

УДК 579.841

ДЕГРАДАЦИЯ ЭДТА ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ НА БИОФИЛЬТРЕ КЛЕТКАМИ *Chelativorans oligotrophicus*

© 2012 г. Е. Н. Капаруллина, Н. В. Доронина, В. А. Ежов, Ю. А. Троценко

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

Поступила в редакцию 01.07.2011 г.

Получен биофильтр на основе керамзита и клеток облигатного деструктора этилендиаминтетрацетата (ЭДТА) *Chelativorans oligotrophicus* LPM-4. Культура стабильно поддерживала высокую активность ЭДТА-монооксигеназы в течение трех месяцев на уровне 180–200 нмоль мин/мг белка. На биофильтре объемом 2 дм³ при скорости протока 20 мл/ч достигнута полная конверсия ЭДТА при его концентрации 0.5–0.7 г/л и 80%-ная конверсия при исходной концентрации 2.0 г/л.

В настоящее время комплексообразующие агенты, такие, как аминокислоты (АПК), к которым относится ЭДТА, находятся под пристальным вниманием экологов [1]. Высокая персистентность ЭДТА приводит к накоплению его в окружающей среде и активизирует транспорт тяжелых и токсичных металлов, включая радионуклиды. ЭДТА широко применяется в целлюлозно-бумажной, пищевой, косметической и фармацевтической промышленности, производстве моющих средств, для промывки теплоэнергетического оборудования и во многих других областях [2, 3].

Уровни продаж ЭДТА в Европе достигают 200000 т ежегодно [1]. Появление в водоемах таких АПК, как ЭДТА и нитрилотриацетат (НТА), происходит, прежде всего, вследствие сбрасывания в водоемы сточных вод с предприятий бумажной промышленности. Часто фиксируемое количество ЭДТА и НТА в сточных и поверхностных водах находится в пределах 10–35 мг/л [1] и 10–500 мкг/л [4]. Поскольку производство бумаги, при котором не используются соединения хлора, растет, то ежегодное ожидаемое использование ЭДТА в бумажной промышленности составляет 65 тыс. т [4].

Согласно данным сайта www.chemeurope.com концентрация ЭДТА в реках Европы достигает 100 мг/л, в озерах — 10 мг/л, тогда как концентрация этого поллютанта в грунтовых водах США — 1–72 мг/л. Содержание ЭДТА в образцах морской воды составляет 0.3–3 мкг/л [5].

Загрязнение почв металлами широко распространено по всему миру. Токсичные металлы могут включаться в экологические циклы и вызывать хронические заболевания вследствие биоаккумуляции. Свойство ЭДТА активно связывать ионы металлов в комплексы широко применяется в ремедиации почв. ЭДТА не адсорбируется на

почвенных частицах и комплексы с металлами (свинец, кадмий, цинк) переходят в раствор [6]. Ремедиация почв с использованием до 60 мМ хелатов приводит к образованию большого количества отмывочных растворов с высокой концентрацией самих хелатов, которые нуждаются в более тщательной и эффективной обработке перед сбросом в окружающую среду [6].

АПК используются для обработки ядерных реакторов, поэтому присутствуют в загрязненных радионуклидами местах. Показано также, что ЭДТА увеличивает миграцию кобальта, тория, плутония и урана [7].

Комплексы ЭДТА с металлами характеризуются токсическим эффектом по отношению к водным организмам [8]. ЭДТА нарушает деление клеток, синтез хлорофилла и накопление биомассы водорослей. Масштабное применение ЭДТА или НТА (оба содержат азот) может увеличить эвтрофикацию водоемов [9].

Показано летальное воздействие ЭДТА в низких концентрациях (<100 мкМ) на клетки почечных крыс [8], подавлялся синтез белка из-за образования комплексов цинка и марганца в клетках печени после введения Ca²⁺ЭДТА. ЭДТА оказывал неблагоприятное воздействие на размножение и развитие млекопитающих, но безопасен при наружном применении, поэтому активно используется в косметической промышленности [10]. По данным ВОЗ, ежедневное потребление ЭДТА в концентрации 2.5 мг/кг не оказывает токсического действия на людей. Тем не менее, в ряде Западно-европейских стран и в Австралии запрещено использование ЭДТА в моющих средствах.

В целом, накопление заметных количеств ЭДТА и других комплексонов в окружающей среде создает серьезные экологические проблемы, поэтому актуален поиск эффективных штаммов —

деструкторов ЭДТА для разработки современных технологий биоремедиации экосистем и очистки промышленных стоков.

Микробный способ деструкции ЭДТА является наиболее перспективным, однако спектр бактерий, использующих ЭДТА в качестве источника углерода и энергии, весьма ограничен [11–14]. Особый интерес представляет облигатный деструктор ЭДТА *Chelativorans oligotrophicus* LPM-4 [14, 15] для создания биофильтра и локальной очистки стоков от этого поллютанта.

Цель работы – создание и испытание проточно-го биофильтра на основе иммобилизованных клеток *C. oligotrophicus* LPM-4 для деградации ЭДТА.

МЕТОДИКА

Объекты и условия культивирования. В работе использовали чистую культуру *C. oligotrophicus* LPM-4 (=ВКМ В-2395) [14].

Для выращивания бактерий и последующей сорбции клеток на биофильтре использовали среду следующего состава (г/л): $\text{Na}_4\text{ЭДТА}$ – 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1.0; KH_2PO_4 – 0.26; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.4; $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 0.84, pH 7.0, в которую добавляли 2 мл раствора микроэлементов (мг/л): $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 1.5; H_3BO_3 – 0.06; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.12; ZnCl_2 – 0.07; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.025; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.015; Na_2MoCl_4 – 0.025 и 0.025 мг/л биотина. Бактерий культивировали в колбах Эрленмейера объемом 750 мл с 200 мл среды в течение 4 сут на роторной качалке (120 об/мин) при 29°C.

Биофильтр для деструкции ЭДТА объемом 2 дм³ представлял собой стеклянный сосуд, заполненный промытым и высушенным керамзитом (1.7 кг сухого керамзита) с проложенным снизу и сверху слоем стекловолокна для равномерного распределения жидкости при подаче. Биофильтр стерилизовали при 1 атм 1 ч. Подачу минеральной среды осуществляли снизу с помощью перистальтических насосов LKB Bromma 1200 Varioprepex (“LKB”, Швеция) со скоростью 20–40 мл/ч, воздуха со скоростью 100 мл/ч компрессором Mison LP-1-1A Pump. Подаваемый воздух проходил через ротаметр и стерилизующий фильтр и далее поступал на биофильтр. Отработанный воздух и жидкость после прохождения через биофильтр накапливались в сборнике отработанной среды.

Клетки сорбировали на керамзите при комнатной температуре (21–23°C) при циркуляции суспензии бактерий со скоростью 100 мл/ч с исходной концентрацией, соответствующей 1.0 г высушенной биомассы/л. Сорбцию проводили в течение 14 сут, поддерживая концентрацию ЭДТА 1.0 г/л и pH, равный 7.0 (5.0%-ной H_2SO_4), при скорости пропускания воздуха 3 л/мин. Величину

клеточной нагрузки носителя измеряли, смывая биомассу с носителя и определяя ее массу после высушивания.

При циркуляции суспензии клеток в среде через биофильтр наблюдали обрастание частиц керамзита бактериями. Через 14 сут сорбция биомассы на керамзите стабилизировалась и достигала 19 г высушенной биомассы/дм³ керамзита. Далее через биофильтр пропускали свежую среду, постепенно изменяя концентрацию ЭДТА (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 г/л) и скорость подачи среды.

Количественный анализ содержания ЭДТА и промежуточных продуктов его биодеградации в стоке с биофильтра проводили с использованием колонки Separon Six C18 (“Tessek”, Чехия) и системы ВЭЖХ 2150 (“LKB”, Швеция) при 195 нм. Для анализа в колонку вводили 50 мкл образца. Скорость потока элюента (вода) составляла 0.4 мл/мин. В качестве метчика для построения калибровочной кривой использовали этилендиаминтетрауксусную кислоту (“Sigma”, США). Время удержания ЭДТА составляло 2.3–2.4 мин.

Эффективность биофильтра в отношении деградации ЭДТА на основе иммобилизованных клеток определяли по степени деструкции хелатона в жидкости.

В ходе эксперимента для определения активности монооксигеназы ЭДТА из биофильтра отбирали около 300 мг клеток. Клетки осаждали центрифугированием при 6000 g 15 мин, отмывали 0.05M трис-НСI буфером, pH 7.4, ресуспендировали в том же буфере и обрабатывали ультразвуком на аппарате Misonix S-4000 (США) мощностью 150 Вт при 20 кГц (6 × 30 с) при 4°C. Не разрушенные клетки и их фрагменты осаждали центрифугированием (10000 g, 40 мин), супернатант использовали в качестве бесклеточного экстракта для определения активности фермента в термостатированной кювете (1 см) при 30°C на регистрирующем спектрофотометре Shimadzu UV-1700 (“Shimadzu”, Япония). Активность ЭДТА-монооксигеназы в экстрактах клеток определяли по окислению НАДН₂ [16]. Реакционная смесь (2 мл) содержала (мкмоль): трис-НСI буфер, pH 8.0–5.0, флавиномононуклеотид (ФМН) – 0.5; Mg^{2+} ЭДТА – 40; НАДН₂ – 0.5; бесклеточный экстракт 50 мкл. Реакцию начинали добавлением Mg^{2+} ЭДТА. Удельную активность ЭДТА-монооксигеназы выражали, как количество наномолей окисленного НАДН₂ на 1 мг белка в мин. Содержание белка в бесклеточных экстрактах определяли модифицированным методом Лоури [17]. В работе использовали реактивы фирмы “Sigma” (США). В таблицах представлены средние результаты трех независимых анализов, ошибка не превышала 5%.

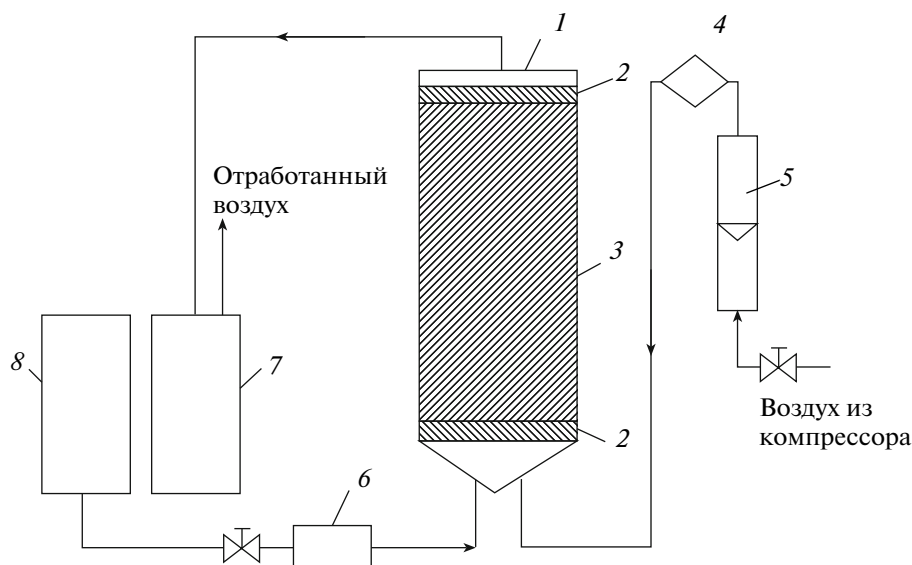


Рис. 1. Схема биофильтра для деградации ЭДТА.

1 – биофильтр, 2 – слой стекловолокна, 3 – слой керамзита, 4 – стерилизующий воздушный фильтр, 5 – ротаметр, 6 – перистальтический насос, 7 – сборник очищенного раствора, 8 – сосуд для среды с ЭДТА.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Аэробный облигатный деструктор ЭДТА *S. oligotrophicus* LPM-4, отвечает требованиям, предъявляемым к современным технологиям процесса биофильтрации: культура непатогенна, сохраняет высокую степень жизнеспособности после лиофилизации, а также в 25–45%-ном глицерине при -70°C в течение пяти лет. Лيوфилизованную культуру *S. oligotrophicus* LPM-4 высевали на агаризованную среду, а затем переносили в жидкую среду, содержащую 1.0 г/л ЭДТА, и инкубировали в оптимальных условиях. Клетки отделяли от среды центрифугированием, ресуспендировали в свежей среде, и аseptически иммобилизовали на биофильтре (рис. 1).

В первой серии опытов после 14 сут сорбции клеток на керамзите устанавливали непрерывный проток среды, содержащей 0.7 г/л ЭДТА, со скоростью 10 мл/ч. Через 5 сут скорость протока увеличивали до 20 мл/ч, а через 6 сут – до 40 мл/ч. Динамика содержания ЭДТА в жидкости на входе и выходе из биофильтра представлена в табл. 1. Показано, что при концентрации ЭДТА 0.7 г/л и скоростях протока 10–20 мл/ч на выходе из биофильтра ЭДТА в пробах отсутствовал, т.е. биоконверсия хелатона составляла 100%. При увеличении скорости протока до 40 мл/ч на выходе биофильтра оставалось 0.24 г/л ЭДТА, т.е. утилизировалось только 65%.

Во второй серии опытов, после наращивания культуры на биофильтре среду пропускали со скоростью 20 мл/ч, меняя концентрацию с ЭДТА от 0.5 до 2 г/л. Результаты представлены в табл. 2. Через 4 сут после подачи 0.5 г/л ЭДТА наблюдали

его полное потребление. При увеличении концентрации ЭДТА в подаваемой среде до 1.0 г/л через тот же промежуток времени в элюате оставалось 0.09 г/л ЭДТА, что соответствовало 91% потребления ЭДТА. При увеличении концентрации до 1.5 г/л ЭДТА через 3 сут в элюате было обнаружено 0.24 г/л ЭДТА, биоконверсия составила 84%.

На рис. 2 представлены хроматограммы (ВЭЖХ) промежуточных продуктов деградации ЭДТА – этилендиаминдиацетата (ЭДА) и иминодиацетата (ИДА), а также элюатов с биофильтра при потреблении ЭДТА. Обнаружено, что при циркуляции среды с концентрацией ЭДТА 1.0 г/л со скоростью 20 мл/ч в пробах элюата накопления промежуточных продуктов метаболизма не происходило, что свидетельствовало о полном его разложении клетками деструктора в биофильтре.

Ранее нами было показано, что штамм *S. oligotrophicus* LPM-4 окисляет ЭДТА с помощью фермента монооксигеназы, активной с НАДН₂ и стимулируемой ФМН и ИДА-оксидазой, участвующей в заключительном этапе разложения ЭДТА

Таблица 1. Потребление ЭДТА иммобилизованными клетками *S. oligotrophicus* LPM-4 в зависимости от скорости протока среды в биофильтре

Концентрация ЭДТА, г/л	Скорость протока, мл/ч			
	10	20	30	40
На входе	0.7	0.7	0.7	0.7
На выходе	0	0	0.13	0.24
Потребление, %	100	100	81	65

Таблица 2. Потребление ЭДТА иммобилизованными клетками *C. oligotrophicus* LPM-4 в зависимости от его концентрации при скорости протока среды через биофильтр 20 мл/ч

Концентрация ЭДТА, г/л		Потребление ЭДТА, %
исходная	конечная	
0.5	0	100
1.0	0.09	91
1.5	0.24	84
2.0	0.38	81

[18–19]. В ходе работы из биофильтра отбирали пробы, делали смыв клеток с керамзита и определяли активность ЭДТА-монооксигеназы, которая в среднем составляла 180–200 нмоль/мин мг белка, как в начале, так и в конце эксперимента. Это свидетельствует об активной регенерации клеток на биофильтре, что обеспечивает их достаточно высокую метаболическую активность.

При периодическом культивировании *C. oligotrophicus* LPM-4 на среде с 2.35 г/л ЭДТА Дедюхина с соавт. [20] наблюдали длительную (5 сут) лаг-фазу в динамике роста культуры. Методом обратных величин была рассчитана константа ингибирования, которая составила 2.2 г/л ЭДТА (8.05 мМ) [20]. В наших экспериментах при подаче на биофильтр среды с концентрацией ЭДТА 2.0 г/л лаг-фаза отсутствовала, но через 1 сут уровень остаточного ЭДТА составил 0.21 г/л, тогда как через 3 сут его концентрация в элюате увеличивалась до 0.38 г/л, а количество потребленного ЭДТА достигало 81%.

Следует отметить, что уровень ЭДТА в сточных водах и на очистных сооружениях обычно значительно ниже исследуемых нами модельных концентраций (от нескольких десятков мкг/л до 1 г/л) [2, 3]. В ходе проведенных испытаний биофильтр перерабатывал до 3.24 г ЭДТА за 4 сут при концентрации ЭДТА на входе 2.0 г/л и скорости протока 20 мл/ч, что соответствует производи-

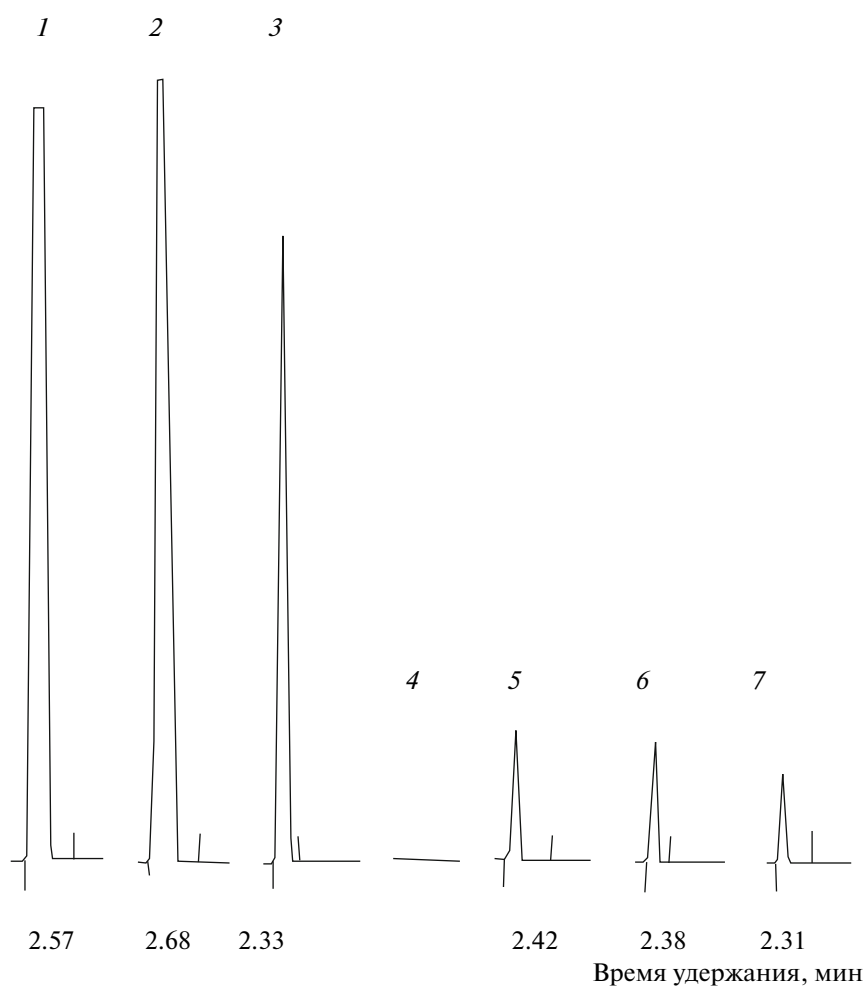


Рис. 2. ВЭЖХ элюата из биофильтра при концентрации ЭДТА на входе 1.0 г/л и скорости протока 20 мл/ч.

1 – ЭДТА, 1.0 г/л; 2 – ИДА, 1.0 г/л; 3 – ЭДТА, 1.0 г/л; 4 – минеральная среда без ЭДТА, 5–7 – элюат на 4, 5 и 6 сут.

тельности биофилтра по продукту 1.26 г ЭДТА/г высушенной биомассы сут или по объему 0.24 м³/м³ сут. Биофилтр стабильно функционировал в течение 3 месяцев. При периодическом культивировании оптимальной концентрацией для роста культуры *C. oligotrophicus* LPM-4 и потребления субстрата была концентрация 1.0 г/л ЭДТА, при иммобилизации культура эффективно разлагала значительно более высокие концентрации хелатона.

Таким образом, созданный лабораторный биофилтр с иммобилизованными клетками *C. oligotrophicus* LPM-4 может быть использован для последующего масштабирования процесса очистки стоков, содержащих ЭДТА.

Работа выполнялась в рамках ГК 02.740.11.0296.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sillanpaa M.E.T., Kurniawan T.A. Lo W.-H. // Chemosphere. 2011. V. 83. № 11. P. 1443–1460.
2. Bucheli-Witschel M., Egli T. // FEMS Microbiol. Rev. 2001. V. 25. № 1. P. 69–106.
3. Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 5. С. 508–522.
4. Pirkanniemi K., Metsarinne S., Sillanpaa M.E.T. // J. Hazard. Mater. 2007. V. 147. № 1. P. 556–561.
5. Kemmei T., Kodama S., Fujishima H., Yamamoto A. Inoue Y., Hayakawa K. // Analyt. Chim. Acta. 2012. V. 709. P. 54–58.
6. Pociacha M., Kastelec D., Lestan D. // J. Hazard. Materials. 2011. V. 192. № 2. P. 714–721.
7. Reinoso-Maset E., Worsfold P.J., Keith-Roach M. // Env. Pollution. 2012. V. 162. № 1. P. 399–405.
8. Hugenschmidt S., Planas-Bohne F., Taylor D. // Arch. Toxicol. 1993. V. 67. № 1. P. 76–78.
9. Wolf K., Gilbert P.A., Hutzinger O. // The Handbook of Environmental Chemistry. Berlin: Springer, 1992. V. 3. P. 241–259.
10. Lanigan R.S., Yamarik T.A. // Int. J. Toxicol. 2002. V. 21. № 2. P. 95–142.
11. Lauff J.J., Steele D.B., Coogan L.A., Breifeller J.M. // Appl. Environ. Microbiol. 1990. V. 56. № 11. P. 3346–3353.
12. Noertemann B. // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. № 2. P. 671–676.
13. Chistyakova T.I., Belikova V.L., Satroudinov A.D., Deduykhina E.G., Eroshin V.K. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 19. № 6. P. 977–980.
14. Doronina N.V., Kaparullina E.N., Trotsenko Y.A., Noertemann B., Bucheli-Witschel M., Weilenmann H.-U., Egli T. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. № 5. P. 1044–1051.
15. 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.
16. Witschel M., Nagel S., Egli T. // J. Bacteriol. 1997. V. 179. № 22. P. 6937–6943.
17. Schacterle L.B., Pollack R.L. // Anal. Biochem. 1973. V. 51. № 2. P. 654–655.
18. Доронина Н.В., Капаруллина Е.Н., Вайнштейн М.Б., Троценко Ю.А. // Микробиология. 2006. Т. 75. № 3. С. 420–423.
19. Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А., Алферов В.А. // Известия Тульского гос. университета. Естественные науки. 2010. № 2. С. 271–278.
20. Дедюхина Э.Г., Салмов Н.Н., Чистякова Т.И., Минкевич И.Г., Вайнштейн М.Б. // Вода: химия и экология. 2008. № 2. С. 31–34.

EDTA Degradation by Cells of *Chelativorans oligotrophicus* Immobilized on a Biofilter

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

Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences,
pr. Nauki 5, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

Received July 1, 2011

Abstract—A biofilter based on light expanded clay aggregate (LECA) and cells of the obligate ethylenediamine tetraacetate (EDTA) destructor *Chelativorans oligotrophicus* LPM-4 has been developed. The culture steadily maintained a high level of EDTA monoxygenase activity of 180–200 nmol/min/mg of protein during three months. EDTA was converted completely or by 80% at initial concentrations of 0.5–0.7 or 2.0 g/l, respectively, in a 2-dm² biofilter at a flow rate of 20 ml/h.