

УДК 579.821

О. Л. Рахімова, асист., Ю. Б. Чистякова студ.
Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
каф. мікробіології і вірусології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

БИОМАСА *Mucococcus xanthus* У ЯКОСТІ БІОСОРБЕНТУ КАДМІЮ

Вивчено сорбцію кадмію клітинами *Mucococcus xanthus* Beebe 1941 в залежності від стану біомаси, віку культури, температури та концентрації кадмію у розчині. Продемонстровано, що найбільш ефективно кадмій сорбує 72-х годинна суха клітинна біомаса з невідаленим ліпополісахаридом при початковій концентрації кадмію від 0,3 до 0,5 мМ. Достовірних відмінностей в сорбції кадмію при температурах — 20, 30, 37°C не виявлено. Встановлено, що з використанням 0,2 мМ цитрату натрію в якості десорбуючого агенту можливе відновлення 90–95% сорбованого кадмію, що підтверджує акумуляцію цього металу поверхнею клітини.

Ключові слова: міксобактерії, важкі метали, біосорбція.

Забруднення оточуючого середовища важкими металами в промислово розвинених країнах постійно зростає [1]. Можливим варіантом вирішення цієї проблеми є очищення стічних вод за допомогою бактерій. На разі використання мікробної біомаси для екстрагування важких металів дуже розповсюджене. Можливе використання для цієї мети як неушкоджених живих, так і вбитих мікробних клітин поряд з використанням окремих клітинних компонентів [2, 3]. Н. L. Ehrlich [4] показав, що будь-які мікроорганізми або їх клітинні фракції (за умов, що в них є негативно заряджені групи) потенційно можуть бути використані для екстрагування катіонів металів.

У попередній роботі [5] було досліджено закономірності акумуляції деяких важких металів, у тому числі кадмію, штамми *M. xanthus*. *M. xanthus* належить до міксобактерій, що відомі своїм складним життєвим циклом, морфогенезом, диференціацією та біотехнологічним потенціалом. Міксобактерії є звичайними ґрунтовими мешканцями, вони характеризуються рясним продукуванням слизу полісахаридної природи [6].

Кадмій є поширеним забруднювачем стічних вод в Україні. Цей метал відносять до токсичних важких металів, оскільки для нього не відома біологічна функція. Тому метою даної роботи було дослідження потенційно можливого використання *M. xanthus* у біотехнологічних процесах вилучення кадмію зі стічних вод.

Матеріали і методи

У даному дослідженні були використані два штами бактерій роду *Mycococcus*: *M. Xanthus*: *M. xanthus* V-25 (ізольований з чорнозему України) і *M. xanthus* 422, що має властивості типового (люб'язно наданий професором J. Ma. Arias-Penalver, Granada University, Spain). Штами зберігали у вигляді зрілих плодових тіл у висушеному стані на дисках фільтрувального паперу (діаметр 6 мм) при 5°C. Перед експериментом диски з культурами пророщували на дріжджовому агарі yeast-calcium agar (YCA) [Reichenbach, Dworkin, 1992], що містить 0,5% пекарських дріжджів, 0,1% CaCl₂, 1,5% агару і 0,5 мкг/мл ціанкоболаміну (рН 7,2) при 30°C у темряві. У подальшому культивування провадили на рідкому середовищі СТ [7], що містить 2% пептону, 0,2% MgSO₄ · H₂O, фосфатного буферу рН 7,6–0,01 М.

Скляний та пластиковий посуд, що використовували в експерименті, попередньо обробляли 50% розчином HNO₃ на протязі 24 годин, потім відмивали двічі дистильованою водою. Хімічні реактиви, що були використані в експерименті, мали марку "ч. д. а."

Через 24, 48 і 72 години після вирощування культур на середовищі СТ клітини з ліпополісахаридом осаджували центрифугуванням при 4000 об/хв 15 хв. Для відділення клітин від ліпополісахариду використовували центрифугування при 11000 об/хв 15 хв. При цьому осад містив клітини мікроорганізмів, супернатант-ліпополісахарид.

Вологу біомасу збирали відразу після центрифугування без додаткової обробки. Для отримання сухої біомаси клітини висушували при 90°C протягом 12 годин.

Для визначення біосорбційного потенціалу мікроорганізмів брали наважку сухої біомаси (або її еквівалент вологої) і поміщали у флакони, що містили CdCl₂ у концентраціях 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0; 1,5 і 5 мМ. Інкубували в ротаторі при 30°C і 150 обертах за хвилину протягом 20 хвилин при температурі 20°C, 30°C і 37°C. Потім центрифугували і відмивали двічі 0,2 мМ малеатного буферу (рН 7,2). Аналіз вмісту Cd здійснювали за допомогою атомно-абсорбційного спектрофотометра (Perkin-Elmer 3100) за довжини хвилі 228,8 нм у газово-ацетиленовій суміші. Кількість акумульованого металу виражали у міліграмах на грам сухої ваги біомаси.

Для оцінки процесів десорбції Cd використовували два реактиви — карбонат натрію і лимоннокислий натрій у концентраціях 0,1; 0,2 і 0,3 М. Зібрані, як і у попередньому експерименті, варіанти біомаси потім ресуспендували з різними агентами десорбції і інкубували за 30°C у ротаторі при 150 обертах за хвилину протягом 20 хвилин. Потім клітини збирали і оцінювали вміст металу (див. вище).

Всі дослідження проводили в трьох повторностях. Обробку результатів провадили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Office 2000 від Microsoft Corporation®.

Результати і обговорення

Порівняння біосорбційної здатності сухої і вологої біомаси провадили за концентрації 0,5 мМ кадмію (табл. 1). Виявлено, що суха біомаса клітин з екстрацелюлярним ліпополісахаридом 72-годинної культури є найбільш ефективним біосорбентом із усіх вивчених зразків як штаму *M. xanthus* V-25, так і штаму *M. xanthus* 422. Аналогічна закономірність виявлена для інших видів мікроорганізмів і катіонів металів [2, 8, 9].

Таблиця 1

Біосорбція кадмію біомасою штамів *M. xanthus* (мг/г сухої ваги)

Штам	Умови		Час інкубації, год.		
			24	48	72
V-25	Волога біомаса	Клітини	10,0±0,8	38,0±2,7	88,0±7,5
		Клітини з ліпополісахаридом	70,0±5,9	69,0±5,8	110,0±9,3
		Ліпополісахарид	60,0±5,1	45,0±3,8	51,0±4,3
	Суша біомаса	Клітини	5,0±0,4	30,0±2,5	60,0±5,1
		Клітини з ліпополісахаридом	39,0±2,8	57,0±4,8	125,0±10,6
		Ліпополісахарид	30,0±2,5	35,0±2,9	39,0±2,8
422	Волога біомаса	Клітини	120,0±10,2	410,0±35,6	850,0±72,0
		Клітини з ліпополісахаридом	700,0±51,4	720,0±61,0	1250,0±106,0
		Ліпополісахарид	500,0±42,4	250,0±21,2	500,0±42,4
	Суша біомаса	Клітини	70,0±5,9	200,0±17,6	700,0±51,4
		Клітини з ліпополісахаридом	350,0±30,1	770,0±65,2	1300,0±110,2
		Ліпополісахарид	290,0±24,6	250,0±21,2	350,0±30,8

У подальшому експерименти продовжували лише із сухою біомасою 72-х годинних клітин з невилученим слизовим шаром.

Подальшими дослідженнями було виявлено, що у діапазоні температур 20–37°C кількість кадмію, що сорбується, при його початковій концентрації 0,5 мМ істотно не змінюється (табл. 2). Таким чином, з'ясовано, що цей процес за умов дослідження не залежить від температури.

Також було оцінено вплив початкової концентрації кадмію у розчині на біосорбційну здатність сухої біомаси (клітини зі слизовим шаром), отриманої в результаті 72 годин культивування (табл. 3). Виявлено, що найбільш інтенсивно процеси акумуляції йдуть у діапазоні концентрацій кадмію від 0,3 до 0,5 мМ.

Таблиця 2

**Адсорбція кадмію біомасою мікроорганізмів за різних температур
($\text{мг} \cdot \text{г}^{-1}$ сухої ваги)**

Штам <i>M. xanthus</i>	20 °C	30 °C	37 °C
V-25	125±13,4	138±21,5	130±11,4
422	1300±110,2	1360±115,3	1400±118,7

Таблиця 3

**Кількість кадмію, біосорбованого із розчинів з різною вихідною
концентрацією (%)**

Штам <i>M. xanthus</i>	Початкова концентрація CdCl_2 , мМ							
	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1,0	1,5	5,0
V-25	41	43	96	95	90	30	20	18
422	39	45	98	99	90	37	25	20

Таким чином, виявлено, що на біосорбцію штамми *M. xanthus* впливають вік культури і початкова концентрація CdCl_2 у розчині. У концентраціях до 0,5 мМ біосорбція йде більш ефективно. Аналогічні закономірності виявлені для інших видів мікроорганізмів [10].

Як було показано раніше, можливе вилучення акумульованих важких металів, у тому числі і кадмію, за допомогою ЕДТА [5]. Цього разу була зроблена спроба дослідити у якості десорбентів менш дорогі реактиви (табл. 4).

Виходячи з отриманих даних, оптимальним десорбентом кадмію із біомаси клітин міксобактерій є лимоннокислий натрій у концентрації 0,2 мМ.

Ж. А. Brierely et al. [11] розраховували, що біосорбент можна вважати ефективним, якщо він здатен акумулювати не менш, ніж 150 мг металу на грам сухої біомаси. У даному дослідженні показано, що кількість кадмію, яку здатна акумулювати біомаса *M. xanthus*, досягає 1300 мг кадмію на грам сухої ваги.

Таблиця 4

Десорбція кадмію з клітин штамів *M. xanthus* (% від адсорбованого)

Штам	Десорбент	Концентрація десорбенту, мМ		
		0,1	0,2	0,3
V-25	Карбонат натрію	10	12	20
	Цитрат натрію	50	90	70
422	Карбонат натрію	12	11	25
	Цитрат натрію	57	95	78

Примітка: Інкубація клітин — 20 хвилин у розчині 0,5 мМ кадмію при рН 5,5.

Оскільки попередньо у міксобактерій виявлено ряд властивостей, що дозволяють використовувати штами у біотехнологічних виробництвах (наявність літичних ензимів, продукція фунгіцидних і антибактеріальних сполук), то, враховуючи здатність цих бактерій акумулювати різні важкі метали [5], нами вперше з'ясована можливість використання біомаси *M. xanthus* (як можливого і дешевого відходу виробництва) для сорбції кадмію з ґрунту.

Висновки

1. Найбільш успішно як суха, так і волога біомаса міксобактерій акумулює кадмій за таких умов: 72 години інкубації за вихідної концентрації CdCl₂ у розчині 0,3–0,5 мМ.
2. Біомасу міксобактерій можна звільнити від кадмію, використовуючи 0,2 М водний розчин цитрату натрію.
3. Температура культивування (20, 30, 37°C) не впливає на здатність міксобактерій сорбувати кадмій.

Література

1. Crine M. Le traitement des eaux industrielles chargees en metaux lourds // Tribune de l'eau. — 1993. — Vol. 561. — P. 3–19.
2. Fourest E., Canal C., Roux J. C. Improvement of heavy metal biosorption by mycelial dead biomasses (*Rhizopus arrhizus*, *Mucor miehei* and *Penicillium chrysogenum*): pH control and cationic activation // FEMS Microbiology Reviews. — 1994. — Vol. 14. — P. 325–332.
3. Scott J. A., Palmer S. J. Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption // Applied Microbiology and Biotechnology. — 1990. — Vol. 33. — P. 221–225.
4. Ehrlich H. L. What types of microorganisms are effective in bioleaching, bioaccumulation of metals, ore beneficiation, and desulfurization of fossil fuels? // Biotechnology Symposium. — 1986. — Vol. 16. — P. 227–237.
5. Рахімова О. Л. Біологічні властивості міксобактерій природних біоценозів півдня України: Автореф. дис... канд. біол. наук. — К., 2006. — 21 с.
6. Dworkin M., Kaiser D. Myxobacteria / Biomedical polymers. Washington: American Society for Microbiology. — 1993. — P. 483–487.
7. Reichenbach H., Dworkin M. The myxobacteria / Prokaryotes, 2nd edn. Balows A., Truper H. G., Dworkin M., Harder W., Schleiter K. H. (eds). New York: Springer-Verlag, 1992. — P. 3416–3487.
8. Removal of lead from aqueous solutions by *Penicillium* biomass / H. Niu, X. S. Xu, J. H. Wang, B. Volesky // Biotechnology and Bioengineering. — 1993. — Vol. 42. — P. 785–787.
9. Sadowski Z., Golab Z., Smith R. W. Flotation of *Streptomyces pilosus* after lead accumulation // Biotechnology and Bioengineering. — 1991. — Vol. 37. — P. 955–959.
10. Gadd G. M., de Rome L. Biosorption of copper by fungal melanin // Applied Microbiology and Biotechnology. — 1988. — Vol. 29. — P. 610–617.
11. Brierley J. A., Goyak G. M., Brierley C. L. Considerations for commercial use of natural products for metal recovery / H. Eccles and S. Hunt (ed.), Immobilization of Ions by Biosorption, — 1986. Ellis Horwood, Chichester. — P. 105–117.

Е. Л. Рахімова, Ю. Б. Чистякова

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
каф. микробиологии и вирусологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

БИОМАССА МУХОСОCCUS XANTHUS КАК БИОСОРБЕНТ КАДМИЯ

Резюме

Изучена сорбция кадмия клетками *Myxococcus xanthus* Beebe 1941 в зависимости от состояния биомассы, возраста культуры, температуры и начальной концентрации кадмия в растворе. Продемонстрировано, что наиболее эффективно кадмий сорбирует 72-х часовая сухая клеточная биомасса с неуглеводородным липополисахаридом при начальной концентрации кадмия от 0,3 до 0,5 мМ. Достоверных различий в сорбции кадмия при температурах — 20, 30, 37°C не выявлено. Установлено, что при использовании 0,2 мМ цитрата натрия в качестве десорбирующего агента возможно восстановление 90–95% сорбированного кадмия, что подтверждает аккумуляцию этого металла поверхностью клетки.

Ключевые слова: миксобактерии, тяжелые металлы, биосорбция.

O. L. Rakhimova, Ju. B. Chistyakova

Odesa National University, Department of Microbiology and Virology,
Dvoryanska, 2, Odesa, 65026, Ukraine

MYXOCOCCUS XANTHUS BIOMASS AS CADMIUM BIOSORBENT

Summary

The sorption of cadmium by *Myxococcus xanthus* Beebe 1941 cells depending of biomass stage, age of culture and initial cadmium concentration in solution was studied. It was shown that the 72 hours age cell biomass with extracellular polysaccharide at the initial cadmium concentration 0,3–0,5 mM accumulates cadmium more efficiently. The reliable distinctions in sorption of cadmium at the temperatures — 20, 30, 37°C were not exposed. It was established that 90–95% accumulated cadmium could be recovered by using sodium citrate as a desorbent agent. It affirms that biosorbed cadmium is located on the cellular wall.

Keywords: myxobacteria, heavy metals, biosorption.