

УДК 579.222

К.Н. Генералова, А.А. Минькова, В.Ф. ОлонцевПермский национальный исследовательский
политехнический университет, Пермь, Россия**ИЗОТЕРМЫ АДсорбЦИИ НЕРАСТУЩИХ КЛЕТОК
БАКТЕРИЙ НА УГЛЕРОДНЫХ МАТЕРИАЛАХ**

Судьба иммобилизованного биопрепарата во многом определяется выбором носителя и способом фиксации на его поверхности. Следует отметить, что по количеству проведенных исследований угольные материалы занимают скромное место, хотя по своим физико-химическим характеристикам они не уступают, а во многом и превосходят носители других типов. Угольные материалы обладают высокой химической и биологической стойкостью, механической прочностью, достаточной проницаемостью для фермента и субстратов, большой удельной поверхностью, существованием удобных форм. Они отличаются высокими адсорбционными характеристиками, развитой пористостью с существенным вкладом мезо- и макропор. Удержание адсорбционной молекулы фермента на поверхности носителя обеспечивается за счет неспецифических вандерваальсовых связей и гидрофобных взаимодействий между носителем и поверхностными группами белка.

Рассмотрена проблема выбора подходящего сорбента в качестве носителя для нерастущих клеток бактерий. Основным моментом стало построение изотермы адсорбции. Приведены основные виды существующих изотерм. Достаточно полно описан ход эксперимента, дан подробный расчет основных показателей. На основании экспериментальных данных построены изотермы адсорбции на активированном угле и углеродном волокне. Сделано заключение о зависимости пористой структуры и вида изотермы адсорбции. В случае активированного угля выявлена возможность образования монослойного покрытия, о чем свидетельствует плато на изотерме, которое образуется в результате заполнения клетками бактерий всего объема макропор. При использовании углеродного волокна в качестве носителя показано, что увеличение концентрации суспензии приводит к возрастанию величины адсорбции.

Ключевые слова: адсорбция, активированный уголь, углеродное волокно, изотерма, иммобилизация бактерий.

K.N. Generalova, A.A. Minkova, V.F. Olontsev

Perm National Research Polytechnic University,
Perm, Russian Federation

THE ISOTHERM OF ADSORPTION OF BACTERIA'S NON-GROWING CELL ON CARBON MATERIALS

The fate of the immobilized biological product is largely determined by the choice of the carrier and fixation technique on its surface. It should be noted that the number of studies carbon materials occupy a modest place, although its physical and chemical characteristics, they are not inferior, and in many respects superior to other types of media. Carbon materials have a high chemical and biological stability, mechanical strength, a sufficient permeability for the enzyme and substrates, large specific surface area, the existence of suitable forms. They have high adsorption characteristics, porosity developed with a significant contribution of meso- and macropores. Holding of the enzyme on the surface of the support provided by non-specific links: van der Waals bonds and hydrophobic interactions between the carrier and the surface groups of the protein.

This article deals with the problem of selecting a suitable sorbent as a carrier for non-growing cells of bacteria. As the main points touched upon the construction of the adsorption isotherm. The main types of existing isotherms. Adequately described the course of the experiment, given a detailed calculation of key indicators. On the basis of experimental data of the adsorption isotherm constructed on activated carbon and carbon fiber. Concluded according to the porous structure and the type of adsorption isotherm. In the case of activated carbon revealed the possibility of formation of a monolayer coating, as evidenced by a plateau in the isotherm, which is formed by bacterial cells fill the entire volume of macropores. When using carbon fibers as carrier shown that increasing the concentration of suspension increases the quantity of adsorption.

Keywords: *adsorption, activated carbon, carbon fiber, isotherm, immobilization of bacteria.*

Специфическое применение биотехнологических методов для решения проблем окружающей среды, таких как очистка воды, устранение загрязнений, является одним из направлений современной биотехнологии [1]. В данном направлении можно выделить возможность

использования микроорганизмов в качестве генераторов новых химических веществ. Микробиологический синтез – процесс образования новых химических веществ под воздействием выделяемых микроорганизмами (бактериями, дрожжами, микроскопическими грибами) ферментов, играющих роль биокатализаторов. Микробиологическим синтезом получают некоторые аминокислоты, витамины, антибиотики, бактериальные удобрения [2]. Авторы многих публикаций, таких как работа [3], например, указывают на практическую возможность применения адсорбционной иммобилизации и стабилизации ферментативно-активных субстанций на органических носителях. Биотехнологические процессы, реализуемые при использовании гетерогенных биокатализаторов в виде иммобилизованных клеток микроорганизмов, позволяют получать целевые продукты как результат сложных многостадийных биохимических превращений исходных субстратов [4]. При этом, говоря об иммобилизации микроорганизмов, подразумевают один из известных способов связывания с поверхностью носителя – адсорбцию [5].

Адсорбция – поглощение (точнее, концентрирование) каких-либо компонентов из объема гомогенных сопредельных фаз на поверхности раздела этих фаз [6]. Адсорбция клеток бактерий (или их иммобилизация) относится к типу физадсорбции, которая осуществляется только за счет сил межмолекулярного взаимодействия без переноса или обобществления электронов. Наиболее заметно поверхностные явления проявляются в объектах с высокоразвитой поверхностью, которая придает им новые свойства.

Данная статья посвящена вопросу изучения адсорбции клеток на носителях. В качестве носителей, как уже отмечалось выше, можно использовать вещества, имеющие большое значение удельной поверхности, а также с высокоразвитой пористостью. Наиболее доступными и оптимальными сорбентами являются активированные угли (АУ) и углеродные волокна (УВ). К примеру, АУ обладают следующими характеристиками пористой структуры: удельная поверхность – до 900 м²/г; диаметр пор – до 6 нм; широкий диапазон макро- и микропор.

УВ, как более перспективный материал, имеет более развитую микропористость и, следовательно, большую удельную поверхность. В настоящее время подобные углеродные материалы активно используются в качестве фильтрующих материалов в адсорберах, в аэротенках, в очистке сточных вод от нефтепродуктов и т.д. Обезвреживание разнообразных органических отходов, жидких стоков производствен-

ных предприятий все чаще проводится с помощью микробиологических методов. Наиболее широко применяются микроорганизмы [7]. В естественной среде, особенно в почве, илах и на поверхности растений, микроорганизмы существуют в основном в иммобилизованном состоянии. Способность прикрепляться к поверхности твердых веществ является естественным свойством бактериальных клеток, которое может быть использовано в технологиях, реализующих их биосинтетические и биокаталитические возможности [8].

Стандартный вид изотермы адсорбции выражает соотношение между количеством адсорбированного газа и давлением или относительным давлением при постоянной температуре. В литературе приводятся десятки тысяч изотерм адсорбции, полученных для самых различных твердых тел. Тем не менее большинство изотерм физической адсорбции можно отнести к одному из пяти типов, от I до V (рис. 1) по классификации, впервые предложенной С. Брунауэром, Л. Демингом и Э. Теллером. Ступенчатые изотермы (VI) очень редки, но представляют практический интерес, поэтому включены в общую классификацию [9].

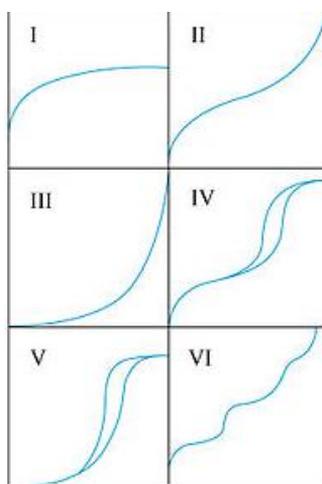


Рис. 1. Виды изотерм адсорбции

Для физической адсорбции первый тип (I) изотермы обусловлен полным заполнением микропор и может соответствовать более чем монослойному покрытию. Второй тип (II) соответствует полимолекулярной адсорбции. В ее начале изотерма имеет выпуклую форму, так как взаимодействие адсорбата с адсорбентом достаточно велико. Если энергия взаимодействия невелика, то адсорбция описывается III типом изотермы. IV и V имеют сорбционный гистерезис – обуславливается присутствием капиллярной конденсации в порах материала [10].

Цель настоящего исследования – изучение адсорбции клеток бактерий штамма *Rhodococcus* по отношению к различным видам углеродных материалов.

Материалы эксперимента

Объектом иммобилизации являлся ранее полученный в Институте экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН в результате селекции штамм бактерии *Rhodococcus rhodochrous* 4-1. Штамм является продуцентом фермента амидазы.

В качестве носителей использовали углеродные материалы различного происхождения: БАУ-А (березовый активированный уголь), древесный уголь, «карбопон β-актив» (углеродное волокно).

Методика эксперимента

Для выращивания клеток бактерий использовали синтетическую среду N следующего состава: KH_2PO_4 – 0,4 г; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 1,5 г; NaCl – 0,2 г на 400 мл дистиллированной воды (д/в). Отдельно готовили раствор микроэлементов: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 20 г; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,4 г; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 г на 100 мл д/в. Далее микроорганизмы инокулировали в среду N, содержащую 1 мл глюкозы; микроэлементы – 1 мл; ацетонитрил – 400 мкл. Колба с приготовленной суспензией помещается на качалку 100 об/мин, 22 °С. Клетки рассеивались на плотную агаризованную среду (12 г мясо-пептонного бульона, 8 г агар-агара разводили в сосуде на 400 мл дистиллированной воды (д/в), затем автоклавировали и переносили в стерильной атмосфере на чашки Петри). Плотная агаризованная среда также используется для хранения микроорганизмов.

Для контроля плотности культуры клеток измеряли оптическую плотность на Ultrospec 3300pro с использованием кюветы толщиной 1 см, длина волны 230 нм. В одну кювету вводили буферный раствор в качестве контроля, в другую – 0,25 мл суспензии и 7 мл буферного раствора. Результаты для двух отдельно приготовленных суспензий имеют следующие значения:

$$d_{\text{исход}} = 7,3;$$

$$d_{\text{буфера}} = 0.$$

Для определения количества сухих клеток в 1 мл суспензии три пробирки типа *эппендорф* взвешивали на аналитических весах, среднее значение их массы равно соответственно $m = 1,2375$ г. В пробирки вводили 2 мл суспензии и центрифугировали при 11,8 тыс. об/мин. Клетки осаждаются. Далее эппендорфы с осадком высушивали в тер-

мостате при температуре 30 °С до постоянной массы. Далее путем взвешивания на аналитических весах определялась масса пробирки с осадком. Масса соответственно равна $m = 1,242$ г. Путем вычитания определяется, что оптической плотности $d_{\text{исход}}$ в 7,3 опт. ед. соответствует 2,5 мг сухих клеток в 1 мл суспензии.

Адсорбцию клеток проводили в течение 30 мин на 10 мл суспензии на изучаемых адсорбентах при перемешивании на качалке со скоростью вращения 100 об/мин. Концентрации суспензий соответственно равны 100 % (2,5 мг/мл), 75 % (1,875 мг/мл), 50 % (1,25 мг/мл), 25 % (0,625 мг/мл), 3 % (0,075 мг/мл). На основании полученных результатов об оптической плотности и по формуле вычисляют количество клеток на носителе (мг/мл) (табл. 1).

$$d_{\text{исход}} - (d_{\text{фильтр}} + d_{\text{промыв}}) = d_{\text{сорб}}$$

Таблица 1

Экспериментальные данные по адсорбции
на углеродных материалах

Сорбент	$d_{\text{фильтр}}$	$d_{\text{промыв}}$	$d_{\text{фильтрат}} + d_{\text{промыв}}$	$d_{\text{исход}}$	$d_{\text{сорб}}$	Адсорбция на сорбенте, мг/мл	Адсорбция на носителе, мг/г
«Карбопон β-актив»	0,169	0,468	2,158	7,3	5,142	17,609	35,219
«Карбопон β-актив»	0,142	0,244	1,664	5,475	3,811	17,401	34,802
«Карбопон β-актив»	0,123	0,112	0,235	3,65	3,415	2,339	4,678
«Карбопон β-актив»	0,100	0,060	0,106	1,825	1,719	2,354	4,708
«Карбопон β-актив»	0,003	0,033	0,036	0,219	0,183	2,089	4,178
БАУ-А	0,413	0,151	4,281	7,3	3,019	10,339	20,678
БАУ-А	0,164	0,198	1,838	5,475	3,637	16,607	33,214
БАУ-А	0,122	0,185	1,405	3,65	2,245	15,376	30,752
БАУ-А	0,562	0,115	0,677	1,825	1,148	18,493	36,986
БАУ-А	0,089	0,020	0,109	0,219	0,11	1,255	2,51

На основании полученных данных (табл. 2) построены изотермы адсорбции суспензии клеток бактерий на АУ (рис. 2) и УВ (рис. 3).

Таблица 2

Зависимость адсорбционной способности АУ и УВ
от увеличения концентрации

БАУ-А		«Карбопон β-актив»	
Концентрации суспензии, мг/мл	Адсорбция на носителе, мг/г	Концентрации суспензии, мг/мл	Адсорбция на носителе, мг/г
0	0	0	0
0,075	20,678	0,075	4,178
0,625	33,214	0,625	4,708
1,25	30,752	1,25	4,678
1,875	36,986	1,875	34,802

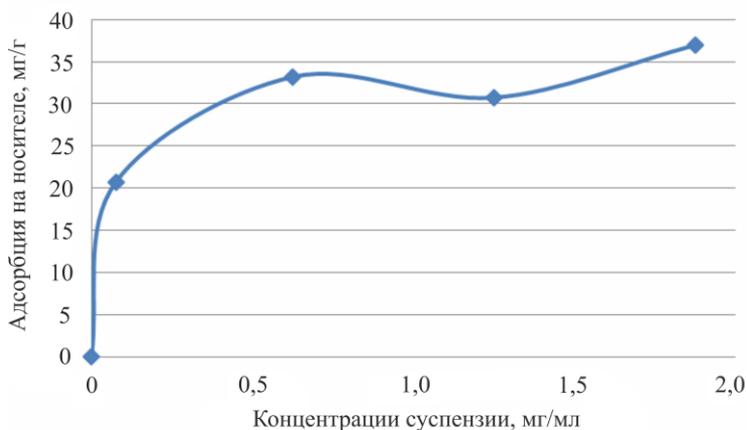


Рис. 2. Изотерма адсорбции на БАУ-А

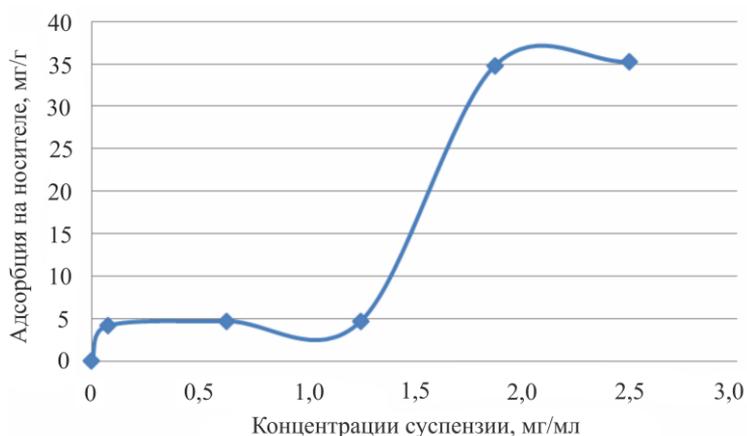


Рис. 3. Изотерма адсорбции на «карбопон β-актив»

Результаты

Как видно из рис. 1, наибольшей сорбционной емкостью по отношению к клеткам бактерий, достигшей 34 мг веса сухих клеток на 1 г сорбента, обладал активированный уголь БАУ-А. Процесс адсорбции клеток зависит от площади доступной поверхности, которая складывается в основном из макропор в случае с АУ, превышающих по своим размерам клетку бактерии. На рис. 2 изображена изотерма адсорбции для БАУ-А. Если сравнивать ее с рис. 1, то можно отнести к I типу изотерм. В случае БАУ-А за счет большой доли макропор достигается полное насыщение поверхностью суспензией бактерий уже при концентрации в 75 % (см. табл. 1). Кривая имеет вид изотерм Ленгмюра, и на кривых наблюдается характерное плато, соответствующее образованию монослойного покрытия из адсорбированных клеток. В случае с УВ адсорбционную способность изученного носителя по отношению к клеткам бактерий можно повысить путем увеличения концентрации клеточной суспензии. При исследовании адсорбционной иммобилизации клеток на «карбопон β-актив» было показано, что увеличение концентрации клеточной суспензии от 1,2 до 2 мг/мл приводило к возрастанию величины адсорбции от 5 до 35 мг сухих клеток на 1 г.

Список литературы

1. Клунова С.М. Биотехнология: учеб. для высш. пед. проф. образ. – М.: Академия, 2010. – 256 с.
2. Коваленко Г.Н. Гетерогенные биокатализаторы. – Lambert Academic Publishing, 2012. – 216 с.
3. Ефременко Е.Н. Гетерогенные биокатализаторы на основе иммобилизованных клеток микроорганизмов: фундаментальные и прикладные аспекты: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М., 2009. – 53 с.
4. Досон Р., Эллиот Д. Справочник биохимика: пер. с англ. – М.: Мир, 1991. – 544 с.
5. Ложкомоев А.С., Глазкова Е.А. Закономерности адсорбции микроорганизмов волокнистым сорбционным материалом // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 2.
6. Грег С., Синг К. Адсорбция, удельная поверхность, пористость: пер. с англ. – 2-е изд. – М.: Мир, 1984. – 306 с.
7. Земскова Л.А. Модифицированные углеродные волокна: сорбенты, электродные материалы, катализаторы // Вестник ДВО РАН. – 2009. – № 2. – С. 39–45.

8. Максимова Ю.Г. Биотрансформация акрилонитрила иммобилизованными клетками актинобактерий рода *Rhodococcus*: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Пермь, 2006. – 22 с.

9. Карнаухов А.П. Адсорбция. Текстура дисперсных и пористых материалов. – Новосибирск: Наука, 1999. – 496 с.

10. Киселев А.В. Межмолекулярные взаимодействия в адсорбции и хроматографии: учеб. пособие для хим., биол. и хим.-технол. спец. вузов. – М.: Высшая школа, 1986. – 360 с.

References

1. Klunova S.M. *Biotechnologiya [Biotechnology]*. Moscow: Akademiya, 2010. 256 p.

2. Kovalenko G.N. *Geterogennyye biokatalizatory [Heterogeneous biocatalysts]*. Lambert Academic Publishing, 2012. 216 p.

3. Efremenco E.N. *Geterogennyye biokatalizatory na osnove immobilizovannykh kletok mikroorganizmov: fundamentalnye i prikladnye aspekty [Heterogeneous biocatalysts based on immobilized cells of microorganisms: fundamental and applied aspects: abstract thesis of the doctor of biological sciences]*. Moscow, 2009. 53 p.

4. Dason R., Elliot D. *Spravochnik biokhimiya [Directory biochemist]*. Moscow, 1991. 544 p.

5. Lozhkomoev A.S., Glazkova E.A. *Zakonomernosti adsorbtsii mikroorganizmov voloknistym sorbtsionnym materialom [Laws of adsorption of microorganisms on fiber sorption material]*. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*, 2013, no. 2.

6. Greg S., Sing K. *Adsorbtsiya, udelnaya poverkhnost, poristost [Adsorption, specific surface area, porosity]*. Moscow, 1984. 306 p.

7. Zemskova L.A. *Modifitsirovannyye uglevodnyye volokna: sorbenty, elektrodnyye materialy, katalizatory [Modified carbon fibers: sorbents, electrode materials, catalysts]*. *Vestnik Dalnevostochnogo otdeleniya Rossiyskoy akademii nauk*, 2009, no. 2, pp. 39-45.

8. Maksimova Y.G. *Biotransformatsiya akrilonitrila immobilizovannymi kletkami aktinobakterii roda Rhodococcus [Biotransformation of acrylonitrile by immobilized cells of Rhodococcus actinobacteria]: abstract thesis of the doctor of biological sciences*, 2006. 22 p.

9. Karnaukhov A.P. *Adsorbtsiya. Tekstura dispersnykh i poristykh materialov [Adsorption. Texture of dispersed and porous materials]*. Novosibirsk: Nauka, 1999. 496 p.

10. Kiselev A.V. *Mezhmolekulyarnyye vzaimodeystviya v adsorbtsii i khromatografii [Intermolecular interactions in the adsorption and chromatography]*. Moscow: Vysshaya shkola, 1986. 360 p.

Об авторах

Генералова Ксения Николаевна (Пермь, Россия) – магистрант кафедры порошкового материаловедения Пермского национального исследовательского политехнического университета (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29; e-mail: generalovakn_21_1992@mail.ru).

Минькова Анфиса Андреевна (Пермь, Россия) – магистрант кафедры порошкового материаловедения Пермского национального исследовательского политехнического университета (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29; e-mail: minkova20@gmail.com).

Олонцев Валентин Федорович (Пермь, Россия) – доктор технических наук, профессор кафедры порошкового материаловедения Пермского национального исследовательского политехнического университета (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29; e-mail: olontsevvf@gmail.com).

About the authors

Kseniya N. Generalova (Perm, Russian Federation) – master student, department of powdered materials, Perm National Research Polytechnic University (Komsomolsky av., 29, Perm, 614990, Russian Federation; e-mail: generalovakn_21_1992@mail.ru).

Anfisa A. Minkova (Perm, Russian Federation) – master student, department of powdered materials, Perm National Research Polytechnic University (Komsomolsky av., 29, Perm, 614990, Russian Federation; e-mail: minkova20@gmail.com).

Valentin F. Olontsev (Perm, Russian Federation) – doctor of technical science, professor, department of powdered materials, Perm National Research Polytechnic University (Komsomolsky av., 29, Perm, 614990, Russian Federation; e-mail: olontsevvf@gmail.com).

Получено 15.09.2014