномітки-дріжджова клітина] і встановлення його сорбційних властивостей в процесі видалення іонів міді Cu^{2+} із робочих розчинів в магнітогідродинамічному режимі перемішування.

Матеріали і методи. В роботі використовуємо клітини дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* виробництва ЗАТ «ЕНЗИМ», кристалогідрат міді $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, хлориди заліза $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ і FeCl_2 , азотна HNO_3 , хлорна HCl і перхлорна HClO кислоти і аміак NH_4OH .

Визначення розмірів частинок наномагнетиту, дослідження поверхні дріжджових клітин проводимо методом атомно-силової і магнітно-силової мікроскопії на скануючому зондовому мікроскопі Solver PRO-M. Використовуємо напівконтактний і магнітний режими сканування, кобальтовий магнітний (NSG01/Co) тип зонду розмірами: $130 \times 35 \times 2$ мкм. Відстань від зонду до поверхні – 100 нм, частота сканування – 1 Hz.

Приготування наномагнетиту. Готуємо 2 М розчин хлориду заліза (II) у 2 М розчині HCl та 1 М розчин хлориду заліза (III). Змішуємо у водному розчині 40 мл 1 М хлориду заліза (III) і 10 мл 2 М хлориду заліза (II) та додаємо до 500 мл 0,7 М розчину аміаку. Відділяємо желатиноподібний осад від супернатанту постійним магнітом. Отриманий осад перемішуємо з 200 мл перхлорної кислоти протягом 10 хв на магнітній мішалці. Потім осад знову відділяємо постійним магнітом та перемішуємо з перхлорною кислотою. Так повторюємо двічі. Далі отриманий гель перемішуємо з 200 мл води протягом 5 хв, додаємо 200 мл 2 М перхлорної кислоти та відділяємо осад постійним магнітом. Таким чином тричі повторюємо перемішування з водою та подальшим додаванням 200 мл 2 М перхлорної кислоти та відділенням преципітату постійним магнітом. Гель центрифугуємо за 2000 хв^{-1} протягом 1 години та видаляємо супернатант. 3 г гелю розчиняємо у воді з доведенням об'єму до 10 мл [4].

На одержаному методом атомно-силової мікроскопії зображенні поверхні зразку (рис. 1) визначаємо розподіл розмірів часток наномагнетиту. Як видно, ефективний розмір часток коливається у межах від 5 нм до 20 нм, середній розмір наночастинок: від 7 нм до 9 нм.

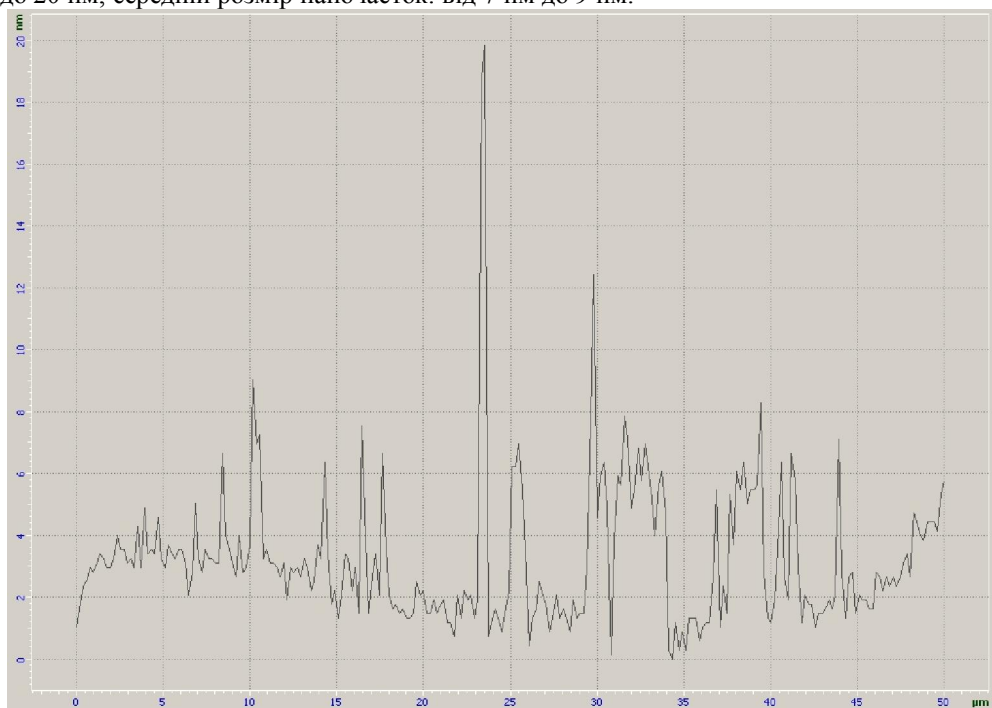


Рис. 1- Розподіл наномагнетиту, одержаний методом атомно-силової мікроскопії

Приготування немагнітного біосорбенту. Первинну біомасу дріжджів промиваємо дистильованою водою, після чого змішуємо з водою в ємності на 500 мл завдяки механічному перемішувачу пристрою з частотою обертів 180 хв^{-1} протягом 15 хвилин. Таким чином досягаємо рівномірного розподілу часток біосорбенту (окремих та скупчених клітин) із середнім розміром від 5 $\mu\text{м}$ до 15 $\mu\text{м}$ по об'єму.

Приготування магнітного біосорбенту. Немагнітний біосорбент, розчинений у воді, змішуємо з розчином наномагнетиту так, щоб відношення об'ємів біосорбенту до наномагнетиту складало 100:1, причому концентрація дріжджових клітин дорівнювала 8×10^9 кл/л (100 мг сухих дріжджів на 1л), а концентрація наномагнетиту у вихідному розчині становила 1 мг/л.

Отриманий розчин доводимо до $\text{pH}=2,5$ азотною кислотою HNO_3 для максимально ефективного прикріплення магнітних міток до часток біосорбенту під час багатовихрового магнітогідродинамічного перемішування. Потім для кожної серії кювету з розчином і високоградієнтною феромагнітною насадкою встановлюємо в магнітний сепаратор із напруженістю зовнішнього магнітного поля 3,5 кЕ, в якому відбувається процес перемішування і, власне, створення комплексів [магнітні наномітки-дріжджова клітина].

Далі отриманий розчин висушували в сушильній шафі за температури $105 \text{ }^\circ\text{C}$ до постійної ваги для отримання абсолютно сухої речовини.

Приготування препарату для сканування. Для дослідження поверхні магнітомічених дріжджів *S. cerevisiae* методами скануючої зондової мікроскопії отриманий розчин магнітокерованого біосорбенту висушуємо до утворення плівки із сухого осаду.

Видалення іонів міді Cu^{2+} із робочого середовища. Для вивчення сорбційної здатності комплексів [магнітні наномітки-дріжджова клітина] і нативних дріжджових клітин їх розчини змішуємо з розчином іонів міді Cu^{2+} концентрацією 50 мг/л і pH середовища 2,5. Біосорбцію проводимо за допомогою

механічного і багатовихрового магнітогідродинамічного перемішування. Механічне перемішування здійснюється мішалкою у вільному об'ємі частотою обертів 180хв^{-1} . Для багатовихрового магнітодинамічного перемішування використовуємо кювету з вміщеними в неї стальними стрижнями діаметром 0,5 мм і довжиною 30 мм, відстань між стрижнями складає 2 мм. Напруженість зовнішнього магнітного поля – $H=240\text{ кА/м}$. Вимірювання концентрації іонів міді Cu^{2+} проводимо через 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50 і 60 хв.

Для дослідів з побудови адсорбційної ізотерми готуємо серію кювет з 1 мг абсолютно сухої речовини біосорбента і 20 мл розчину Cu^{2+} у діапазоні концентрацій від 5 мг/л до 150 мг/л. В кожну кювету встановлюємо високоградієнтну феромагнітну насадку, а кювету розміщуємо в магнітному сепараторі з напруженістю зовнішнього магнітного поля 3 кЕ.

Процес біосорбції іонів міді Cu^{2+} відбувається за допомогою багатовихрового магнітогідродинамічного перемішування протягом 10 хвилин за кімнатної температури.

Визначання концентрації іонів міді Cu^{2+} проводимо за кімнатної температури вимірюванням інтенсивності синього забарвлення комплексу $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ світлом довжиною хвилі 590 нм за допомогою спектрофотометра СФ-46.

Результати й обговорення. Для вивчення взаємодії магнітної рідини з дріжджовими клітинами у разі багатовихрового магнітогідродинамічного перемішування проводимо дослідження поверхні магнітомічених дріжджових клітин методами скануючої зондової мікроскопії. На рисунках 2 і 3 представлено типові фотографії дріжджових клітин, до яких приєднані частинки наномагнетиту таким способом перемішування.

На рисунку 3 видно окремі дріжджові клітини з піками прикріплених частинок наномагнетиту: кожний пік відповідає частинці наномагнетиту. Аналіз фотографій показує, що весь наномагнетит знаходиться на поверхні дріжджових клітин і свідчить про стійкість одержаних комплексів [магнітні наномітки-дріжджова клітина].

Дослідження процесу біосорбції іонів міді Cu^{2+} одержаними комплексами [магнітні наномітки-дріжджова клітина] залежно від типу перемішування та орієнтації магнітного поля наочно представлено динамікою концентрації цих іонів в розчинах (рис. 4-8).

На рис. 4 показано залежності концентрації іонів міді Cu^{2+} в розчині від часу проведення біосорбції комплексами [магнітні мітки-дріжджова клітина] і нативними дріжджовими клітинами. Крива 1 описує процес сорбції іонів міді магнітоміченими дріжджами у разі механічного перемішування, а крива 2 – дріжджовими клітинами без магнітних міток.

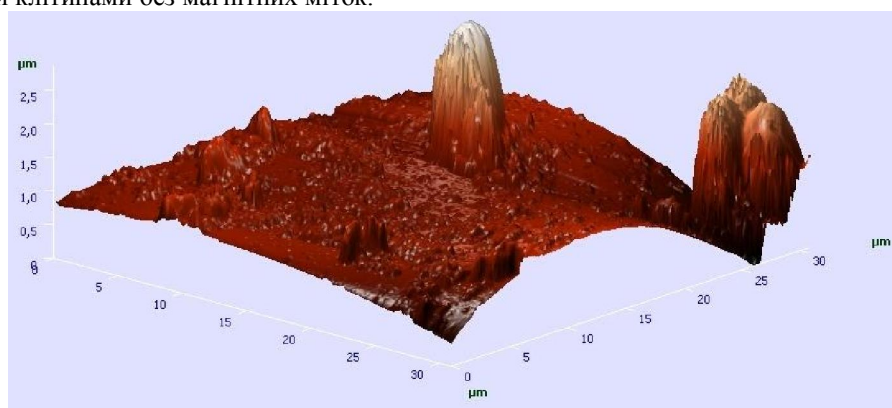


Рис. 2. Фотографія магнітомічених дріжджових клітин, отримана за допомогою напівконтактного методу атомно-силової мікроскопії

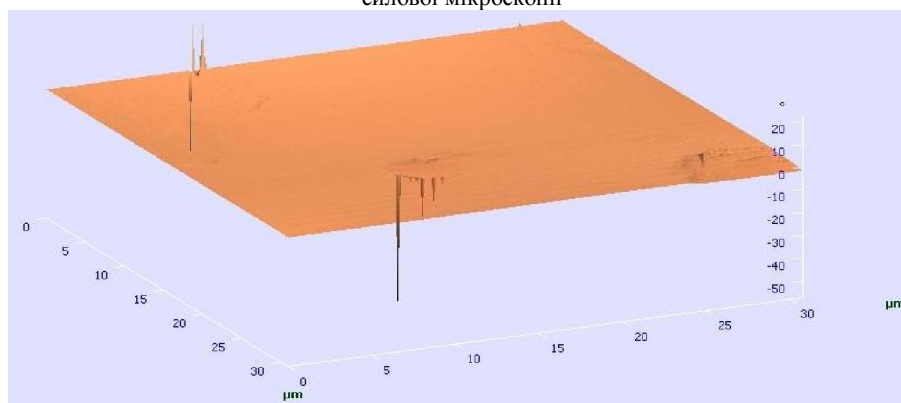


Рис. 3. Фотографія магнітомічених дріжджових клітин, отримана за допомогою статичного методу магніто-силової мікроскопії

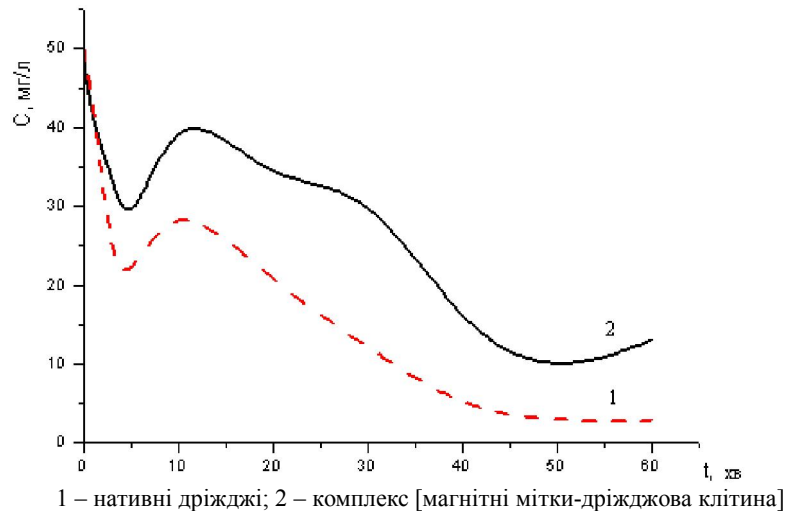
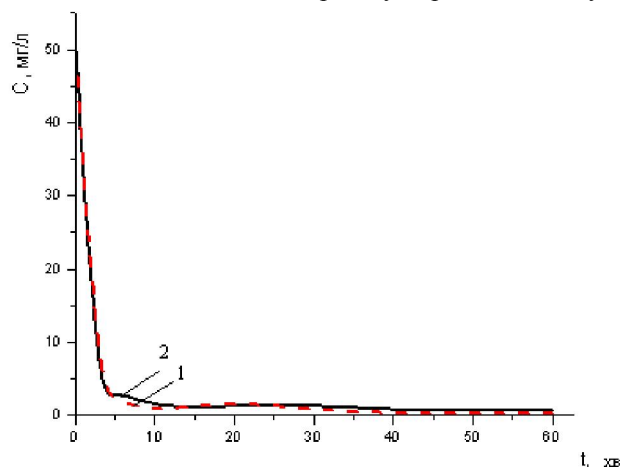


Рис. 4. Динаміка концентрації іонів міді Cu^{2+} в розчині у разі механічного методу перемішування

Очевидно, що швидкість процесу сорбції іонів Cu^{2+} в обох випадках максимальна в перші 3-5 хвилин, причому більш якісна сорбція відбувається за використання нативних дріжджів, що підтверджує раніше одержані результати [2,3]. Це пояснюється тим, що у дріжджів, зв'язаних з магнітними мітками, в процесі зайнята не вся поверхня кожної клітини, що, в свою чергу, призводить до зменшення поверхні масообміну та загальної сорбційної активності. Також слід відмітити, що у разі проведення процесу біосорбції з використанням механічного перемішування і магнітних міток після 5 хвилин від початку експерименту спостерігається процес десорбції і внаслідок цього – збільшення концентрації іонів міді Cu^{2+} в розчині. Подібний ефект менш помітний у разі застосування нативної культури дріжджів.

На рис.5 наведено залежності концентрації іонів міді Cu^{2+} в розчині від часу проведення біосорбції комплексами [магнітні мітки-дріжджова клітина] і нативними дріжджовими клітинами у разі багатовихрового магнітогідродинамічного перемішування за паралельної орієнтації магнітного поля до насадок. Крива 1 описує процес сорбції іонів міді дріжджовими клітинами без магнітних міток, а крива 2 – магнітоміченими дріжджами. У разі багатовихрового магнітогідродинамічного перемішування процес сорбції проходить швидше, також має максимальну швидкість у перші 3-5 хвилин, але перевагою цього способу є те, що процес десорбції практично не проходить, що дає змогу стверджувати про ефективність сорбції іонів міді Cu^{2+} дріжджами.

На рис. 6 показано залежності концентрації іонів міді Cu^{2+} в розчині від часу проведення біосорбції комплексами [магнітні мітки-дріжджова клітина] і нативними дріжджовими клітинами у разі багатовихрового магнітогідродинамічного перемішування за перпендикулярної орієнтації магнітних насадок до магнітного поля. Крива 1 описує процес сорбції іонів міді Cu^{2+} дріжджовими клітинами без магнітних міток, а крива 2 – магнітоміченими дріжджами. Як видно з рис.5 і рис.6, максимальна кількість міді сорбується в перші хвилини за максимальної швидкості процесу і практично відсутня десорбція.



1 – нативні дріжджі; 2 – комплекс [магнітні мітки-дріжджова клітина]

Рис. 5. Динаміка концентрації іонів міді Cu^{2+} в розчині у разі багатовихрового магнітогідродинамічного методу перемішування за паралельної орієнтації магнітного поля до насадок

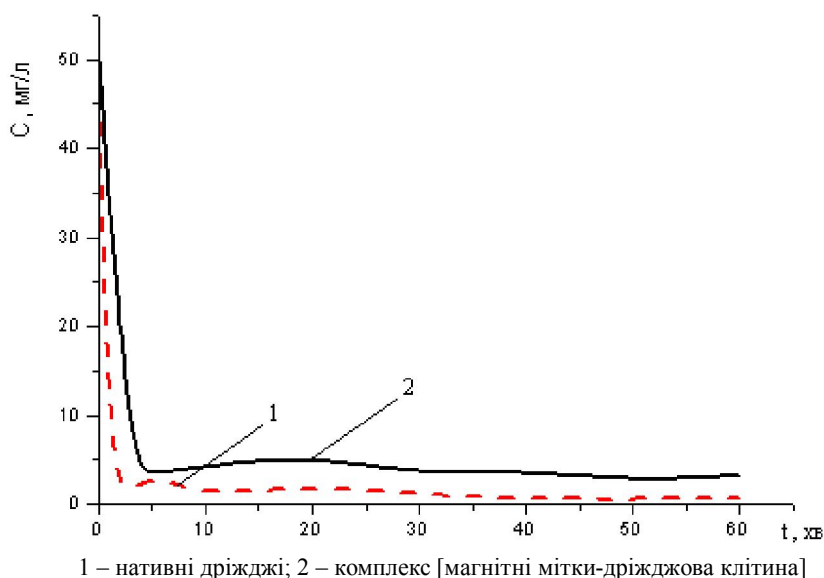
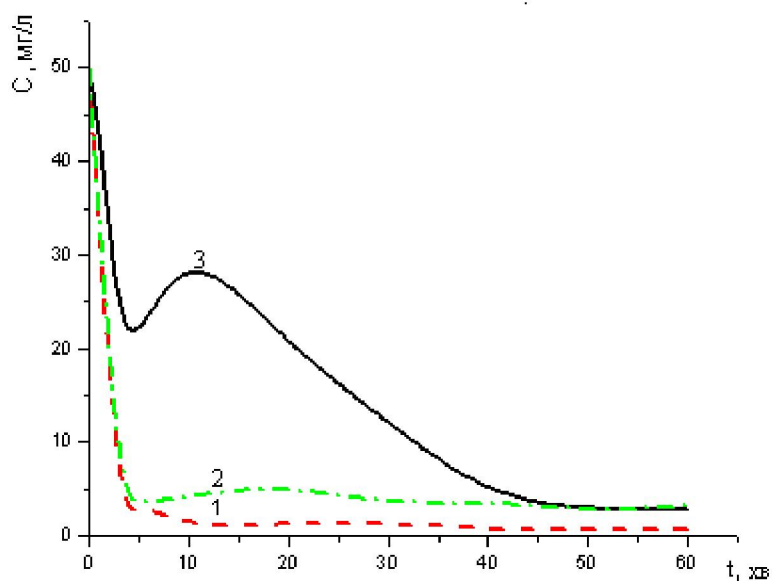


Рис. 6. Динаміка концентрації іонів міді Cu^{2+} в розчині у разі багатовихрового магнітогідродинамічного методу перемішування за перпендикулярної орієнтації магнітного поля до насадок
1 – нативні дріжджі; 2 – комплекс [магнітні мітки-дріжджова клітина]

Необхідно відзначити, що за паралельної орієнтації магнітного поля до насадок процес сорбції іонів міді Cu^{2+} з розчину проходить більш ефективно, ніж за даної конфігурації системи. Навіть використання магнітних міток, прикріплених до дріжджів, не дає результату, одержаного у попередньому досліді.

На рис. 7 представлено залежності концентрації іонів міді Cu^{2+} в розчині від часу проведення біосорбції нативними дріжджовими клітинами у разі багатоговихрового магнітогідродинамічного перемішування за паралельної і перпендикулярної орієнтації магнітних насадок до магнітного поля і у разі механічного перемішування. Очевидно, що у випадку багатоговихрового магнітогідродинамічного перемішування за паралельної орієнтації насадки до магнітного поля процес сорбції відбувається значно інтенсивніше. В початковий період часу швидкість сорбції у разі багатоговихрового магнітогідродинамічного перемішування вище швидкості сорбції за механічного перемішування. Даний результат дуже добре узгоджується з відомими з літератури експериментальними даними [3,5].

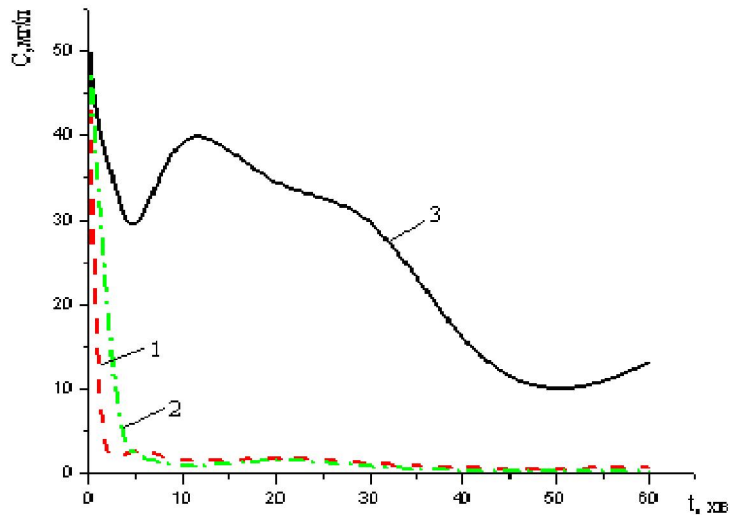


1 – багатоговихрове магнітогідродинамічне перемішування, магнітне поле орієнтоване паралельно до насадки;
2 – багатоговихрове магнітогідродинамічне перемішування, магнітне поле орієнтоване перпендикулярно до насадки;
крива 3 – механічне перемішування

Рис. 7. Порівняння динаміки концентрації іонів міді Cu^{2+} в розчині у разі відсутності магнітних міток на дріжджах за різних типів перемішування

На рис. 8 подано залежності концентрації іонів міді Cu^{2+} в розчині від часу проведення біосорбції комплексами [магнітні мітки-дріжджова клітина] у разі багатовихрового магнітогідродинамічного перемішування за перпендикулярної і паралельної орієнтації магнітних насадок до магнітного поля і за механічного перемішування. Як і у випадку з нативними дріжджовими клітинами, магнітогідродинамічне перемішування є значно ефективніше, а також практично не спостерігаємо процесу десорбції. Можна відмітити, що результати біосорбції за перпендикулярної орієнтації магнітного поля до насадки у разі багатовихрового магнітогідродинамічного перемішування співставні на рівні похибки дослід з результатами паралельної орієнтації.

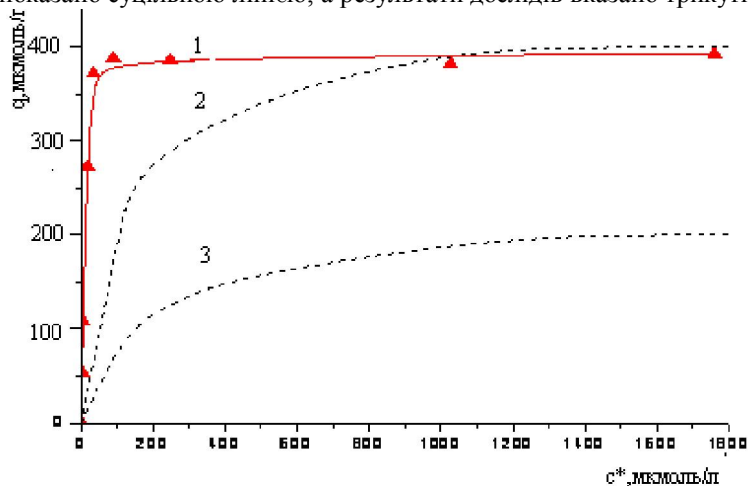
Нарешті, до перерахованих вище переваг магнітодинамічного перемішування можна додати і те, що за більших проміжків часу 40-60 хв остаточна концентрація несорбованих іонів міді Cu^{2+} набагато менше, ніж у разі застосування механічних методів перемішування.



1 – багатовихрове магнітогідродинамічне перемішування, магнітне поле орієнтоване паралельно до насадки;
2 – багатовихрове магнітогідродинамічне перемішування, магнітне поле орієнтоване перпендикулярно до насадки;
3 – механічне перемішування

Рис. 8. Порівняння динаміки концентрації іонів міді Cu^{2+} в розчині з комплексами [магнітні мітки-дріжджові клітини] за різних варіантів перемішування

На основі отриманих експериментальних даних будемо ізотеру біосорбції міді (рис. 9, крива 1) у вигляді залежності кількості вилучених іонів міді Cu^{2+} , q , мкмоль/г АСР, від залишкової концентрації, c^* , мкмоль/л, яку показано суцільною лінією, а результати дослідів вказано трикутниками.



1 – ізотерна біосорбції міді комплексом [магнітні мітки-дріжджова клітина]; 2 – ізотерна біосорбції міді дріжджами без наномагнетиту; 3 – ізотерна біосорбції міді магнітним сорбентом за даними [2]

Рис. 9. Ізотери біосорбції іонів міді Cu^{2+} створеним біосорбентом порівняно з відомим і нативними дріжджами

Згідно з моделлю Ленгмюра розраховуємо максимальну сорбційну ємність створеного комплексу [магнітні мітки-дріжджова клітина] q_{max} , що складає 393 мкмоль/г сухого сорбенту. Така ефективність

видалення іонів міді Cu^{2+} близька до рівня нативних дріжджів, який складав 400 $\mu\text{моль/г}$ [2]. Тобто можна стверджувати, що прикріплений наноманетит способом багатовихрового магнітогідродинамічного перемішування практично не впливає на сорбційну здатність дріжджів.

В роботі [2] для надання біосорбенту магнітних властивостей використовували значно більше магнетиту порівняно з кількістю, яку використовуємо в даному дослідженні, і, як наслідок, максимальна сорбційна ємність за іонами міді Cu^{2+} склала приблизно 200 $\mu\text{моль/г}$. Тому можна стверджувати, що запропонований нами метод багатовихрового магнітогідродинамічного перемішування для біосорбції дає змогу використовувати наноманетит більш економно та ефективно.

Зазначимо також, що у разі використання створеного біосорбенту система набуває рівноважного стану за значно менших значень концентрації іонів міді Cu^{2+} , ніж у разі використання нативних дріжджів.

Висновки. 1. Багатовихрове магнітогідродинамічне перемішування значно інтенсифікує процес біосорбції дріжджами *S. cerevisiae* іонів міді Cu^{2+} порівняно з механічним.

2. У разі багатовихрового магнітогідродинамічного перемішування практично відсутній процес десорбції навіть за тривалого часу сорбції.

3. Орієнтація насадки в магнітному полі впливає на ефективність процесу біосорбції і підвищує її за паралельного розташування насадки (її стрижнів) в магнітному полі (незалежно від наявності наноманетиту).

4. Наноманетит, який прикріплений до дріжджових клітин, практично не зменшує поверхню масообміну, але натомість збільшує ефективність сорбції комплексами [магнітні мітки-дріжджова клітина], а їх сорбційна ємність лише на 2 % менша за сорбційну ємність нативних дріжджів.

5. Створений біосорбент у разі багатовихрового магнітогідродинамічного перемішування ефективніше сорбує мідь за значно менших значень її концентрації в розчині порівняно з немагнітокерованими дріжджами і магнітним сорбентом з більшим вмістом наноманетиту.

РЕЗЮМЕ

С помощью многовихревого магнитогидродинамического перемешивания наноманетита и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* получен эффективный магнитоуправляемый комплекс [магнитные нанометки-дрожжевая клетка] для сорбции ионов меди Cu^{2+} из рабочих растворов.

Проведены сравнительные исследования процесса очистки рабочих растворов от ионов меди Cu^{2+} новым биосорбентом, определена его сорбционная емкость, построена изотерма адсорбции.

SUMMARY

The effective magnetically controlled set [magnetic labels-yeast cells] was obtained by multivortex magnetohydrodynamic mixing of nanomagnetic and yeast cells for sorption of copper ions Cu^{2+} from working solutions.

Comparative study on purification process of copper ions Cu^{2+} from working solutions by new biosorbent were conducted, sorption capacity was determined, isotherm of adsorption was built.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Wang J. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae* 1968 / J.Wang, C.Chen // *Biotechnology Advances* – 2006. – Vol. 24, № 5 – P. 427-451.
2. Горобець С.В., Карпенко Ю.В. Інтенсифікація сорбційної здатності дріжджів *S. cerevisiae* за допомогою багатовихрового магнітогідродинамічного перемішування / С.В.Горобець, Ю.В.Карпенко // *Електроника и связь – Тематический выпуск «Электроника и нанотехнологии»*. – 2009. – 1, № 2-3. – С.191-195.
3. Patzak M. Development of magnetic biosorbents for metal uptake / M.Patzak, P.Dostalek, R.Fogarty., I.Safarik, J.Obin // *Biotechnology Techniques*. – 1997. – 11, № 7 – P. 483-487.
4. Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media / R.Massart // *IEEE transactions on magnetics*. – 1981. – 17. – № 2. – P. 1247-1248.
5. Gorobets S.V. Intensification of the process of sorption of copper ions by yeast of *Saccharomyces cerevisiae* 1968 by means of a permanent magnetic field / S.V. Gorobets, O.Yu. Gorobets, T.P. Kasatkina, A.I. Ukrainetz, I.Yu. Goyko // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2004. – Vol. 272-276. – P. 2413-2414.

Поступила в редакцію 05.05.2010 г.