

А. М. ЗЯКУН, И. А. РЕШЕТНИКОВА, А. Г. МАТРОСОВ, В. К. ЕРОШИН  
ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ИЗОТОПОВ СЕЛЕНА ДРОЖЖАМИ  
*CANDIDA TROPICALIS*

(Представлено академиком А. А. Базевым 30 XI 1973)

Показано, что различие изотопного состава селена в минералах, в сере осадочных месторождений и в нескольких образцах почв является незначительным по сравнению с метеоритным селеном и не превышает 0,1—0,4% для отношений  $\text{Se}^{76}/\text{Se}^{82}$  (<sup>1</sup>). Наибольшие вариации указанных отклонений отмечены для растений *Astragalus patersonii* (−1,1%) и *Astragalus bisulcatus* (+0,2%). Можно предположить, что причиной заметных изменений в изотопном составе селена в растениях является биологическое фракционирование изотопов или различное содержание его изотопов в почвах. Поскольку анализ изотопного состава селена в почвах, на которых произрастали эти растения, не был выполнен, трудно судить о причинах таких вариаций.

В настоящей работе сделана попытка обнаружить биологическое фракционирование изотопов селена. В опытах использовали дрожжи рода *Candida*, способные восстанавливать селенит-ион и накапливать селен в клетках (<sup>2</sup>). О фракционировании судили, сравнивая изотопный состав селена биомассы микроорганизмов и культуральной жидкости, оставшейся после выращивания дрожжей. Дрожжи *Candida tropicalis* ИБФМ303 выращивали на синтетической среде 8E (<sup>3</sup>). В среду добавляли  $3 \cdot 10^{-3}\%$  селена в виде двуокиси. Культивирование проводили в колбах на качалке при  $26 \pm 2^\circ$ . Полученную биомассу отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 4000 об/мин при  $0^\circ$  в течение 15 мин. Биомассу промывали 0,85% раствором NaCl и лиофилизировали. Культуральную жидкость упаривали до получения сухого остатка, в котором наряду с органическими и неорганическими продуктами содержался не включенный в биомассу селен. Количественное определение селена в биомассе и культуральной жидкости осуществляли по ранее описанной методике (<sup>4</sup>). Образцы озонляли кислотами  $\text{HClO}_4$  и  $\text{HNO}_3$  в соотношении 1:3. К охлажденному минерализату приливали 7N раствор соляной кислоты и 1 мл водного раствора мышьяка (конц. 1 мг/мл). Селен восстанавливали на мышьяке (носителе) в присутствии избытка гипофосфита натрия, используемого в качестве восстановителя. Осадок растворяли в концентрированной азотной кислоте. Из полученного раствора проводили осаждение селена азотнокислым серебром при pH 3—4. Образовавшийся осадок селенита серебра использовали для масс-спектрометрических измерений. Селенит серебра при нагревании выше  $200^\circ$  диссоциировал с образованием  $\text{SeO}_2$ , арсенат при этом не разлагался и не мешал масс-спектрометрическому определению изотопов селена. Масс-спектр двуокиси селена представляет совокупность ионов  $\text{Se}^+$ ,  $\text{SeO}^+$ ,  $\text{SeO}_2^+$  с интенсивностями 9,4; 32,6 и 58%, соответственно, от общей суммы интенсивностей пиков, образовавшихся при электронном ударе. Определение содержания изотопного селена для каждой формы ионов показало, что на уровне ошибки эксперимента, с учетом вклада кислорода  $\text{O}^{18}$ , изотопный состав всех ионов одинаков. Изотопный анализ селена проводили по ионам  $\text{SeO}_2^+$ , пики которых имеют максимальные интенсивности в масс-спектре. Измерение распространенности изотопов селена проводили на масс-спектрометре MC-1302. Разрешающая способность прибора составляла 2000. Содержание изотопов селена измеряли однолучевым способом с отделением «органического» фона (<sup>5</sup>). Фракционирование изотопов селена определяли

по соотношению интенсивностей пиков ионов  $\text{Se}^{76}\text{O}_2$  ( $m/e$  108) и  $\text{Se}^{82}\text{O}_2$  ( $m/e$  114). Для обнаружения микробиологического разделения изотопов использовали формулу

$$r = \frac{[\text{Se}^{76}]/[\text{Se}^{82}]_6}{[\text{Se}^{76}]/[\text{Se}^{82}]_{\text{к.ж}}}, \quad (1)$$

где  $[\text{Se}^{76}]/[\text{Se}^{82}]_6$  — отношение распространенностей изотопов  $[\text{Se}^{76}]$  и  $[\text{Se}^{82}]$  в биомассе,  $[\text{Se}^{76}]/[\text{Se}^{82}]_{\text{к.ж}}$  — отношение распространенностей изотопов  $\text{Se}^{76}$  и  $\text{Se}^{82}$  в культуральной жидкости после выращивания дрожжей.

В тех случаях, когда дрожжи *Candida tropicalis* имели высокую скорость роста и сравнительно высокую скорость включения селена в биомассу, фракционирования изотопов селена на уровне ошибки эксперимента не обнаруживалось (табл. 1).

Таблица 1  
Фракционирование изотопов селена дрожжами *Candida tropicalis* 303 на различных стадиях их роста

Время культивирования, час	Удельная скорость роста, г/(г·час)	Удельная скорость включения селена в биомассу, мг/(г·час)	Количество восстановленного селена $F$ , %	Степень фракционирования изотопов, $r$	Коэффициент разделения $\alpha$
72	$7 \cdot 10^{-3}$	0,18	16	$1,00 \pm 0,01$	—
120	$1 \cdot 10^{-3}$	0,14	30	$1,02 \pm 0,01$	1,017
360	$2 \cdot 10^{-4}$	0,03	77	$1,04 \pm 0,01$	1,02
720	$1 \cdot 10^{-4}$	0,01	80	$1,04 \pm 0,01$	1,019

При низкой скорости роста биомассы и малой скорости включения селена в клетки наблюдается заметное фракционирование его изотопов, т. е. возрастает относительное содержание легкого изотопа селена в биомассе и соответственно увеличивается содержание тяжелого изотопа селена в культуральной жидкости. Как видно из табл. 1, величина фракционирования изотопов селена ( $r$ ) при микробиологической селеноредукции увеличивается с увеличением количества восстановленного селена ( $F$ ).

Если принять, что восстановление селенита приближенно описывается кинетическим уравнением реакции первого порядка, как это было показано ранее при сульфатредукции<sup>(6)</sup>, то коэффициент разделения изотопов  $\text{Se}^{76}$  и  $\text{Se}^{82}$  может быть определен из выражения

$$r = \frac{[\text{Se}^{76}]/[\text{Se}^{82}]_6}{[\text{Se}^{76}]/[\text{Se}^{82}]_{\text{к.ж}}} = \frac{F^{(k_2/k_1)-1}}{1-F}, \quad (2)$$

где  $r$  — степень фракционирования изотопов,  $F$  — количество восстановленного селена,  $k_1$  и  $k_2$  — константы скорости восстановления  $\text{Se}^{76}\text{O}_3^{2-}$  и  $\text{Se}^{82}\text{O}_3^{2-}$ , соответственно.

Измеренный коэффициент разделения ( $\alpha = k_1/k_2$ ) в случае микробиологического восстановления селенит-иона составил 1,019, что близко к величине коэффициента разделения, теоретически рассчитанного для кинетического изотопного эффекта реакции восстановления  $\text{SeO}_3^{2-} \rightarrow \text{Se}^0$  ( $\alpha = 1,017$ )<sup>(7)</sup>. Таким образом, установлено, что в процессе селеноредукции дрожжи *C. tropicalis* 303 способны фракционировать изотопы селена.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов  
Академии наук СССР  
Пущино-на-Оке

Поступило  
19 XI 1973

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> H. R. Krause, H. G. Thode, *Canad. J. Chem.* v. 40, 2, 367 (1962). <sup>2</sup> I. Falcone, W. J. Nickerson, *J. Bacteriol.*, v. 85, 4, 754 (1963). <sup>3</sup> В. К. Ерошин, А. Ф. Перцовская, *Микробиология*, т. 4, 5, 883 (1965). <sup>4</sup> А. Г. Матросов, И. А. Решетникова и др., т. 6, 19 (1972). <sup>5</sup> А. Г. Матросов, А. М. Зяжун, *Изв. АН СССР, сер. хим.*, № 1, 150 (1973). <sup>6</sup> N. Nakai, M. L. Jensen, *Geochim. et cosmochim. acta*, v. 28, 1893 (1964). <sup>7</sup> C. E. Rees, H. G. Thode, *Canad. J. Chem.*, v. 44, 419 (1966).