

УДК 576.8+621.039.85

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАДИОАКТИВНОСТИ ГАЗООБРАЗНЫХ ^{14}C -АЛКАНОВ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ

А. Г. ЖИВОТЧЕНКО, А. П. БЕЛОВ

(Кафедра прикладной атомной физики и радиохимии)

Развитие биотехнологии, в частности получение белка из природного газа, требует проведения обширных исследований метаболизма газообразных н-алканов. Применение метода радиоактивных индикаторов существенно ускоряет и упрощает такого рода работы [2]. Однако существует ряд трудностей при определении радиоактивности газообразных н-алканов [4, 5, 6].

Цель настоящей работы — разработка методики определения радиоактивности газообразных н-алканов (метана, этана, пропана) с помощью жидкостно-сцинтилляционных счетчиков.

В работе использовали газообразные ^{14}C -алканы (метан, этан, пропан) производства фирмы Изокомерц (ГДР) и их нерадиоактивные аналоги-носители фирмы Мерк (ФРГ). Химическую и радиохимическую чистоту газообразных н-алканов определяли на газовом хроматографе фирмы Перкин-Элмер с детектором по теплопроводности, к выходу которого присоединена приставка (ИСИ-Нуклеар, Англия) для учета радиоактивности выходящих газообразных веществ. В качестве газа-носителя в хроматографе применяли аргон (30 мл/мин). Колонка длиной 3 м с внутренним диаметром 2,5 мм была наполнена парапаком Q (80—100 меш). Рабочая температура колонки 50°. Чистота меченых алканов (метана, этана, пропана) соответственно 99,4; 98,7; 98,1 %, а нерадиоактивных углеводов выше 99,9 %.

Радиоактивность в ходе работы измеряли на жидкостном сцинтилляционном радиометре Марк II. Использовали сцинтиллятор, приготовленный на толуольной основе, и искинтиллятор Unisolve фирмы Кох-Лайт (Англия). Радиоактивность определяли в абсолютных единицах (расп/мин) по стандартным кривым гашения. Расчет производили при помощи мини-компьютера ПДС-3, присоединенного к радиометру.

Культивирование метаноокисляющих бактерий рода *Methylococcus* проводили в стерильных условиях в герметичных качалочных колбах объемом 850 мл на термостатированной качалке фирмы Браун (ФРГ) при 200 об/мин. Температура выращивания 42°, начальное pH $6,9 \pm 0,1$. Жидкая питательная среда (объем 100 мл) имела следующий состав (в мг/л): $\text{NH}_4\text{Cl} - 0,76$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,68$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,87$ г/л; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 3,63$; $\text{MgSO}_4 - 70$; $\text{ZnSO}_4 - 0,43$; $\text{MnSO}_4 - 0,88$; $\text{CuSO}_4 - 0,78$; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 0,25$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 4,97$. Начальная концентрация био-

массы 0,03—0,05 г/л (в расчете на сухую массу). Колбы вакуумировали и наполняли газовой смесью следующего состава: 40 % O_2 , 40 % CH_4 и 20 % N_2 . Газовым шприцем вводили затем не более 5 мл меченого углерода. Концентрацию биомассы определяли весовым и нефелометрическим способами. Культивирование продолжалось 20—36 ч.

В настоящее время радиоактивность газообменных н-алканов определяют с помощью газопоточного счетчика [6] или жидкостно-сцинтилляционных радиометров [5]. Первый метод нельзя использовать при высоких концентрациях меченого метана в анализируемом газе, поскольку метан, как показано в работе [4], существенно снижает скорость счета радиоактивности ^{14}C -алкана. Второй метод можно применять только для растворенного в сцинтилляторе газа, а газообразный н-алкан, оставшийся над сцинтиллятором, учесть невозможно, что может привести к большой погрешности (например, в толуольном сцинтилляторе не учитывается приблизительно 20 % метана [4]). Эту часть радиоактивного н-алкана можно измерить с помощью газопоточного счетчика. Но тогда нужно составлять сложную программу об-счета данных, что усложняет методику измерения. Ошибка определения радиоактивности газообразного н-алкана с использованием жидкостной сцинтилляции будет наименьшей только в том случае, если меченый н-алкан обладает высокой радиоактивностью при его малом измеряемом объеме. Устранить указанные недостатки измерения радиоактивности газообразных углеводов можно путем сжигания их до $^{14}\text{CO}_2$, которая легко связывается щелочными поглотителями, или путем использования лучших растворителей метана и его гомологов, чем толуол.

Для сжигания газообразного н-алкана нами была смонтирована специальная печь (рис. 1), состоящая из заполненной катализаторами кварцевой трубки, нагреваемой спиралью. Максимальная температура 740°. Печь обеспечивала полное сжигание газов до CO_2 с незначительными потерями за счет сорбции, составляющими не более 0,1 % вводимого меченого н-алкана. На выходе из печи стоят ловушки-поглотители, герметично соединенные с вакуумным насосом. На вход подается кислород, используемый для сжигания н-алкана и одновременно в качестве газа-носителя. Поглотителями образующей-

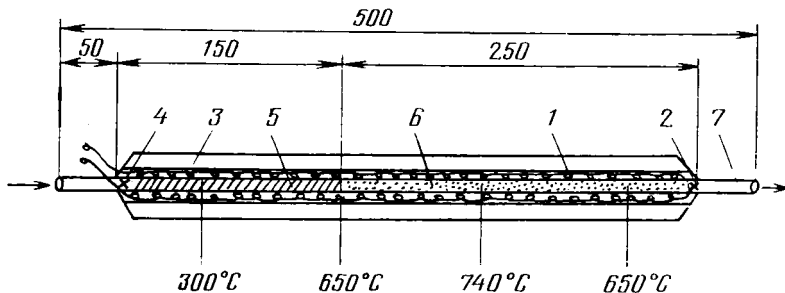


Рис. 1. Схема печи для сжигания углеводородов. 1 — спираль нагрева (150—160 В); 2 — глина; 3 — асбест; 4 — кварцевая вата; 5 — катализатор I (закись меди + окись меди); 6 — катализатор II (окись марганца); 7 — кварцевая трубка с внутренним диаметром 8 мм.

ся при сжигании в печи $^{14}\text{CO}_2$ были использованы NaOH (1 н. раствор), фенилэтиламин, органическая щелочь Nuamine Hydroxide фирмы Кох-Лайт.

Экспериментально определено, что для полного поглощения выходящей из печи $^{14}\text{CO}_2$ (при скорости газового потока 10—30 мл/мин) требуется 6—7 ловушек с первым поглотителем или по 2 ловушки со вторым или третьим, причем в ловушке с фенилэтиламином при избытке CO_2 образуется белый осадок, что может привести к неточному определению радиоактивности. Поэтому в дальнейшем вся работа проводилась с использованием в качестве поглотителя Nuamine Hydroxide (2 последовательные ловушки по 50 мл 5 % раствора в метаноле).

Из рис. 2, а, б, в видно, что расхождения в результатах определения радиоактивности газообразных n-алканов при сжигании их до $^{14}\text{CO}_2$ согласно описанной выше методике и при растворении их в толуольном сцинтилляторе, находящемся в специальной герметично закрытых сосудах с резиновой прокладкой, через которую шприцем вводят определенные объемы анализируемого газа [4], составляют для метана, этана и пропана соответственно 40, 15—20 и не более 10 %. При этом пропорциональность радиоактивности метана при измерении путем прямого растворения сохраняется для пробы, объемом до 0,2 мл.

Таким образом, принятая нами методика измерения радиоактивности газообразных n-алканов, особенно метана, более эффективна, чем используемые ранее [4, 5, 6].

С целью найти более подходящий растворитель для газообразных n-алканов, чем толуол, мы испытали диэтиловый эфир. Способность к растворению метана в диэтиловом эфире в 2 раза больше, чем в толуольном сцинтилляторе, и составляет соответственно 1,157 см³ метана при 0° [3] и 0,65 см³ — при 4° [4] на 1 см³ растворителя. В герметичный сосуд, аналогичный описанному в [4], с определенным количеством эфира вводится шприцем через резиновую прокладку заданное количество метана. Сосуды переворачиваются и в течение часа встряхиваются на качалке. После этого шприцем отбирают аликвоту растворителя и вносят в толуольный сцинтиллятор для измерения радиоактивности.

Как видно из рис. 3, результаты, полученные с использованием описанных методик, практически совпадают (расхождения не более 10 %), что дает возможность в равной мере применять их для определения радиоактивности газообразных n-алканов.

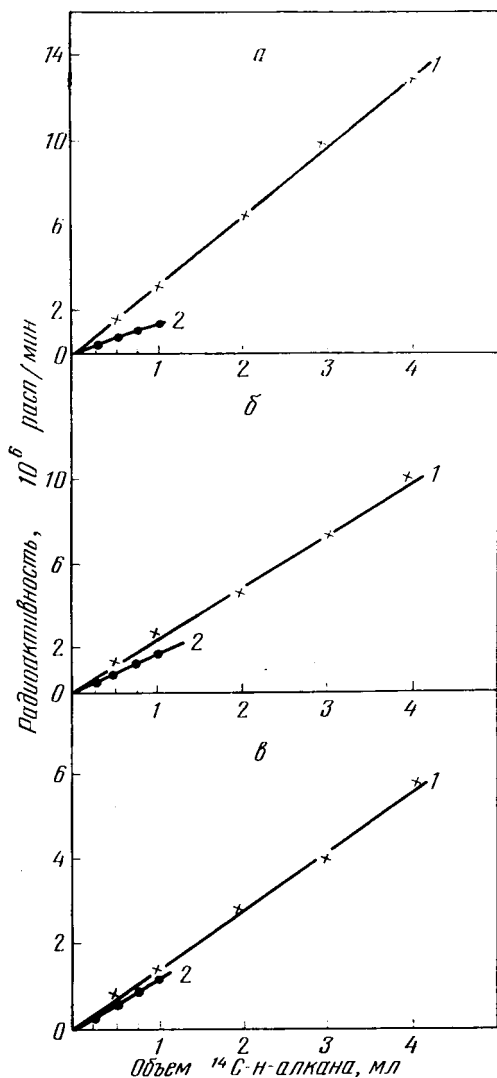


Рис. 2. Определение радиоактивности газообразных меченных ^{14}C н-алканов. а — метан; б — этан; в — пропан; 1 — при сжигании н-алкана до $^{14}\text{CO}_2$; 2 — при растворении алкана в толуольном сцинтилляторе.

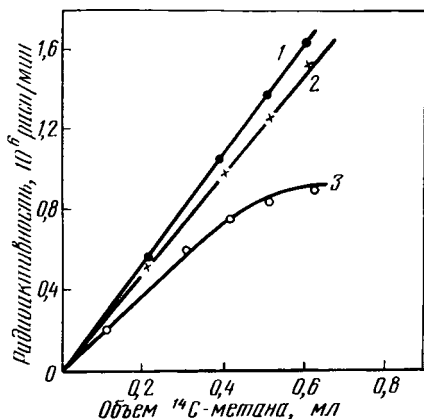


Рис. 3. Определение радиоактивности ^{14}C -метана.

1 — при сжигании до $^{14}\text{CO}_2$; 2 — при растворении метана в диэтиловом эфире; 3 — при растворении метана в толуольном сцинтилляторе.

Вместо диэтилового эфира можно подобрать и другие растворители, например, спирты, жидкие алканы, в которых растворимость газообразных н-алканов значительно выше, чем в толуоле.

Однако методика измерения радиоактивности газов при использовании герметичных сосудов с резиновой прокладкой имеет недостаток, заключающийся в том, что в сосуд с растворителем можно ввести не более 1 мл газа. При больших объемах как в шприце, так и в сосуде создается при вводе газа повышенное давление, что приводит к нарушению герметичности и неточности определения активности. В случае сжигания в печи объемы вводимого газа существенной роли не играют: пропорциональность счета сохраняется вплоть до 20 мл вводимого для сжигания газа, что существенно, если у проб низкая активность (рис. 4). При этом для измерения радиоактивности поглощенной $^{14}\text{CO}_2$ может быть использован практически любой сцинтиллятор, в то время как для других методик требуется только толуольный.

Сопоставление результатов определения радиоактивности, полученных с применением всех рассмотренных методик, позволяет сделать вывод, что более универсальной и точной является методика, когда газообразный н-алкан сжигается до $^{14}\text{CO}_2$, связываемой

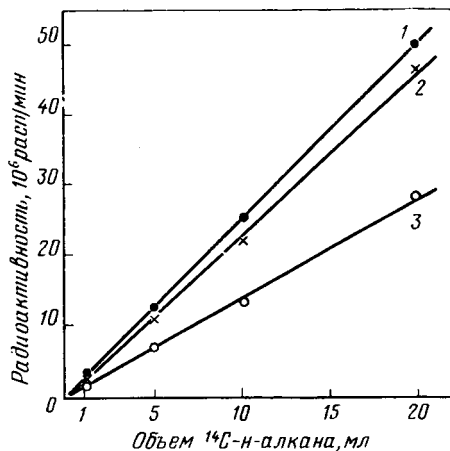


Рис. 4. Определение радиоактивности ^{14}C н-алкана по сжиганию до $^{14}\text{CO}_2$.

1 — метан, 2 — этан, 3 — пропан.

затем поглотителем, а радиоактивность измеряется с помощью жидкостного сцинтилляционного радиометра.

Пригодность выбранной методики для микробиологических исследований была проверена в опыте с выращиванием метанотрофов в атмосфере, содержащей меченый ^{14}C -метан. Предварительно устанавливали удельную радиоактивность вводимого в газовую фазу меченого ^{14}C -метана. Бактерии *Methylococcus capsulatus* культивировали в течение 20—36 ч согласно методике, описанной выше. Затем определяли их радиоактивность, а также выделяющихся в окружающую среду продуктов метаболизма (CO_2 и растворимых в воде веществ) и остающегося неассимилированного ^{14}C -метана. Для этой цели из герметично закрытой культивационной колбы с помощью вакуумного насоса, не нарушая герметичности, отсасывали суспензию бактерий и вместо нее вводили 1 н. раствор NaOH для поглощения $^{14}\text{CO}_2$, образовавшейся во время культивирования. Суспензию центрифугировали при 4000 g в течение 40 мин для отделения бактериальных клеток от культуральной жидкости и определяли радиоактивность полученных фракций согласно методике, описанной в работе [1]. Поглощение $^{14}\text{CO}_2$ осуществлялось в течение 24 ч, затем через колбы в течение 5 ч пропускали O_2 и вводили оставшийся метан в печь для сжигания. Определение его радиоактивности осуществля-

Баланс меченого углерода (в 10^6 расп/мин) при культивировании метаноокисляющих бактерий на ^{14}C -метане

Фракция	Биологическая повторяемость			
	1	2	3	4
Исходная радиоактивность метана	36,0±1,8	18,0±0,9	10,4±1,0	4,36±0,06
^{14}C в биомассе	6,5±0,3	2,50±0,09	1,82±0,06	0,64±0,01
$^{14}\text{CO}_2$	11,7±0,4	6,76±0,21	2,63±0,08	1,30±0,01
Внеклеточные метаболиты	0,98±0,02	0,67±0,03	0,11±0,01	0,21±0,01
Остаточный метан	17,8±0,5	7,71±0,31	6,14±0,44	2,62±0,16
Сумма ^{14}C	37,0±1,1	17,60±0,62	10,70±0,58	4,76±0,20
Разность	+(1,0±2,9)	-(0,36±1,50)	+(0,29±1,50)	+(0,4±0,3)
% разности	+3,0	-2,0	+2,8	+9,0

ли по описанной выше методике. При измерении радиоактивности биомассы внеклеточных метаболитов, начальных и конечных концентраций меченого алкана использовали сцинтиллятор Unisolve. На основании полученных значений активностей всех фракций составляли баланс меченого углерода (таблица 1).

Как видно из таблицы, сходимость баланса хорошая. Разность исходной радиоактивности метана и конечной радиоактивности суммы всех продуктов находится в пределах

ошибки опыта во всех четырех биологических повторностях.

Таким образом, предложенная методика определения радиоактивности метана и его гомологов путем сжигания в смонтированной печи дает удовлетворительные результаты и успешно может быть использована в микробиологических экспериментах.

Авторы выражают благодарность проф. В. В. Рачинскому за консультацию при выполнении работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кретова Л. Г., Давидова Е. Г. Радиометрический контроль баланса углерода при фракционировании биомассы дрожжей. — Изв. ТСХА, 1976, вып. 6, с. 22—26. — 2. Рачинский В. В. Курс основ атомной техники в сельском хозяйстве. — М.: Атомиздат, 1974. — 3. Справочник по растворимости. М.—Л.: Изд-во АН СССР, 1962, т. 1, с. 1123—1127. — 4. Ale-

xandr J. B. Zehnder, Beat Huser, Thomas D. Brock. Appl. and Environm. Microb., 1979, vol. 37, N 5, p. 897—899. — 5. Ferry J. I., Wolfe R. S. Arch. Microbiol., 1976, vol. 107, p. 33—40. — 6. Nelson D. R., Zeikus J. I. Appl. Microbiol., 1974, vol. 28, p. 258—261.

Статья поступила 27 марта 1984 г.

SUMMARY

Method of determining radioactivity of gaseous ^{14}C -alkanes is considered. According to this method gaseous ^{14}C -alkane is burnt into $^{14}\text{CO}_2$ which is absorbed by alkaline solutions. Radioactivity of absorbed $^{14}\text{CO}_2$ is measured with the help of liquid scintillation meter. The method is used in the experiment with methane-oxidizing bacteria, grown on ^{14}C -methane.