

УДК 579.841

## АЭРОБНАЯ ДЕГРАДАЦИЯ ЭТИЛЕНДИАМИНТЕТРААЦЕТАТА (ОБЗОР)

© 2011 г. Е. Н. Капарулина, Н. В. Доронина, Ю. А. Троценко

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино, Московская область 142290  
e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 17.12.2010 г.

Проанализированы и обобщены данные литературы по влиянию комплексообразующего соединения этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) на окружающую среду, а также экологические риски в связи с его применением. Систематизированы способы абиотического и биотического разложения ЭДТА. Особое внимание уделено микробиологической деградации этого соединения. Представлены данные о транспорте и путях метаболизма ЭДТА у аэробных бактерий. Обсуждаются практические аспекты использования аэробных бактерий-деструкторов ЭДТА в экобиотехнологии.

Проблема разложения персистентных и опасных соединений, которые накапливаются в окружающей среде вследствие интенсивного промышленного производства и применения, актуальна. Органические соединения группы аминополикарбоновых кислот (АПК), к которым относится ЭДТА, способны образовывать стабильные комплексы с большинством ионов металлов в водных растворах [1]. Анион ЭДТА<sup>4-</sup> содержит 10 активных центров, способных осуществлять координацию лиганда ионами металлов: 2 атома азота и 8 атомов кислорода (рис. 1). В твердой фазе в качестве донорных атомов могут выступать все 10 центров. Однако геометрия лиганда такова, что с одним атомом металла он может образовывать не более 6 связей: 2 с атомами азота и 4 с атомами кислорода разных ацетатных фрагментов ЭДТА, что соответствует гексадентатному типу данного комплексона. При этом образуется 5 пятичленных металлоциклов: один этилендиаминный (Е-цикл) и четыре глицинатных (Gly-циклы) (рис. 1). Такое сочетание донорных центров делает ЭДТА одним из наиболее эффективных хелатов, применяемых в различных областях современных технологии, аналитической химии и медицины.

Универсальность действия ЭДТА связана в первую очередь с хелатоэффектом [2], при котором отличительным свойством хелата является цикличность, обусловленная наличием нескольких донорных групп, вследствие чего лиганд занимает несколько координационных мест во внутренней сфере комплекса. Кроме способности к формированию хелатных циклов, для молекулы ЭДТА характерна повышенная лабильность как во взаимном расположении этилендиаминного и глицинатного фрагментов, так и в конформации каждого из них в отдельности.

Другой интересной особенностью ЭДТА является возможность варьирования относительных

расстояний металл–кислород и металл–азот в комплексах с металлами разной природы [3]. В зависимости от металла изменяется способность преимущественно координироваться с О- и N-атомами, которые служат непосредственными донорами в большинстве комплексов. Катионы трехвалентных металлов образуют комплексы при pH 2–3, тяжелые двухвалентные металлы при pH > 3–4, тогда как щелочноземельные – при pH > 7 [4].

Важной характеристикой комплексов является константа стабильности K, представляющая собой константу равновесия реакции образования комплекса металла (Me) с лигандом (L):  $K = \frac{[MeL]}{[Me] \cdot [L]}$ . Константы стабильности для различных комплексов MeEDTA различаются [5, 6], наименьшее значение константы стабильности определено для Ba-EDTA, а наибольшее – для Fe(III)-EDTA.

Первые упоминания о синтезе ЭДТА связаны с именем Ф. Мюнца, который, пытаясь создать заменитель лимонной кислоты, синтезировал ЭДТА из этилендиамина, обрабатывая его хлоруксусной кислотой и гидроокисью натрия [7]. Однако промышленное производство ЭДТА было начато немецкой фирмой “I.G. Farbenindustrie” лишь к 1940 г. В дальнейшем методы получения комплексона совершенствовались в связи с широким практическим использованием.

В настоящее время ЭДТА синтезируют из этилендиамина, формальдегида и цианида натрия под наиболее известными торговыми названиями: трилон Б, версен, эдетат, титриплекс, комплексон II и хелатон. Спектр производимых комплексона, включая ЭДТА, насчитывает более 200 наименований. Суммарное мировое производство ЭДТА в 2000 г. достигло  $2 \times 10^5$  т, при этом 70–80% потребленного ЭДТА поступает в окружающую среду [8–10].

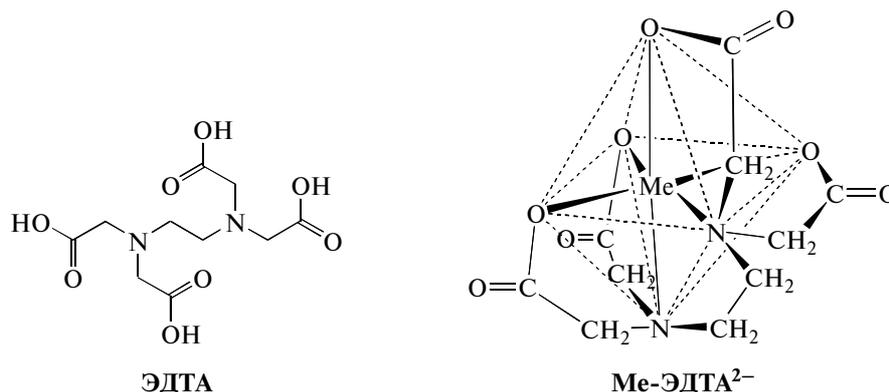


Рис. 1. Структура ЭДТА и его комплекса с металлами [29].

Развитие фундаментальных исследований химии комплексонов способствовало расширению сфер их применения. В основном это относится к использованию комплексонов для предотвращения образования осадков металлов, устранения ионов металлов, катализирующих нежелательную реакцию (смягчение воды, удаление накипи), или наоборот, делая их более доступными путем удержания в растворе (удобрения в сельском хозяйстве). Кроме того, комплексные соединения широко применяются в текстильной, нефтегазовой, фармацевтической, косметической и пищевой промышленности для предотвращения трансформации ингредиентов и их прогоркания вследствие спонтанно происходящих окислительных реакций, а также в фотографии, где  $\text{FeNH}_4$ -ЭДТА используют как окисляющий агент для серебра [11–13].

Традиционно, в механических процессах измельчения древесины хелаты добавляют до стадии сгущения. Затем металлы из хелатов удаляют на стадии обезвоживания, при этом общая концентрация ионов в пульпе значительно снижается. Поскольку требования к белизне бумаги возрастают, добавление хелатов на разных этапах технологического процесса повышает степень отбеливания (<http://www.versene.com>).

Обнаружено, что присутствие ЭДТА во фракции очищенных сточных вод целлюлозно-бумажного производства стимулировало рост водорослей на 20–40%, возможно, из-за повышения доступности необходимых металлов, как железо, цинк и медь [14]. Способность таких промышленных стоков поддерживать рост водорослей была сравнима с богатой питательной средой для морских водорослей. Следовательно, присутствие плохо деградируемого хелата, вызывающего увеличение доступности металлов, может ускорять эвтрофикацию водоемов, где концентрация ЭДТА и диэтиленetriаминпентаацетата (ДТПА) достигала 10–60 мг/л [15].

При удалении радионуклидов и продуктов коррозии из охлаждающих систем ядерных реакторов используют широкий спектр реакций, причем обычно применяют ЭДТА, ДТПА, пиколиновую и лимонную кислоты для образования комплексов. Такие комплексы с радионуклидами затем обрабатывают ионообменными смолами. Полученные отходы уплотняют и ликвидируют [16–19].

ЭДТА широко используется в медицине как фармацевтический агент с полифункциональными свойствами. Он применяется для выведения ядов и тяжелых металлов из организма человека, как антикоагулянт в крови для лабораторных исследований [20], кроме того, эффективен при сосудистых нарушениях (гиперкальцемия), предотвращает атеросклероз и другие хронические заболевания [21–23]. Клинические испытания показали снижение уровня холестерина и кровяного давления в ходе орального применения препаратов, содержащих ЭДТА [24]. Разработаны методы выведения радиоактивных изотопов с помощью комплексонов. Отмечается резкое возрастание интереса к исследованию комплексонов радиоактивных металлов (технеция-99) для диагностики. По данным ВОЗ, ежедневное потребление ЭДТА в концентрации 2.5 мг/кг не оказывает токсичного действия на людей, однако необходимы дополнительные и более длительные исследования его безопасности.

Изучено влияние ЭДТА на клетки *Salmonella enterica* при выращивании в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  или  $\text{Mg}^{2+}$ . ЭДТА оказывал влияние на внешнюю мембрану активнее в начале, нежели в середине или конце экспоненциальной фазы роста [25]. Дестабилизирующий эффект ЭДТА на клеточные стенки грамотрицательных бактерий хорошо известен. ЭДТА удаляет катионные мостики в клеточных стенках бактерий, где концентрируются катионы магния и кальция. При этом клетки становятся более чувствительными к антимикробным агентам [26].

**Уровни ЭДТА в окружающей среде.** Повсеместное использование и устойчивость к биодеграда-

ции приводят к накоплению хелатных агентов в окружающей среде. В 1997 г. мировые продажи ЭДТА в Европе составили 32550 т, а в 2000 г. их использование достигало 200000 т [27]. Примечательно, что среди антропогенных соединений ЭДТА присутствует в водоемах в самой высокой концентрации [12]. ЭДТА обнаружен в грунтовых и в сточных водах [28]. Другой хелат, нитрилотриацетат (НТА), широко распространен в грунтовых водах [29].

Концентрация ЭДТА в реках Англии достигала 1 г/л, тогда как в других европейских реках составляла десятки мкг/л [30]. Несмотря на широкое использование, накопление НТА в водоемах Канады не выявлено. В прибрежных водах Атлантики и Тихого океана и в образцах из порта в Галифаксе ЭДТА не обнаруживали в течение двух лет после первого использования в моющих средствах, тогда как в реках Германии и Швейцарии содержание ЭДТА превышало 100 мг/л. В донных отложениях северной части озера Рифенс обнаружен ЭДТА в концентрации 60–170 мг/л [31], а в донных осадках южной части этого озера концентрация ЭДТА составляла 80–310 мг/л. Столь высокие концентрации объясняются сбросами сточных вод целлюлозно-бумажных заводов Швейцарии, которые используют ЭДТА и ДТПА в технологических процессах [12]. Следовательно, комплексоны могут потенциально адсорбировать тяжелые металлы из донных отложений рек и других водоемов в естественных условиях [6, 31]. В фильтрате воды с поверхности реки Рур обнаружены довольно высокие концентрации ЭДТА (25 мг/л). В таких же концентрациях встречается ЭДТА и в необработанной воде, поскольку это соединение не удаляется в ходе фильтрации [6]. Хотя ЭДТА не токсичен для животных и людей в столь высоких концентрациях, его накопление в грунтовых водах приводит к ухудшению качества питьевой воды, так как способствует переходу в растворенное состояние ионов тяжелых и токсичных металлов. Кроме того, нельзя исключать, что это соединение может адсорбировать тяжелые металлы в трубопроводах, образуя растворимые в воде комплексы. Анализ проб, взятых из очистных сооружений Швейцарии, показал, что средние концентрации ЭДТА в необработанных сточных водах варьировали в пределах 10–500 мг/л. Однако уровни ЭДТА до и после очистки этих сточных вод существенно не отличались. Из этого следует, что большая часть ЭДТА не удалялась из сточных вод в процессе их очистки [28, 32].

**Экологические риски применения хелатов.** Мониторинг окружающей среды выявил накопление ЭДТА, поскольку биодegradация этого соединения в очистных сооружениях малоэффективна, а в природе обнаружен только один значимый путь деградации ЭДТА – фотохимическое разложение комплекса Fe(III)-ЭДТА на поверхности воды под

воздействием УФ-лучей. К главным проблемам, обсуждаемым в связи с риском накопления АПК в окружающей среде, относят: токсическое действие на млекопитающих, вклад азота в эвтрофикацию водоемов и иммобилизацию металлов.

Токсичность НТА изучена на 50 разновидностях пресноводных и морских организмов, эффекты наблюдали лишь в тех случаях, когда концентрации НТА, используемые в тестах, были равны или превышали концентрации ионов двухвалентных металлов [33]. Аналогично, комплексы ЭДТА и ДТПА с металлами характеризовались токсическим эффектом по отношению к водным организмам [34]. Показано, что ЭДТА нарушает клеточное деление, синтез хлорофилла и накопление биомассы водорослей. Интересно отметить, что та же концентрация хелатов ЭДТА с микроэлементами не оказывала токсического действия на водоросли. Показано также, что масштабное применение ЭДТА или НТА (оба содержат азот) может увеличить эвтрофикацию водоемов, но существенного вклада в этот процесс не обнаружено [11].

Цитотоксичность хелатов возникает чаще всего на фоне недостатка металлов, необходимых для различных клеточных функций. Показано летальное воздействие ЭДТА в низких концентрациях (<100 мкМ) на клетки почек крыс [34]. Кроме того, подавлялся синтез белка из-за образования комплексов цинка и марганца в клетках печени крыс после введения Ca<sup>2+</sup>-ЭДТА. ЭДТА оказывал также неблагоприятное воздействие на размножение и развитие млекопитающих, но был безопасен при наружном применении, поэтому активно используется в косметической промышленности [35].

Установлено, что при pH 7–8 тяжелые токсичные металлы (Pb<sup>2+</sup> или Cd<sup>2+</sup>) сорбируются на частицах, а комплекс Fe(III)-ЭДТА, присутствующий во многих реках, может повторно мобилизовать адсорбируемые тяжелые металлы. С другой стороны, в водоносных слоях с pH < 7 двухвалентные Me-ЭДТА комплексы будут реагировать с Fe(OH)<sub>3</sub>, что способствует формированию Fe(III)-ЭДТА комплексов. Итак, появление заметных количеств ЭДТА и других комплексонов в окружающей среде создает серьезные экологические проблемы, поэтому актуален поиск новых эффективных штаммов-деструкторов ЭДТА для разработки современных технологий биоремедиации экосистем и очистки промышленных стоков.

Удаление различных АПК из окружающей среды основано на различных абиотических, а также биотических процессах, которые играют главную роль в их деструкции. Несмотря на химическое и структурное сходство АПК, механизмы, ответственные за их деградацию, следует рассматривать отдельно для каждого соединения [6].

**Абиотические методы разложения АПК.** В природных условиях ЭДТА, как и другие АПК, могут

подвергаться физико-химическому разложению под действием УФ (фотолиз) в диапазоне спектра излучения солнечного света не выше 400 нм [36]. Показано, что только комплекс Fe(III)-ЭДТА разрушается под действием солнечного света с периодом полураспада 11.3 мин, тогда как комплексы ЭДТА с  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  и  $Hg^{2+}$  не подвергаются фотолизу. В лабораторных условиях комплексы Mn(II)-ЭДТА и Co(III)-ЭДТА также подвергаются фотолизу, но разрушение незначительно [37, 38]. Фотолиз другого хелата — ДТПА, происходит быстрее, по сравнению с ЭДТА [39]. Выявлена деградация ЭДТА под действием УФ-лучей в диапазоне, который чаще всего используется для очистки от радиоактивности (0.6–30 г/л ЭДТА, pH 10) и ядерных отходов (1.5 г/л лимонной кислоты + 2.5–5 г/л ЭДТА). Показано, что фотохимическая деградация ЭДТА (1–7 г/л) возможна в щелочных условиях при pH 10, а также при pH 3.3–3.6 [40].

В опытах с различными видами излучения показано, что при использовании ксеноновых ламп уровень деградации ЭДТА на единицу светового излучения выше, по сравнению с ртутными лампами. Положительный результат был достигнут при добавлении  $H_2O_2$ : время разложения ЭДТА под действием УФ сокращалось с 80 до 5 мин [40]. В ходе фотокаталитической деградации ЭДТА с  $TiO_2$  идентифицированы интермедиаты, такие как глиоксилат, гликолевая кислота, этилендиамин, иминодиацетат, глицин, что позволило предложить путь превращения ЭДТА [41]. Кроме того, выявлена незначительная адсорбция ЭДТА на гуминовых кислотах, кварце, каолине, речных отложениях, твердых частицах перегнойа и на частицах активного ила [36]. Из-за отрицательного заряда комплексов Me-ЭДТА в диапазоне pH 5.0–8.0 их сорбция возможна только на твердых положительно заряженных частицах, таких как: гидроксид алюминия, гидроксид железа (III) и оксид марганца (III, IV) [6].

Разложение 1 мМ ЭДТА в ходе озонирования (10 мг/мин/л) зависело от уровня озона [42]. При pH 3.0 получен ряд продуктов деградации, таких как этилендиаминтриацетат, ИДА, НТА, глиоксилат, формиаат, оксалиновая кислота, глицин, аммоний, нитрат и перекись. При pH 7.0 обнаружены те же продукты, за исключением перекиси и формиаата [43]. В ходе термической деградации комплексов ЭДТА с металлами в щелочных условиях при 250°C основными продуктами были ИДА, гидроксидэтилиминодиацетат и этиленгликоль, тогда как при более высокой температуре выделялись диметиламин и углекислота [44]. Исследовали также совместное действие озона и УФ на деградацию комплекса  $Cu^{2+}$ -ЭДТА, полученного в ходе выщелачивания меди из загрязненной почвы виноградников. В итоге, было удалено почти 40% меди, при этом токсичность почвы снизилась на 29% [45]. Кроме того, для деградации ЭДТА используют радиолиз [46] и ком-

бинированные физико-химические подходы [30]. Недавно показано, что ЭДТА, НТА и этилендиамин могут окисляться в присутствии перманганата калия при pH 12–14 [47].

**Разложение АПК микроорганизмами.** Известно небольшое число штаммов-деструкторов АПК, способных расти на НТА, ЭДТА и этилендиаминдисулфинате (ЭДС). Бактерии могут разрушать НТА как в присутствии молекулярного кислорода, так и в условиях денитрификации. Первые принадлежат к классу *Alphaproteobacteria* и кластеризуются с родами *Rhizobium* и *Agrobacterium*, вторые — к классу *Gammaproteobacteria* и близки *Xanthomonas* [6, 48]. Охарактеризованы и изучены граммотрицательные, аэробно использующие НТА *Chelatobacter heintzii* ATCC 29600 и *Chelatococcus asaccharovorans* [6, 49–51]. Хотя микробиологический способ деградации ЭДТА считается наиболее перспективным, до сих пор выделено несколько смешанных и чистых культур деструкторов ЭДТА [6, 42, 52].

1. *Agrobacterium radiobacter* выделен из сточных вод, содержащих Fe(III)-ЭДТА [46, 53], позднее реклассифицирован в *Rhizobium radiobacter* [54]. Этот штамм деградировал комплекс Fe(III)-ЭДТА в высоких концентрациях (30 мМ) в течение 48 ч до остаточной концентрации 3 мМ. В ходе эксперимента варьировали начальную концентрацию Fe(III)-ЭДТА от 2.9 до 140 мМ. Рост *R. radiobacter* на ЭДТА, связанным с другими металлами, не обнаружен [53]. Этот штамм не использовал НТА, ИДА и этилендиаминдиацетат (ЭДДА). Добавление пептона или дрожжевого экстракта в среду не влияло на разложение ЭДТА, однако внесение глицерина резко снижало его деградацию. По-видимому, в присутствии глицерина культура утилизировала ЭДТА только как источник азота.

2. *Pseudomonas* sp. A1 разлагал Fe(III)-ЭДТА и другие хелаты при начальной концентрации менее 100 мг/л (0.3 мМ/л), а при более высоких концентрациях рост этого штамма ингибировался [55].

3. Из морских образцов изолированы несколько бактериальных штаммов-деструкторов Fe(III)-ЭДТА. Аэробный грамм-вариабельный штамм 02-N-2, выделенный из моллюска в Индийском океане, разрушал комплекс Fe(III)-ЭДТА при различных концентрациях морской воды (осмолярности). Кроме того, интактные клетки были способны деградировать комплексы ЭДТА с  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , и  $Mg^{2+}$ . По данным секвенирования гена 16S рРНК этот штамм проявлял высокое сходство с *Bacillus jeotgali* JCM 10885<sup>T</sup> [56].

4. Транспорт и деградацию Fe(III)-ЭДТА также изучали у *Escherichia coli* BL21 [57]. Этот штамм использовал комплекс Fe(III)-ЭДТА до 20 мМ в качестве единственного источника азота, причем накопление биомассы было примерно одинаковым на среде с глюкозой или на среде с глюкозой и Fe(III)-ЭДТА. При этом штамм BL21 слабо ис-

пользовал комплексы ЭДТА (10 мМ) с другими ионами:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ . При определении протондвижущей силы для транспорта ЭДТА использовали ионофоры карбонилцианид-м-хлорфенилгидразон и грамицидин ( $\text{Na}^+$ ), которые не влияли на потребление ЭДТА клетками *E. coli*. Сделано заключение, что транспорт ЭДТА у исследуемого штамма зависит от АТФ. Кроме того, штамм BL21 обладал никель-транспортной системой, имеющей сходство с известными АВС-транспортерами. Показано, что в присутствии  $\text{Ni}^{2+}$  потребление ЭДТА составляло 10% от потребления Fe(III)-ЭДТА. Другие катионы ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) не оказывали ингибирующего действия, хотя скорость потребления была невысокой. Остается невыясненным, какой фермент *E. coli* BL21 разрушает Fe(III)-ЭДТА, поскольку при сравнении геномов штаммов BL21 и BNC1 не удалось найти нуклеотидные последовательности монооксигеназы, имеющей более 20% сходства с ЭДТА-монооксигеназой штамма BNC1, характеристика которой приведена ниже.

5. Из сточных вод, содержащих ЭДТА, выделена грамотрицательная бактерия BNC1 (DSM 6780), у которой способность к деструкции ЭДТА строго зависела от термодинамической стабильности комплексов [58–60]. Штамм BNC1 способен разлагать комплексы с константой стабильности ниже  $10^{16}$  – Ba-(lg K 7.8), Mg-(lg K 10.6), Ca-ЭДТА (lg K 10.7) со скоростью 20 мкМ/мг белка/ч и комплекс Mn-ЭДТА (lg K 15.6) с меньшей скоростью 15 мкМ/мг белка/ч. В тоже время комплексы с константой стабильности выше  $10^{16}$  [Fe(III)-, Co-, Cd-, Pb-, Ni-, Cu-ЭДТА] не утилизировались. Кроме того, штамм не способен расти в присутствии свободного, не объединенного в комплекс, ЭДТА. Предполагают, что свободный ЭДТА значительно снижает жизнеспособность клеток из-за взаимодействия с ионами металлов клеточной поверхности. Недавно выделен штамм ANP11, способный наряду с ЭДТА разрушать 1,2-диаминопропантетраацетат [61].

6. В чистую культуру выделен также бактериальный штамм DSM 9103 [62, 63], который при добавлении в активный ил городских очистных сооружений полностью разрушал ЭДТА при его начальной концентрации 3 мМ. Обнаружено, что клетки этого штамма способны разрушать свободный ЭДТА и хелаты с низкой константой стабильности. Комплексы  $\text{Mg}^{2+}$ -,  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Mn}^{2+}$ -ЭДТА разрушались в течение 10 ч с постоянной скоростью. Деструкция более стабильных хелатов с Co-, Cu-, Zn-, Pb-ЭДТА происходила частично и с меньшей скоростью, а Cd- и Fe(III)-ЭДТА не выявлена [64].

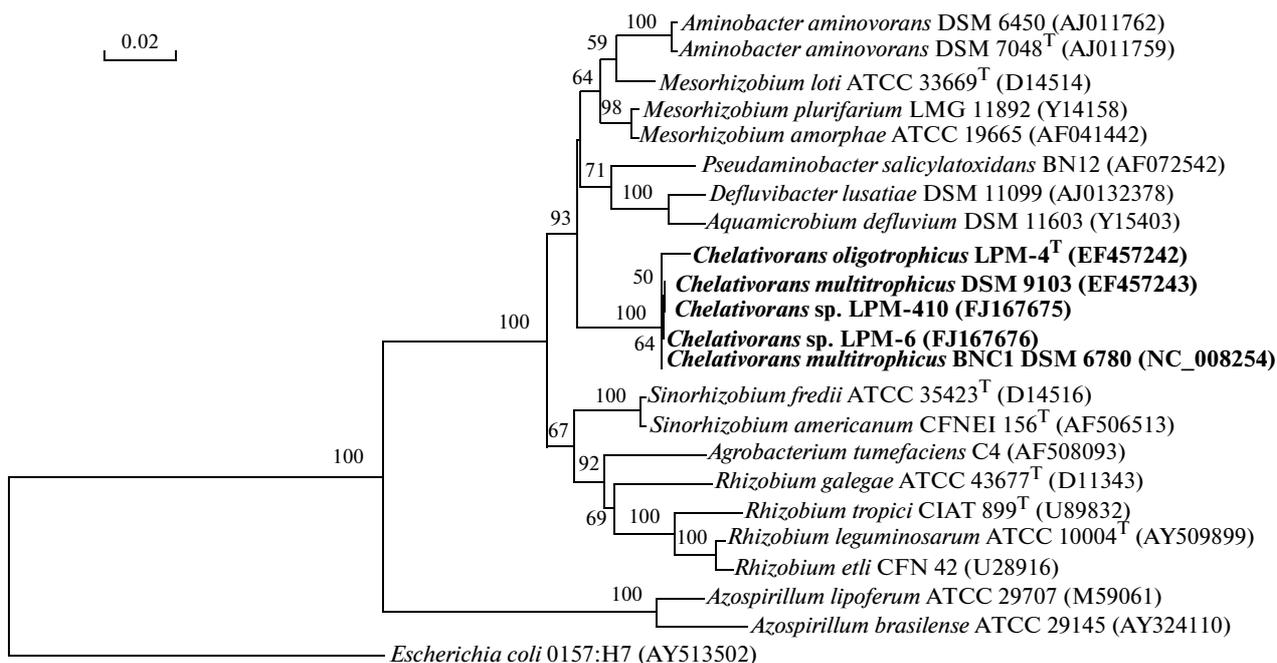
7. *Burkholderia cepacia* YL-6 использует 1 г/л Fe(III)-ЭДТА в качестве источника углерода и энергии, а также смесь  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  в качестве источника азота. Показано, что через

17 сут периодического культивирования комплекс Fe(III)-ЭДТА разрушался до конечной концентрации 100 мг/л. Кроме того, штамм YL-6 способен разлагать 0.5 г/л Cu(II)-ЭДТА за 20 сут [65].

8. Из очистных сооружений г. Пушкино выделены три чистые культуры грамотрицательных бактерий – факультативных деструкторов ЭДТА: LPM-410, LPM-5, LPM-6, а также облигатный деструктор ЭДТА – штамм LPM-4 [66, 67]. Штамм LPM-410 утилизировал ЭДТА в качестве источника углерода, энергии и азота, а также широкий спектр других органических соединений [66]. Показано, что суспензия клеток, собранных в экспоненциальной фазе роста на ЭДТА, способна разрушать комплексы ЭДТА с Mg-, Ca-, Ba- и Mn-ЭДТА с постоянной скоростью от 0.363 до 0.525 мМ ЭДТА/(г клеток·ч). Более стабильный комплекс Zn-ЭДТА разлагался штаммом с низкой скоростью – 0.195 мМ ЭДТА/(г клеток·ч). Не обнаружена дегградация комплексов с Co-, Cu-, Fe(III)-ЭДТА [66].

Облигатный деструктор, штамм LPM-4, обладает специфической потребностью в ЭДТА как единственном источнике углерода, энергии и азота [9]. Подобно штамму DSM 9103, клетки штамма LPM-4 деградировали комплексы Mg-, Ca-, Ba-, Mn-ЭДТА со скоростью от 0.310 до 0.486 мМ ЭДТА/(г клеток·ч) в течение 10 ч. Более стабильный комплекс Zn-ЭДТА ( $K = 10^{18.3}$ ) разрушался в течение 48 ч с начальной скоростью 0.137 мМ ЭДТА/(г клеток·ч). Комплексы ЭДТА с Pb-, Cu-, Fe(III)-ЭДТА не разрушались. Следовательно, штаммы DSM 9103, LPM-410 и LPM-4 более активно, чем другие известные деструкторы, разлагают не только ЭДТА, но и его комплексы с Ba, Mg, Ca, Mn, Zn, т.е. перспективны для практического применения с целью очистки сточных вод, содержащих ЭДТА или его хелаты [52]. Факультативные деструкторы штаммы LPM-410, LPM-5 и LPM-6 способны расти в среде, содержащей 1.0 г/л ЭДТА.

Несколько работ посвящено деструкции ЭДТА смешанными культурами. Из ассоциации изолировано 40 культур, среди которых обнаружены представители родов *Methylobacterium*, *Variovorax*, *Enterobacter*, *Aureobacterium* и *Bacillus*. Однако смешанная культура слабо разрушала комплексы Me-ЭДТА, которые по степени деградальности располагались в следующем порядке: Fe (60%) > Cu (30%) > Co (25%) > Ni (23.4%) > Cd (19.3%). Деструкция Na-ЭДТА после 28 сут культивирования составила 1.57 мМ (31%). При добавлении в среду неорганического фосфора наблюдали удаление тяжелых металлов, которое происходило параллельно с разложением ЭДТА. Имобилизованные клетки данной культуры разрушали 20% комплекса Fe(III)-ЭДТА в течение 2.5 ч, тогда как в непрерывной культуре для этого требовалось 4.5 сут, что может быть использовано для биодеградации целого ряда комплексов с тяжелыми металлами [68].



**Рис. 2.** Филогенетическое положение деструкторов ЭДТА, среди представителей *Alphaproteobacteria*, основанное на сравнении нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Масштаб соответствует двум нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционным расстоянием). Корень определен включением последовательности *E. coli* в качестве внешней группы. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа 100 альтернативных деревьев.

**Таксономия и филогения новых деструкторов ЭДТА.** Таксономическое положение деструкторов ЭДТА – штаммов DSM 9103, LPM-410, LPM-6, LPM-5 и LPM-4 долгое время оставалось невыясненным. Для идентификации новых деструкторов ЭДТА использовали методы полифазной таксономии. Нами показано, что штаммы LPM-410, LPM-6 и LPM-4 принадлежат к новому роду *Chelativorans* [69], тогда как штамм LPM-5 отнесен к новому виду *Stenotrophomonas chelatiphaga* [70] (рис. 2, 3). Основные и дифференцирующие свойства деструкторов ЭДТА представлены в таблице.

**Биохимические и генетические аспекты деградации НТА и ЭДТА.** Эти аспекты ранее изучались на *Chelatobacter heintzii* ATCC 29600, *Chelatococcus asaccharovorans* TE 11, ЭДТА-деградирующих штаммах DSM 9103 и BNC1 (DSM 6780) [59, 63, 71, 72]. Также была исследована деградация ЭДДС штаммом DSM 9103 [6].

**Транспорт ЭДТА.** Энергозависимость транспорта ЭДТА исследовали на клетках штамма DSM 9103 [62]. Определяли влияние различных ингибиторов энергетического метаболизма на транспорт ЭДТА и внутриклеточный уровень АТФ. 2,4-Динитрофенол, карбонилцианид-м-хлорфенилгидразон и карбонилцианид-п-(трифторметокси)-фенилгидразон могут разобщать протондвижущую силу, электрический (мембранный) потенциал и градиент рН через мембрану клетки.

Преинкубация с этими соединениями значительно ингибировала процесс транспорта ЭДТА.

Эксперименты с цианидом калия показали, что транспорт ЭДТА является энергозависимым. Транспорт ЭДТА в клетки штамма DSM 9103 (конечная концентрация 10.4 мкмоль) полностью подавлялся в присутствии 10 мМ KCN, а при концентрации 1 мМ KCN наблюдали лишь 8% от первоначальной активности транспорта [62].

Потребление комплекса  $Ca^{2+}$ -ЭДТА клетками штамма DSM 9103 значительно снижалось также в присутствии ингибитора АТФазы и ионофора нигерицина, разобщающего протонный градиент. Напротив, валиномицин, который действует на электрохимический градиент, практически не влиял на транспорт ЭДТА, указывая на то, что транспорт ЭДТА, вероятно, осуществляется по протонному градиенту [62]. Комбинация обоих ионофоров разобщала протондвижущую силу. Добавление ингибитора АТФазы, N,N-дициклогексил-карбосидимиды, привело к наибольшему ингибированию. В присутствии ингибиторов транспорта и ингибитора АТФазы уровень внутриклеточного АТФ снижался до 40% от контроля. Добавление одного из двух ионофоров несущественно влияло на этот уровень. Тем не менее, в присутствии нигерицина потребление ЭДТА клетками штамма DSM 9103 значительно снижалось, несмотря на высокий уровень АТФ, возможно, из-за отсутствия корреляции между ак-

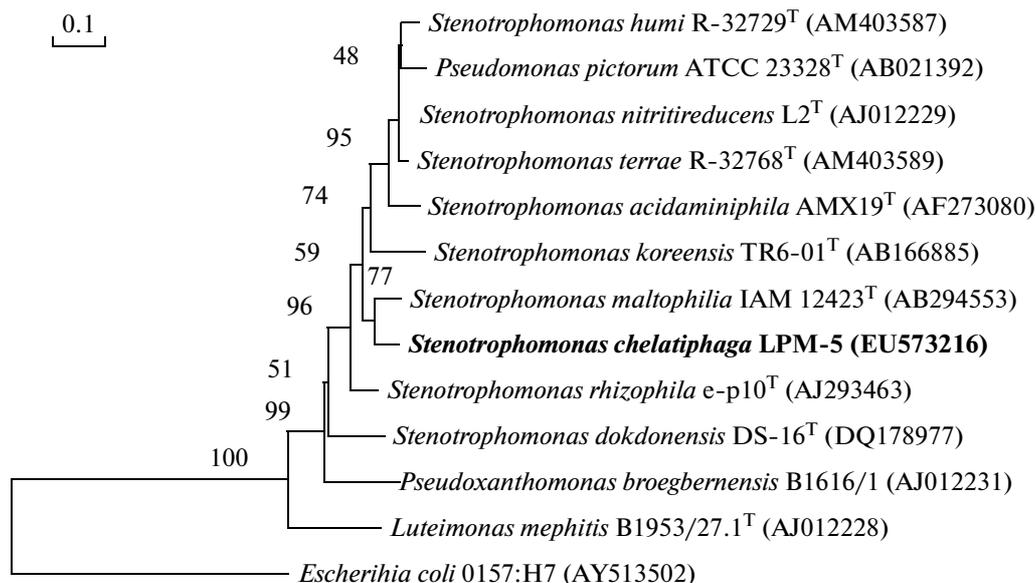


Рис. 3. Филогенетическое положение *Stenotrophomonas chelatiphaga* LPM-5<sup>T</sup>, основанное на сравнении нуклеотидных последовательностей 16S рДНК представителей родов *Stenotrophomonas*, *Luteimonas* и *Pseudoxanthomonas*. Показаны bootstrap значения выше 45%. Дерево построено относительно последовательности 16S рДНК *E. coli* 0157:H7 (AY513502).

тивностью транспорта и внутриклеточным содержанием АТФ. Показано, что оптимальными для транспорта ЭДТА в клетки были 40°C и pH 7.0 [62]. Доказано существование индуцибельной и энергозависимой транспортной систем, которые весьма специфичны, поскольку из всего диапазона АПК только ДТПА конкурентно ингибировал потребление ЭДТА.

Установлено, что транспортные системы для НТА и ЭДТА у *S. heintzii* и штамма DSM 9103 имеют много общего [71, 73]. Также обнаружено, что транспорт ЭДТА клетками, выращенными на НТА, ингибировался при внесении НТА в среду культивирования. Вероятно, НТА транспортируется своим переносчиком, отличным от транспортера ЭДТА, либо идет конкуренция между двумя ферментами за субстрат. Транспорт различных комплексов ЭДТА с металлами строго зависел от констант стабильности этих комплексов. Так, клетки штамма DSM 9103 способны поглощать свободный ЭДТА или в комплексе с металлами, с константами их стабильности менее 10<sup>16</sup>. Близкие результаты получены для штамма BNC1 [59].

Результаты опытов с <sup>45</sup>Ca-ЭДТА во многом объяснили поведение иона металла в ходе этого процесса. Установлено, что ионы Ca<sup>2+</sup> транспортируются в клетки вместе с ЭДТА [62]. Выдвинуты две гипотезы относительно того, каким образом клетки справляются с высокими внутриклеточными концентрациями ионов металлов. Согласно первой гипотезе, ионы металлов осаждаются в виде нерастворимых солей, например,

фосфатов кальция. Согласно второй гипотезе ионы металлов экскретируются. Кроме того, рентгеноструктурный анализ показал, что клетки, выращенные на ЭДТА, имеют включения, содержащие преимущественно ионы Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>, что подтверждает механизм осаждения металлов внутри клеток. Механизмы экскреции ионов Ca<sup>2+</sup> также, вероятно, присутствуют у всех бактерий, чтобы поддерживать низкую внутриклеточную концентрацию ионов металла.

#### ЭДТА-монооксигеназа штамма DSM 9103.

Первичные реакции деградации ЭДТА у факультативных деструкторов DSM 9103 и BNC1 очень близки и катализируются монооксигеназными системами [71, 73–75].

Показано, что при добавлении Mg-ЭДТА и НАДН<sub>2</sub> к бесклеточному экстракту штамма DSM 9103 ЭДТА разлагается монооксигеназой, активность которой составила 0.097 мкмоль/мин/мг белка [74]. Добавление в реакционную смесь ФМН или ФАД увеличивало активность фермента в 7 и 2.5 раза соответственно. Оптимум фермента наблюдался при pH 8.0. При pH 7.0 и 8.5 отмечена 50%-ная активность этого фермента, а при pH 6.0 и 9.5 активность фермента не удалось обнаружить. Оптимум температуры фермента – 28–30°C. Экстракты клеток, выращенных на фумарате с аммонием в качестве источника азота или ИДА в качестве источника углерода, энергии и азота, имели десятикратное снижение активности первого фермента разложения ЭДТА. Напро-

Характеристика деструкторов ЭДТА

Свойства	<i>Chelativorans oligotrophicus</i> LPM-4 [69]	<i>Chelativorans multitrophicus</i> DSM 9103 [69]	<i>Chelativorans</i> sp. LPM-410 [66]	<i>Chelativorans</i> sp. LPM-6 [66]	<i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i> LPM-5 [70]
Размеры клеток, мкм	0.4–0.5 × 1.0–2.0	0.5–1.0 × 0.7–2.0 мкм	0.6–0.8 × 1.0–3.0	0.6–0.7 × 1.0–1.3	0.5–0.7 × 0.8–1.3
Морфология клеток	Палочки	Палочки	Палочки	Палочки	Палочки
Тип клеточной стенки	Грамотрицательные	Грамотрицательные	Грамотрицательные	Грамотрицательные	Грамотрицательные
Жгутикование	–	+	+	+	+
Оксидаза, каталаза	+	+	+	+	+
Тип деструкции ЭДТА	Облигатный	Факультативный	Факультативный	Ограниченно-факультативный	Факультативный
<b>Источники углерода и энергии</b>					
ЭДТА	+	+	+	+	+
Нитрилогриацетат	–	+	+	–	+
Этилендиаминдисулфинат	–	+	+	–	–
Глюкоза	–	+	+	–	+
Фумарат	–	+	–	–	–
Сукцинат	–	+	+	+	+
Малаг	–	–	–	–	+
Ацетат, пируват	–	–	+	–	+
L-аланин, L-серин	–	–	+	–	–
Спирты и амины:					
Этанол, метанол	–	–	–	–	–
Потребность в витаминах	Биотин	Биотин, тиамин	–	Биотин, тиамин	–
Температурный оптимум, °С	32–34	30	28–30	28–37	28–37
Оптимальный рН для роста	6.8–7.2	7.0	6.8–7.2	6.8–7.2	5.5–8.5
Оптимальный NaCl для роста, %	1.5	1.5	1.5	1.5	2.5
Содержание ГЦ в ДНК, мол. %	60.8	63.1	65.4	63.2	68.3

Примечание: “+”, “–” – положительная и отрицательная реакция.

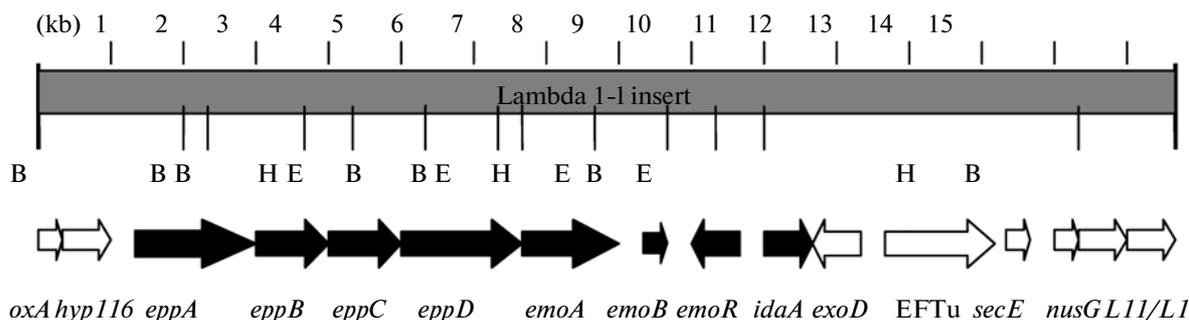


Рис. 4. Рестрикционные сайты *Bam*HI (B), *Hind*III (H) и *Eco*RI (E) и организация генов 15.603 п.н. фрагмента ДНК. Гены, показанные черными стрелками, непосредственно участвуют в деградации ЭДТА [76].

тив, клетки, выращенные на НТА или ЭДДС, обладали 80% активности ЭДТА-монооксигеназы.

Установлено, что ЭДТА-монооксигеназа состоит из двух субъединиц [74, 76]. Субъединица В – оксидоредуктаза, которая переносит восстановительные эквиваленты от НАДН<sub>2</sub> на ФМН. Субъединица А – собственно монооксигеназа, превращающая комплекс металл-ЭДТА в этилендиаминтриацетат и глиоксилат в присутствии O<sub>2</sub> и ФМНН<sub>2</sub>. Очищены полный ферментный комплекс деградации ЭДТА и субъединицы в отдельности [74]. Активность субъединицы А (сА<sup>1</sup>), которая составила 0.2 мкмоль/мин/ мг белка, определяли после реконструкции фермента с оксидоредуктазой сВ<sup>1</sup> из *Photobacterium fischeri*. Методом электрофореза в ПААГ показано, что очищенная субъединица сА имеет молекулярную массу (м.м.) 44 кДа, а методом аналитической гель-фильтрации определена величина нативной м.м. 210 кДа, что соответствует тетрамерной структуре. Субъединица оксидоредуктазы (сВ<sup>1</sup>) – гомодимер (25 × 2 кДа). Оксидоредуктазная активность четко проявлялась с НАДН<sub>2</sub>, но не наблюдалась с НАДФН<sub>2</sub> и составляла 50 мкмоль/мин/мг белка. После достижения концентрации ЭДТА 0.2–0.3 мМ начинался второй этап – деструкция этого промежуточного соединения с образованием глиоксилата и N,N<sup>1</sup>-ЭДДА. “ЭДДА-трансформирующий фермент”, который приводил к образованию этилендиаминмоноацетата и глиоксилата, был охарактеризован для штамма BNC1 позднее. Кроме того, предполагается, что в ходе деградации ЭДТА и ДТПА один из интермедиатов этилендиаминтриацетат может спонтанно приобретать циклическую структуру, образуя кетопиперазинкарбоксилат, устойчивый к деградации, но о его токсичности и поведении в окружающей среде ничего не известно [42].

**Моноксигеназа ЭДТА штамма BNC1.** Обнаружено, что монооксигеназа в клетках штамма BNC1 аналогична таковой штамма DSM 9103. Очищенная монооксигеназа ЭДТА имеет м.м. 45 кДа, что коррелирует с данными для монооксигеназы штамма

DSM 9103, но является мономером по данным гель-фильтрации. Установлено, что фермент катализирует окисление не только свободного ЭДТА, но и комплексов с ионами двухвалентных металлов, из которых комплекс с Mg<sup>2+</sup> наиболее предпочтителен. Оптимальными условиями для работы фермента являются 20 мМ HEPES буфер с pH 7.7 и температура 35°C. Кроме того, монооксигеназа ЭДТА штамма BNC1 может использовать НТА и ДТПА в качестве субстратов [75]. ФМНН<sub>2</sub>-оксидоредуктаза из штамма BNC1 детально охарактеризована [77]. Для расшифровки механизма этой реакции определили кристаллическую структуру апоформы, ФМН–ФМН комплекса и ФМН–НАДН<sub>2</sub> комплекса. ФМН–НАДН<sub>2</sub>-оксидоредуктаза ЕмоВ представляет собой гомотетрамер, состоящий из четырех альфа/бета единичных мономеров, окруженных пятью альфа-спиралями, которые различаются вторичной и третичной структурой от других двухкомпонентных монооксигеназ, таких как PheA2 и PheC. Два изоаллоксазиновых кольца и никотинамид/изоаллоксазиновых кольца служили для переноса водородной связи. Следовательно, реакция идет по механизму пинг-понга, что подтверждено энзимологическими исследованиями [77].

**Иминодиацетат-оксидаза штамма BNC1.** Из клеток штамма BNC1 наряду с монооксигеназой выделена и охарактеризована оксидаза иминодиацетата (ИДА), отвечающая за последующее его расщепление до глицина и глиоксилата, а также ЭДДА – до этилендиамина [78]. Очистка белка, включающая 8 этапов, позволила получить гомогенный препарат ИДА-оксидазы. Методом электрофореза в ПААГ удалось показать, что очищенный фермент имеет м.м. 40 кДа, а нативный белок представляет собой гомодимер. Очищенная ИДА-оксидаза имела слегка желтоватый цвет с пиком поглощения при 446 нм, характерным для флавопротеинов. Флавин, экстрагированный из ИДА-оксидазы, давал флуоресцентное пятно с Rf 0.055, которое соответствовало ФАД, а молярное соотношение флавина к белку 0.98 указало на то, что каждая субъединица содержит по одной молекуле ФАД [78]. Также

показано, что очищенная ИДА-оксидаза высоко-специфична, так как скорость деградации других субстратов ЭДДА и саркозина составляла соответственно 26 и 4% таковой ИДА. Фермент не проявлял активности в присутствии ЭДТА, НТА, сукцината, фумарата и глицина. При деградации 500 нмоль ЭДДА образовалось 794.4 нмоль глиоксилата, а молярное соотношение 1.59 указывало на отщепление обеих ацетильных групп и образование этилендиамина в качестве конечного продукта. Определены оптимальные условия для работы фермента: наибольшую активность наблюдали в 20 мМ Трис-НСl буфере (рН 8.0) при 35°C. Добавление CaCl<sub>2</sub> или MgCl<sub>2</sub> к очищенному ферменту не влияло на активность, следовательно, данный фермент не нуждается в ионах двухвалентных металлов. Таким образом, выделен и охарактеризован еще один важный фермент, участвующий в процессе деградации НТА и ЭДТА, что позволяет лучше понять пути образования интермедиатов их метаболизма.

#### Генный кластер, участвующий в деградации ЭДТА.

Клонирован и секвенирован кластер, состоящий из восьми генов *errABCD*, *emoA*, *emoB*, *emoR*, *idaA* [76]. Особое место в деградации ЭДТА занимает группа генов *errABCD*, действующих как АТФ-связывающая транспортная система и обеспечивающая транспорт ЭДТА в клетки [79]. Как гидрофильное соединение ЭДТА нуждается в активном транспорте через цитоплазматическую мембрану. Установлено, что гены деградации и транспорта ЭДТА транскрибируются и регулируются как один оперон (рис. 4). Стоп-кодон последнего гена пермеазной системы *errABCD* перекрывается со стартовым кодоном гена монооксигеназы ЭДТА *emoA*, за которым расположен ген *emoB*, кодирующий НАДН<sub>2</sub>-ФМН-зависимую оксидоредуктазу и далее следует регуляторный ген *emoR*. АВС-транспортер имеет периплазматический связанный белок (*ErrA*), придающий субстратную специфичность транспортеру. С использованием изотермической титрационной калориметрии показано, что белок *ErrA* способен связывать свободный ЭДТА с константой диссоциации ниже 25 нмоль, а также комплексы Ca<sup>2+</sup>-ЭДТА, Mg<sup>2+</sup>-ЭДТА, Ca-НТА и Mg-НТА<sup>-</sup>, но не Cu<sup>2+</sup>-ЭДТА<sup>2-</sup> или Cu-НТА.

Поскольку ЭДТА-монооксигеназа находится в цитоплазме и использует стабильные комплексы в качестве субстратов, отсутствие связывания *ErrA* некоторых комплексов может приводить к неспособности их деградации клетками штамма BNC1. Ген *errV* кодирует пермеазный белок, состоящий из 315 аминокислот, а ген *errC* кодирует белок из 308 аминокислот с консервативной петлей (ЕАА) между двумя трансмембранными спиралями. Оба белка содержали консервативные домены, имеющие высокую гомологию с пермеазными компонентами АВС транспортной системы и шесть

мембранных α-спиралей. Далее гена *errC* находится ген, кодирующий белок *ErrD*, который является АТФ-связывающим белком. *ErrD* содержал два мотива, характерные для таких белков, и аминокислотную линкерную последовательность, что свидетельствует об АТФ-связывающем домене АВС-транспортера [79]. Методом ПЦР в реальном времени показано, что гены транспорта и ген *emoA* транскрибируются с одного промотора, а ген *emoB* конститутивно экспрессируется со своего промотора. Ген ИДА-оксидазы *idaA* располагается после регуляторного гена и не входит в оперон, так как отстоит от него примерно на 400 п.н. Однако *idaA* играет важную роль в окислении ИДА до глицина и глиоксилата, а рассматриваемый генный кластер содержит все гены, необходимые для деградации ЭДТА.

**Пути первичного и центрального метаболизма ЭДТА у новых деструкторов.** Несмотря на то, что были изучены первичные пути деградации ЭДТА у факультативных штаммов DSM 9103 и BNC1, пути центрального метаболизма до сих пор оставались невыясненными. При выращивании *C. oligotrophicus* LPM-4, *S. chelatiphaga* LPM-5, *Chelativorans* sp. LPM-6, LPM-410 на среде с ЭДТА, в качестве единственного источника углерода, азота и энергии нами обнаружены два промежуточных продукта деградации: глиоксилат (13–30 мкМ) и ионы аммония (40–80 мг/л) [80]. Кроме того, в культуральной жидкости обнаружено вещество, окрашиваемое нингидрином, тогда как ЭДТА не проявляется нингидрином. С использованием тонкослойной хроматографии и аминокислотного анализатора, показано, что это соединение содержит аминокислотную группу, но, не будучи аминокислотой, возможно, является этилендиамином.

Полярографические исследования показали, что клетки штаммов-деструкторов LPM-4, LPM-410, LPM-5, LPM-6 при внесении ЭДТА активно потребляли кислород. Анализ продуктов разложения ЭДТА экстрактами клеток исследуемых штаммов выявил, что одним из первых продуктов деградации является глиоксилат. Реакция разложения ЭДТА зависела от НАДН<sub>2</sub> и стимулировалась ФМН у штаммов LPM-4 и LPM-6, но не ФАД или рибофлавином. Следовательно, первым ферментом деградации ЭДТА у исследуемых штаммов была монооксигеназа, подобная обнаруженной ранее у штамма DSM 9103 [74]. В отличие от штаммов LPM-4 и DSM 9103, штамм LPM-5 обладает ФАД-стимулируемой ЭДТА-монооксигеназой, в то время как первый фермент деградации ЭДТА у штамма LPM-410 не стимулируется флавинами. ЭДТА-монооксигеназы у штаммов LPM-4, LPM-410 и LPM-5 активны в широком диапазоне рН, в отличие от известного штамма DSM 9103. Это существенно отличает первый фермент деградации ЭДТА у новых деструкторов. Нами показана высокая активность мо-

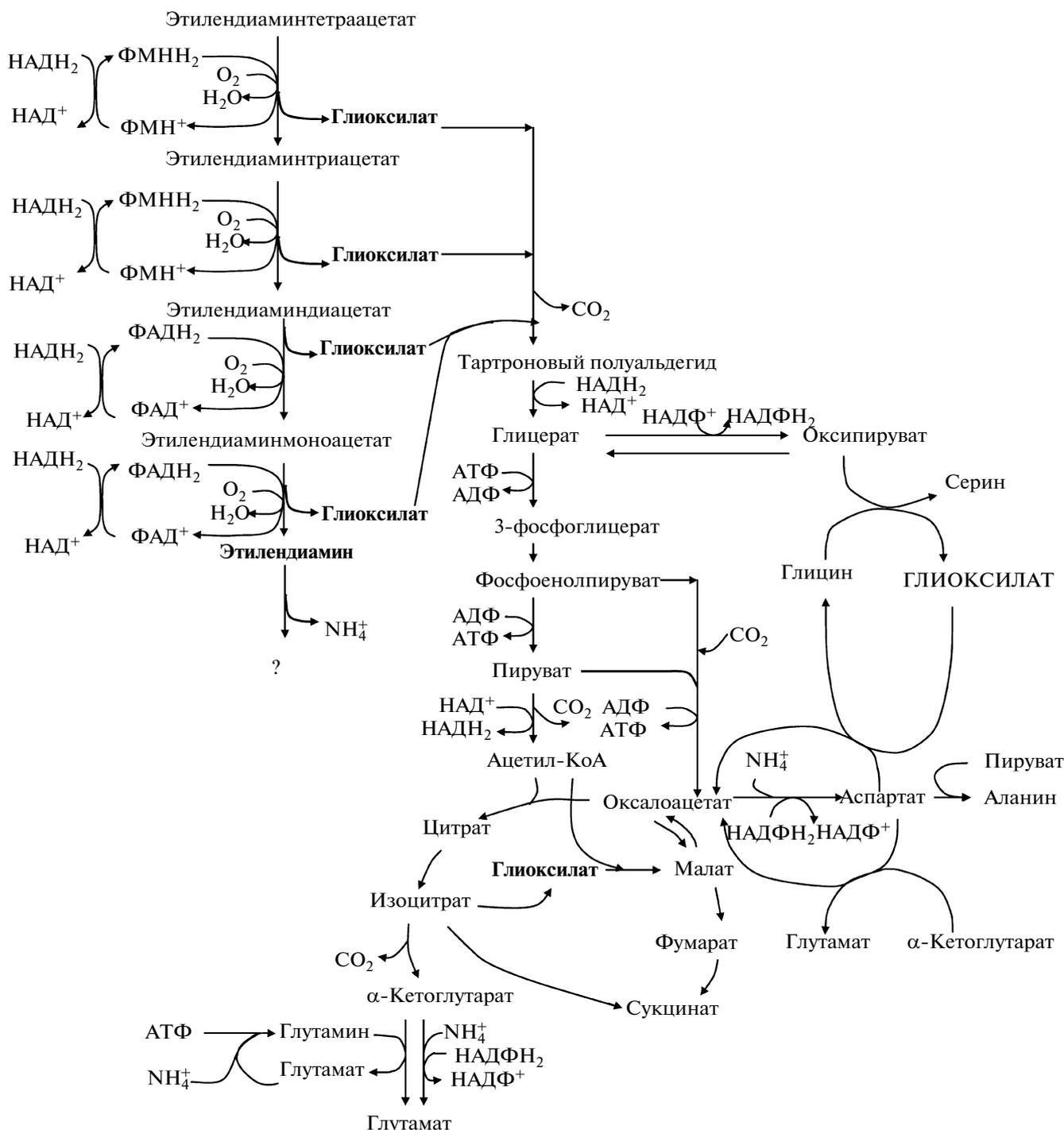


Рис. 5. Схема путей первичного и центрального метаболизма ЭДТА у облигатного деструктора *Chelativorans oligotrophicus* LPM-4.

нооксигеназы у штаммов LPM-4 и LPM-410 при pH 8.0, а у штамма LPM-5 – при pH 7.4.

Использование “функциональных генов” позволяет оценить распространение различных групп микроорганизмов в биотопах. Нами была разработана система олигонуклеотидных прай-

меров на монооксигеназу ЭДТА [81]. Учитывая, что список бактерий, способных к деградации ЭДТА, весьма ограничен, объем выборки включал последовательности гена *emoA* из кластера генов, ответственных за разрушение ЭДТА, штамма BNC1 (AF176664) и гена *ntoA* деградации НТА у *Aminobacter aminovorans* ATCC 29600 (L49438).

Последовательности монооксигеназ других поллютантов значительно отличались от таковых *emoA*, что привело к высокой степени вырожденности разработанных нами праймеров. Были выбраны наиболее консервативные участки гена монооксигеназы, что позволило создать системы праймеров для амплификации генов *emoA* размером около 750 п. н. ДНК чистых культур деструкторов ЭДТА (*C. oligotrophicus* LPM-4, *C. multitrophicus* DSM 9103, *Chelativorans* sp. LPM-410, *Chelativorans* sp. LPM-6 и *S. chelatiphaga* LPM-5) использовали для проверки разработанных систем праймеров, а в качестве негативного контроля – ДНК *E.coli*. Для проверки того, что полученные ампликоны действительно являются фрагментами генов *emoA*, их секвенировали. Все выделенные ДНК имели 99.5–100% гомологию между секвенированными фрагментами генов *emoA* и *emoA* у штамма BNC1 [81]. Показано, что все новые и ранее известные деструкторы ЭДТА объединены в один кластер. Следует отметить, что род *Stenotrophomonas* принадлежит к классу *Gammaproteobacteria*, тогда как остальные исследованные штаммы–деструкторы ЭДТА являются представителями *Alphaproteobacteria*. Следовательно, предложенная система праймеров способна успешно выявлять фрагменты гена *emoA* у прокариот различных классов.

Энзимологический анализ, проведенный нами, у штаммов-деструкторов LPM-4, LPM-410, LPM-5 и LPM-6, выращенных на ЭДТА, показал, что первичные продукты деградации ЭДТА – глиоксилат и ионы аммония, далее вовлекаются в центральный метаболизм. Глиоксилат метаболизируется с участием малатсинтазы через глиоксилатный шунт и глицератный путь. Факультативные деструкторы ЭДТА штаммы LPM-410 и LPM-5 имеют замкнутый цикл Кребса, в отличие от облигатного (LPM-4) и ограниченно-факультативного штамма LPM-6, у которого цикл Кребса разомкнут на уровне  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы и отсутствуют ферменты гликолиза (6-фосфофруктокиназа и фруктозо-1,6-бисфосфатальдолаза). Очевидно, что обнаруженные метаболические дефекты являются одной из причин облигатной и ограниченно-факультативной зависимости от ЭДТА. Напротив, факультативные деструкторы LPM-410 и LPM-5 обладают активностями фруктозо-1,6-бисфосфатальдолазы, фруктозо-1,6-бисфосфатазы и 2-кето-3-дезоксиглюконоат альдолазы. Из этого следует, что данные штаммы ассимилируют глюкозу гликолитическим и пентозофосфатным путями.  $\text{NH}_4^+$  ассимилируется посредством восстановительного аминирования пирувата или  $\alpha$ -кетоглутарата и в реакциях трансаминирования. В анаэробной фиксации  $\text{CO}_2$  у штаммов LPM-4 и LPM-410 участвуют пируваткарбоксилаза, ФЕП-карбоксилаза и ФЕП-карбоксикиназа. На основании результатов

энзимологического анализа нами предложена схема путей первичного и центрального метаболизма ЭДТА для наиболее детально изученного деструктора *C. oligotrophicus* LPM-4 (рис. 5). Используя праймеры на ИДА-оксидазу, показано, что *IdaA* штаммов BNC1 и LPM-4 имеют 99.7% сходства, что свидетельствует об участии ИДА оксидазы у штамма LPM-4 в окислении этилендиаминтетраацетата до глиоксилата и этилендиамина [82].

Особый интерес представляло изучение способности *C. oligotrophicus* LPM-4 к двухфазному росту на смеси ЭДТА + глюкоза. Показано, что глюкоза не метаболизируется культурой в течение 48 ч и начинала потребляться только после значительного снижения концентрации ЭДТА в среде. Предполагается, что при этом глюкоза используется в качестве дополнительного источника углерода. Возможно, рост культуры на глюкозе после исчерпания ЭДТА в среде обусловлен использованием энергии накопленных полифосфатов, уровень которых снижался во второй фазе роста. Обнаруженное ингибирование гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы ЭДТА может быть одной из причин диауксии *C. oligotrophicus* LPM-4 на смеси ЭДТА с глюкозой [83].

Также установлено, что потребление ацетата клетками *C. oligotrophicus* LPM-4 происходило практически одновременно с использованием ЭДТА, тогда как сукцинат, фумарат, малат и цитрат потреблялись после значительного снижения концентрации ЭДТА в среде. *C. oligotrophicus* LPM-4 можно использовать на очистных сооружениях, поскольку присутствие органических кислот и сахаров не снижало способности культуры к деградации ЭДТА.

**Применение деструкторов ЭДТА в экобиотехнологии.** Многочисленные исследования показали, что значимого разрушения ЭДТА в очистных сооружениях практически не происходит. Большинство комплексов, которые образуются в результате взаимодействия ЭДТА с ионами металлов, в том числе тяжелых и токсичных, проникают в грунтовые и сточные воды, а также в питьевую воду. Проблема очистки от комплексов металл-ЭДТА может быть решена микробиологическим способом. Выделенные чистые культуры, использующие ЭДТА в качестве источников углерода, азота и энергии, перспективны как деструкторы этого соединения.

Первые работы по деградации ЭДТА смешанными культурами относятся к 1975 г. Исследовали биodeградацию ( $^{14}\text{C}$ )ЭДТА и комплексов смешанной культурой из почвы и осадков озера Мичиган. Свежеотобранную почву и осадки инкубировали с ( $^{14}\text{C}$ )ЭДТА и его комплексами в аэробных условиях. За исключением комплекса с  $\text{Ni}^{2+}$ , деградация которого проходила медленно, хелаты с  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$ , добавленные к смешанной культуре успешно разлагались [84]. Показана 90%-

ная деструкция комплекса ( $^{14}\text{C}$ )ЭДТА с железом смешанной культурой в течение 5 сут при оптимальном значении pH 7.0–8.0 и комнатной температуре [85]. Дegrаdация ЭДТА проходила успешнее при щелочных значениях pH 8.0–9.0, ее эффективность возрастала до 50% [6].

Факультативные деструкторы *C. multitrophicus* DSM 9103 и *C. multitrophicus* BNC1 также ранее использовали для очистки сточных вод от ЭДТА [86]. В случае *C. multitrophicus* DSM 9103 при добавлении к сточным водам растворов щелочноземельных металлов проходила дegrаdация до 3.5 мМ ЭДТА, тогда как *Chelativorans multitrophicus* BNC1 разрушал до 16 мМ ЭДТА [58]. Имобилизованные клетки факультативного деструктора *C. multitrophicus* DSM 9103 использовали для определения низких концентраций ЭДТА, регистрируя скорость потребления кислорода [87]. Кроме того, недавно на основе иммобилизованных клеток облигатного деструктора *C. oligotrophicus* LPM-4 разработан биосенсор амперометрического типа, рабочий диапазон которого составил 0.1–4.0 мМ. Этот диапазон концентраций согласуется с физиологическими особенностями штамма LPM-4, который может использовать до 8 мМ ЭДТА.

Анализ доступной информации свидетельствует о наличии нескольких ЭДТА-деструкторов и детальном изучении первого этапа дegrаdации. Получены данные по транспорту ЭДТА в клетки деструкторов. Клонирован и секвенирован генный кластер, участвующий в дegrаdации этого вещества. Поскольку ЭДТА – исключительно техногенное соединение, появившееся в промышленных стоках относительно недавно, возникновение в природе штаммов, использующих ЭДТА в качестве единственного источника углерода, азота и энергии, свидетельствует о достаточно высокой скорости эволюционного процесса у бактерий, реализующих новые метаболические пути. Следовательно, облигатные и факультативные штаммы–деструкторы ЭДТА перспективны в качестве моделей для исследования механизмов адаптации бактерий к данному хелатону и для биоремедиации окружающей среды.

Работа выполнялась в рамках ГК 02.740.11.0296.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дятлова И.М., Темкина В.Я., Колпакова М.Д. Комплексоны и комплексонаты металлов. М.: Химия, 1988. 545 с.
2. Schwarzenbach G. // Helv. Chim. Acta. 1952. V. 35. P. 2344–2359.
3. Порой-Коненц М.А., Полюнова Т.Н. Координационная химия М.: Химия, 1984. 725 с.
4. Дятлова И.М., Темкина В.Я., Колпакова М.Д. Комплексоны. М.: Химия, 1970. 416 с.
5. Martell A.E., Smith, R.M. *Amino Acids*. New York: Plenum Press, 1974. V. 1. P. 469.
6. Bucheli-Witshel M., Egli T. // FEMS Microbiol Rev. 2001. V. 25. P. 69–106.
7. Munz F. Patent USA 2 130 505. 1938.
8. Nowack B., Van Briesen J.M. // Biogeochemistry of Chelating Agents. Eds B. Nowack and J.M. VanBriesen, ACS Symposium Series 910. Washington DC: Oxford Univ. Press for the Amer. Chem. Soc., 2005. P. 1–18.
9. Дедюхина Э.Г., Чистякова Т.И., Минкевич И.Г. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии. 2007. № 2. С. 40–49.
10. Дедюхина Э.Г., Салмов Н., Чистякова Т.И., Минкевич И.Г., Вайнштейн М.Б. // Вода: химия и экология. 2008. № 2. С. 31–34.
11. Wolf K., Gilbert P.A., Hutzinger O. // The Handbook of Environmental Chemistry. Berlin: Springer, 1992. V. 3. P. 241–259.
12. Sillanpaa M. // Rev. Environ. Contam. Toxicol. 1997. V. 152. P. 85–111.
13. Kechrid Z., Amamra S., Dahdouh F., Bouzerna N. // Iranian J. Publ. Health. 2007. V. 36. P. 15–21.
14. Eklund B., Bruno E., Lithner G., Borg H. // Environ. Toxicol. Chem. 2002. V. 21. № 5. P. 1040–1051.
15. Suss H.U. // Restaurator. 2009. V. 30. P. 245–279.
16. Акользин П.А., Герасимов В.В. Коррозия конструкционных материалов ядерных и тепловых энергетических установок. М.: Высшая школа. 1963. 350 с.
17. Means J.L., Alexander C.A. // Nucl. Chem. Waste Manag. 1981. V. 2. P. 183–196.
18. Macaskie L.E. // Crit. Rev. Biotechnol. 1991. V. 11. P. 41–112.
19. Toste A.P., Lechner-Fish T.J. // Waste Manag. 1993. V. 13. P. 237–244.
20. Manville I., Moser R. // AMA Atrch. Indust. Health. 1955. V. 12. P. 528–538.
21. Casdorff H.R. // J. Holistic Medicine. 1981. V. 3. № 1. P. 53–59.
22. Olszwer E., Carter J. // Medical Hypotheses. 1988. V. 27. P. 41–49.
23. Gordon G.F. // J. Holistic. Medicine. 1986. V. 8. P. 79–80.
24. Schroeder H.A. // Chronic Diseases. 1956. V. 4. P. 461–468.
25. Alakomi H.-L., Saarela M., Helander I. M. // Microbiology. 2003. V. 149. P. 2015–2021.
26. Ferris F.G., Beveidge T.J., Doyle R.J. // J. Metal Ions and Bacteria. 1989. V. 102. P. 295–323.
27. Yuan Z., VanBriesen J.M. // Environ. Eng. Scie. 2006. V. 23. P. 533–544.
28. Alder A.C., Siegrist H., Gujer W., Giger W. // Water Res. 1990. V. 24. P. 733–742.
29. Egli T. // J. Biosci. Bioeng. 2001. V. 92. P. 89–97.
30. Oviedo C., Rodriguez J. // Quim. Nova. 2003. V. 26. P. 901–905.

31. Nowack B., Xue H., Stigg L. // Environ. Sci. Technol. 1997. V. 31. P. 866–872.
32. Kari F.G., Giger W. // Environ. Sci. Technol. 1995. V. 29. P. 2814–2827.
33. Anderson R.L., Bishop E.B., Campbell R.L. // Crit. Rev. Toxicol. 1985. V. 15. P. 1–102.
34. Hugenschmidt, S., Planas-Bohne, F., Taylor D. // Arch. Toxicol. 1993. V. 67. P. 76–78.
35. Lanigan R.S., Yamarik T.A. // Int. J. Toxicol. 2002. V. 21. P. 95–142.
36. Kari F.G., Giger W. // Water Res. 1996. V. 30. P. 122–134.
37. Lockhart H.B., Blakeley R.V. // Environ. Sci. Technol. 1975. V. 9. P. 1035–1038.
38. Natarajan P. and Endicott J.F. // J. Phys. Chem. 1973. V. 77. P. 2049–2054.
39. Alarcón E., Decap J., Vidal G. // Electronic J. Biotechnol. 2005. V. 8. № 3. P. 308–313.
40. Селиверстов А.Ф., Ершов Б.Г., Лагунова Ю.О., Морозов П.А., Камруков А.С., Шапковский С.Г. // Радиохимия. 2008. Т. 50. С. 62–65.
41. Babay P.A., Emilio C.A., Ferreyra R.E., Gautier E.A., Gettar R.T., Litter M.I. // Int. J. Photoenergy. 2001. V. 3. P. 193–199.
42. Nörtemann B. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 51. P. 751–759.
43. Gilbert E., Hoffmann-Glewe S. // Water Res. WATRAG. 1990. V. 24. P. 39–44.
44. Motekaitis R., Cox III X.B., Taylor P., Martell A.E., Miles B. Tvedt T.J. // Can. J. Chem. 1982. V. 60. № 10. P. 1207–1213.
45. Udovic M., Lestan D. // Water Air Soil Pollut. 2007. V. 181. P. 319–327.
46. Palumbo A.V., Lee S.Y., Borman P. // Appl. Biochem. Biotechnol. 1994. V. 45/46. P. 811–822.
47. Chang H.S., Korshin G.V., Ferguson J.F. // Environ. Sci. Technol. 2006. V. 40. P. 5089–5090.
48. Nishikiori T., Okuyama T., Naganawa T., Takita T., Hamada M., Takeuchi Aouyagi T., Umezawa H. // J. Antibiot. 1984. V. 37. P. 426–427.
49. Auling G., Busse H.G., Egli T., El-Banna T., Stakebrandt E. // Syst. Appl. Microbiol. 1993. V. 16. P. 104–112.
50. Wilberg E., El-Banna T., Auling G., Egli T. // Syst. Appl. Microbiol. 1993. V. 16. P. 147–152.
51. Bolton H., Girvin D.C., Playmale A.E., Harvey S.D., Workman D.G. // Environ. Sci. Technol. 1996. V. 30. P. 931–938.
52. Сатрутдинов А.Д., Дедюхина Э.Г., Чистякова Т.И., Минкевич И.Г., Ерошин В.К. // Микробиология. 2003. Т. 72. № 1. С. 97–102.
53. Lauff J.J., Steele D.B., Coogan L.A., Breitfeller J.M. // Appl. Environ. Microbiol. 1990. V. 56. P. 3346–3353.
54. Young J.M., Kuykendall L.D., Martinez-Romero E., Kerr A., Sawada H. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001. V. 51. P. 89–103.
55. Miyzaki H., Suzuki S., Imada K. // Environ. Sci. 1997. V. 10. P. 257–262.
56. Imada C., Harada Y., Kobayashi T., Hamada-Sato N., Watanabe E. // Mar. Biotechnol. (NY) 2005. V. 7. P. 21–25.
57. Suzuki Y., Koyama N. // Biodegradation. 2009. V. 20. P. 39–44.
58. Nörtemann B. // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. P. 671–676.
59. Kluener T., Henneken L., Gehle M., Bruggenthies A., Norteman B., Hempel D.C. // Bioforum. 1994. V. 17. P. 284–288.
60. Yuan Z., VanBriesen J.M. // Biogeochemistry of Chelating Agents. Ed. B. Nowack, J.M. VanBriesen, ACS Symposium Series 910. Washington DC: Oxford Univ. Press for the Amer. Chem. Soc., 2005. P. 139–148.
61. Nörtemann B. // Biogeochemistry of Chelating Agents. Ed. B. Nowack, J.M. VanBriesen, ACS Symposium Series 910. Washington DC: Oxford Univ. Press for the Amer. Chem. Soc. 2005. P. 150–170.
62. Witschel M., Egli T., Wehrli E., Zehnder A., Spycher M. // Microbiology (UK). 1999. V. 154. P. 973–983.
63. Weilenmann H.-U., Engeli B., Bucheli-Witschel M., Egli T. // Biodegradation. 2004. V. 15. P. 289–301.
64. Satrutdinov A.D., Dedyukhina E.G., Chistyakova T.I., Witschel M., Minkevich I.G., Eroshin V.K., Egli T. // Environ. Sci. Technol. 2000. V. 34. P. 1715–1720.
65. Chen S.C., Chen S.-L., Fang H.Y. // Biores. Technology. 2005. V. 96. P. 1782–1787.
66. Chistyakova T.I., Belikova V.L., Satrutdinov A.D., Dedyukhina E.G., Eroshin V.K. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 19. P. 977–980.
67. Chistyakova T.I., Dedyukhina E.G., Satrutdinov A.D., Kaparullina E.N., Gavriush E.Yu., Eroshin V.K. // Proc. Biochem. 2005. V. 40. № 2. P. 601–605.
68. Thomas R.A.P., Lawlor K., Bailey M., Macaski L.E. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. P. 1319–1322.
69. Doronina N.V., Kaparullina E.N., Trotsenko Yu.A., Nörtemann B., Bucheli-Witschel M., Weilenmann H.-U., Egli T. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. P. 1044–1051.
70. Kaparullina E., Doronina N., Chistyakova T., Trotsenko Yu. // Syst. Appl. Microbiol. 2009. V. 32. № 3. P. 157–162.
71. Uetz T., Schneider R., Snozzi M., Egli T. // J. Bacteriol. 1992. V. 174. P. 1179–1188.
72. Uetz T., Egli T. // Biodegradation. 1993. V. 3. P. 423–434.
73. Knobel H.R., Egli T., Van den Meer J.R. // J. Bacteriol. 1996. V. 178. № 21. P. 6123–6132.
74. Witschel M., Nagel S., Egli T. // J. Bacteriol. 1997. V. 179. P. 6937–6943.
75. Payne J. W., Bolton H., Campbell J. A., Xun L. // J. Bacteriol. 1998. V. 180. P. 3823–3827.

76. Bohuslavek J., Payne J.W., Liu Y., Bolton H., Hun L. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. № 2. P. 688–695.
77. Nissen M.S., Youn B., Knowles B.D., Ballinger J.W., Jun S.Y., Belchik S.M., Hun L., Kang C. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 28710–28720.
78. Liu Y., Louie T. M., Payne J., Bohuslavek J., Bolton Jr. H., Hun L. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. P. 696–701.
79. Zhang H., Herman J.P., Bolton H., Zhang Z., Clark S., Hun L. // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. P. 7991–7997.
80. Доронина Н.В., Капаруллина Е.Н., Вайнштейн М.Б., Троценко Ю.А. // *Микробиология.* 2006. Т. 75. № 4. С. 420–423.
81. Капаруллина Е.Н., Федоров Д.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2008. Т. 44. № 4. С. 399–403.
82. Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А., Алферов В.А. // *Известия ТулГУ. Естественные науки.* 2010. № 2. С. 271–278.
83. Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Трилисенко Л.В., Вагабов В.М., Троценко Ю.А. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2009. Т. 45. С. 555–560.
84. Tiedje J.M. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1975. V. 30. P. 327–329.
85. Belly R.T., Lauff J.J., Goodhue C.T. // *Appl. Microbiol.* 1975. V. 29. P. 787–794.
86. Henneken L., Noertemann B., Hempel D.C. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. V. 44. P. 190–179.
87. Eroshin V.K., Satroutdinov A.D., Minkevich I.G., Deduykhina E.G., Chistykhova T.I., Reshetilov A.N. // *Process Biochem.* 2002. V. 38. P. 151–154.

## Aerobic Degradation of Ethylenediaminetetraacetate (Review)

E. N. Kaparullina, N. V. Doronina, and Yu. A. Trotsenko

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

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

Received December 17, 2010

**Abstract**—Literature data on the influence of complexing compound ethylenediaminetetraacetate (EDTA) on environmental and ecological risks related with its application were analyzed and summarized. Methods of abiotic and biotic degradation of EDTA were systemized. Special attention was paid to microbiological degradation of EDTA was paid. Data on EDTA transport and metabolism pathways in aerobic bacteria are represented. The practical aspects of application of aerobic bacteria-destroyers of EDTA in ecobiotechnology were discussed.