

УДК 579.222

## ДЕГРАДАЦИЯ ЭДТА И ЕГО КОМПЛЕКСОВ С МЕТАЛЛАМИ ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ БАКТЕРИЙ

### *Chelativorans oligotrophicus* LPM-4

© 2012 г. Т. Н. Кувичкина, Е. Н. Капаруллина, Н. В. Доронина, Ю. А. Троценко, А. Н. Решетилов

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН

Пушино, Московская область, 142290, e-mail: kuv@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 28.11.2011 г.

Рассмотрена ферментативная окислительная деградация ЭДТА и его комплексов с металлами, осуществляемая иммобилизованными клетками облигатного деструктора *Chelativorans oligotrophicus* LPM-4. Полярографическим методом зарегистрировано потребление кислорода клетками. Впервые показано, что комплексы Cd-ЭДТА и Ni-ЭДТА подвергаются деградации изучаемыми бактериями.

Этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) является хелатирующим агентом группы аминокислотных кислот. Благодаря способности образовывать стабильные водорастворимые комплексы (хелаты) с ионами двух- и трехвалентных металлов ЭДТА широко применяется в промышленных процессах для удаления ионов металлов [1, 2]. Он используется в производстве бытовой химии, в том числе синтетических моющих средств, в виде стабилизатора в процессах полимеризации, при производстве каучука [3]. В сельском хозяйстве ЭДТА используется как стимулятор фиторемедиации почв, так как способствует десорбции тяжелых металлов (медь, цинк, кадмий) из почвы. ЭДТА переводит их в растворимую форму и делает доступными для поглощения растениями [3]. Промышленное производство ЭДТА начато в Германии в 1939 г. В 2000 г. суммарное производство ЭДТА достигло 200000 т. Показано, что до 80% потребленного ЭДТА поступает в окружающую среду [3]. В настоящее время ЭДТА считается одним из наиболее распространенных антропогенных загрязнителей в мире [4]. Известно, что накопление ЭДТА в грунтовых водах приводит к ухудшению качества питьевой воды, а также переводу в растворенное состояние ионов тяжелых и токсичных металлов [3].

Известны два способа разрушения ЭДТА: физико-химический и микробиологический. Физико-химический способ представляет собой фотохимическое разложение комплекса Fe(III)-ЭДТА под воздействием ультрафиолета на поверхности естественных водоемов [5]. Этот процесс зависит от климатических условий, освещенности, сезона и не может рассматриваться, как существенный фактор разрушения ЭДТА в природе [6]. Микробиологический способ разрушения ЭДТА происходит под действием микроорганизмов-деструк-

торов. В результате исследований, ведущихся более 40 лет, выделено лишь несколько чистых культур бактерий-деструкторов ЭДТА [7–11]. Из очистных сооружений г. Пушино выделен новый штамм бактерий, разлагающих ЭДТА (LPM-4). Штамм является облигатным деструктором, обладающим специфической потребностью в ЭДТА как единственном источнике углерода, азота и энергии [12]. На основании хемо- и генотаксономических данных штамм отнесен к группе  $\alpha$ -Proteobacteria, к новому роду и виду *Chelativorans oligotrophicus* LPM-4 (VKMB2395<sup>T</sup> = DSM19276<sup>T</sup>) [11]. Известно, что у факультативного деструктора *Chelativorans multitrophicus* DSM 9103 первый этап деградации ЭДТА катализирует ЭДТА-монооксигеназа, которая окисляет ЭДТА до этилендиаминтриацетата (ЭДЗА) и глиоксилата с потреблением молекулярного кислорода [8, 10]. Ферментативные и полярографические исследования, а также анализ продуктов разложения показали, что у облигатного деструктора *C. oligotrophicus* LPM-4 первый этап разложения ЭДТА катализирует ЭДТА-монооксигеназа, подобная той, которая обнаружена ранее у факультативного деструктора *C. multitrophicus* DSM 9103 [8, 13].

Цель работы – изучение ферментативной окислительной деградации ЭДТА и его комплексов с металлами иммобилизованными клетками облигатного деструктора *Chelativorans oligotrophicus* LPM-4 полярографическим методом, позволяющим регистрировать потребление кислорода клетками.

#### МЕТОДИКА

**Материалы и реактивы.** В качестве источника углерода, азота и энергии и использовали ЭДТА (ч.д.а. “ДиаЭМ”, Германия). Соли для пригото-

ления питательной среды и для приготовления комплексов металлов с ЭДТА были аналитической чистоты (“Реахим”, Россия). Агаризованные среды готовили с бакто-агаром Type USA (“Difco”, США). Для определения субстратной специфичности использовали реактивы производства фирмы “Sigma” (США).

**Объект исследования.** В работе использовали штамм *Chelativorans oligotrophicus* LPM-4 облигатный деструктор ЭДТА, выделенный в лаборатории физиологии микроорганизмов ИБФМ РАН из активного ила городских очистных сооружений г. Пущино [11].

**Среды и условия культивирования.** Культуру поддерживали на минеральной агаризованной (2%) среде следующего состава (г/л):  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 1.0,  $KH_2PO_4$  – 0.26,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  – 0.40,  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  – 0.83,  $Na_2EDTA$  – 1.0. Микроэлементы (мг/л):  $FeCl_3 \cdot 4H_2O$  – 1.5,  $H_3BO_3$  – 0.06,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  – 0.1,  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$  – 0.12,  $ZnCl_2$  – 0.07,  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$  – 0.025,  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  – 0.015,  $Na_2MoCl_4$  – 0.025. Использовали смесь следующих витаминов (мг/л): пиридоксин·HCl – 0.1, тиамин·HCl – 0.05, рибофлавин – 0.05, никотиновая кислота – 0.05, кальций пантотенат – 0.05, Р – аминобензойная кислота – 0.05, липоевая кислота – 0.05, никотинамид – 0.05, витамин  $B_{12}$  – 0.05, биотин – 0.02, фолиевая кислота – 0.02. Витамины и микроэлементы готовили в виде концентрированных стерильных растворов и добавляли в среду перед посевом в количестве 1 и 2 мл/л соответственно (начальное значение pH составляло 7.0).

Музейную культуру штамма *C. oligotrophicus* LPM-4 пересевали на скошенный ЭДТА-агар и выдерживали в термостате при 28°C в течение 5 сут. Смыв со свежей культуры в количестве 1–2 мл переносили в стерильные колбы Эрленмейера объемом 750 мл со 100 мл среды. Для выращивания биомассы использовали жидкую среду того же состава. Периодическое культивирование бактерий проводили на качалке 150 об/мин при 28°C в течение 5–7 сут.

Биомассу (конец экспоненциальной фазы роста) отделяли центрифугированием при 5000 g в течение 30 мин, +4°C, ресуспензировали в 60 мл свежей среды с ЭДТА. Клеточную суспензию хранили в холодильнике при +4°C.

**Иммобилизация клеток.** Для иммобилизации аликвоту клеточной суспензии центрифугировали при 10000 g в течение 3 мин при комнатной температуре. Клетки отмывали дважды 30 мМ НЕРЕС-буфером, pH 7.4. Иммобилизацию клеток *C. oligotrophicus* LPM-4 осуществляли методом физической адсорбции. Для этого клеточную суспензию, содержащую 10 мкл НЕРЕС-буфера (pH 7.4) с 2 мг сырой биомассы, наносили на полосу хроматографической стеклобумаги (“What-

man GF/A”, Великобритания), формируя пятно диаметром 3 мм. Пятно подсушивали при комнатной температуре в течение 20 мин. Подготовленный распознающий элемент (биорецептор) на основе иммобилизованных клеток (ИМК) *C. oligotrophicus* LPM-4 фиксировали на измерительной поверхности кислородного электрода типа Кларка (“Кронас”, Россия) с помощью нейлоновой сетки.

**Условия измерений.** Измерения проводили в 30 мМ НЕРЕС-буфере (pH 7.4), насыщенном кислородом, при 30–32°C в открытой кювете объемом 2 мл с помощью потенциостата IPC-Micro (“Кронас” (Россия)). Для управления прибором и регистрации измерений использовался персональный компьютер, присоединенный через стандартное последовательное подключение RS-232. Потенциостат IPC-Micro управлялся программой, позволяющей регистрировать отклик распознающего элемента. Регистрируемым параметром являлась максимальная скорость изменения выходного сигнала  $dI/dt$  (нА/с), связанная пропорциональной зависимостью со скоростью изменения концентрации потребленного кислорода (отклик). Для обработки полученных результатов использовали компьютерную программу для нелинейной регрессии (Программа Sigma Plot 11). Объем пробы субстрата – 100 мкл. Время отклика не превышало  $30 \pm 10$  с, время регенерации составляло 300 с. Длительность однократного измерения – 6–8 мин.

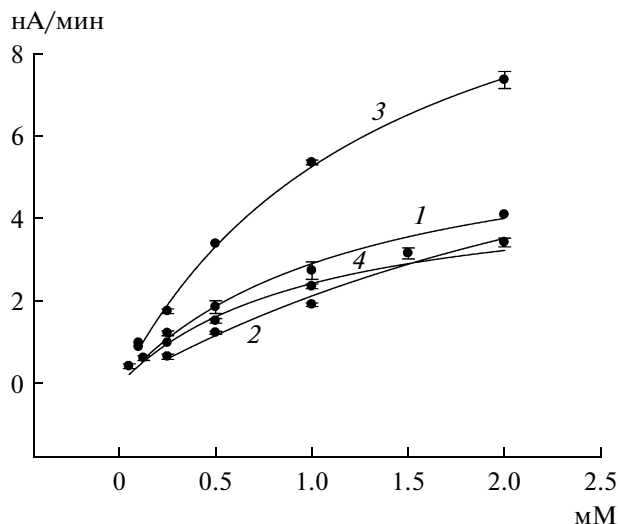
**Приготовление комплексов ЭДТА с металлами.** Водные растворы комплексов ЭДТА с металлами (Me-ЭДТА) готовили, смешивая эквимольные концентрации водных растворов ЭДТА и соответствующей соли металла за 24 ч до начала эксперимента. Использовали 40 мМ стоковые растворы.

**Построение зависимостей отклика распознающего элемента от значений pH.** Для измерения pH-зависимости использовали 30 мМ НЕРЕС-буфер, со значениями pH 6.8, 7.2, 7.4, 7.8, 8.2. В качестве субстрата использовали 2 мМ Mg-ЭДТА. Все исследования проверялись в трех повторностях. Вариация данных не превышала 5%.

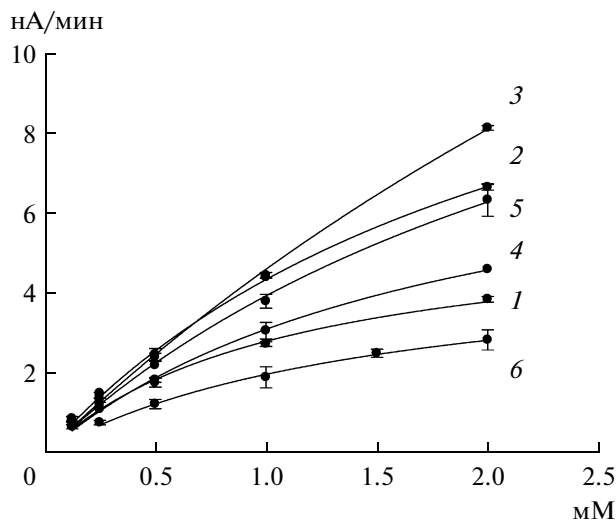
**Построение зависимостей отклика распознающего элемента от концентрации NaCl.** Для исследования зависимости откликов распознающего элемента от ионной силы буферного раствора использовали концентрации растворов NaCl в диапазоне 30–200 мМ. pH полученных растворов доводили до 7.4. В качестве субстрата использовали 2 мМ Mg-ЭДТА.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях эксперимента были использованы нерастущие культуры, для которых следует ожидать стабильные стехиометрические соотноше-

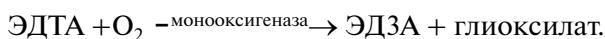


**Рис. 1.** Градуировочные кривые зависимости откликов распознающего элемента на основе ИмК штамма *C. oligotrophicus* LPM-4 от концентрации субстратов ЭДТА (1) и комплексов ЭДТА с элементами главной подгруппы II группы Ba-ЭДТА(2), Mg-ЭДТА (3), Ca-ЭДТА (4).



**Рис. 2.** Градуировочные кривые зависимости откликов распознающего элемента на основе ИмК штамма *C. oligotrophicus* LPM-4 от концентрации комплексов ЭДТА с ионами металлов переходных элементов Mn-ЭДТА (1), Co-ЭДТА (2), Cd-ЭДТА (3), Zn-ЭДТА (4), Ni-ЭДТА (5), Cu-ЭДТА (6).

ния между количеством потребленного кислорода и ЭДТА:



Кинетические константы скорости потребления кислорода и деградации ЭДТА идентичны. Максимальные скорости обоих процессов взаимно пропорциональны. Сравнение значений скорости потребления кислорода является обоснованным для подобного параметра деградации ЭДТА. Для изучения влияния концентраций Me-ЭДТА на потребление кислорода ИмК концентрации субстратов варьировали от 0.125 до 2.000 мМ. На рис. 1 представлены градуировочные кривые зависимости отклика от концентрации ЭДТА (1) и комплексов ЭДТА с ионами металлов главной подгруппы II группы периодической системы элементов ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ) Ba-ЭДТА (2), Mg-ЭДТА (3), Ca-ЭДТА (4). На рис. 2 приведены градуировочные кривые зависимости для комплексов ЭДТА с ионами металлов переходных элементов Mn-ЭДТА (1), Co-ЭДТА (2), Cd-ЭДТА (3), Zn-ЭДТА (4), Ni-ЭДТА (5), Cu-ЭДТА (6). Для всех изученных субстратов скорость деградации ЭДТА росла по мере повышения концентрации ЭДТА. В случае *C. oligotrophicus* LPM-4 показано, что комплексы Co-ЭДТА и Cu-ЭДТА подвергались разложению (рис. 2, кривые 2, 6). Кроме того, показано, что комплексы Cd-ЭДТА и Ni-ЭДТА также подвергались деградации, хотя в имеющейся литературе отсутствуют сведения о биодеградации названных комплексов бактериями [14].

Известно, что ферментный комплекс ЭДТА-монооксигеназа факультативных деструкторов ЭДТА состоит из двух субъединиц [8, 10]. Это дает основание предполагать, что при окислении возможно наблюдение кооперативного эффекта. Однако в условиях нашего эксперимента коэффициент Хилла (h) был близок к единице, что свидетельствовало об отсутствии кооперативного эффекта. Используя кривые субстратной зависимости (градуировочная зависимость) и компьютерную программу для нелинейной регрессии, вычислили значения максимальной скорости потребления кислорода ИмК ( $V_{\text{макс}}$ ) и кажущиеся константы сродства к субстрату ( $K_{\text{M(каж)}}$ ) для ЭДТА и его комплексов с ионами металлов по уравнению Михаэлиса-Ментен (рис. 1, 2).

$$v = V_{\text{макс}} / (1 + K_{\text{M(каж)}} / C),$$

где  $C$  – концентрация ЭДТА-субстрата, мМ.

Среди комплексов ЭДТА с ионами металлов главной подгруппы II группы периодической системы элементов ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ) самую высокую скорость деградации наблюдали для Mg-ЭДТА. Эти данные согласуются с результатами, полученными для этого же облигатного деструктора как в опыте с отмытыми клетками [14], и с данными, полученными с использованием биосенсорной методики для ИмК факультативного деструктора *C. multitrophicus* DSM 9103 [13]. Сравнение максимальных скоростей потребления кислорода ( $V_{\text{макс}}$ ) у факультативного [14] и облигатного деструкторов (таблица) показало, что облигатный деструктор характеризовался более высокой ско-

Кинетические константы штамма *Chelativorans oligotrophicus* LPM-4 в процессе разложения ЭДТА-содержащих субстратов

ЭДТА-содержащий субстрат	Максимальная скорость потребления кислорода ( $V_{\text{макс}}$ ), нА/мин	Кажущаяся константа сродства к субстрату ( $K_{\text{M(каж)}}$ ), мМ	Чувствительность, нА мМ/мин
ЭДТА	6.43 ± 0.39	1.20 ± 0.14	4.33
Ba-ЭДТА	10.43 ± 0.02	3.88 ± 0.01	2.38
Mg-ЭДТА	12.48 ± 0.45	1.37 ± 0.09	7.82
Ca-ЭДТА	4.79 ± 0.04	1.03 ± 0.02	4.39
Mn-ЭДТА	5.85 ± 0.26	1.09 ± 0.09	4.25
Co-ЭДТА	14.35 ± 0.64	2.30 ± 0.16	5.56
Cd-ЭДТА	33.89 ± 4.80	6.37 ± 1.14	5.11
Zn-ЭДТА	8.76 ± 0.43	1.83 ± 0.15	4.16
Ni-ЭДТА	15.56 ± 1.93	2.95 ± 0.55	4.82
Cu-ЭДТА	4.96 ± 0.52	1.51 ± 0.30	2.39

ростью потребления кислорода и, следовательно, большей скоростью деградации ЭДТА и его комплексов с ионами  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ .

Оценку субстратной специфичности распознающего элемента на основе штамма *C. oligotrophicus* LPM-4 провели по следующим 7 субстратам: Mg-ЭДТА и промежуточным продуктам деградации ЭДТА (N,N'-этилендиаминдиацетат, иминодиацетат, глиоксилат), ацетат натрия, кроме этого использовали глюкозу и пировиноградную кислоту. ИмК давали отклики на Mg-ЭДТА, N,N'-этилендиаминдиацетат, иминодиацетат, глиоксилат, а также пировиноградную кислоту. На глюкозу и ацетат натрия откликов с поглощением кислорода не наблюдали.

Изучена зависимость ответов распознающего элемента от ионной силы в диапазоне от 30 до 200 мМ концентрации NaCl. Зависимость носила монотонно убывающий характер. Максимальные отклики наблюдались в области 30 мМ раствора NaCl.

Значение pH среды является одним из факторов, влияющих на активность клеточных ферментов распознающего элемента. Для измерения pH-зависимости использовали 30 мМ HEPES-буфер в диапазоне значений pH 6.8–8.2. Максимальный отклик ИмК *C. oligotrophicus* LPM-4 наблюдался при pH 7.4.

Данное исследование, проведенное с ИмК *C. oligotrophicus* LPM-4 при помощи полярографического метода, позволило получить новые результаты по сравнению с ранее известным методом изучения деградации ЭДТА этим штаммом [14]. Нами впервые показано, что комплексы Cd-

ЭДТА и Ni-ЭДТА подвергаются деградации бактериальным штаммом *C. oligotrophicus* LPM-4. Использованный способ основан на работе с ИмК и представлял собой, по сути, модель биосенсора. В этой связи отметим, что данную систему можно рассматривать и в применении к решению биосенсорных задач, например, для определения ЭДТА и комплексов ЭДТА с металлами в исследовательских лабораториях.

Исследование было частично поддержано грантами Программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 годы ГК № 16.740.11.0020 и “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы”, ГК 16.512.11.2126.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Egli T., Weilenmann H.U., El-Banna T., Auling G. // Syst. Appl. Microbiol. 1988. V. 10. № 2. P. 297–305.
2. Weilenmann H.U., Engeli B., Bucheli-Witshel M., Egli T. // Biodegradation. 2004. V. 15. № 5. P. 289–301.
3. Дедюхина Э.Г., Чистякова Т.И., Минкевич И.Г. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии. 2007. № 2. С. 40–49.
4. Дедюхина Э.Г., Салмов Н., Чистякова Т.И., Минкевич И.Г., Вайнштейн М.Б. // Вода: химия и экология. 2008. № 2. С. 31–34.
5. Bucheli-Witshel M., Egli T. // FEMS Microbiol. Rev. 2001. V. 25. № 1. P. 69–106.
6. Wolf K., Gilbert P.A., Hatzinger O. // The handbook of Environmental Chemistry. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1992. V. 3. P. 243–259.

7. Noertemann B. // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. № 2. P. 671–676.
8. Witschel M., Nagel S., Egli T. // J. Bacteriol. 1997. V. 179. № 22. P. 6937–6943.
9. Сатрутдинов А.Д., Дедюхина Э.Г., Чистякова Т.И., Минкевич И.Г., Ерошин В.К. // Микробиология. 2003. Т. 72. № 1. С. 97–102.
10. Chistyakova T.I., Belikova V.L., Satroutdinov A.D., Dedyukhina E.G., Eroshin V.K. // Word J. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 19. № 6. P. 977–980.
11. Doronina N.V., Kaparullina E.N., Trotsenko Y.A., Noertemann B., Bucheli-Witschei M., Weilenmann H.-U., Egli T. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. № 5. P. 1044–1051.
12. Noertemann B. // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. № 2. P. 671–676.
13. Eroshin V.K., Satroutdinov A.D., Minkevich I.G., Dedyukhina E.G., Chistyakova T.I., Reshetilov A.N. // Proc. Biochem. 2002. V. 38. № 2. P. 151–154.
14. Сатрутдинов А.Д., Чистякова Т.И., Дедюхина Э.Г., Капаруллина Е.Н., Ерошин В.К. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 5. С. 535–540.

## Degradation of the EDTA and EDTA Complexes with Metals by Immobilized Cells of *Chelativorans oligotrophicus* LPM-4 Bacteria

**T. N. Kuvichkina, E. N. Kaparullina, N. V. Doronina, Yu. A. Trotsenko, and A. N. Reshetilov**

*Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino,  
Moscow oblast, 142290 Russia*

*e-mail: kuv@ibpm.pushchino.ru*

Received November 28, 2011

**Abstract**—Enzymatic oxidative degradation of EDTA and EDTA complexes with metals has been investigated using immobilized cells of *Chelativorans oligotrophicus* LPM-4. A polarographic method, which makes it possible to register oxygen consumption by cells, has been used. For the first time, it has been indicated that the Cd-EDTA and Ni-EDTA complexes undergo degradation by the bacteria under study.