

## БИОСОРБЕНТ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК И МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ УДАЛЕНИЯ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Солопов М.В., Легенький Ю.А., Беспалова С.В.

Донецкий национальный университет

ул. Университетская, 24, г. Донецк, 283050, ДНР; e-mail: mxsolopov@yandex.ru

Поступила в редакцию: 30.06.2018

**Аннотация.** Проблема возможности использования биосорбентов для очистки сточных вод от ионов тяжелых металлов является актуальным направлением исследований. Статья посвящена оценке магнитных и сорбционных свойств дрожжевых клеток, полученных путем маркирования наночастицами  $Fe_3O_4$ . На основе вычисленных значений магнитной восприимчивости дрожжей была проведена компьютерная симуляция сепарации клеток в рассматриваемой модели сепаратора в зависимости от скорости потока жидкости и индукции магнитов. Результаты моделирования свидетельствуют о возможности высокоэффективной сепарации модифицированных клеток. Биосорбционные свойства клеток определялись при очистке модельных растворов от ионов меди, никеля и железа. Путем анализа кинетики сорбции ионов металлов из растворов была определена биосорбционная емкость нативных и модифицированных клеток. Было показано, что маркированные наночастицами клетки могут более эффективно аккумулировать ионы меди и никеля по сравнению с нативными дрожжами. Результаты могут быть использованы при реализации технологии очистки вод с помощью дрожжевых сорбентов.

**Ключевые слова:** дрожжевые клетки, биосорбент, ионы тяжелых металлов, магнитные наночастицы, магнитная сепарация.

### ВВЕДЕНИЕ

Поиск новых способов очистки сточных вод от ионов тяжелых металлов представляется весьма актуальным. Помимо физико-химических способов удаления ионов металлов внимание привлекают биологические методы очистки, которые в большинстве своем подразумевают использование биомассы микроорганизмов в качестве сорбентов. Среди множества работ, посвященных изучению различных типов биосорбентов, особо выделяется большой пул исследований биосорбционных свойств дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* [1]. Такой интерес вызван за счет изученности этого организма, простоты культивирования и работы с ним. Принимая во внимание то, что дрожжи широкомасштабно применяются в пищевой и алкогольной промышленности, отходы от этих производств могут быть реутилизированы, но уже в роли очистителя загрязненных вод.

При использовании дрожжевых клеток для сорбции ионов тяжелых металлов необходим быстрый и эффективный способ отделения биосорбента по завершении процесса очистки. Применение магнитных наночастиц оксидов железа (SPION) для маркировки клеток позволяет дрожжам приобретать свойство управляемости при наложении внешнего магнитного поля [2, 3]. На этом принципе основана технология магнитной сепарации клеток.

Цель данного исследования – определение сорбционных свойств и эффективности магнитной сепарации дрожжевых клеток, маркированных SPION.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Магнитные наночастицы  $Fe_3O_4$  синтезировали по аналогии с методикой, описанной в работе [4], для стабилизации коллоидов использовали тетраметиламмоний гидроксид (ТМАН) и цитрат натрия (Cit). Магнитомаркированию подвергался коммерческий штамм сухих пекарских дрожжей («Саф-Левюр», Россия). На начальном этапе навеску сухих дрожжей суспендировали в 0,9 % NaCl при 4 °C и центрифугировали в течение 7 минут при 1000 об/мин. Затем, если для маркировки применялись наночастицы  $Fe_3O_4$ -ТМАН, биомассу суспендировали в буфере глицин-NaOH (pH = 10,6), при использовании  $Fe_3O_4$ -Cit клетки суспендировали в буфере глицин-HCl (pH = 2,2). После этого в суспензию добавляли коллоид наночастиц с расчетом 2 пг Fe/кл и инкубировали на протяжении 1 минуты. Затем биомассу магнитомаркированных дрожжей тоекратно отмывали 0,9 % NaCl. В результате этой процедуры были получены два типа парамагнитных клеток: YFT- и YFC-клетки, покрытые наночастицами  $Fe_3O_4$ -ТМАН и  $Fe_3O_4$ -Cit соответственно. Магнитную восприимчивость модифицированных дрожжей ( $\chi_{кл}$ ) вычисляли на основе определения

магнитофоретической скорости YFT- и YFC-клеток. Процедура проведения магнитофореза и определения значений  $\chi_{\text{кл}}$  была описана нами в работе [5]. Рассчитанные значения  $\chi_{\text{кл}}$  использовались для компьютерного моделирования сепарации дрожжей, маркированных SPION.

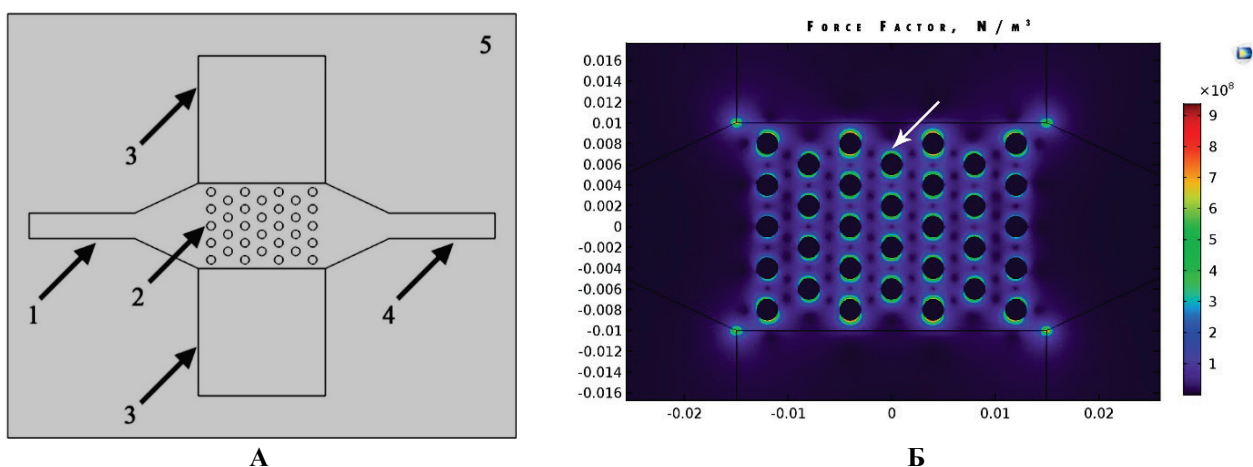
Для оценки возможности отделения магнитомаркированных дрожжей с помощью магнитного поля в производственных условиях предлагается модель сепаратора, входящего в установку для очистки сточных вод. Схема сепаратора приведена на рисунке 1А. Он представляет собой канал с расширением, в конструкцию которого входят два магнита и концентраторы поля в форме цилиндрических стержней из ферромагнитного материала. Теоретически, вода после процесса очистки, но еще содержащая дрожжевой биосорбент, поступает в сепаратор, где происходит отделение клеток путем удержания на магнитных полюсах стержней. При попадании в сепаратор клетки испытывают действие сил со стороны магнитного поля и вязкой среды. Они включают магнитофоретическую силу, силу сопротивления среды (силу Стокса), выталкивающую силу, гравитацию, инерциальные, и силы взаимодействия частиц с жидкостью. Последние два типа сил являются незначительными, поэтому в нашей модели они игнорировались. Так как геометрия модели рассматривалась в двумерной проекции, то выталкивающая сила и гравитация, также не учитывались. Поэтому, суть всей модели сводилась к решению следующего уравнения:

$$m_{\text{к}} \frac{d^2 r}{dt^2} = F_{\text{М}} + F_{\text{С}}, \quad (1)$$

где  $m_{\text{к}}$  – масса клетки;  $r$  – пространственное расположение клетки;  $F_{\text{М}}$  – магнитофоретическая сила;  $F_{\text{С}}$  – сила Стокса.

Рассматриваемый магнитный сепаратор позволяет создавать заданное количество областей с высокими значениями силового фактора поля  $(H \cdot \nabla)B$  ( $H$  и  $B$  – напряженность и индукция магнитного поля) на протяжении выходного канала за счет наличия системы ферромагнитных стержней. Присутствие зон с высокими значениями  $(H \cdot \nabla)B$  является ключевым для эффективного протекания сепарации, так как магнитофоретическая сила линейно зависит от этого параметра. Предлагаемое расположение стержней в шахматном порядке на расстоянии  $2r$  друг от друга ( $r$  – радиус стержня) позволяет увеличить вероятность захвата магнитомаркированных клеток и исключить их взаимное влияние друг на друга [6]. Результаты моделирования силового фактора магнитного поля в сепараторе (рис. 1Б) указывают на то, что наибольшие значения параметра  $(H \cdot \nabla)B$  были характерны для полюсов стержней и углов магнитов. Отдельно стоит отметить, что на полюсе одного из стержней значение  $(H \cdot \nabla)B$  превышает таковые в центре и на углах поверхности магнитов в 15 раз и 2 раза соответственно.

Для построения, вычисления и обработки результатов модели использовался программный пакет для мультифизического моделирования Comsol Multiphysics 5.2. При создании модели были использованы модули AC/DC (для моделирования магнитного поля) и CFD (для вычисления гидродинамики процесса) со следующими физическими интерфейсами: Magnetic Fields, No Currents, Laminar Flow и Particle Tracing for Fluid Flow. Решение модели, состояло из двух этапов, первый – моделирование распределения магнитного поля и скорости потока жидкости, второй – вычисление траекторий движения клеток.



**Рисунок 1.** А) Геометрия модели сепаратора магнитомаркированных клеток: 1 – входной канал, 2 – сеть ферромагнитных концентраторов, 3 – магнит, 4 – выходной канал; 5 – расчетная область; Б) распределение силового фактора магнитного поля  $(H \cdot \nabla)B$  в магнитном сепараторе, смоделированное в программе Comsol Multiphysics (стрелкой указан стержень, на полюсе которого вычислялось значение  $(H \cdot \nabla)B$  для сравнения с силовыми характеристиками магнитов)

Магнитная восприимчивость клеток была представлена в качестве варьируемого параметра. Расчет траекторий движения производили для 100 клеток, выпуск которых осуществлялся со входного канала. Эффективность сепарации биосорбента определялась процентом клеток, удержанных на ферромагнитных концентраторах или у оснований полюсов магнитов.

Нативные, YFT- и YFC-клетки применялись в роли биосорбентов ионов  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$  из модельных растворов, для приготовления которых были использованы следующие соли металлов:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (AppliChem GmbH, Германия). Начальные концентрации ионов меди, никеля и железа составляли 200 мг/л, 50 мг/л и 60 мг/л соответственно. На начальном этапе биомассу трехкратно промывали дистиллированной водой путем центрифугирования при 1000 об/мин в течение 7 минут. Далее биосорбенты выдерживали в 0.1 М растворе NaOH на протяжении 5 минут. Затем биомассу еще раз дополнительно двукратно промывали. После чего пробирки с биосорбентом, суспендированном в модельном растворе металла, инкубировали на орбитальном шейкере (при 28 об/мин) на протяжении 30 минут. Концентрация биосорбента составляла 10 г/л. Кинетику концентрации ионов металла регистрировали в течение 30 минут с момента начала контактирования. Определение содержания металлов в растворах осуществляли с помощью фотометрических методов.

Статистическую обработку данных по кинетике биосорбции ионов металлов проводили путем регрессионного анализа. Экспериментальные данные моделировались уравнением кинетики адсорбции псевдo-второго порядка [7]:

$$\frac{dq_t}{dt} = K(q_e - q_t)^2, \quad (2)$$

где  $t$  – время, с;  $q_t$  – сорбционная емкость в заданный момент времени, мг/г;  $K$  – константа равновесной скорости,  $\text{г} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ ;  $q_e$  – равновесная сорбционная емкость, мг/г. Путем интегрирования и применения граничных условий  $t=0, q_t=0$  и  $t=t, q_t=q_e$ , уравнение (2) можно представить в виде:

$$q_t = \frac{t}{1/Kq_e^2 + t/q_e}. \quad (3)$$

Для регрессионного анализа экспериментальных данных использовалась линейная форма уравнения (3):

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{Kq_e^2} + \frac{1}{q_e} t. \quad (4)$$

Сорбционную емкость биосорбента в заданный момент времени рассчитывали по формуле:

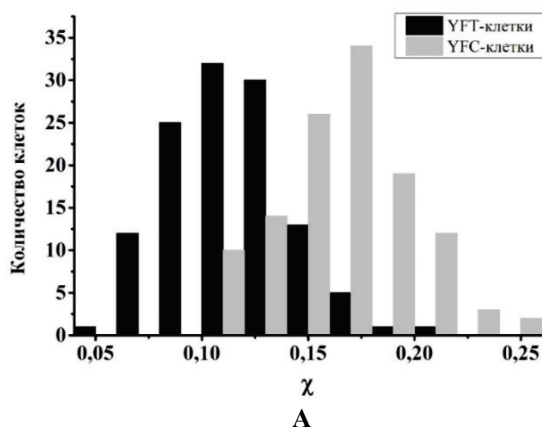
$$q_t = \frac{C_i - C_t}{m} \times V, \quad (5)$$

где  $q_t$  – сорбционная емкость в заданный момент времени, мг/г;  $C_i$  – начальная концентрация металла в растворе, мг/л;  $C_t$  – концентрация металла в растворе в заданный момент времени, мг/л;  $m$  – масса биосорбента, г;  $V$  – объем реакционной смеси, л.

Для определения коэффициентов кинетической модели использовался линейный регрессионный анализ, выполненный с помощью программы OriginPro 9.0 (США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рассчитанные значения параметров  $\chi_{\text{кл}}$  для YFT- и YFC-клеток представлены на рисунке 2. Анализ полученных данных с помощью критерия Шапиро-Вилка свидетельствует о том, что распределение YFT- и YFC-клеток по параметру магнитной восприимчивости является нормальным. Среднее значение восприимчивости, характерное для YFT-клеток ( $\chi_{\text{YFT}}$ ) составляет 0,115, в то время как  $\chi_{\text{YFC}} = 0,166$ . Несмотря на то, что два типа клеток модифицировались при одинаковых дозах внеклеточного железа (2 пг Fe / кл), их магнитные свойства отличаются, свидетельствуя о том, что YFC-клетки обладают более сильными парамагнитными свойствами. Это может быть связано с коагуляцией и неравномерным распределением наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -ТМАН в процессе магнитомаркирования клеток. Микрофотографии фиксированных и окрашенных на выявление ионов железа нативных и модифицированных клеток представлены на рисунках 3А-В.



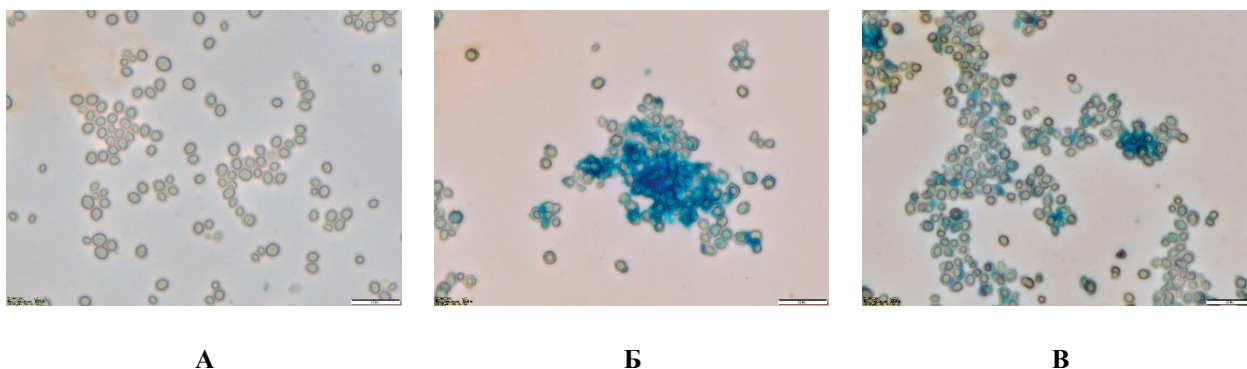
**Рисунок 2.** Распределение YFT- и YFC-клеток по значениям магнитной восприимчивости (среди каждой фракции проанализировано 120 клеток)

На фотографиях заметно, что YFC-клетки обладают более равномерным распределением наночастиц на своей поверхности, что нельзя сказать о YFT-клетках, конгломераты которых внутри содержат скопления частиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -ТМАН.

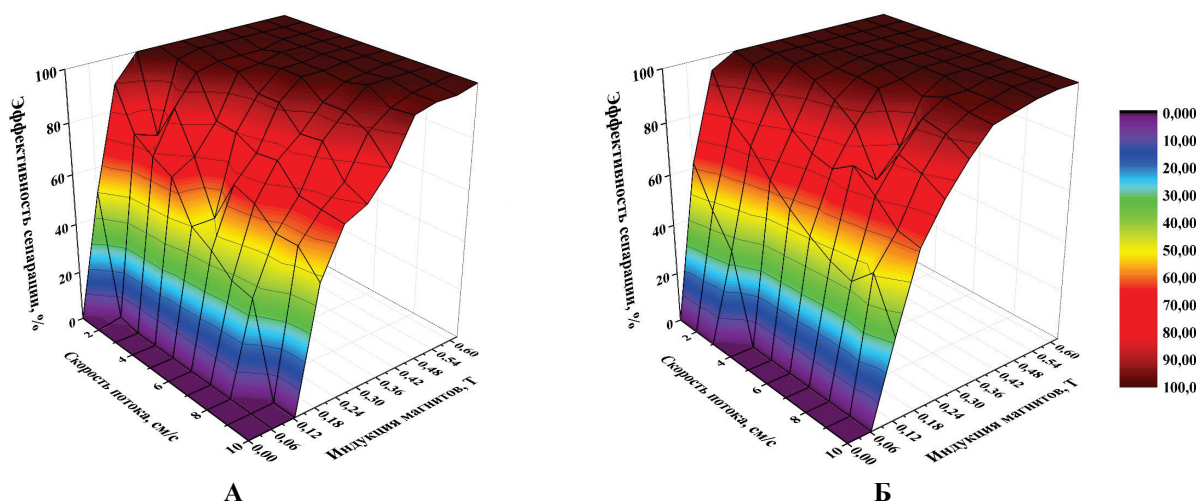
Таким образом, коагуляция и неравномерное распределение наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -ТМАН на поверхности дрожжевых клеток может являться причиной сниженного значения  $\chi_{\text{YFT}}$  по сравнению с  $\chi_{\text{YFC}}$ . Полученные в результате расчетов значения  $\chi_{\text{YFT}}$  и  $\chi_{\text{YFC}}$  были использованы при компьютерной симуляции магнитного захвата клеток в модели сепаратора.

Эффективность модельной сепарации магнитомаркированных клеток во многом определяется не только значением их магнитной восприимчивости, но также соотношением силовых характеристик магнитов и скорости выходного потока жидкости. Для оценки оптимальных параметров установки для осуществления биосорбции было проведено моделирование траекторий движения YFT- и YFC-клеток в выходном канале при варьировании индукции магнитов и скорости выходного потока. На основе результатов вычисляли эффективность сепарации, определяемую процентом клеток, удержанных системой магнитов и стержней. Результаты моделирования представлены на рисунке 4.

Так как две фракции полученных модифицированных дрожжей отличаются по средней величине магнитной восприимчивости, определенной методом магнитофореза, то и эффективность их сепарации различна. Согласно результатам моделирования, при индукции магнитов 0,31 Т и скорости потока 5 см/с эффективность сепарации YFT-клеток составила 92 %, а YFC-клеток – 98 %. На основе полученного распределения эффективности захвата магнитомаркированных клеток можно определять оптимальные сочетания характеристик магнитов и скорости выходного потока в магнитном сепараторе. Если предпочтительным является использование недорогих магнитов, то скорость потока должна быть предельно низкой. Так, при использовании магнитов с индукцией около 0,2 Т для 100 %-ой сепарации YFC-клеток скорость выходного потока не должна превышать 1 см/с. Однако в очистительных сооружениях минимизация времени на сепарацию биосорбента являлась бы более предпочтительной. При максимальной исследуемой скорости выходного потока (10 см/с) наивысшая степень сепарации YFC-клеток наблюдалась при значении индукции магнитов в 0,6 Т.



**Рисунок 3.** Микроскопия нативных (А), YFT- (Б) и YFC-клеток (В), окрашенных гексацианоферратом калия для визуализации распределения наночастиц (увеличение 400х, масштабная линейка 20 мкм)



**Рисунок 4.** Эффективность сепарации YFT- (А) и YFC-клеток (Б) в зависимости от скорости потока жидкости и индукции магнитов

Таким образом, моделирование показало, что YFT- и YFC-клетки могут сепарироваться в разработанной модели при сочетаниях сильной магнит-высокая скорость и слабой магнит-малая скорость потока.

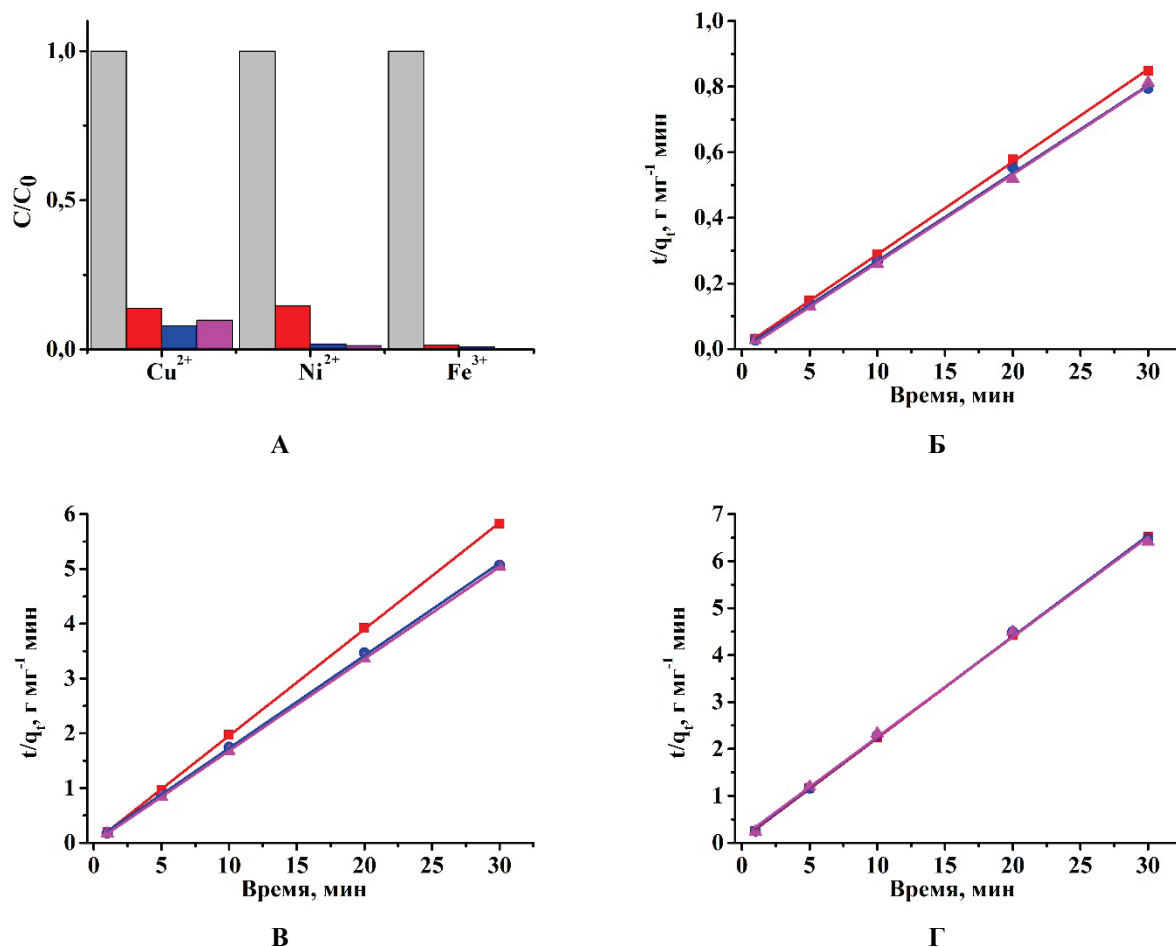
Определение содержания ионов тяжелых металлов позволило выявить, что после 30-минутного контактирования исследуемых биосорбентов с модельными растворами, удается добиться снижения концентрации загрязнителя на 85-100 % (рис. 5А). Стоит отметить, что основная часть ионов металла сорбировалась клетками уже после 1-5 минут контактирования и вплоть до 30-й минуты процесс десорбции не наблюдался. Согласно литературным данным [8, 9] в течение этого периода процесс биосорбции происходит за счет пассивного пути, для осуществления которого метаболическая активность клеток не является необходимостью. Пассивная сорбция характеризуется взаимодействием ионов с функциональными группами поверхностного аппарата клетки за счет механизмов координации, комплексообразования, ионообмена, электростатической адсорбции или неорганического микроосаждения. Высокая эффективность сорбции исследуемых ионов металлов за столь короткий период свидетельствует о перспективности использования магниточувствительных дрожжевых клеток в роли пассивных биосорбентов.

Линейный регрессионный анализ был использован для обработки экспериментальных данных с целью определения параметров равновесной биосорбционной емкости ( $q_e$ ) исследуемых биосорбентов. Результаты представлены на рис. 5Б-5Г и в таблице 1. Кинетическая модель псевдо-второго порядка удовлетворительно описывает экспериментальные значения, это отображено в высоких значениях коэффициента  $R^2$ . Полученные результаты указывают на усиление биосорбционной емкости у YFT- и YFC-клеток в сравнении с нативными. При биосорбции ионов  $Cu^{2+}$  значение  $q_e$  для нативных клеток составляет 35.40 мг/г, а YFT- и YFC-клеток – 37,36 мг/г и 37,58 мг/г соответственно. В случае биосорбции ионов  $Ni^{2+}$  значение  $q_e$  для нативных клеток составляет 5,14 мг/г, а YFT- и YFC-клеток – 5,92 мг/г и 5,96 мг/г соответственно. Параметры биосорбционной емкости исследуемых клеток не имели достоверно значимых различий при сорбции ионов  $Fe^{3+}$ . Повышение биосорбционной емкости у магнитомаркированных дрожжей может быть вызвано участием наночастиц  $Fe_3O_4$  в процессе связывания ионов металла или их влиянии на состав и свойства поверхностных сайтов клеток.

**Таблица 1.** Биосорбционная емкость дрожжевых биосорбентов

Тип клеток	$Cu^{2+}$			$Ni^{2+}$			$Fe^{3+}$		
	$q_e$ , мг/г	$\sigma_{рег}$	$R^2$	$q_e$ , мг/г	$\sigma_{рег}$	$R^2$	$q_e$ , мг/г	$\sigma_{рег}$	$R^2$
Нативные	35.40	0.304	0.999	5.14	0.022	0.999	4.63	0.031	0.999
YFT	37.36	0.666	0.999	5.92	0.066	0.999	4.65	0.077	0.999
YFC	37.58	0.610	0.999	5.96	0.007	0.999	4.69	0.104	0.998

$\sigma_{рег}$  – стандартная ошибка коэффициента регрессии



**Рисунок 5.** Изменение концентрации тяжелых металлов в растворах после 30-минутного взаимодействия с нативными клетками (красный), YFT- (синий) и YFC-клетками (пурпурный), серый столбец отмечает нормированное начальное содержание ионов металла в модельном растворе (А); кинетика биосорбции ионов  $\text{Cu}^{2+}$  (Б),  $\text{Ni}^{2+}$  (В) и  $\text{Fe}^{3+}$  (Г) при контакте с: ■ – нативными клетками, ● – YFT-клетками, ▲ – YFC-клетками

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Компьютерное моделирование на основе экспериментально рассчитанных значений магнитной восприимчивости свидетельствует о возможности осуществления проточной высокоэффективной магнитной сепарации дрожжевых клеток, маркированных наночастицами  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Исследование сорбционных свойств модифицированных дрожжей указывает на высокий уровень очистки растворов (85-100 %) от ионов тяжелых металлов. Связывание наночастиц с поверхностным аппаратом дрожжевой клетки может положительно влиять на ее биосорбционный потенциал путем усиления такой характеристики как биосорбционная емкость. Результаты работы могут быть использованы в реализации технологии очистки сточных вод от ионов тяжелых металлов с помощью магнитоуправляемых дрожжевых биосорбентов.

### Список литературы / References:

1. Wang J., Chen C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnology Advances*, 2006, no. 24, pp. 427-451.
2. Safarik I., Maderova Z., Pospiskova K., Baldikova E., Horska K., Safarikova M. Magnetically responsive yeast cells: methods of preparation and applications. *Yeast*, 2015, no. 32, pp. 227-237.
3. Беспалова С.В., Легенький Ю.А., Солопов М.В., Холявка М.Г. Инверсия сахарозы и биосорбция ионов  $\text{Cu}^{2+}$  магнитомаркированными клетками *Saccharomyces cerevisiae*. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*, 2017, № 1, с. 98-101. [Bespalova S.V., Legenkiy Yu.A., Solopov M.V., Holiavka M.G. Inversion of sucrose and biosorption of  $\text{Cu}^{2+}$  ions by magnetically labeled *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya*, 2017, no. 1, pp. 98-101 (In Russ.)]

4. Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Transactions on Magnetics*, 1981, vol. 17, iss. 2, pp. 1247-1248.

5. Турчин В.В., Легенький Ю.А., Солопов М.В., Попандопуло А.Г., Беспалова С.В., Фисталь Э.Я. Магнитофоретические свойства фетальных фибробластов человека, маркированных суперпарамагнитными наночастицами оксида железа, стабилизированными цитратом. *Гены и клетки*, 2017, т. 12, вып. 1, с. 47-53. [Turchyn V.V., Legenkiy Yu.A., Solopov M.V., Popandopulo A.G., Bepalova S.V., Fistal E.Ya. Magnetophoretic properties of human fetal fibroblasts magnetically labeled with citrate stabilized superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Genes and cells*, 2017, vol. 12, iss. 1, pp. 47-53 (In Russ.)]

6. Горобец С.В., Горобец О.Ю. Оптимизация функциональных параметров высокоградиентных ферромагнитных насадок магнитных фильтров для очистки жидких сред. *Химия и технология воды*, 2003, № 6, с. 505-514. [Gorobets, S. V., Gorobets, O. Yu. Optimization of functional parameters of high-gradient ferromagnetic nozzles of magnetic filters for cleaning liquid media. *Khimiia i tekhnologiya vody*, 2003, no. 6, pp. 505-514 (In Russ.)]

7. Farhan S.N., Khadom A.A. Biosorption of heavy metals from aqueous solutions by *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Industrial Chemistry*, 2015, no. 6, pp. 119-130.

8. Ferraz A.I., Tavares T., Teixeira J.A. Cr (III) removal and recovery from *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemical Engineering Journal*, 2004, no. 105, pp. 11-20.

9. Suh J.H., Kim D.S., Yun J.W., Song S.K. Process of  $Pb^{2+}$  accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 1998, № 20, iss. 2, pp. 153-156.

#### BIOSORBENT BASED ON THE COMPLEX OF YEAST CELLS AND MAGNETIC NANOPARTICLES FOR REMOVING HEAVY METAL IONS

Solopov M.V., Legenkiy Yu.A., Bepalova S.V.

Donetsk National University

*Universitetskaya str., 24, Donetsk, 283050, DPR; e-mail: mxsolopov@yandex.ru*

**Abstract.** A wastewater purification from heavy metal ions using biosorbents has a great scientific interest. The article is devoted to the evaluation of magnetic and sorption properties of yeast cells obtained by marking with  $Fe_3O_4$  nanoparticles. Basing on the calculations of the values of the magnetic susceptibility of yeast cells a computer simulation of cells separation in the considering model separator was carried out under various fluid flow rates and inductions of the magnets. The results of simulation indicate the possibility of highly efficient separation of the modified cells. The biosorption properties of the cells were determined by the purification of model solutions from copper, nickel and iron. The biosorption capacity of intact and modified cells was determined by the analysis of kinetics of metal ions sorption from the model solutions. It has been shown that cells labeled with nanoparticles can more effectively accumulate copper and nickel ions compared to intact yeast. The obtained results can be used to implement in the technology of water purification with yeast sorbents.

**Key words:** yeast cells, biosorbent, heavy metal ions, magnetic nanoparticles, magnetic separation.