

УДК 573.7 : 582.282

## ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДЕТОКСИКАЦИЯ ЦИНКА ГРИБАМИ *PENICILLIUM CHRYSOGENUM* И *ASPERGILLUS NIGER*

© 2023 г. К. В. Сазанова<sup>1,2,3,\*</sup>, М. С. Зеленская<sup>2,\*\*</sup>, А. В. Корнеев<sup>2,\*\*\*</sup>, Д. Ю. Власов<sup>1,2,\*\*\*\*</sup>

<sup>1</sup>Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, 197376 Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, 199034 Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский филиал Архива Российской академии наук, 196084 Санкт-Петербург, Россия

\*e-mail: ksazanova@binran.ru

\*\*e-mail: marsz@yandex.ru

\*\*\*e-mail: a\_v\_korneev@list.ru

\*\*\*\*e-mail: dmitry.vlasov@mail.ru

Поступила в редакцию 16.04.2023 г.

После доработки 25.05.2023 г.

Принята к публикации 25.05.2023 г.

Микроскопические грибы являются перспективными объектами для биоремедиации, благодаря их способности переводить металлы в менее подвижные и доступные для организмов формы. В выполненном исследовании показано, что грибы *Penicillium chrysogenum* и *Aspergillus niger* обладают физиологическими механизмами экстраклеточной детоксикации цинка при его исходной концентрации 250 мкмоль – 2 ммоль в среде. В концентрациях 250–500 мкмоль Zn способствует накоплению биомассы и обильному спороношению *A. niger* и *Penicillium chrysogenum*, а в концентрациях 1–2 ммоль подавляет рост грибов. Экстраклеточная детоксикация цинка грибом *Aspergillus niger* происходит путем образования двуводного оксалата цинка катсаросита, благодаря активному биосинтезу щавелевой кислоты. Основным механизмом детоксикации цинка *Penicillium chrysogenum* было образование фосфата цинка (гопеита). Образование фосфата цинка (гопеита) под действием гриба было установлено впервые. Ключевыми факторами, определяющими направление процессов образования внеклеточных минеральных фаз, являются количества продуцируемых грибами экстраклеточных полимерных соединений и щавелевой кислоты, а также изменение pH среды в процессе роста культур.

**Ключевые слова:** биоремедиация, детоксикация, оксалаты, органические кислоты, тяжелые металлы, экстраклеточный полимерный матрикс

DOI: 10.31857/S0026364823060089, EDN: TXQBNH

### ВВЕДЕНИЕ

Геохимическая деятельность грибов имеет важное значение для функционирования экосистем. Грибы изменяют подвижность и биодоступность элементов, а также играют большую роль в преобразовании минералов (Gadd, 2010). На территориях, подверженных высокой антропогенной нагрузке и загрязненным избыточными концентрациями тяжелых металлов, способность грибов участвовать в изменении биодоступности элементов, проявляющих токсичность в определенных концентрациях, может быть использована для целей биоремедиации (Syed et al., 2020). Элементы, проявляющие токсичность в высоких концентрациях, такие как цинк, кадмий, хром, кобальт, медь, мышьяк, свинец, никель, селен, серебро, ртуть, сурьма и таллий, присутствуют в природе, но их концентрация многократно повышается в результате техногенного загрязнения природной среды (Расуна, Расуна, 2001; Камра, Castanas, 2008; Ashi-

khmina et al., 2018; Rehan, Alsohim, 2019). Грибы, благодаря их способности аккумулировать металлы в количествах, превышающих таковые в окружающей среде, чаще других организмов рассматриваются для использования в биоремедиации (Siddiquee et al., 2015). Кроме того, грибы обладают высокой степенью устойчивости к действию тяжелых металлов, что позволяет им выживать в среде с высокой концентрацией металлов и использовать физиологически активные механизмы их накопления (Mukhopadhyay et al., 2011; Tian et al., 2019; Chandran et al., 2014).

Взаимодействие грибов с металлами может происходить внутриклеточно и экстраклеточно (Sayer, Gadd, 2001; Gadd, 2001, 2007; Lúcia Leitão, 2009; Siddiquee et al., 2015). Внутриклеточное накопление элементов реализуется за счет поступления металлов через транспортеры на мембране. Попав в клетку, металл может быть иммобилизован внутри вакуолей. В механизмах иммобилизации

металлов могут участвовать органические кислоты или специфические белки (металлотионеины и фитохелатины, способные связывать металлы через SH-группы) (Siddiquee et al., 2015; Gadd, 2001, 2007).

Экстраклеточная иммобилизация металлов более эффективна, поскольку позволяет полностью избежать их токсического действия. Образование соединений с органическими кислотами снижает активность и токсичность свободных катионов металлов в почве или на минеральном субстрате и способствует выживанию грибов в среде с высоким содержанием токсичных металлов (Fomina et al., 2005; Munir et al., 2005; Abbas et al., 2014; Chandran et al., 2014). Среди низкомолекулярных органических кислот наиболее сильным связывающим агентом является щавелевая кислота. Формируя с рядом металлов устойчивые комплексы и/или нерастворимые соли (оксалаты), щавелевая кислота сильно снижает биодоступность металлов. Поэтому оксалатообразование рассматривается как высокоэффективный способ иммобилизации многих металлов (Munir et al., 2005; Chandran et al., 2014).

Многочисленные данные указывают на важную роль механизма сорбции металлов на поверхности клеточных стенок (Dhankhar et al., 2011; Mukhopadhyay et al., 2011; Chandran et al., 2014; Tian et al., 2019). Клеточная стенка может принимать участие в сорбции ионов даже при отсутствии физиологической активности (в мертвой биомассе). Внеклеточное накопление катионов может сопровождаться ионным обменом, приводящим к образованию комплексов, в которых катионы координируются органическими функциональными группами полимеров клеточной стенки (Siddiquee et al., 2015). Кроме полимеров клеточных стенок, во внеклеточной детоксикации металлов принимают участие полисахариды, гликопротеины и гликолипиды секретируемые грибами в среду и образующие так называемый матрикс экстраклеточных полимерных соединений (ЭПС) (De Veeck, 2021). Наличие в среде ЭПС многократно усиливает интенсивность сорбции металлов. Кроме того, в щелочной среде при участии ЭПС может происходить кристаллизация карбонатов металлов (Anbu et al., 2016; Zhu et al., 2016). В литературе имеются доказательства совместного осаждения карбонатов тяжелых металлов и карбоната кальция грибами (Zhao et al., 2022). В процессе кристаллизации кальцита тяжелые металлы могут быть включены путем замещения двухвалентных катионов  $\text{Ca}^{2+}$  (Kim et al., 2021). Кроме того, образование карбонатов тяжелых металлов, в том числе цинка, кадмия, свинца, лантана без участия кальция описаны для некоторых грибов, обладающих уреазной активностью: *Verticillium* sp., *Fusarium oxysporum*, *Neurospora crassa*, *Myrothecium gramineum*, *Pestalotiopsis* sp. (Li et al., 2017).

Существующие запатентованные методики удаления элементов из водных р-ров основаны на сорбции металлов полимерами клеточной стенки (Tan et al., 2003; Mukhopadhyay et al., 2011; Siddiquee et al., 2015; Ashikhmina et al., 2018). Однако при очистке почв и твердых минеральных субстратов эти методы неэффективны, поскольку со временем они приводят к высвобождению иммобилизованных или адсорбированных тяжелых металлов обратно в окружающую среду (Achal et al., 2011). Следовательно, необходимы альтернативные методы, эффективного, экономичного и экологически чистого удаления тяжелых металлов из окружающей среды, в том числе почв сельскохозяйственного назначения. В основу таких методов могут быть положены механизмы иммобилизации металлов в нерастворимые кристаллические фазы. На протяжении последних 10 лет идут активные разработки биотехнологий удаления тяжелых металлов из различных сред с использованием кальция биогенного происхождения (Anbu et al., 2016).

Наши предыдущие исследования, выполненные на грибах *Aspergillus niger* и *Penicillium* spp., продуцирующих в среду щавелевую кислоту, показали, что при исходной концентрации Zn в среде 2 ммоль *Aspergillus niger* активно образует оксалаты цинка. Механизмы же детоксикации цинка грибами рода *Penicillium* до конца не понятны (Sazanova et al., 2015). Вероятно, образование оксалатов цинка *Aspergillus niger* и их отсутствие в культурах *Penicillium* spp. связано с низким соотношением концентраций щавелевая кислота/Zn в культуральной жидкости изученных грибов рода *Penicillium*. Кроме того, на примере *Penicillium chrysogenum* было показано, что грибы этого рода, в отличие от *Aspergillus niger*, активно осаждают вторичный кальцит (Sazanova et al., 2020, 2023), что связано с их способностью продуцировать ЭПС. Эти свойства *Penicillium chrysogenum* могут эффективно участвовать и в иммобилизации цинка.

Цель данной работы – анализ биохимических свойств *Aspergillus niger* и *Penicillium chrysogenum*, способствующих реализации адаптивных механизмов этих грибов при культивировании на средах с различными концентрациями цинка.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Штаммы грибов и культивирование.** Для исследования было использовано два штамма грибов: *Penicillium chrysogenum* (штамм Cs/21, номер в Генбанке OP758843) выделен из поверхностных наслоений на бронзовой скульптуре Геракла Фарнезского (ГМЗ “Царское Село”, г. Пушкин, Санкт-Петербург) и *Aspergillus niger* (штамм Ch4/07, номер в Генбанке KF768341) выделен с поврежденной поверхности мрамора (музей-заповед-

ник “Херсонес Таврический”, г. Севастополь, Крым).

Грибы культивировали поверхностным способом в матрасах для культивирования на жидкой питательной среде Чапека–Докса (г/л: глюкоза – 30;  $\text{NaNO}_3$  – 2.0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1.0;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.5;  $\text{KCl}$  – 0.5;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.01). Объем среды составлял 30 мл. В среду добавляли сульфат цинка в нескольких концентрациях: 250 мкмоль, 500 мкмоль, 1 ммоль и 2 ммоль/л. Контролем служили культуры, выращенные на среде без добавления цинка. Продолжительность культивирования составляла 7, 14, 21 и 28 сут. Опыты проводились в трехкратной повторности.

В ходе выполнения эксперимента анализировали следующие показатели: количество биомассы мицелия, количество ЭПС, pH среды, состав и количество органических кислот в среде, состав продуктов кристаллизации.

**Световая и электронная микроскопия.** Для изучения морфологии мицелия и первичной визуализации продуктов кристаллизации микропрепараты мицелия просматривали под микроскопом Микромед-2.

Для более детального анализа образовавшихся структур использовали сканирующую электронную микроскопию (СЭМ) и энергодисперсионную рентгеновскую спектроскопию (ЭДХ). Исследование проводили на микроскопе TM3000 (НИТАСНИ, Япония). Для полуколичественного EDX-анализа микроскоп был оснащен системой Oxford Inca (Oxford Instruments, Abingdon, UK), которая работала в режиме низкого вакуума (60 Па) и при ускоряющем напряжении 15 кВ. Чтобы избежать эффекта зарядки на изображениях SEM, образцы были покрыты тонким слоем углерода (высоковакуумный угольный распылитель Q150TE). Спектры EDX анализировали с помощью пакета программ EDAX Genesis.

**Анализ органических кислот в среде.** Значения pH во время эксперимента оценивали с помощью pH-метра Checker 1 (HI 98103).

Для определения общего количества низкомолекулярных органических кислот, продуцируемых грибами, культуральную жидкость обрабатывали 3 мл концентрированной HCl для растворения нерастворимых оксалатов кальция и пропускали через катионит (КУ-2-8). Для определения содержания органических кислот в растворимой форме культуральную жидкость пропускали через катионит (КУ-2-8) без предварительной обработки HCl. Полученный водный р-р органических кислот выпаривали на ротаторном испарителе при 40°C. Высушенные экстракты растворяли в пиридине (50 мкл) и инкубировали с BSTFA (N,O-бис-3-метилсилил-3-F-ацетамид) (50 мкл) при 100°C в течение 15 мин. Дериватизированные образцы анализировали методом хромато-масс-

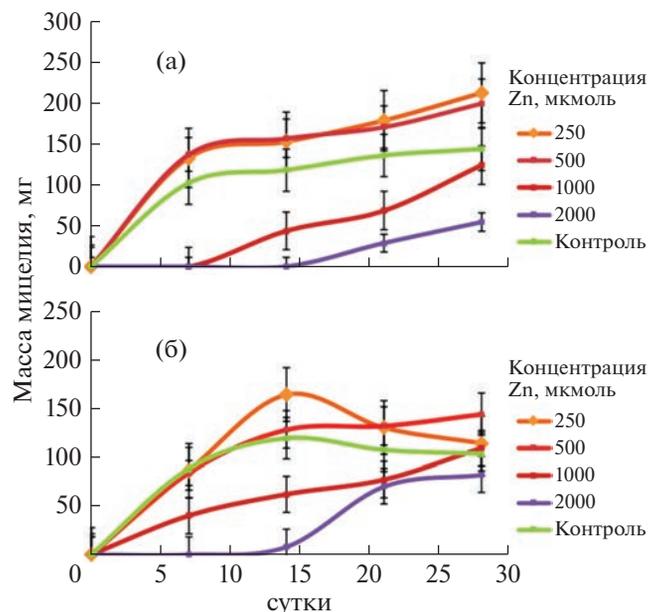


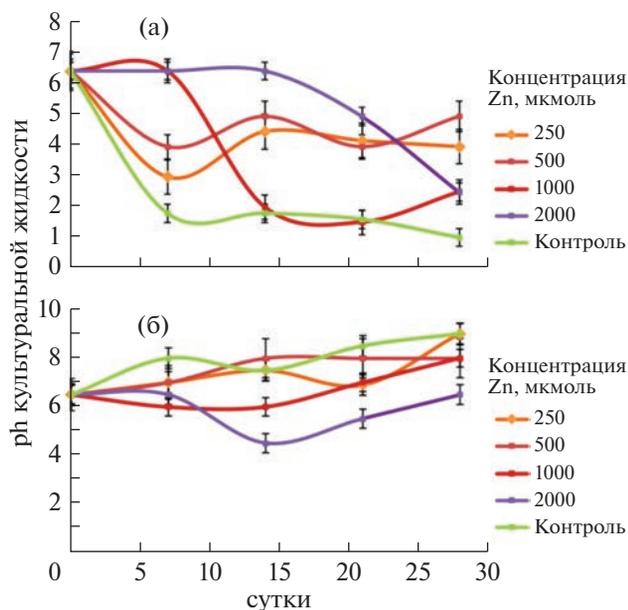
Рис. 1. Динамика роста биомассы мицелия *Aspergillus niger* (а) и *Penicillium chrysogenum* (б).

спектрометрии (ГХ-МС) на приборе Maestro (Interlab, Россия) с масс-селективным детектором Agilent 5975 (Санта-Клара, Калифорния, США). Использовали колонку HP-5MS 30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм. Хроматографию проводили при запрограммированном линейном увеличении температуры от 70 до 320°C и при постоянном потоке газа-носителя (гелия) со скоростью 1 мл/мин. Масс-спектры сканировали в диапазоне 50–800 m/z с частотой 2 скана/с. Хроматограммы регистрировали по полному ионному току.

Масс-спектрометрическая информация была обработана и интерпретирована с использованием программы AMDIS (<http://www.amdis.net/index.html>) и стандартной библиотеки NIST2005. Количественную интерпретацию хроматограмм методом внутреннего стандарта также проводили с использованием тридекана в программе UniChrom (версия 5.0.19.1180) (<http://www.unichrom.com/unichrome.shtml>).

**Определение биомассы и содержания ЭПС.** Мицелий отделяли от культуральной жидкости, высушивали при 25°C и определяли его биомассу гравиметрическим методом. На рис. 1 каждый график соответствует количественным показателю биомассы с одной колбы (30 мл).

Для определения количества ЭПС культуральную жидкость центрифугировали при 11 000 об./мин в течение 10 мин. Собранный супернатант смешивали с равным объемом охлажденного льдом этанола и инкубировали при 4°C в течение 24 ч. Затем охлажденный р-р центрифугировали при 2500 об./мин в течение 20 мин. Полученные осадки ресуспендировали в дистиллированной воде



**Рис. 2.** Динамика изменения pH культуральной жидкости в процессе роста микромицетов *Aspergillus niger* (а) и *Penicillium chrysogenum* (б).

вместе с равным объемом ледяного этанола. Затем р-р снова центрифугировали при 2500 об./мин в течение 20 мин. Полученный конечный осадок сушили при комнатной температуре.

**Порошковая рентгеновская дифракция.** Измерения порошковой дифракции проводили с использованием дифрактометра Rigaku II Miniflex с излучением  $\text{CuK}\alpha$  ( $2\theta = 5-80^\circ$  с шагом  $0.02^\circ$ ). Образец измельчали в ступке и осаждали на стеклянную кювету из спиртовой суспензии. Фон от кюветы измеряли отдельно и вычитали из полученной рентгенограммы образца. Фазовый состав определяли по базе данных PDF-2 (2019).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные результаты показали, что Zn в концентрациях 250–500 мкмоль оказывает стимулирующее действие на накопление биомассы *A. niger*, а в концентрациях 1–2 ммоль подавляет рост и спороношение *A. niger* (рис. 1а). При высокой концентрации Zn (1 и 2 ммоль) поверхностная пленка мицелия *A. niger* не формировалась, рост происходил преимущественно глубинным образом в виде пеллет, а спороношение отсутствовало. При концентрации цинка 2 ммоль рост мицелия начался только на третью неделю с момента инокуляции.

На рост биомассы *Penicillium chrysogenum* Zn оказывал выраженное ингибирующее действие только при концентрации 2 ммоль (рис. 1б). Однако на морфологию мицелия и спороношение выраженное воздействие проявлялось также при

1 ммоль Zn: рост происходил преимущественно глубинным образом, отдельные фрагменты поверхностного мицелия имели кожистую структуру, спороношение отсутствовало. В отличие от *Aspergillus niger*, в контроле и при низкой концентрации цинка динамика роста мицелия *Penicillium chrysogenum* имела фазу лизиса мицелия в стареющих культурах.

Кислотность среды в процессе роста грибов менялась по-разному у *Aspergillus niger* и *Penicillium chrysogenum*. *Aspergillus niger* сильно подкислял среду даже при минимальном росте мицелия (рис. 2а). Наименьшие показатели pH определялись в контроле. В варианте с *Penicillium chrysogenum* происходило защелачивание среды. Наименьшие показатели pH отмечались при самой высокой концентрации цинка 2 мкмоль (рис. 2б). В контроле и при концентрациях цинка 250–500 мкмоль значения pH среды, начиная с седьмых суток роста, находились в щелочной области (7.5–9).

Количество и состав органических кислот, продуцируемых грибами, сильно различались для двух видов (табл. 1). *Aspergillus niger* продуцировал щавелевую и лимонную кислоты. Лимонная кислота образовывалась преимущественно в контроле и преобладала по сравнению со щавелевой. В культурах с Zn, напротив, лимонная кислота выделялась в минимальных количествах (почти в 10 раз меньше, чем щавелевая). Соотношение свободной и связанной в нерастворимые соли щавелевой кислоты зависело от концентрации цинка в среде: с увеличением концентрации цинка доля связанного в нерастворимые соли оксалата увеличивалась.

В культуральной жидкости *Penicillium chrysogenum* содержалась щавелевая кислота, а также в следовых количествах лимонная, янтарная и яблочная кислоты. Вся щавелевая кислота находилась в связанной форме. Ее количество было более чем в 10 раз ниже, чем в культуральной жидкости *Aspergillus niger*. Оба вида грибов продуцировали в среду экстраклеточные полимерные соединения, осаждаемые спиртом (рис. 3). Следует отметить, что помимо органических полимеров, осаждаемый при центрифугировании осадок содержал продукты кристаллизации, находившиеся в культуральной жидкости. В целом количество ЭПС, продуцируемых *Penicillium chrysogenum*, было в 1.5–2 раза больше, чем у *Aspergillus niger*. ЭПС накапливались с возрастом культур. Цинк оказывал стимулирующее действие на накопление ЭПС в среде в концентрации 250–500 мкмоль у обоих штаммов, а у *Penicillium chrysogenum* также и при высоких концентрациях 1–2 ммоль. У *Aspergillus niger* абсолютное количество ЭПС при этих концентрациях цинка было меньше, чем в контроле, но количество ЭПС относительно биомассы мицелия, напротив, выше.

**Таблица 1.** Содержание шавелевой кислоты в культуральной жидкости грибов

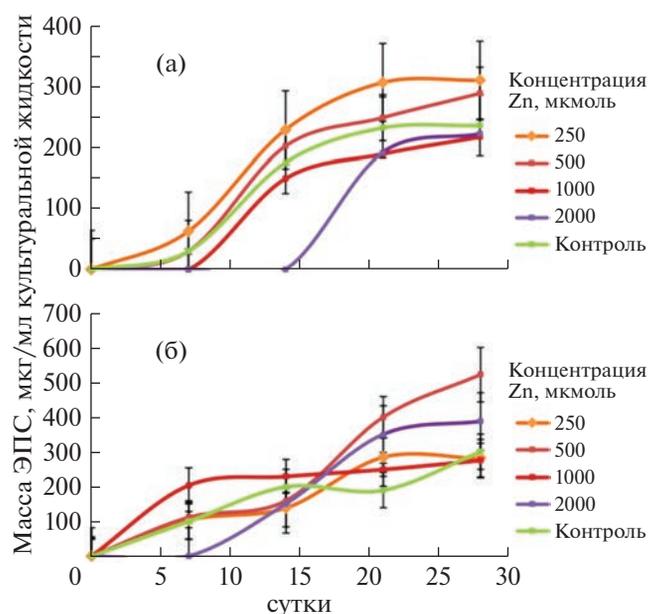
Сут	Форма содержания	Контроль	Zn 250 мкмоль	Zn 500 мкмоль	Zn 1 ммоль	Zn 2 ммоль
<i>Aspergillus niger</i>						
14	Шавелевая кислота, мкг/мл					
	растворимая	197 ± 20*	127 ± 22	155 ± 28	187 ± 34	—
	связанная	180 ± 35	344 ± 43	480 ± 47	640 ± 56	—
	Лимонная кислота, мкг/мл					
28	Шавелевая кислота, мкг/мл					
	растворимая	222 ± 36	204 ± 25	110 ± 18	155 ± 37	102 ± 8
	связанная	257 ± 29	388 ± 56	522 ± 28	720 ± 66	684 ± 73
	Лимонная кислота, мкг/мл					
	растворимая	449 ± 39	57 ± 18	52 ± 21	38 ± 7	—
<i>Penicillium chrysogenum</i>						
14	Шавелевая кислота, мкг/мл					
	растворимая	—	—	—	—	—
	связанная	64 ± 8	86 ± 22	104 ± 9	92 ± 11	—
28	Шавелевая кислота, мкг/мл					
	связанная	48 ± 8	72 ± 11	122 ± 86	108 ± 22	82 ± 13

Примечание. \*Среднее значение ± стандартное отклонение.

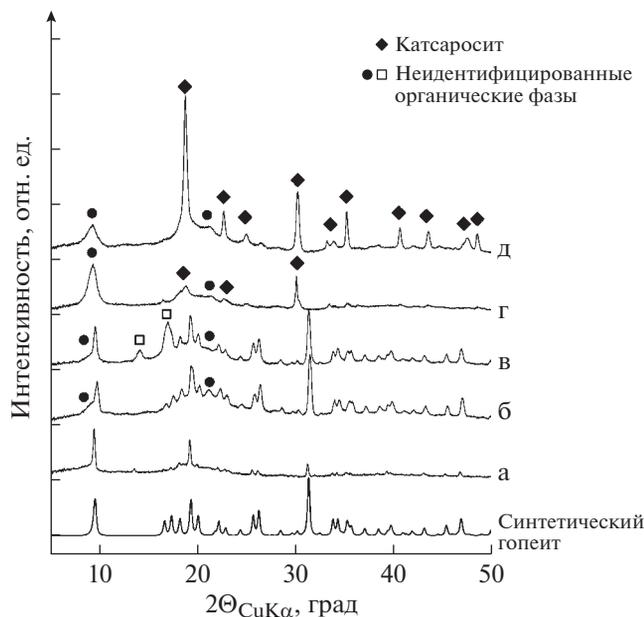
По данным рентгенофазового анализа (РФА) (рис. 4) и с помощью сканирующей электронной микроскопии (рис. 5), совмещенной с ЭДХ, установлено, что на гифах *A. niger* кристаллизуются двухводный оксалат цинка (аналог минерала катсаросита) при всех исходных концентрациях  $ZnSO_4$  в среде. С увеличением концентрации Zn в среде количество образовавшихся кристаллов и их сростков увеличивалось. Размеры сростков кристаллов оксалата цинка увеличивались от 50 до 200 мкм по мере увеличения содержания Zn в среде (рис. 5). При концентрации Zn 250 мкмоль наблюдались единичные сростки кристаллов оксалата цинка с изоморфной примесью Mg. В мицелии в контроле кристаллических структур обнаружено не было.

У *Penicillium chrysogenum* в мицелии методом РФА (рис. 4) был обнаружен четырехводный фосфат цинка (аналог минерала гопеита). При высокой концентрации Zn (2 ммоль) на гифах формировались мелкие глобулы гопеита в большом количестве и они образовывали чехлы (рис. 6, а, б), а также формировались сферолиты таблитчатых кристаллов размером от 10 до 25 мкм (рис. 6, в). При промежуточных концентрациях Zn 1 ммоль и 500 мкмоль в мицелии образовывался четырехводный фосфат цинка в виде глобул на мицелии (содержание цинка 500 мкмоль) и сферолиты таблитчатых кристаллов размером от 25 до 100 мкм (содержание цинка 1 ммоль). При низкой концентрации Zn 250 мкмоль в мицелии при помощи

РФА не было обнаружено кристаллических структур, а по данным СЭМ-анализа наблюдалось только небольшое количество мелких (размером 5–10 мкм) кристаллов, предположительно, двухводного оксалата цинка с изоморфной примесью Mg. По дан-



**Рис. 3.** Накопление ЭПС в культуральной жидкости микромицетов *Aspergillus niger* (а) и *Penicillium chrysogenum* (б).



**Рис. 4.** Рентгенограммы аналогов минералов, образовавшихся в мицелии *Penicillium chrysogenum* (а – 500 мкмоль Zn, б – 1 ммоль Zn, в – 2 ммоль Zn) и *Aspergillus niger* (г – 250 мкмоль, д – 1 ммоль). Не подписанные дифракционные пики на рентгенограммах а, б и в (*Penicillium chrysogenum*) принадлежат четырехводному фосфату цинка (аналогу минерала гопеита).

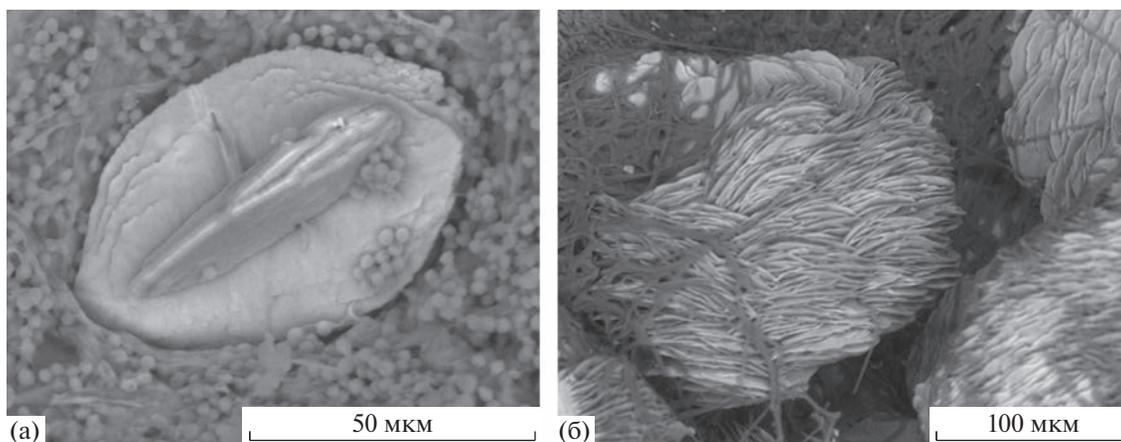
ным ЭДХА глобулы на гифах и сростки кристаллов состоят в основном из Р и Zn.

## ОБСУЖДЕНИЕ

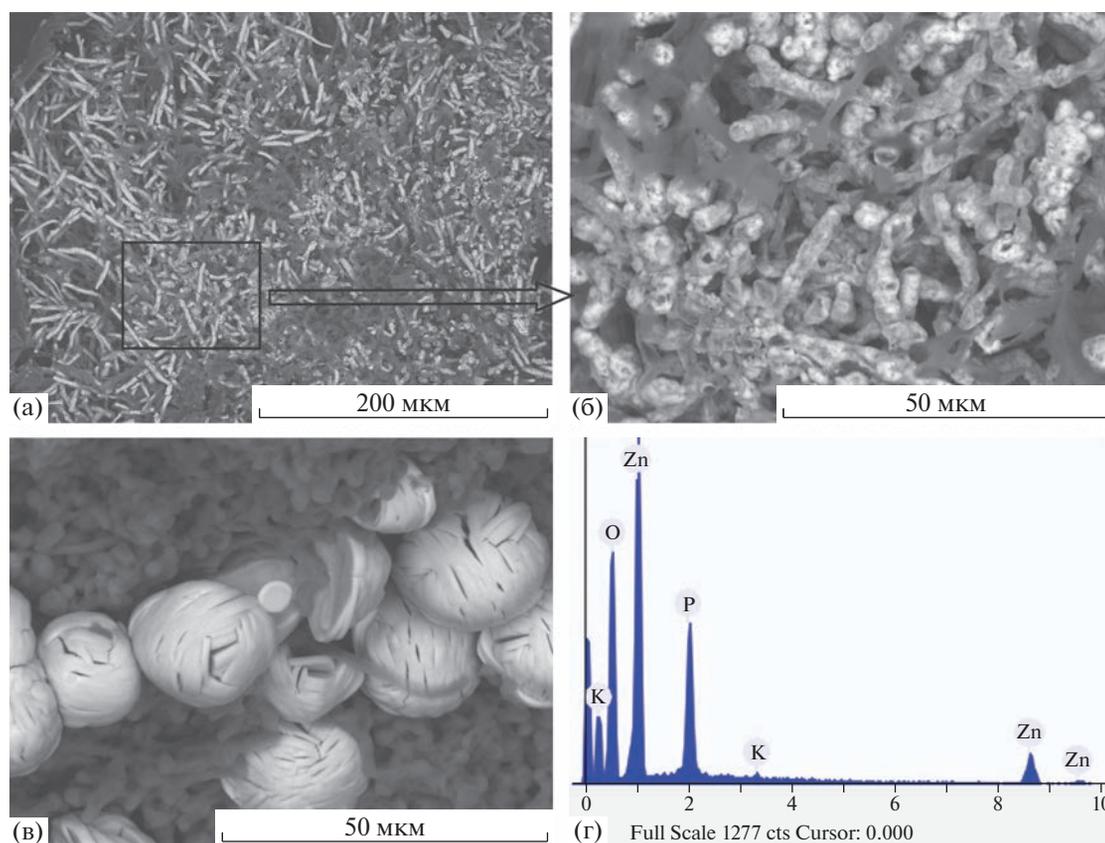
Полученные результаты показали, что оба вида грибов способны развиваться при концентрациях Zn в среде до 2 ммоль. В концентрациях 250–500 мкмоль Zn действует как физиологически необходимый микроэлемент, способствуя активно-

му росту и спороношению. При концентрациях более 500 мкмоль Zn подавляет рост мицелия и спороношение грибов, способствует изменению морфологии. Однако грибы реализуют физиологические механизмы, способствующие адаптации к цинку в высоких концентрациях. В культурах обоих видов грибов формируются минеральные кристаллические комплексы, включающие Zn. Продукты кристаллизации, содержащие цинк у *Aspergillus niger* и *Penicillium chrysogenum* различаются; соответственно физиологические механизмы уменьшения биодоступности катионов  $Zn^{2+}$  в среде у грибов не одинаковы.

Интенсивность продукции щавелевой кислоты, формирующей с цинком нерастворимые соли, у обоих видов возрастала под действием цинка во всех концентрациях. У *Aspergillus niger* под действием цинка также уменьшалось выделение лимонной кислоты, вероятно за счет большей потребности углерода для биосинтеза оксалата. Активирующее действие Zn на продукцию щавелевой кислоты подтверждено литературными данными (Fomina et al., 2005; Gadd, 2010), а также собственными исследованиями (Sazanova et al., 2015). У *Penicillium chrysogenum* 100% оксалата было связано в нерастворимые соли. В культуре же *Aspergillus niger* щавелевая кислота находилась в свободной и связанной формах. По мере увеличения концентрации Zn в среде количество связанной щавелевой кислоты увеличивалось, а свободной уменьшалось, что однозначно свидетельствует о ее роли в детоксикации избыточных количеств цинка. Оксалаты цинка были основной цинксодержащей кристаллической фазой, формирующейся под действием *A. niger* при всех концентрациях цинка в среде, что также указывает на первостепенную роль щавелевой кислоты в реализации механизмов детоксикации цинка.



**Рис. 5.** СЭМ-изображения сростков кристаллов двуводного оксалата цинка (катсаросита) на мицелии *Aspergillus niger*: а – содержание Zn 250 мкмоль; б – содержание Zn 2 ммоль.



**Рис. 6.** СЭМ-изображения четырехводного фосфата цинка (гопеита) на мицелии *Penicillium chrysogenum* при концентрации Zn в среде 2 ммоль: глобулы в виде трубочек (а, б), сростки кристаллов (в) и ЭДХ-спектр глобул на гифах и сростков кристаллов (г).

Продукция ЭПС, напротив, была значительно выше в культуре *Penicillium chrysogenum* по сравнению с *Aspergillus niger*. Образование ЭПС грибами так же, как и щавелевой кислоты, усиливалось под действием цинка, что согласуется с литературными данными (Balasubramanian et al., 2019). При высокой концентрации цинка содержание ЭПС в некоторых случаях было ниже, чем в контроле, что, очевидно, связано с малым количеством биомассы мицелия, продуцирующего ЭПС.

Кристаллическая фаза в составе мицелия *Penicillium chrysogenum* представляла собой четырехводный фосфат цинка (аналог минерала гопеита). Формирование фосфата цинка грибами ранее не было описано. В литературе имеются данные только об образовании грибами хлорфосфата свинца пироморфита (Rhee et al., 2012; Xu et al., 2020). Скорее всего, фосфатные группы, взаимодействующие с цинком, входят в состав ЭПС и полимеров клеточной стенки. Процессы связывания катионов металлов с ЭПС происходят исключительно в щелочной среде (Anbu et al., 2016; Martino et al., 2016; Zhu et al., 2016), поэтому также важно, что *P. chrysogenum* защелачивает среду в процессе роста. Фермент уреазы, продуцируемый *P. chrysogenum*, гидролизует мочевину, что приводит к защелачиванию среды (Mahapatra, Banerjee, 2013). Уреазная активность, вероятно, определяет и уменьшение биомассы *P. chrysogenum* на 28-е сут: накапливающийся в результате гидролиза мочевины аммиак способствует лизису мицелия (Hess et al., 2006) при pH от 6.8 до 8.2 (Santamaria et al., 1988).

Таким образом, оба вида грибов продуцируют щавелевую кислоту, связывающую цинк в нерастворимые соли, и ЭПС, выполняющие роль сорбента свободных катионов с уменьшением содержания цинка в среде. Количественно *P. chrysogenum* продуцирует существенно больше ЭПС, *Aspergillus niger*, напротив, продуцирует значительно больше щавелевой кислоты по сравнению с *Penicillium chrysogenum*. В литературе имеются доказательства, что образование кислот грибами способствует растворению фосфата цинка (Fomina et al., 2004). Таким образом, избыток щавелевой кислоты препятствует образованию гопеита в культуре *Aspergillus niger*.

Образование оксалатов металлов, включая цинк, описано для некоторых видов грибов (Fomina et al., 2005; Munir et al., 2005; Chandran et al., 2014; Gadd et al., 2014; Abbas et al., 2014; Sutjaritvor-

akul et al., 2015; Sazanova et al., 2015; Vlasov, 2020). *A. niger* образует сростки оксалата цинка как при культивировании на среде с добавлением солей Zn, так и при росте на цинк-содержащих минералах (Vlasov et al., 2020). Тем не менее, до настоящего времени эффективность грибов *A. niger* для удаления из среды катионов токсичных металлов связывалась именно со способом адсорбции биомассой (Mukhopadhyay et al., 2011).

*Penicillium chrysogenum* активно образует оксалат кальция при наличии карбоната кальция в среде (Sazanova et al., 2023). Также некоторые виды рода *Penicillium* могут образовывать оксалаты свинца, меди, кадмия, кобальта (Glukhova et al., 2018; Xu et al., 2020). В настоящем исследовании методом РФА не выявлено оксалатов цинка в мицелии *P. chrysogenum* ни при одной из выбранных концентраций цинка, несмотря на то, что гриб продуцировал в среду щавелевую кислоту. Так как вся щавелевая кислота находилась в форме нерастворимых солей, скорее всего, оксалат цинка вместе с оксалатом магния все же присутствуют в виде взвеси или осадка в культуральной жидкости. В мицелии же оксалаты являются минорной фазой и количественно существенно уступают фосфату цинка.

Как и *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* рассматривался ранее для использования в целях биоремедиации благодаря адсорбции металлов полимерами клеточной стенки (Tan et al., 2003). При этом авторы указывали на ключевую роль щелочных условий среды для реализации данного процесса. Основными сайтами хелатирования металлов являются аминогруппы хитозана в мицелии (Tan et al., 2003). Образование фосфата цинка гопеита грибом *P. chrysogenum* установлено нами впервые. Гопеит, как и фосфаты некоторых других металлов, имеет низкую растворимость ( $K_{sp} = 10-35.5$ ), что указывает на потенциал его применения для восстановления почвы (Cotter-Howells, Caporn 1996).

Хотя штаммы *Aspergillus niger* Ch 4/07 и *Penicillium chrysogenum* Cs/21 были изолированы с поверхности мрамора и бронзы соответственно, эти виды являются обычными сапротрофами почв и растительных субстратов. Споры этих грибов легко переносятся ветром. В случае достаточного количества питательных веществ их рост возможен на самых различных субстратах (Salvadori, Muncicchia, 2015).

Полученные данные показали, что оба вида грибов обладают способностью переводить Zn в нерастворимые формы, уменьшающие его биодоступность и токсичность. Именно этот способ детоксикации может рассматриваться как наиболее эффективный для очистки почв или других твердых минеральных субстратов. Перевод металлов в нерастворимую минеральную фазу путем их связывания в минералы оксалаты и фосфаты может

быть использовано в дальнейшем для целей биоремедиации.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-00031 “Грибы и бактерии в биогеохимических циклах: трофические и аллелопатические взаимодействия, роль в детоксикации металлов”).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abbas S.H., Ismail I.M., Mostafa T.M. et al. Biosorption of heavy metals: A review. J. Chemical Sci. Technol. 2014. V. 3 (4). P. 74–102.
- Achal V., Pan X., Zhang D. Remediation of copper-contaminated soil by *Kocuria flava* CR1, based on microbially induced calcite precipitation. Ecological Engineering. 2011. V. 37 (10). P. 1601–1605. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.06.008>
- Anbu P., Kang C.H., Shin Y.J. et al. Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. Springerplus. 2016. V. 5 (250). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1869-2>
- Ashikhmina T.Ya. (ed.). Microorganisms as agents of bio-monitoring and bioremediation of polluted soils. Kirov, 2018 (in Russ.).
- Balasubramanian B., Ilavenil S., Al-Dhabi N.A. et al. Isolation and characterization of *Aspergillus* sp. for the production of extracellular polysaccharides by response surface methodology. Saudi J. Biol. Sci. 2019. V. 26 (3). P. 449–454. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.10.015>
- Chandran S.C., Shijith K.V., Vipin K.V. et al. Study on heavy metals toxicity biomarkers in *Aspergillus niger*. IJAPBC. 2014. V. 3. P. 458–464.
- Cotter-Howells J.D., Caporn S. Remediation of contaminated land by formation of heavy metal phosphates. Appl. Geochem. 1996. V. 11. P. 335–342.
- De Beeck M.O., Persson P., Tunlid A. Fungal extracellular polymeric substance matrices – Highly specialized microenvironments that allow fungi to control soil organic matter decomposition reactions. Soil Biol. Biochem. 2021. V. 159. Art. 108304. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108304>
- Dhankhar R., Hooda A. Fungal biosorption – an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. Environ. Technol. 2011. V. 32. P. 467–491.
- Fomina M., Alexander I.J., Hillier S. et al. Zinc phosphate and pyromorphite solubilization by soil-plant-symbiotic fungi. Geomicrobiology J. 2004. V. 21. P. 351–366. <https://doi.org/10.1080/01490450490462066>
- Fomina M., Hillier S., Charnock J.M. et al. Role of oxalic acid overexcretion in transformations of toxic metal minerals by *Beauveria caledonica*. Appl. Environm. Microbiol. 2005. V. 71 (1). P. 371–381.
- Gadd G.M. Geomycology: Biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. Mycol. Res. 2007. V. 111. P. 3–49.
- Gadd G.M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. Microbiology. 2010. V. 156. P. 609–643.

- Gadd G.M., Bahri-Esfahani J., Li Q. et al. Oxalate production by fungi: significance in geomycology, biodeterioration and bioremediation. *Fungal Biol. Rev.* 2014. V. 28. P. 36–55.
- Glukhova L.B., Frank Y.A., Danilova E.V. et al. Isolation, characterization, and metal response of novel, acid-tolerant *Penicillium* spp. from extremely metal-rich waters at a mining site in Transbaikal (Siberia, Russia). *Microbial Ecol.* 2018. V. 76. P. 911–924. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1186-0>
- Hess C.D., Lu W., Rabinowitz D.J. et al. Ammonium toxicity and potassium limitation in yeast. *PLOS Biol.* 2006. V. 4 (11). P. 2012–2023.
- Kampa M., Castanas E. Human health effects of air pollution. *Environ. Pollut.* 2008. V. 151. P. 362–367.
- Kim Y., Kwon S., Roh Y. Effect of divalent cations (Cu, Zn, Pb, Cd, and Sr) on microbially induced calcium carbonate precipitation and mineralogical properties. *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. Art. 646748. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.646748>
- Leitão A.L. Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. *Int. J. Environm. Res. Public Health.* 2009. V. 6. P. 1393–1417. <https://doi.org/10.3390/ijerph6041393>
- Li Q., Gadd G.M. Fungal nanoscale metal carbonates and production of electrochemical materials. *Microbial Biotechnol.* 2017. V. 10 (5). P. 1131–1136. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12765>
- Mahapatra S., Banerjee D. Fungal exopolysaccharide: Production, composition and applications. *Microbiol. Insights.* 2013. V. 6. 1MBI-S10957.
- Martino P.D. What about biofilms on the surface of stone monuments? The Open Conference Proceedings J. 2016. V. 9. P. 14–28. <https://doi.org/10.2174/2210289201607020014>
- Mukhopadhyay M., Noronha S.B., Suraishkumar G.K. A review on experimental studies of biosorption of heavy metals by *Aspergillus niger*. *Can. J. Chem. Eng.* 2011. V. 89. P. 889–900.
- Mukhopadhyay M., Noronha S.B., Suraishkumar G.K. A review on experimental studies of biosorption of heavy metals by *Aspergillus niger*. *Can. J. Chem. Eng.* 2011. 89. P. 889–900.
- Munir E., Hattori T., Shimada M. Role for oxalate acid biosynthesis in growth of copper tolerant wood-rotting and pathogenic fungi under environmental stress. The 55th meeting of the Japan wood research society. Tokyo, 2005, pp. 1–7.
- Pacyna J.M., Pacyna E.G. An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide. *Environ. Rev.* 2001. V. 9 (4). P. 269–298.
- Rehan M., Alsohim A.S. Bioremediation of heavy metals, environmental chemistry and recent pollution control approaches. *IntechOpen.* 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88339>
- Rhee Y.J., Hillier S., Gadd G.M. Lead transformation to pyromorphite by fungi. *Current Biol.* 2012. V. 22. P. 237–241. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.12.017>
- Santamaria F., Reyes F. Proteases produced during autolysis of filamentous fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 1988. V. 91. P. 217–220.
- Salvadori O., Municchia A.C. The role of fungi and lichens in the biodeterioration of stone monuments. The Open Conference Proceeding J. 2015. № 6 (Suppl 1: M 4). P. 70–82. <https://doi.org/10.2174/2210289201607020039>
- Sayer J.A., Gadd G.M. Binding of cobalt and zinc by organic acids and culture filtrates of *Aspergillus niger* grown in the absence or presence of insoluble cobalt or zinc phosphate. *Mycol. Res.* 2001. V. 105. P. 1261–1267.
- Sazanova (nee Barinova) K.V., Frank-Kamenetskaya O.V., Vlasov D.Y. et al. Carbonate and oxalate crystallization by interaction of calcite marble with *Bacillus subtilis* and *Bacillus subtilis* – *Aspergillus niger* association. *Crystals.* 2020. V. 10. P. 756. <https://doi.org/10.3390/cryst10090756>
- Sazanova K., Osmolovskaya N., Schiparev S. et al. Organic acids induce tolerance to zinc- and copper-exposed fungi under various growth conditions. *Current Microbiol.* 2015. 70 (4). P. 520–527. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0751-0>
- Sazanova K.V., Zelenskaya M.S., Izatulina A.R. et al. Carbonate and oxalate crystallization effected by the metabolism of fungi and bacteria in various trophic conditions: The case of *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium chrysogenum* with *Bacillus subtilis*. *Crystals.* 2023. V. 13. P. 94. <https://doi.org/10.3390/cryst13010094>
- Siddiquee S., Rovina K., Al Azad S. Heavy metal contaminants removal from wastewater using the potential filamentous fungi biomass: A review. *J. Microb. Biochem. Technol.* 2015. V. 7. P. 384–393.
- Sujaritvorakul T., Gadd G.M., Whalley A. et al. Zinc oxalate crystal formation by *Aspergillus nomius*. *Geomicrobiology.* 2015. V. 33 (3). <https://doi.org/10.1080/01490451.2015.1048395>
- Tan T., Che P. Biosorption of metal ions with *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2003. V. 104. P. 119–128.
- Tian D., Jiang Z., Jiang L. et al. A new insight into lead (II) tolerance of environmental fungi based on a study of *Aspergillus niger* and *Penicillium oxalicum*. *Environ. Microbiol.* 2019. V. 21. P. 471–479.
- Vlasov D.Yu. (ed.). *Aspergillus niger*. N.Y., 2020.
- Xu X., Hao R., Xu H. et al. Removal mechanism of Pb (II) by *Penicillium polonicum*: immobilization, adsorption, and bioaccumulation. *Scientific Reports.* 2020. V. 10. Art. 9079. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66025-6>
- Zhao J., Csetenyi L., Gadd G.M. Fungal-induced CaCO<sub>3</sub> and SrCO<sub>3</sub> precipitation: a potential strategy for bioprotection of concrete. *Sci Total Environm.* 2022. V. 816. Art. 151501. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151501>
- Zhu T., Dittrich M. Carbonate precipitation through microbial activities in natural environment, and their potential in biotechnology: A review. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2016. V. 4 (4). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00004>
- Ашихмина Т.Я. (ред.) (Asikhmina) Микроорганизмы как агенты биомониторинга и биоремедиации загрязненных почв. Киров, Науч. изд-во ВятГУ, 2018. 256 с.

**Extracellular Zn Detoxication by *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus niger*****K. V. Sazanova<sup>a,b,c,#</sup>, M. S. Zelenskaya<sup>b,##</sup>, A. V. Korneev<sup>b,###</sup>, and D. Yu. Vlasov<sup>a,b,####</sup>**<sup>a</sup>*Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Science, 197376 St. Petersburg, Russia*<sup>b</sup>*St. Petersburg State University, 199034 St. Petersburg, Russia*<sup>c</sup>*Archive of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg Branch, 196084 St. Petersburg, Russia*<sup>#</sup>*e-mail: ksazanova@binran.ru*<sup>##</sup>*e-mail: marsz@yandex.ru*<sup>###</sup>*e-mail: a\_v\_korneev@list.ru*<sup>####</sup>*e-mail: dmitry.vlasov@mail.ru*

Microfungi are promising objects for bioremediation due to their ability to convert metals into forms that are less mobile and accessible to organisms. The study showed that the fungi *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus niger* have physiological mechanisms of extracellular Zn detoxification at its initial concentration of 250  $\mu\text{mol}$  – 2 mmol in the medium. At concentrations of 250–500  $\mu\text{mol}$  Zn promotes the accumulation of biomass and abundant sporulation of *A. niger* and *Penicillium chrysogenum*, and at concentrations of 1–2 mmol inhibits the growth of fungi. Extracellular Zn detoxification in *Aspergillus niger* culture occurs by the formation of dihydrate zinc oxalate katsarosite, due to the active biosynthesis of oxalic acid in *A. niger*. The main mechanism of zinc detoxification in *Penicillium chrysogenum* culture was the formation of zinc phosphate hopeite. The formation of zinc phosphate hopeite under the action of the fungus was established for the first time. The key factors that determine the direction of the processes of formation of extracellular mineral phases are the amounts of EPS and oxalic acid produced by fungi, as well as changes in the pH of the medium during the growth of cultures.

**Keywords:** bioremediation, detoxification, extracellular polymer matrix, heavy metals, organic acids, oxalates