

A *Desmodesmus communis* zöldalga rézzel szembeni érzékenysége és réz-akkumulációjának jellemzése

Novák Zoltán¹, Szemán Alexandra¹, Jánószky Mihály², Nagy Sándor Alex¹, Bácsi István¹

¹Debreceni Egyetem TEK-TTK Hidrobiológiai Tanszék, 4032 Debrecen, Egyetem tér 1.

²Tiszántúli Környezetvédelmi, Természetvédelmi és Vízügyi felügyelőség, 4025 Debrecen, Hatvan u. 16.

Kivonat: Napjaink egyik legfontosabb problémája a környezetszennyezés. A fő szennyezők közé sorolhatók bizonyos fémek, köztük a réz, mely bár esszenciális, nagy dózisban toxikussá válik. Az egyik leggyakrabban előforduló fémszennyező hazai felszíni vizeinkben, vagy a szennyvizekben. Munkánk során egy széles körben elterjedt zöldalga faj, a *Desmodesmus communis* rézzel szembeni érzékenységét, valamint rézmegkötő-képességét kísértük figyelemmel különböző rézkoncentrációk mellett. Alacsonyabb rézkoncentráció (0,2 mg l⁻¹) a tenyészetek növekedését serkentette. Az 1 mg l⁻¹ és ettől nagyobb réz koncentrációval kezelt tenyészetekben a cönóbiuszszám és a klorofill tartalom alapján egyaránt növekedésgátlás volt kimutatható. Az élő sejtek rézeltávolításával csak 1 mg l⁻¹ koncentrációig kell számolni. A megkötött réz mennyisége a tenyésztés első felében volt a legmagasabb, és nagyjából intracellulárisan történt. Az eredmények azt mutatják, hogy az általunk vizsgált *D. communis* faj rézre érzékeny, és már az 1 mg l⁻¹ rézkoncentráció csaknem teljes növekedésgátlást okozott, így az élő sejtek rézeltávolításban való alkalmazása nem javasolt. Eredményeinket az irodalmi adatokkal összevetve megállapítható, hogy a rézzel szembeni tolerancia és a rézmegkötő képesség fajspecifikus, sőt a fajon belül, izolátumként is mutathat eltéréseket.

Kulcsszavak: *Desmodesmus communis*, nehézfém-szennyezés, réz, biológiai fémmentesítés

Bevezetés

Az elmúlt évszázadokban a gyors iparosodásnak és urbanizációnak köszönhetően megnőtt a környezetet szennyező anyagok mennyisége (Kapoor és Viraraghavan, 1995). A szennyezőanyagok közül a nehézfémek kiemelt jelentőségűek, mivel a biológiailag nem bontható mikroszennyező anyagok közé tartoznak, illetve a legtöbb közülük igen nagy toxicitással rendelkezik (Naja et al., 2009). A nehézfémek közül az esszenciális nehézfémek kis mennyiségben szükségesek az élőlények számára, azonban nagyobb dózisban toxikussá válhatnak, ilyenek többek között a cink (Zn), a réz (Cu) a vas (Fe) vagy a mangán (Mn).

Az eukarióta algák, köztük a zöldalgák körében számos olyan szervezet ismert, amelyek nagy mennyiségű fém sejt felszínén való megkötésére (bioszorpció), vagy sejten belüli felhalmozására (bioakkumuláció) képesek. Ennek köszönhetően az algák egyre nagyobb szerepet kapnak a szennyezett vizek biológiai úton történő fémmentesítésében (Tien, 2002; Conti és Cechetti, 2003; Chojnacka, 2010).

A réz (Cu) az élő szervezetekben, a sejtekben nélkülözhetetlen a normális növekedéshez és fejlődéshez, valamint számos fiziológiai folyamatban részt vesz. Az élőlényekben általában fehérjékhez kötött formában található meg, az eukarióta algák esetében a fotoszintézis során részt vesz az elektrontranszportban, a mitokondriális légzésben, ezen kívül mint kofaktor, számos fontos enzimátikus folyamatban közreműködik (Kováčik et al., 2010). Azonban magasabb koncentrációkban toxikussá válhat: csökkenti a klorofill és a járulékos pigmentek mennyiségét, gátolja az enzimaktivitást és a fehérjefunkciókat, valamint a transzportfolyamatokat, fokozza a lipid-peroxidáció mértékét (Yruela, 2005). A réz jelenléte katalizálja a szabad gyök-képző folyamatokat, amelyek a Fenton- és Haber-Weiss reakciókon keresztül mennek végbe a sejtekben. A reakció során képződött anyagok károsítják a membránokat és a különböző makromolekulákat, valamint értékes tápanyagok elvesztéséhez vezethetnek (Kováčik et al., 2010).

Munkánk során egy kozmopolita, ubiquista zöldalga faj, a *Desmodesmus communis* rézzel szembeni toleranciáját vizsgáltuk. A réz (Cu) kiemelt jelentőségű nyomelem, mivel hazai felszíni vizeinkben és szennyvizeinkben az egyik leggyakrabban előforduló fémszennyező, továbbá az

élőlények számára esszenciális, azonban nagyobb koncentrációkban toxikus hatású. Kísérleteinkkel a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Hogyan hat a réz a tenyészetek növekedésére?
- Milyen fémkoncentrációk mellett számolhatunk jelentős mennyiségű fémtávolítással, illetve a fémmegkötés intra- vagy extracellulárisan történik?
- A különböző *Desmodesmus communis* izolátumok fémmegkötő sajátságai mennyire tekinthetők általánosnak, ugyanazon faj különböző izolátumai (laboratóriumi törzsek) között is lehetnek-e különbségek?

Anyag és módszer

Tenyésztési körülmények: Munkánk során a Debreceni Egyetem Hidrobiológiai Tanszékének alga-törzsgyűjteményben (Algal Culture Collection, Department of Hydrobiology, University of Debrecen) fenntartott *Desmodesmus communis* (ACCDH-UD1004) laboratóriumi törzset vizsgáltuk. A tenyészeteket Jaworski tápoldatban, 400 ml végtérfogatban, állandó hőmérsékleten (24°C), állandó fényintenzitáson, steril levegővel buborékolatva, 500 ml Erlenmeyer-lombikokban tartottuk fent. A *D. communis* (ACCDH-UD1004) laboratóriumi törzs réz-toleranciájának és rézmegkötő-képességének vizsgálatához a tenyészeteket 0,2; 0,8; 0,85; 0,9; 1,0; 1,2; 1,4 és 2 mg l⁻¹ réz-koncentrációkkal kezeltük. A kísérletek során kontroll (hozzáadott réz nem tartalmazó) tenyészeteket is alkalmaztunk.

A növekedés nyomon követése: A tenyészetekben a növekedés nyomon követése a cönóbiuszszámban és a klorofill-tartalomban bekövetkezett változások vizsgálatával történt. A cönóbiuszszám vizsgálatát Olympus BX50 fluoreszcens mikroszkóppal, 400× nagyításon az EN 15204 (2006) szabvány szerint történt. A klorofill-tartalom meghatározásához a mintavételek alkalmazásával 6-6 ml mintát centrifugáltunk össze (Micro-centrifuge Type-320a, 5 perc, 10000 rpm), a minták klorofill tartalmát metanolos extrakciós módszerrel határoztuk meg (Felföldy 1987).

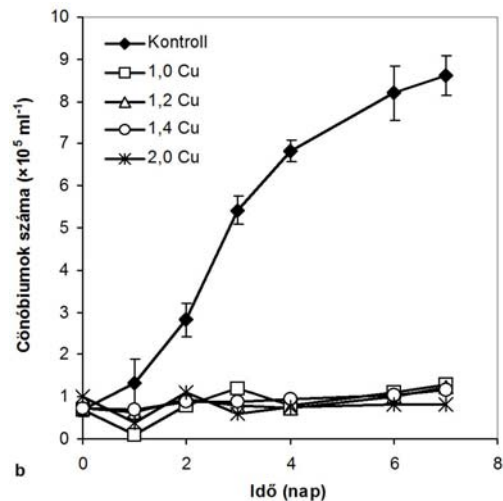
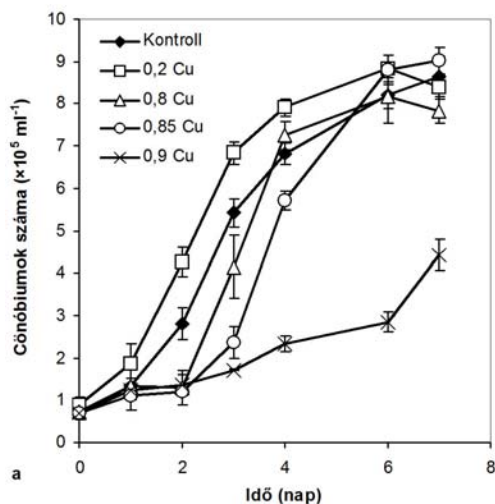
Az extra- és intracellulárisan megkötött réz meghatározása: A rézfelvétel meghatározásához a 0., 3. és 7. napon 6-6 ml mintát vettünk, centrifugáltuk, a sejteket és a

felülűszót pedig a feldolgozásig -20°C -on tároltuk. A felülűszók réz tartalmának meghatározása magyar szabvány szerint, láng-atomabszorpciós spektrometriás (FAAS) eljárással történt a TIKTVF Mérőállomás laboratóriumában. Az összes megkötött réz mennyiségét a felülűszó réz tartalmának csökkenéséből számítottuk ki. Az extra- és intracellulárisan megkötött réz mennyiségének elkülönítésére 6 ml 2 mM EDTA oldatot adtunk az összegyűjtött sejtekhez, majd 10 percig kevertük az elegyeket (Tripathi és Gaur, 2006). A kevertetés után a kezelt mintákat centrifugáltuk és a felülűszókból újabb FAAS méréssel meghatároztuk a sejtek felszínéről lemosott réz mennyiségét.

Statistikai elemzés: Az eredmények statisztikai értékeléséhez a kétutas ANOVA módszert használtuk a SigmaStat-3.10 szoftver alkalmazásával.

Eredmények

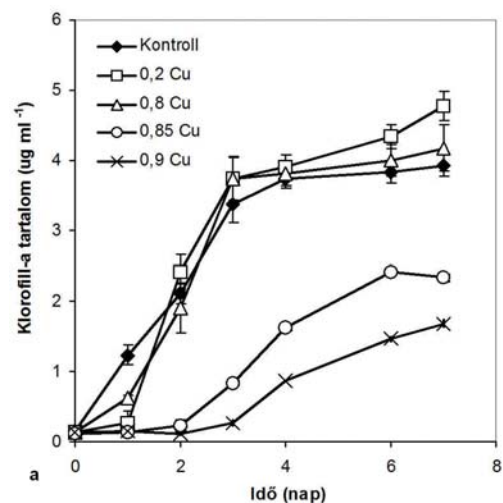
A *Desmodesmus communis* tenyészetek növekedése: A rézzel kezelt tenyészetekben a *D. communis* cönóbiuszám-változása minden esetben eltért a kontroll tenyészetben tapasztalt növekedés mértékétől (1. ábra). A $0,2\text{ mg l}^{-1}$ rézzel kezelt tenyészetekben a cönóbiuszám-gyarapodás intenzívebb volt, mint a kontroll tenyészetekben (1a. ábra). A cönóbiuszámokban bekövetkezett változások eredményei egyértelműen azt mutatták, hogy növekedés-gátlás a $0,8\text{ mg l}^{-1}$ és $0,85\text{ mg l}^{-1}$ rézzel kezelt tenyészetekben csak az első két napon volt, ezt követően a populáció regenerálódott és a tenyésztés végén nem volt szignifikáns különbség a kezelt tenyészetek és a kontroll tenyészetek cönóbiuszám között (1a. ábra). A $0,9\text{ mg l}^{-1}$ rézzel kezelt tenyészetben a kontrollhoz viszonyítva a tenyésztés teljes ideje alatt gátolt volt a cönóbiuszám-növekedés: a kezelés végén 49%-kal volt alacsonyabb a kezelt tenyészet cönóbiuszámja a kontroll tenyészet cönóbiuszámánál (1a. ábra). Az 1 mg l^{-1} , vagy annál magasabb koncentrációval kezelt tenyészetek cönóbiuszám-gyarapodása minden esetben gátolt volt a kontroll tenyészetéhez képest. Általánosságban elmondható, hogy a réz koncentrációjának emelkedésével nőtt a gátlás mértéke is (1b. ábra). Az $1-2\text{ mg l}^{-1}$ rézzel kezelt tenyészetek között szignifikáns különbségek nem voltak kimutathatók.

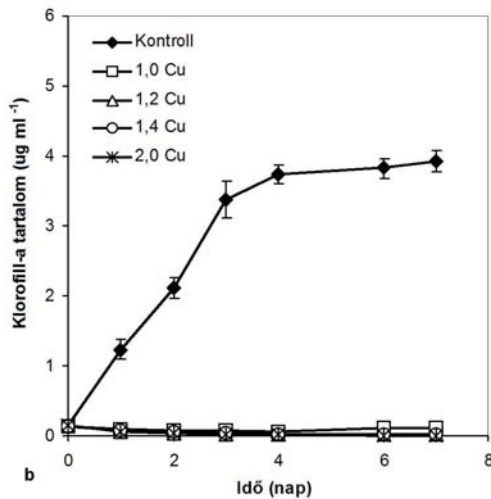


1. ábra. A különböző réz koncentrációkkal kezelt tenyészetek növekedése a cönóbiuszám változása alapján (a) $0,2-0,9\text{ mg l}^{-1}$, (b) $1,0-2,0\text{ mg l}^{-1}$.

Figure 1 Changes of the number of coenobia in *Desmodesmus communis* cultures treated with different copper concentrations (a) $0,2-0,9\text{ mg l}^{-1}$, (b) $1,0-2,0\text{ mg l}^{-1}$.

A rézzel kezelt tenyészetek klorofill-tartalmát megvizsgálva elmondható, hogy az első napon a kezelt tenyészetek klorofill-tartalma minden esetben alacsonyabb volt a kontroll tenyészetekénél (min. 50%-os, max. 90%-os eltérés; 2. ábra). Ezt követően, a 2. napon a $0,2\text{ mg l}^{-1}$ és $0,8\text{ mg l}^{-1}$ réz-koncentrációval kezelt tenyészetek klorofill-tartalma nem tért el jelentős mértékben a kontroll tenyészetétől, míg a $0,85\text{ mg l}^{-1}$ -rel és a $0,9\text{ mg l}^{-1}$ -rel kezelt tenyészetek klorofill-tartalma szignifikánsan alacsonyabb volt (2a. ábra). A $0,2\text{ mg l}^{-1}$ és $0,8\text{ mg l}^{-1}$ réz-koncentrációval kezelt tenyészetek klorofill-tartalma a tenyésztés utolsó napján magasabb volt a kontroll tenyészeténél, ezzel szemben a $0,85\text{ mg l}^{-1}$ és $0,9\text{ mg l}^{-1}$ rézzel kezelt tenyészetek klorofill-koncentrációja szignifikánsan (49% és 58%) alacsonyabb volt, mint a kontrollban. Az $1,0\text{ mg l}^{-1}$, vagy annál magasabb réz-koncentrációval kezelt tenyészetek klorofill-tartalmának növekedése a tenyésztés teljes ideje alatt gátolt volt. A tenyésztési idő végére klorofill-tartalmuk 90-99%-al volt alacsonyabb, mint a kontroll tenyészeté (2b. ábra). Az 1 mg l^{-1} vagy magasabb réz-koncentrációval kezelt tenyészetek klorofill-tartalma közt nem voltak szignifikáns eltérések.

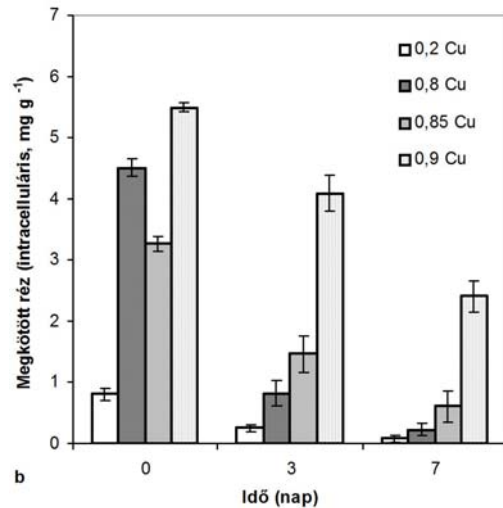
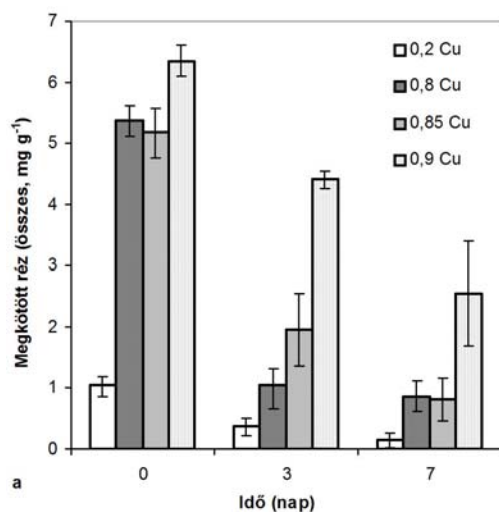




2. ábra. A klorofill-a tartalom változása a rézzel kezelt *Desmodemus communis* tenyészetekben (a) 0,2-0,9 mg l⁻¹, (b) 1,0-2,0 mg l⁻¹.

Figure 2 Changes of chlorophyll-a content in *Desmodemus communis* cultures treated with different copper concentrations (a) 0,2-0,9 mg l⁻¹, (b) 1,0-2,0 mg l⁻¹.

A Desmodemus communis tenyészetek rézeltávoltítása: A rézeltávoltítás mértékét csak azokban a tenyészetekben vizsgáltuk, ahol növekedés volt kimutatható (élő tenyészetek – 0,2; 0,8; 0,85 és 0,9 mg l⁻¹ rézzel kezelt tenyészetek). A különböző mennyiségű rézzel kezelt tenyészetek rézeltávoltítását egységnyi száraz tömegre (mg g⁻¹) vonatkoztatva adtuk meg. Általánosan elmondhatjuk a kezelt tenyészetekről, hogy már a 0. napon a hozzáadott réz ~50%-át megkötötték, a 7. napra ez a mennyiség azonban valamelyest csökkent a kiindulási állapothoz képest. Mindegyik kezelt tenyészetéről elmondhatjuk, hogy a megkötött réz mennyisége a tenyésztési idő legelején volt a legmagasabb, és ennek nagyobb hányadát teszi ki az intracellulárisan kötött réz mennyisége (3. ábra). A tenyésztési idő 0. napján a 0,9 mg l⁻¹ rézzel kezelt tenyészetben volt a legmagasabb az egységnyi térfogatra vonatkoztatott összes (~63%), illetve intracellulárisan megkötött réz mennyisége (~87%). A növekvő koncentrációjú rézzel együtt nőtt az egységnyi szárazanyagra vonatkoztatott megkötött réz mennyisége is, amely a 7. napra lecsökkent 3. ábra).



3. ábra. Az összes (a) és az intracellulárisan (b) megkötött réz mennyiségének változása a *Desmodemus communis* tenyészetekben

Figure 3 The total (a) and intracellular (b) amount of removed zinc in cultures treated with different zinc concentrations (0,2-0,9 mg l⁻¹).

Diskusszió

Kováčik és munkatársai (2010) vizsgálatainak eredményei is azt mutatták, hogy rézzel való kezelés (25 µM; 1,59 mg l⁻¹) a klorofill-tartalom, valamint az oldható fehérjék és fenolok mennyiségének csökkenéséhez vezetett a *S. quadricauda* (ma *D. communis*) zöldalga esetén. Piovar és munkatársai (2011) is hasonló eredményekre jutottak a réz hosszú távú hatásait (14 nap) vizsgálva. Kimutatták, hogy a réz jelenléte negatívan hat a növekedésre, az asszimilációs pigmentekre, a klorofill-a fluoreszcenciára, az oldható fehérje tartalomra, valamint oxidatív stressz is kimutatható volt. Az általunk vizsgált *D. communis* törzs növekedését már 0,85-0,9 mg l⁻¹ réz gátolta, az 1 mg l⁻¹ és annál magasabb réz-koncentrációk a növekedés teljes gátlását okozták.

A Scenedesmeaceae család rézeltávoltító képességével kapcsolatban az irodalom szerint is gyakran megfigyelt jelenség a kezdeti nagy intracelluláris réztartalom csökkenése, Tripathi és Gaur (2006) szintén az intracelluláris réztartalom csökkenését figyelték meg egy *Scenedesmus* faj esetén, már 24 órával a kezelés megkezdése után. Szintén gyakran megfigyelt jelenség, hogy a réz koncentrációjának növekedésével csökken az intracellulárisan felhalmozott réz aránya. Ma és munkatársai (2003) azt figyelték meg a 86.81 SAG *Scenedesmus subspicatus* törzs esetén, hogy alacsonyabb rézkoncentrációval (0,67 mg ml⁻¹) kezelt tenyészetekben a felvett rézmennyiség közel fele intracelluláris, míg nagy koncentrációk esetén (~10 mg l⁻¹) az összes megkötött mennyiségnek csupán 1%-a található a sejtekben. Sabatini és munkatársai (2009) egy *S. vacuolatus* törzssel kapcsolatban írták le, hogy ~0,4 mg l⁻¹ rézzel kezelt tenyészetben a megkötött réz 81%-a intracelluláris, míg a réz koncentrációját 26,5 mg l⁻¹-re emelve ez az érték alig 5%-ra csökken. Magas rézkoncentrációk esetén a növekedésgátlás mértéke már elérte a 99%-ot (Ma et al., 2003), így nem meglepő, ha az aktív felvételi folyamatok – melyek az élő rendszer sajátosságai – háttérbe szorultak, és csak az adszorpciós folyamatok játszódtak le.

Az eredmények azt mutatják, hogy az általunk vizsgált *D. communis* faj rézre érzékeny, és már az 1 mg l⁻¹ réz koncentráció csaknem teljes növekedésgátlást okozott, így az élő sejtek rézeltávoltításban való alkalmazása nem javasolt. Eredményeinket irodalmi adatokkal összevetve megállapítható, hogy a rézzel szembeni tolerancia és a rézmegkötő képesség fajspecifikus, sőt a fajon belül, izolátumonként is mutathat kisebb-nagyobb eltéréseket.

A réz akkumuláció hátterének részletesebb magyarázata, valamint a már nem osztódó, holt biomassza rézmegkötő képességének jellemzése további vizsgálatokat igényel.

Köszönetnyilvánítás

A munka a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0043 számú ENVIKUT, illetve a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú *Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program* című kiemelt projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával (B-Béres Viktória, Novák Zoltán), valamint a Debreceni Egyetem Belső Kutatási Pályázat és a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (Bácsi István) támogatásával készült.

Irodalomjegyzék

- Aksu Z, Egretli G, Kutsal T (1998) A comparative study of copper (II) biosorption on Ca-alginate, agarose and immobilized *C. vulgaris* in a packed-bed column. *Process Biochemistry* 33: 393–400.
- Cañizares-Villanueva RO, González-Moreno S, Domínguez-Bocanegra AR (2001) Growth, nutrient assimilation and cadmium removal by suspended and immobilized *Scenedesmus acutus* cultures: influence of immobilization matrix. In: Chen, F., Jiang, Y. (Eds.), *Algae and their Biotechnological Potential*. Kluwer Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 147–161.
- Chojnacka K (2010) Biosorption and bioaccumulation – the prospects for practical applications. *Environment International* 36 (3): 299–307.
- Conti ME, Cechetti G (2003) A biomonitoring study: trace metals in algae and mollusks from Tyrrhenian coastal areas. *Environmental Research* 93: 99–112.
- Felföldy L (1987) A biológiai vízminősítés. 4. kiad. In: *Vízügyi Hidrobiológia* 16. – VGI, Budapest, 258.
- Guclu Z (2012) Toxicity of copper on *Desmodesmus subspicatus* growth. *Fresenius Environmental Bulletin* 21 (6B): 1703-1707.
- Kapoor A, Viraraghavan T (1995) Fungal biosorption - an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewater: a review. *Bioresource Technology* 53 (3): 195-206.
- Kováčik J, Klejduš B, Hedbavny J, Bačkor M (2010) Effect of copper and salicylic acid on phenolic metabolites and free amino acids in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae). *Plant Science* 178: 307–311.
- Ma M., Zhu W., Wang Z., Witkamp G. J. (2003) Accumulation, assimilation and growth inhibition of copper on freshwater alga (*Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG) in the presence of EDTA and fulvic acid. *Aquatic Toxicology* 63: 221-228.
- Monteiro CM, Castro PML and Malcata FX (2011b) Biosorption of zinc ions from aqueous solution by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Environmental Chemistry Letters* 9: 169–176.
- Monteiro CM, Fonseca SC, Castro PML and Malcata FX (2011a) Toxicity of cadmium and zinc on two microalgae, *Scenedesmus obliquus* and *Desmodesmus pleiomorphus*, from Northern Portugal. *Journal of Applied Phycology* 23: 97–103.
- Naja GM, Murphy V, Volesky B (2010) Biosorption, Metals. In: Flickinger M (editor): *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. New York, Wiley Interscience.
- Omar HH (2002) Bioremoval of zinc ions by *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda* and its effect on growth and metabolism. *International Biodeterioration & Biodegradation* 50: 95 – 100.
- Perales-Vela HV, Pena-Castro JM and Canizares-Villanueva RO (2006) Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere* 64: 1–10.
- Piovár J, Stavrou E, Kaduková J, Kimáková T, Bačkor M (2011) Influence of long-term exposure to copper on the lichen photobiont *Trebouxia erici* and the free-living algae *Scenedesmus quadricauda*. *Plant Growth Regulation* 63: 81–88.
- Sabatini S.E., Juárez Á.B., Eppis M.R., Bianchi L., Luquet C.M., Molina M.C.R. (2009) Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 1200-1206.
- Tien CJ (2002) Biosorption of metal ions by freshwater algae with different surface characteristics. *Process Biochemistry* 38: 605–613.
- Travieso L, Canizares RO, Borja R, Benitez F, Dominguez AR, Dupeyron R and Valiente V (1999) Heavy Metal Removal by Microalgae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 62: 144-151.
- Tripathi BN, Gaur JP (2006) Physiological behavior of *Scenedesmus* sp. during exposure to elevated levels of Cu and Zn and after withdrawal of metal stress. *Protoplasma* 229: 1–9.
- Yruela GI (2005) Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17 (1): 145-156.

Characterisation of copper-tolerance and copper accumulation of the green alga *Desmodesmus communis*

Novák Z., Szemán A., Jánószky M., Nagy S.A., Bácsi I.

Abstract: Nowadays one of the most important problems is the environmental contamination. Certain metals belong to the main contaminants, copper among them, which is an essential element but could become toxic in higher concentration. Copper is one of the most frequent metal contaminant in Hungarian surface waters or wastewaters. In this study, the copper tolerance and copper removal ability of a widespread green alga species, *Desmodesmus communis* was investigated. Lower copper concentration (0.2 mg l^{-1}) stimulated the growth of the cultures. Growth of coenobia number and chlorophyll content was totally inhibited in cultures treated with 1 mg l^{-1} or higher copper concentrations. Copper removal of living cells can be taken into consideration up to 1 mg l^{-1} copper concentration. The amount of removed copper was the highest in the first half of culturing and the removed copper was mainly intracellular. The results show, that the studied *D. communis* strain is sensitive to copper, application of living biomass in copper removal is not recommended. Comparing the results with literary data, it can be concluded that copper tolerance and copper removal ability is species-specific, even within a species, the different isolates could also show differences.

Keywords: *Desmodesmus communis*, heavy metal contamination, copper, biological metal removal