

УДК 544.653.2:577.323.7

ИССЛЕДОВАНИЕ АККУМУЛЯЦИИ МЕДИ МИКРОМИЦЕТАМИ *TRICHODERMA VIRIDE*

И.И. Шахмаева, О.В. Бондарь, Д.И. Тазетдинова, Ф.К. Алимова,
И.С. Газизов, М.В. Морозов, А.Х. Гильмутдинов, Т.И. Абдуллин

Аннотация

Поиск микроорганизмов, аккумулирующих и трансформирующих тяжелые металлы из окружающей среды, является актуальной задачей биотехнологии. В настоящей работе предложен экспрессный электрохимический метод мониторинга накопления тяжелых металлов микроорганизмами на поверхности углеродных электродов.

В качестве модели исследовали микромицет *Trichoderma viride*, культивируемый в среде с повышенным содержанием ионов меди. Биомасса клеток генерировала ток окисления металлической меди, величина которого пропорциональна концентрации ионов меди в среде. Результаты показывают, что *Trichoderma viride* аккумулирует ионы меди, предположительно, с образованием наночастиц меди на поверхности микроорганизма.

Ключевые слова: почвенные микроорганизмы, тяжелые металлы, биотрансформация, электрохимический анализ.

Введение

Одним из источников загрязнения водоемов и почв, нарушающего рост и развитие гидробионтов и сельскохозяйственных культур, являются сточные воды, содержащие разбавленные растворы тяжелых металлов [1–6]. По токсичности эти металлы составляют последовательность такого вида: ртуть, серебро, медь, кадмий, цинк, свинец, хром, никель, кобальт, где ртуть является наиболее токсичным металлом [1]. Для сорбции и выделения металлов и их соединений из стоков перспективно применять микробиологические методы очистки [7–15]. Проводимая в настоящее время очистка стоков от тяжелых металлов химическими, физическими, а также электрохимическими способами дорога, трудоемка и не всегда обеспечивает высокую степень очистки [1]. Несмотря на то что микробиологическая детоксикация отдельных металлов и их соединений достаточно изучена, ведется постоянный поиск новых микроорганизмов для биологической очистки сточных вод и почвы [7–10].

В настоящей работе предложен эффективный электрохимический метод оценки накопления тяжелых металлов микроорганизмами. Для извлечения металлов из растворов могут быть использованы представители различных таксономических групп [7]. В качестве объекта исследования нами выбран микромицет *Trichoderma viride* – супрессор, играющий важную роль в формировании микробиоценозов почвы и ризосферы [16].

1. Экспериментальная часть

В работе использовали многостенные углеродные нанотрубки (УНТ) диаметром 3–10 нм и длиной 0.1–10 мкм производства Sigma-Aldrich. Другие реагенты имели квалификацию не ниже ЧДА (чистый для анализа).

Микромицет культивировали в среде Чапека – Докса в течение 7 дней в термостате при 37 °С в присутствии ионов меди(II) в концентрации 25, 50, 125 мг/л, эквивалентной одному, двум и пяти значениям ПДК меди в водных образцах. Далее мицелий собирали, отмывали водой, обрабатывали ультразвуком для получения однородной суспензии и снова промывали в дистиллированной воде. Массовую концентрацию клеток в суспензии определяли путем взвешивания высушенной биомассы.

Электрохимические измерения проводили с помощью модульного потенциостата/гальваностата AUTOLAB PGSTAT12 (EcoChemie) в режиме квадратно-волновой вольтамперометрии. Электрохимическая ячейка состояла из рабочего дискового стеклоуглеродного электрода (СУЭ) или СУЭ, модифицированного углеродными нанотрубками, никелевого противоиэлектрода и хлоридсеребряного электрода сравнения. В качестве фонового электролита использовали 0.01 М СН₃СООNa + 0.1 М NaCl (рН 5.0). СУЭ модифицировали УНТ путем формирования однородного слоя на рабочей поверхности электрода [17, 18].

Аликвоту суспензии клеток наносили на поверхность СУЭ или СУЭ-УНТ, высушивали и далее записывали анодные вольтамперограммы в отсутствие клеток в поддерживаемом электролите. Для получения наночастиц меди электрохимическим способом электрод погружали в 3 мМ раствор медного купороса. Далее ионы меди восстанавливали при потенциале –0.7 В с образованием металлической меди, ток окисления которой использовали в качестве сигнала. Полученные наночастицы меди визуализировали на атомно-силовом микроскопе ИНТЕГРА Прима (NT-MDT) с использованием сканера 50 мкм с емкостными датчиками, стандартных кремниевых кантилеверов NSGO3 с радиусом кривизны 10 нм.

Для элементного анализа мицелия *Trichoderma viride* использовали масс-спектрометр с индуктивно-связанной плазмой Elan DRC II (PerkinElmer). Образцы мицелия предварительно высушивали. Навеску сухого мицелия (80 мг) растворяли в 5 мл концентрированной HNO₃. Образцы объемом 50 мкл анализировали в масс-спектрометре на наличие атомарной меди. Относительное стандартное отклонение рассчитано для четырех повторных измерений.

2. Результаты и их обсуждение

До изучения накопления меди микромицетами *Trichoderma viride* мы исследовали электрохимические свойства наночастиц меди, полученных электрохимическим способом, на углеродных электродах. Для детектирования меди мы использовали немодифицированный СУЭ или СУЭ, модифицированный УНТ. Ранее нами было показано, что СУЭ-УНТ обладают большой площадью поверхности и эффективно катализируют редокс-реакции с участием различных соединений [17, 18].

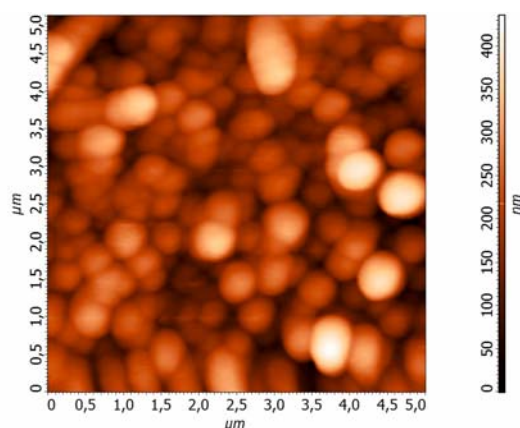


Рис. 1. Топографическое АСМ-изображение поверхности стеклоглеродного электрода, покрытого электроосажденными наночастицами меди

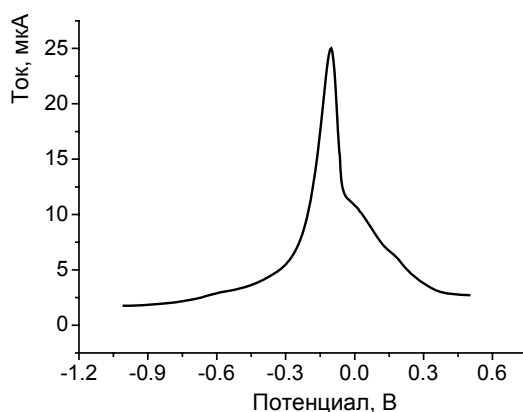


Рис. 2. Квадратно-волновая вольтамперограмма окисления мицелия *Trichoderma viride*, культивируемого в присутствии ионов меди(II) (пятикратное превышение ПДК) на стеклоглеродном электроде, модифицированном углеродными нанотрубками

Для получения наночастиц меди электрод погружали в электрохимическую ячейку, содержащую ионы Cu(II) , которые восстанавливали при контролируемом потенциале до металлической меди, осаждаемой на электроде в виде наночастиц. Морфологию образующихся наночастиц оценивали с помощью атомно-силовой микроскопии. На рис. 1 показано топографическое АСМ-изображение поверхности СУЭ с осажденными наночастицами меди, имеющими сферическую форму, размером около 200–300 нм.

Далее мы исследовали электрохимические свойства мицелия *Trichoderma viride*, выращенного в среде с различным содержанием ионов Cu(II) , методом квадратно-волновой вольтамперометрии. С помощью СУЭ-УНТ получена вольтамперограмма окисления мицелия, выращенного в среде с содержанием меди (двукратное превышение предельно допустимой концентрации (ПДК)) (рис. 2). Вольтамперограмма содержит пик окисления при потенциале -0.1 В, не наблюдаемый в случае контрольного мицелия, культивируемого без добавления меди. Потенциал этого пика близок к потенциалу окисления наночастиц меди

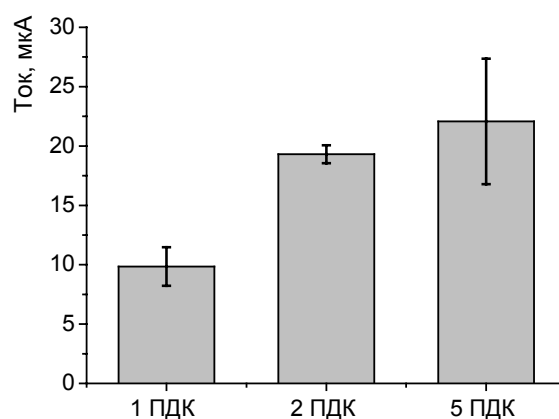


Рис. 3. Величина тока окисления меди в мицелии *Trichoderma viride*, культивируемого в присутствии ионов меди(II), после адсорбции на стеклоуглеродном электроде, модифицированном углеродными нанотрубками

на СУЭ, что указывает на образование восстановленной формы меди в составе мицелия в процессе его культивирования в присутствии ионов Cu(II) . Результаты показывают возможность прямого чувствительного детектирования аккумулируемой микромицетом меди, что, вероятно, объясняется высокой проникающей способностью и каталитической активностью УНТ [17, 18].

На рис. 3 представлены величины токов окисления меди в мицелии, выращенном в среде с различной концентрацией ионов Cu(II) . Электрохимический сигнал увеличивается с увеличением содержания меди в среде культивирования (рис. 3). Аккумуляция меди микромицетами в условиях эксперимента подтверждена с помощью элементного анализа, выполненного методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. В образцах микромицета, выращенных в среде с концентрацией меди 25, 50, 125 мг/л (соответствует одно-, двух- и пятикратному превышению ПДК), медь обнаружена в концентрации 0.377 ± 0.00027 , 0.284 ± 0.0038 и 0.351 ± 0.00025 мг/л соответственно.

Результаты проведенного исследования показывают, что в процессе жизнедеятельности *Trichoderma viride* способен аккумулировать ионы меди с образованием восстановленных форм металла. Предполагаем, что восстановленная медь осаждается на поверхности или в составе клеточной стенки микромицета, что позволяет проводить ее детектирование с помощью электрода на основе углеродных нанотрубок. Разработанный способ анализа микроорганизмов демонстрирует хорошую воспроизводимость и может быть использован для изучения взаимодействия тяжелых металлов с микроорганизмами.

Summary

I.I. Shakhmaeva, O.V. Bondar, D.I. Tazetdinova, F.K. Alimova, I.S. Gazizov, M.V. Morozov, A.Kh. Gilmutdinov, T.I. Abdullin. Study of Copper Accumulation by Micromycetes *Trichoderma viride*.

Screening of microorganisms which accumulate and transform heavy metals from the environment is a relevant problem of biotechnology. In this study we proposed a rapid electrochemical method for detection of heavy metal accumulation in microorganisms using car-

bon electrodes. We studied micromycete *Trichoderma viride* as a model microorganism which was cultured in the presence of copper ion. Micromycete biomass generated copper oxidation current which was proportional to copper ion concentration in the medium. Our results show that *Trichoderma viride* accumulates copper ions probably in the form of copper nanoparticles deposited on the surface of the microorganism.

Key words: soil microorganisms, heavy metals, biotransformation, electrochemical analysis.

Литература

1. Буракаева А.Д., Русанов А.М., Лантух В.П. Роль микроорганизмов в очистке сточных вод от тяжелых металлов. Методическое пособие. – Оренбург: Изд-во Оренб. ун-та, 1999. – 54 с.
2. Jenne E.A. Controls on Mn, Fe, Co, Ni, Cu, and Zn Concentrations in Soils and Water: the Significant Role of Hydrous Mn and Fe Oxides // *Adv. Chem.* – 1968. – V. 73, Ch. 21. – P. 337–387.
3. Alonso E., Santos A., Callejón M., Jiménez J.C. Speciation as a screening tool for the determination of heavy metal surface water pollution in the Guadimar river basin // *Chemosph.* – 2004. – V. 56, No 6. – P. 561–570.
4. Liang Y., Wong M.H. Spatial and temporal organic and heavy metal pollution at Mai Po Marshes Nature Reserve, Hong Kong // *Chemosph.* – 2003. – V. 52, No 9. – P. 1647–1658.
5. He M., Wang Z., Tang H. The chemical, toxicological and ecological studies in assessing the heavy metal pollution in Le An River, China // *Water Res.* – 1998. – V. 32, No 2. – P. 510–518.
6. Zarazua G., Ávila-Pérez P., Tejeda S., Barcelo-Quintal I., Martínez T. Analysis of total and dissolved heavy metals in surface water of a Mexican polluted river by total reflection X-ray fluorescence spectrometry // *Spectrochimica Acta. Part B: Atomic Spectroscopy.* – 2006. – V. 61, No 10–11. – P. 1180–1184.
7. Gadd G.M. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms // *Cell. Mol. Life Sci.* – 1990. – V. 46, No 8. – P. 834–840.
8. Macaskie L.E., Jeong B.C., Tolley M.R. Enzymically accelerated biomineralization of heavy metals: Application to the removal of americium and plutonium from aqueous flows // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1994. – V. 14, No 4. – P. 351–367.
9. Tengerdy R.P., Jonson J.E., Hollo J., Toth J. Denitrification and Removal of Heavy Metals from Waste Water by Immobilized Microorganisms // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 1981. – V. 6, No 1. – P. 3–13.
10. Ahluwalia S.S., Goyal D. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater // *Biores. Technol.* – 2007. – V. 98, No 12. – P. 2243–2257.
11. Pérez-de-Mora A., Burgos P., Madejón E., Cabrera F., Jaekel P., Schloter M. Microbial community structure and function in a soil contaminated by heavy metals: effects of plant growth and different amendments // *Soil Biol. Biochem.* – 2006. – V. 38, No 2. – P. 327–341.
12. Wilde E.W., Benemann J.R. Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae // *Biotechnol. Adv.* – 1993. – V. 11, No 4. – P. 781–812.
13. Srivastava N.K., Majumder C.B. Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater // *J. Hazard. Mater.* – 2008. – V. 151, No 1. – P. 1–8.
14. Chartier M., Mercier G., Blais J.F. Partitioning of trace metals before and after biological removal of metals from sediments // *Water Res.* – 2001. – V. 35, No 6. – P. 1435–1444.

15. *Geets J., Vangronsveld J., Diels L., Taghavi S., van der Lelie D.* Microbial activities, monitoring and application as part of a management strategy for heavy metal-contaminated soil and ground water // *Developments in Soil Sci.* – Amsterdam: Elsevier, 2008. – V. 32, Ch. 21. – P. 521–559.
16. *Алимова Ф.К.* Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*. – Казань: Казан. гос. ун-т, 2006. – 208 с.
17. *Абдуллин Т.И., Никитина И.И., Ишмухаметова Д.Г., Будников Г.К., Коновалова О.А., Салахов М.Х.* Электроды, модифицированные углеродными нанотрубками, для электрохимических ДНК-сенсоров // *Журн. аналит. химии.* – 2007. – Т. 62, № 6. – С. 667–671.
18. *Абдуллин Т.И., Никитина И.И., Бондарь О.В., Ишмухаметова Д.Г., Коновалова О.А., Салахов М.Х.* Конструирование и тестирование электродов на основе многостенных углеродных нанотрубок // *Рос. нанотехнологии.* – 2007. – Т. 2, № 7–8. – С. 156–160.

Поступила в редакцию
09.12.09

Шахмаева Ирина Игоревна – ассистент кафедры биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: shakhmaevairi@gmail.com

Бондарь Оксана Викторовна – аспирант кафедры биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: o.v.bondar@mail.ru

Тазетдинова Диана Ирековна – кандидат биологических наук, ассистент кафедры биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: tazetdinova_d@rambler.ru

Газизов Ильдар Сабирович – ведущий инженер НИЛ БНК кафедры биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Алимова Фарида Кашифовна – доктор биологических наук, заведующий кафедрой биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: farida_alimova@hotmail.com

Морозов Михаил Валерьевич – аспирант кафедры общей физики Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: misha617@mail.ru

Гильмутдинов Альберт Харисович – доктор физико-математических наук, профессор кафедры общей физики Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: Albert.Gilmutdinov@ksu.ru

Абдуллин Тимур Илдарович – кандидат биологических наук, ассистент кафедры биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: tabdullli@gmail.com