

ПОГЛОЩЕНИЕ И НАКОПЛЕНИЕ  $Mn^{54}$  И  $Zn^{65}$  ХЛОРЕЛЛОЙ

С. А. Патин, В. Н. Ткаченко, Л. В. Федотова

При выяснении действия тяжелых металлов на одноклеточные водоросли встает вопрос о поглощении и накоплении ими химических элементов. В предлагаемой работе сделана попытка выяснить механизм накопления металла одноклеточными водорослями в связи с фотосинтезом и дыханием.

Под влиянием света в клетках водорослей происходят сложные биохимические процессы, следствием которых является поглощение клетками углекислоты и выделение кислорода. В результате этого процесса среда, в которой выращиваются водоросли, сильно подщелачивается и образуются гидроокиси металлов, которые легко затем сорбируются на поверхности клеток. В процессе дыхания выделяется углекислота. Пограничный с клеткой слой среды подкисляется, гидроокиси, сорбированные на поверхности клеток, нейтрализуются с образованием свободных ионов металлов, которые затем легко вступают в связь со структурой клетки. Для проверки этого предположения было поставлено две серии опытов: первая—для выяснения влияния фотосинтеза и физиологического состояния культуры на накопление марганца и цинка одноклеточными водорослями, а вторая для выяснения механизма поглощения марганца и цинка клетками водорослей.

Во всех опытах использовалась альгологически чистая культура протококковой водоросли *Chlorella vulgaris*. Водоросль выращивали на среде Прата и отбирали во все опыты в логарифмической фазе роста. В опытах использовали радиоактивные растворы  $Mn^{54}$  и  $Zn^{65}$ . Во всех опытах в культуры водорослей изотопы вносили из расчета  $10^{-5}$  Ки\*/л, что соответствовало приблизительно 1000 имп./мин на 1 мл воды. При таких концентрациях радиоактивных изотопов количество стабильного  $Mn$  не превышало 0,03 мкг/л, а  $Zn$  было менее 0,03 мг/л. Токсическое действие  $Zn$  на одноклеточные водоросли проявляется, начиная с концентраций 0,7 мг/л, а  $Mn$  с 0,005 мг/л (North, Stephens, North, 1970), поэтому возможность токсичного действия  $Zn$  и  $Mn$  в наших опытах отпала. Опыты ставились в колбах Эрленмейера емкостью 50 мл. Объем экспериментальных растворов водорослей с изотопом составлял во всех опытах 20 мл. Плотность культуры в экспериментальных растворах всех опытов составляла 1 млн. клеток в 1 мл. Опыты ставили в люминостате при освещенности  $1 \cdot 10^5$  эрг/(см<sup>2</sup> · с) и температуре  $20 \pm 3^\circ C$ .

Был поставлен предварительный опыт для выяснения зависимости накопления  $Mn^{54}$  хлореллой от продолжительности освещения. Одна партия колб с экспериментальными растворами была помещена

\* Ки (кюри) в системе СИ =  $3,7 \cdot 10^{10}$  с<sup>-1</sup>.

в люминостат и освещалась непрерывно, другая экспонировалась на свету с интервалом 10 ч, а третья была поставлена в темноту. Из рис. 1а видно, что накопление изотопов идет особенно быстро в первые часы и при непрерывном освещении их активность достигает постоянного уровня через 48 ч, при прерывистом значительно позже. Эти данные согласуются с результатами работ, проводимых ранее (Гилева, 1965; Bachmann, Odum, 1960). В водорослях, находящихся в темноте, количество изотопов достигает постоянного уровня уже через 24 ч. Исходя из этих данных, все последующие опыты по накоплению изотопов проводились при непрерывном освещении. Продолжительность опытов составляла 48 ч для водорослей, экспонированных в люминостате, и 24 ч для водорослей, находящихся в темноте.

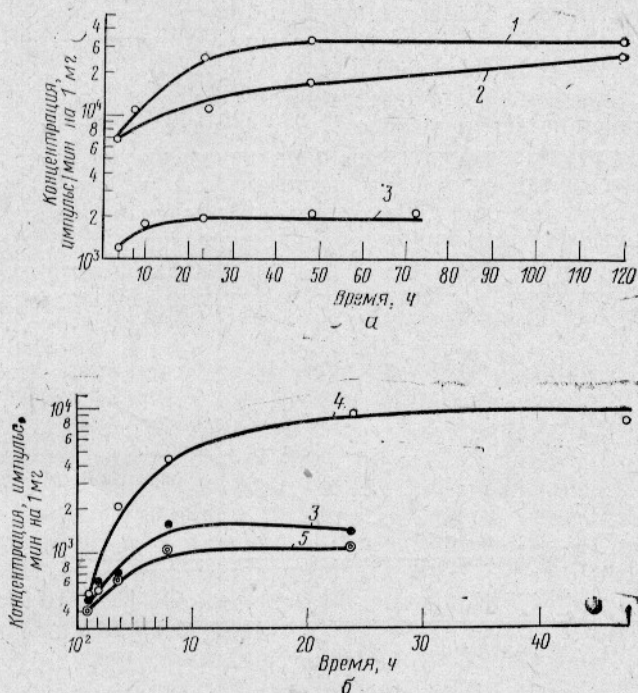


Рис. 1. Накопление  $Mn^{24}$  в зависимости от продолжительности освещения (а) и от физиологического состояния культуры б: 1 и 2 — соответственно непрерывное и прерывистое освещение; 3 — в темноте; 4 — на свету; 5 — мертвая культура.

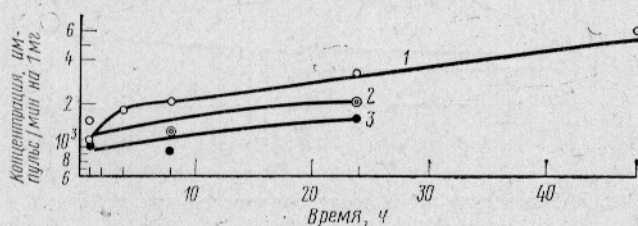


Рис. 2. Накопление  $Zn^{65}$  в зависимости от физиологического состояния культуры: 1 — на свету; 2 — мертвая культура; 3 — в темноте.

Первая серия опытов была поставлена по следующей схеме. Среду с водорослями разливали по колбам и туда вносили радиоактивный раствор изотопов  $Mn^{54}$  или  $Zn^{65}$ . Предварительно часть водорослей была убита нагреванием до температуры  $95^{\circ}C$  (Гилева, 1965). Контроль за состоянием культуры после нагревания осуществлялся с помощью люминесцентного микроскопа МЛ-2. Колбы с живой и мертвой культурой помещали в люминостат. Часть колб с живой культурой ставили в темноту. Опыт осуществлялся в трех повторностях для каждой из трех групп водорослей (живые, убитые и в темноте). Через час из каждой группы снимали параллельные колбы. Водоросли отфильтровывали на мембранные фильтры № 3, а в фильтрате каждой колбы измеряли рН. Фильтры после сушки в эксикаторе с силикагелем в течение 24 ч поступали на измерение. Активность фильтров определяли при помощи установки Б-4 и сцинтилляционного датчика с кристаллом  $NaJ(Tl)$  размером  $40 \times 40$ . Ту же операцию повторяли с остальными колбами, когда их снимали через 2, 4, 8, 24 и 48 ч.

Результаты этого опыта представлены на рис. 1, б и 2. В культурах, экспонированных в темноте, и в убитых культурах накопление  $Mn$  и  $Zn$  происходит приблизительно на одном уровне и количество их достигает постоянного уровня в первые часы опыта. В водорослях, экспонированных на свету, накопление  $Mn$  идет более активно, и его количество достигает постоянного уровня уже через 24 ч, причем относительная активность почти в 10 раз превышает активность убитой культуры и культуры, находящейся в темноте. Накопление  $Zn$  идет

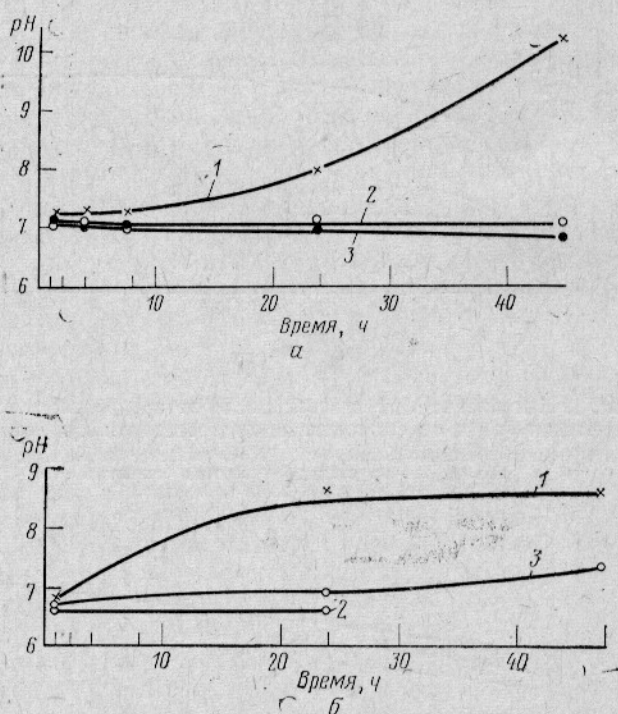


Рис. 3. Изменение рН в среде водорослей при добавках  $Mn^{54}$  (а) и  $Zn^{65}$  (б):

1 — на свету без изотопа; 2 — в темноте с изотопом; 3 — на свету с изотопом.



гораздо медленнее и его количество достигает постоянного уровня уже через 48 ч. Таким образом, накопление металлов связано с фотосинтезом и физиологическим состоянием культуры, при этом накопление Мп происходит более интенсивно, так как в этом случае, по-видимому, преобладают метаболические процессы накопления, в то время как в случае накопления Zn — сорбционные процессы. Аналогичный вывод получен другими авторами (Иванов, Рожанская, 1972). Значительный разброс результатов опытов (плохая воспроизводимость) объясняется четкой связью накопления Мп с фотосинтезом. Незначительные отклонения в интенсивности фотосинтеза приводят к значительным колебаниям захватывания металла клетками водорослей. Относительная ошибка воспроизводимости составила в опытах с Мп 20—25%, а в опытах с Zn не превышала 10%.

Результаты измерения рН в фильтрах представлены на рис. 3. В опытных растворах, экспонированных на свету, видимого изменения рН не наблюдается, тогда как в контрольных растворах (без изотопа) рН на свету возрастает. Такое изменение рН, по-видимому, связано с влиянием радиоактивности на метаболизм и фотосинтез водорослей.

Вторую серию опытов по выяснению механизма накопления металлов ставили параллельно с первой. Культуру водорослей разливали по колбам, добавляли радиоактивный раствор Мп или Zn и колбы ставили в люминостат на 0,5—3 ч в опытах с Мп и 4—8 ч в опытах с Zn. Продолжительность экспозиции на свету культуры с раствором цинка больше, так как Zn накапливается значительно медленнее, чем Мп (см. рис. 2).

Эти опыты ставили в пяти повторностях. После экспозиции на свету одну часть колб с водорослями убирала в темноту, а из другой части колб водоросли отфильтровывали на мембранный фильтр № 3. После этого фильтры половины колб промывали чистой средой Прата, а остальные — 0,01 н. раствором  $\text{HNO}_3$  объемами, равными объемам экспериментальных растворов (20 мл). Фильтры подсушивали в эксикаторе в течение 24 ч, и активность их измеряли на той же установке. Колбы с водорослями, поставленные в темноту, выдерживали в таких условиях от 0,5 до 3 ч в опытах с Мп и от 10 до 22 ч в опытах с Zn. Затем водоросли также отфильтровывали на фильтрах № 3, причем опять часть фильтров смывали средой Прата, а часть 0,01 н. раствором

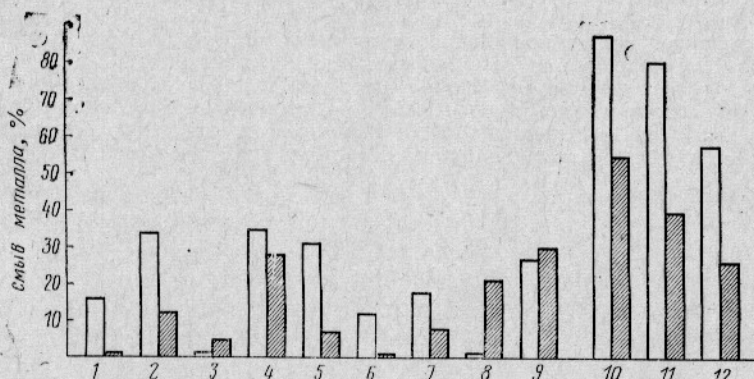


Рис. 4. Влияние выдерживания культур в темноте и на свету на прочность связи металла с клетками фитопланктона (1, 2 и т. д. — порядковые номера опытов):

1—9 — опыты с Мп; 10—12 — опыты с Zn.

$\text{HNO}_3$ . Исходя из предположения, изложенного выше, в первом световом периоде образуются гидроокиси Mn и Zn и они адсорбируются на поверхности клеток. При промывке фильтров с водорослями кислым раствором гидроокиси растворяются и ионы Mn и Zn смываются с поверхности клеток. Измеренная активность должна быть выше в том случае, когда водоросли промывали средой Прата, так как с поверхности клеток сорбированные гидроокиси не смываются. В темноте ионы металлов закрепляются в структуре клетки и вследствие этого промывка водорослей кислым раствором не дает эффекта (рис. 4). Как видно из рис. 4, опыты с Mn плохо воспроизводимы по причинам, отмеченным выше. Так, опыты № 3, 8, 9 не подтверждают нашего предположения, т. е. фиксации металла клетками после выдерживания культур в темноте не произошло. Однако тенденцию к усилению прочности связи металла с клеткой после пребывания культуры в темноте можно отметить по совокупности данных. В опытах с Zn меньшая зависимость его накопления от фотосинтеза дает более четкий эффект повышения прочности связи после выдерживания культур в темноте.

На основании изложенного выше можно сделать вывод о фиксации металлов клетками водорослей вследствие локального повышения рН на их поверхностях на свету и последующего закрепления в структуре клетки в темноте. Этот механизм справедлив для элементов гидролизаторов (Fe, Mn, Zn, Co, Cd и др.) и, возможно, применим для любых фотосинтезирующих поверхностей в водной среде.

#### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Гилева Э. А. О накоплении некоторых химических элементов пресноводными водорослями.— «Труды института биологии УФ АН СССР», 1965, вып. 45, с. 5—31.

Иванов В. Н., Рожанская Л. И. Поведение цинка-65 в морской воде и накопление его гидробионтами.— В кн.: Радиационная и химическая экология гидробионтов. Киев, 1972, с. 42—62.

Bachmann R. W., E. P. Odum. Uptake of  $\text{Zn}^{65}$  and primary productivity in marine benthic algae. *Limn. and Oceanog.*, 1960, v. 5, № 4, pp. 349—356.

North W. I., G. C. Stephens, B. B. North. Marine algae and their relations to pollution problems. *FAO Tech. Conf. Marine Pollution*, Rome, 1970, 22 p.

*Pollution: an international problem for fisheries*. FAO, 1971, № 14, p. 85.

#### SUMMARY

The experiment on accumulation of manganese and zinc by *Chlorella* is carried out with radioactive indicators. It has been ascertained that the mechanism of accumulating the metals by monocell algae is closely associated with photosynthesis and cell respiration. Besides, accumulation is also related to the physiologic state of cell culture. It has been concluded that accumulation of manganese is connected with metabolic processes in cells whereas accumulation of adsorption type is characteristic for zinc.