

УДК 576.809.5

ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ АКТИВНОГО ИЛА ПИЛОТНОЙ УСТАНОВКИ АНАЭРОБНОГО ОКИСЛЕНИЯ АММОНИЯ

© 2013 г. М. Н. Козлов, М. В. Кевбрина, А. Г. Дорофеев, Е. А. Казакова, В. А. Грачёв, Д. Ю. Поляков, В. Г. Асеева, Ю. А. Николаев

ОАО “Мосводоканал”, Москва

Поступила в редакцию 12.02.2013 г.

Исследован липидный состав микробного сообщества активного ила пилотного реактора, осуществляющего анаэробное окисление аммония (процесс анаммокс) на Курьяновских очистных сооружениях (г. Москва). Основная часть жирнокислотного состава (95%) представлена традиционными жирными кислотами C_{14} – C_{18} как нормального, так и изостроения. В биомассе активного ила установлено наличие липидов, содержащих т.н. ладдерановые вещества (“лестничные” спирты и жирные кислоты), характерные для анаммокс-бактерий: C_{20} -[3]-ладдерановый и C_{20} -[5]-ладдерановый спирты, C_{18} - и C_{20} -[3]-ладдерановая и C_{18} - и C_{20} -[5]-ладдерановые кислоты. Кроме того, в нативном (негидролизованном) экстракте обнаружены простые и сложные эфиры этих веществ с остатками фосфохолина, фосфоэтанолamina, фосфоглицерина. Для некоторых соединений получены и публикуются впервые спектры электронного удара и tandemной масс-спектрометрии.

DOI: 10.7868/S0555109913050061

Бактерии – основные участники самой масштабной биотехнологии – очистки сточных вод, которая в ее современном виде, с использованием активного ила, создана 100 лет назад [1]. Развитие этой биотехнологии связано с успехами микробиологии и биохимии. Одной из недавно открытых и только внедряемых в настоящее время биотехнологий удаления азота из воды является процесс анаэробного окисления аммония – анаммокс (anaerobic ammonia oxidation), открытый в 90-х годах прошлого века [2]. В этом процессе аммоний окисляется нитритом микроорганизмами, входящими в группу Planctomycetes и обладающих рядом уникальных физиологических и морфологических признаков. Процесс анаммокс обнаружен во многих экотопах – в очистных сооружениях, в заболоченных почвах, в морях и океанах, в том числе – в арктических [2–4]. Технология на основе автотрофного удаления азота представляет собой комбинацию двух процессов: частичной нитрификации, в ходе которой половина аммония окисляется до нитрита, и анаэробного окисления аммония нитритом (собственно процесс Анаммокс). Технология анаммокс реализована на многих очистных сооружениях Европы, Азии и США. ОАО Мосводоканал в настоящее время проводит первые в России полупромышленные испытания этой технологии. Испытания прошли стадии получения накопительной культуры анаммокс-бактерий и лабораторного реактора [5.] В настоящее время функционирует пилотная установка производительностью 900 л/сут, очищаю-

щая фильтрат, получаемый от сгущения сброженного осадка [6].

Важной характеристикой любых микроорганизмов является их липидный состав. У анаммокс-бактерий обнаружены уникальные липиды – т.н. ладдерановые (лестничные) липиды (от англ. *ladder* – лестница), в составе которых имеются сконденсированные циклобутановые структуры [7].

Цель работы – исследование липидного состава активного ила биореактора, осуществляющего анаэробное окисление аммония.

МЕТОДИКА

Активный ил пилотного реактора, осуществляющего анаэробное окисление аммония в фильтрате сброженного осадка сточных вод Курьяновских очистных сооружений г. Москвы [6], обладающий высокой анаммокс-активностью, собирали отстаиванием в течение 1 ч, центрифугировали (1000 g, 5 мин) для отделения избыточного количества воды и использовали для исследования липидов.

Подготовка образцов для анализа. Липиды экстрагировали двумя способами. Способ 1. К осадку после центрифугирования (5 мл) добавляли 5 мл смеси дихлорметана и метанола в соотношении 1 : 1 [8], встряхивали 2 мин в закрытой пробирке и переносили в стеклянный центрифужный стаканчик. Нижний слой после центрифугирования (1000 g, 5 мин) собирали в чистую емкость. Процедуру экстракции той же порции

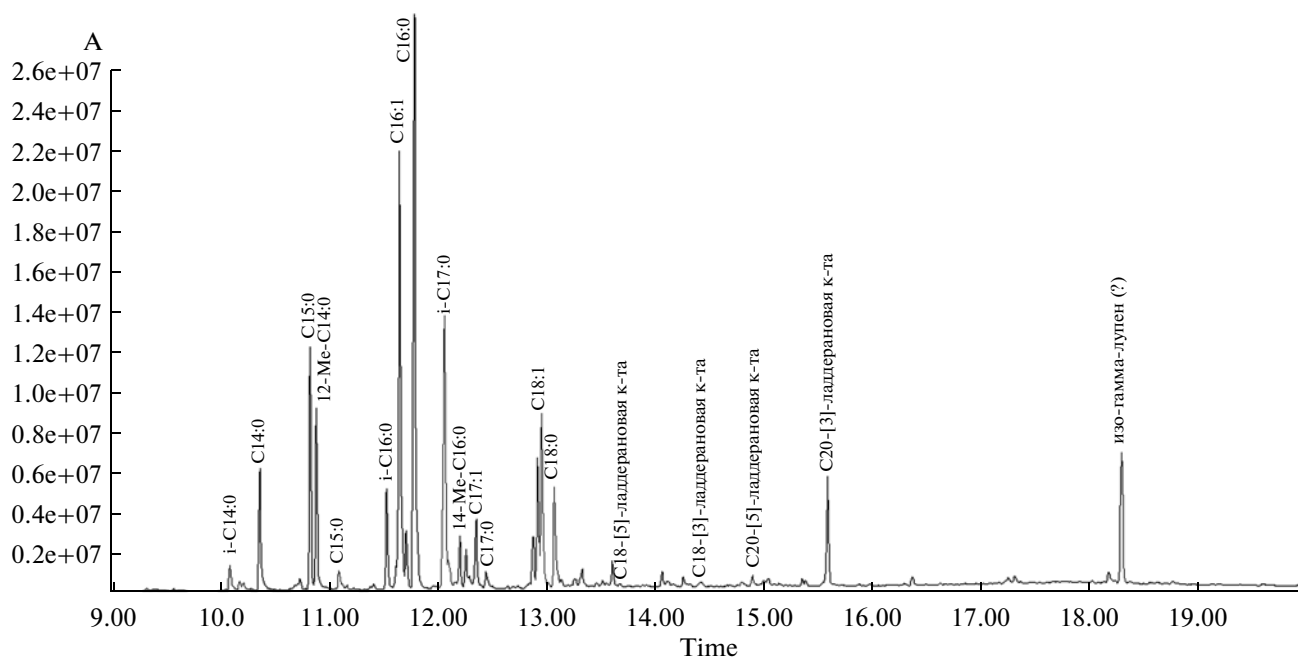


Рис. 1. Хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот активного ила.

осадка повторяли и объединяли две порции нижних слоев жидкости, после чего их упаривали досуха под азотом при комнатной температуре. Способ 2. К осадку после центрифугирования (5 мл) добавляли 5 мл метанола, встряхивали 2 мин в закрытой пробирке и центрифугировали (1000 g, 5 мин). Супернатант отбрасывали, осадок экстрагировали дважды 5 мл метил-*трет*-бутилового эфира (МТБЭ) при обработке ультразвуком в ультразвуковой бане Branson 1510 (“Branson” США) в течение 5 мин, после чего упаривали экстракт досуха под азотом при комнатной температуре.

Получение метиловых эфиров жирных кислот. К упаренному экстракту (полученному 1 или 2 способом), содержащему 1 мг вещества, добавляли 400 мкл раствора трифторида бора в метаноле (“Aldrich”, США), нагревали в закрытой емкости при 80°C в течение 1 ч. К охлажденной реакционной массе добавляли последовательно по 400 мкл воды и гексана, встряхивали в закрытой пробирке 2 мин, отстаивали в течение 5 мин, собирали верхнюю гексановую вытяжку. Процедуру повторяли. Две гексановые вытяжки объединяли.

Получение силиловых эфиров. К упаренному экстракту (полученному 1 или 2 способом), содержащему 1 мг вещества, добавляли 150 мкл N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамида (БТМСФА) (“Supelco”, США), нагревали в закрытой емкости при 80°C в течение 30 мин. К охлажденной реакци-

онной массе добавляли 400 мкл МТБЭ, раствор использовали для анализа.

Газовая хромато-масс-спектрометрия (ГХ-МС). Исследование проводили на хромато-масс-спектрометре модели 6890/5975N фирмы “Agilent Technologies” (США). Хроматографическая колонка: DB-5ms фирмы “Agilent Technologies” (США) диаметром 0.25 мм, с толщиной слоя неподвижной фазы 0.25 мкм и длиной 30 м. Температура инжектора 280°C. Режим инжектора — “без деления потока”. Газ-носитель — гелий, скорость потока 40 см/с. Температурный режим программировали: изотерма 70°C в течение 1 мин, нагрев со скоростью 15°C/мин до 320°C и выдержка при данной температуре 15 мин. Температура квадруполя 150°C, ионного источника 230°C, интерфейса 280°C. Объем вводимой пробы 1 мкл. Масс-спектры разделенных веществ регистрировали в режиме электронного удара в диапазоне массовых чисел 34–900 а.е.м.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Исследование проводили на жидкостном хромато-масс-спектрометре модели Accella/LTQ Velos фирмы “Thermo Fisher Scientific” (США). Хроматографическая колонка: Hypersil Gold C18 50 × 2 мм с размером частиц сорбента 3 мкм фирмы “Thermo Fisher Scientific” (США). Разделение проводили в градиентном режиме повышения концентрации метанола (с добавлением 0.01% муравьиной кислоты) в водном растворе

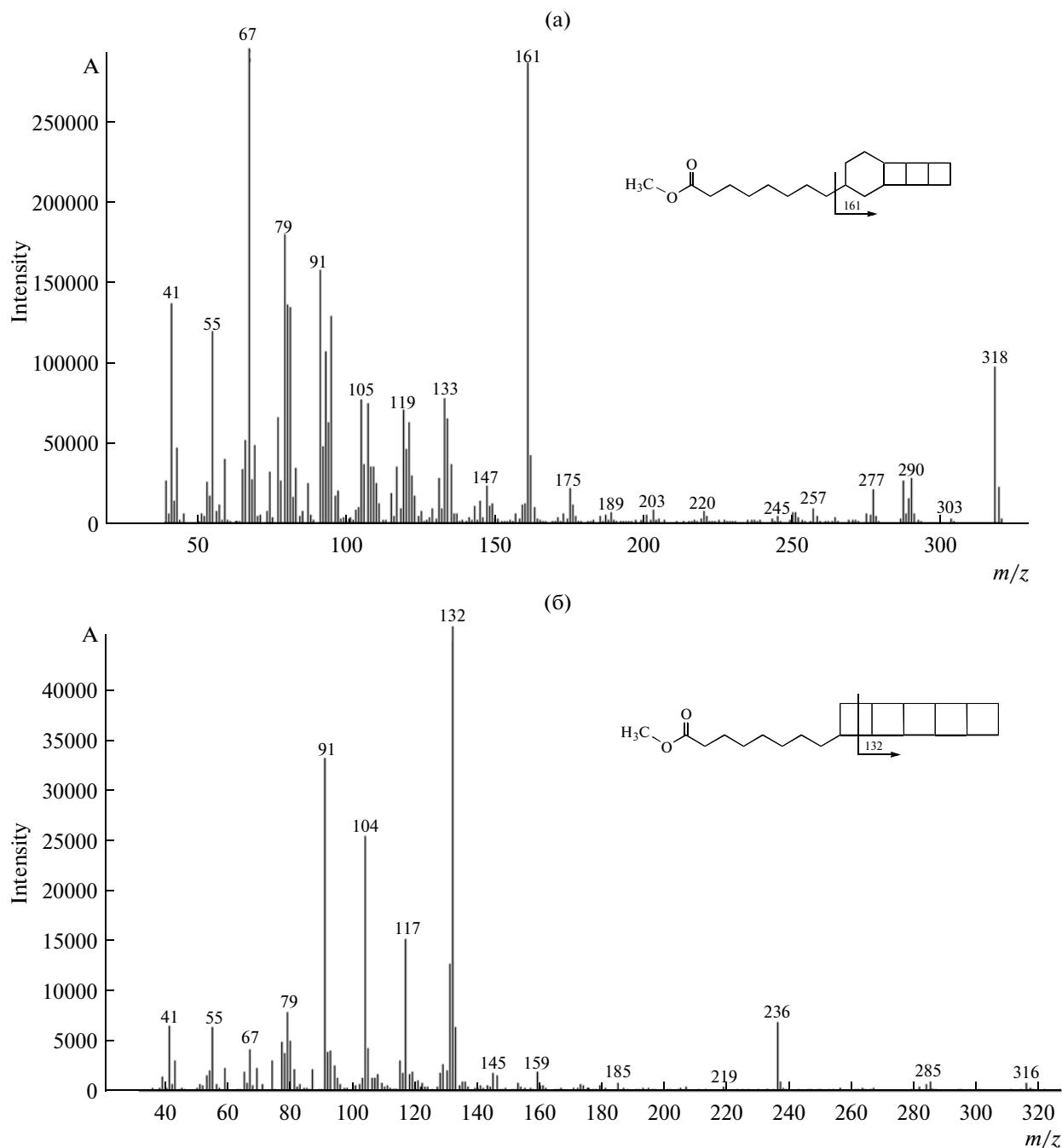


Рис. 2. Масс-спектры веществ со временами удерживания ($t_{уд}$) 15.6 мин (соответствует метилому эфиру C_{20} -[3]-ладдерановой кислоты [9]) (а) и с $t_{уд} = 14.9$ мин (соответствует метилому эфиру C_{20} -[5]-ладдерановой кислоты [9]) (б). Формулы представлены на врезке к рисункам.

формата аммония (0.005 М) и муравьиной кислоты 0.05% с 40 до 100% за 10 мин и выдержки 100%-ной концентрации метанола до 20 мин. Скорость потока 0.25 мл/мин. Источник ионизации – нагреваемый электроспрей (Н-ESI). Расход обдувающего газа – 50 усл. ед., вспомогательного газа – 5 усл. ед. Потенциал распыления 5 кВ. Температура капилляра 275°C, нагревателя –

300°C. Режим масс-селективного детектирования – “Data Dependent Scan” в диапазоне массовых чисел от 150 до 1000 а.е.м. Нормализованная энергия соударений в режиме МС/МС (танDEMная масс-спектрометрия) равна 35%, окно изоляции ионов 2.0 а.е.м., коэффициент активации $Q = 0.25$, время активации 10 мс.

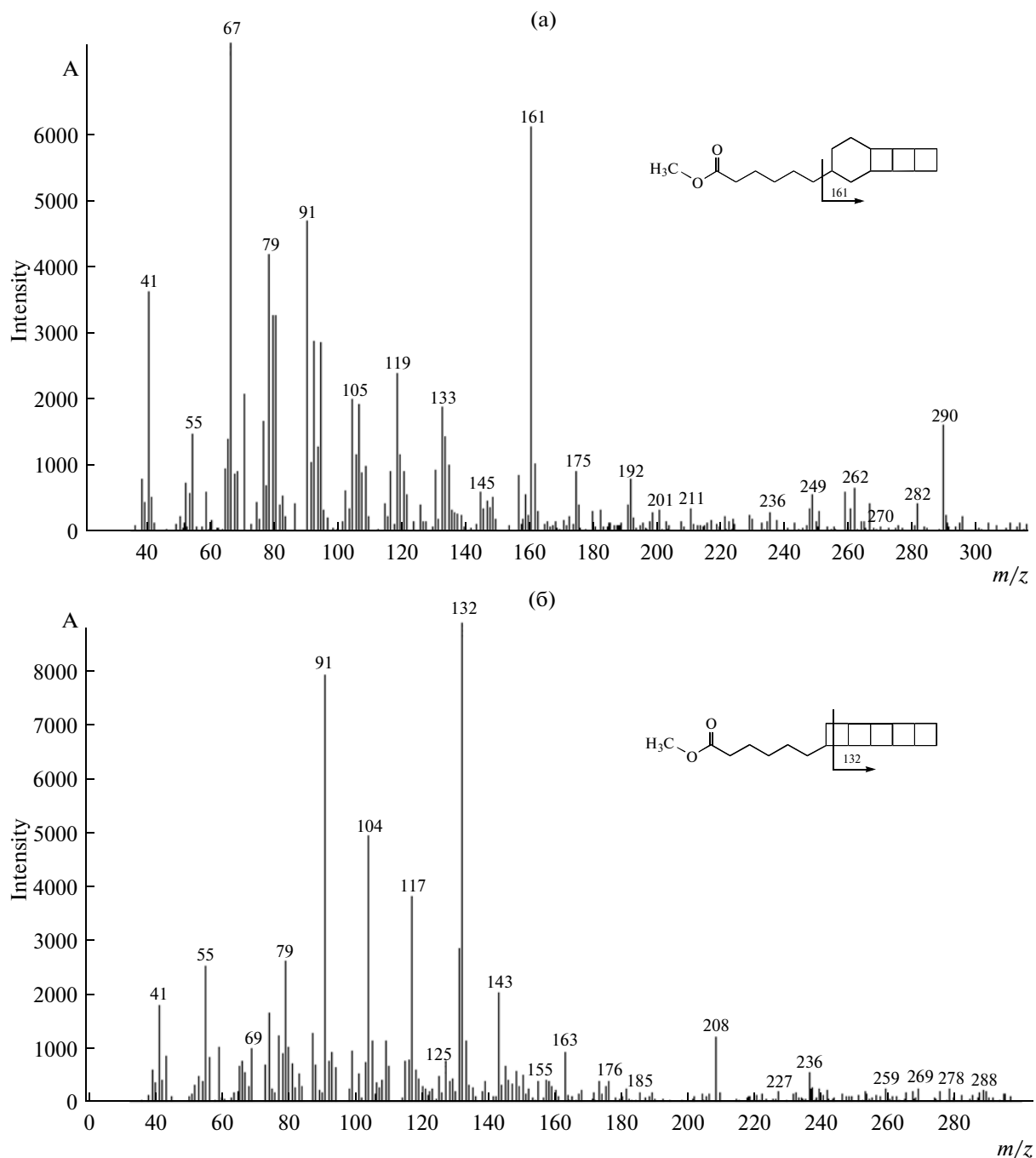


Рис. 3. Масс-спектры веществ с $t_{уд} = 14.4$ мин, метиловый эфир C_{18} -[3]-ладдерановой кислоты, (а) и с $t_{уд} = 13.68$ мин, метиловый эфир C_{18} -[5]-ладдерановой кислоты (б). Данные спектры получены впервые.

Идентификацию веществ проводили с использованием масс-спектральных библиотек NIST08, Wiley8n.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Хроматограмма метилированного экстракта, записанная по полному ионному току и потому

отражающая соотношение традиционных и ладдерановых липидов, приведена на рис. 1. Основная часть жирнокислотного состава представлена традиционными жирными кислотами C_{14} – C_{18} как нормального, так и изоостроения. На хроматограммах также присутствуют жирные кислоты рядов [3]-ладдерана и [5]-ладдерана (составляющие до 5% от общего количества липидов), спектры ко-

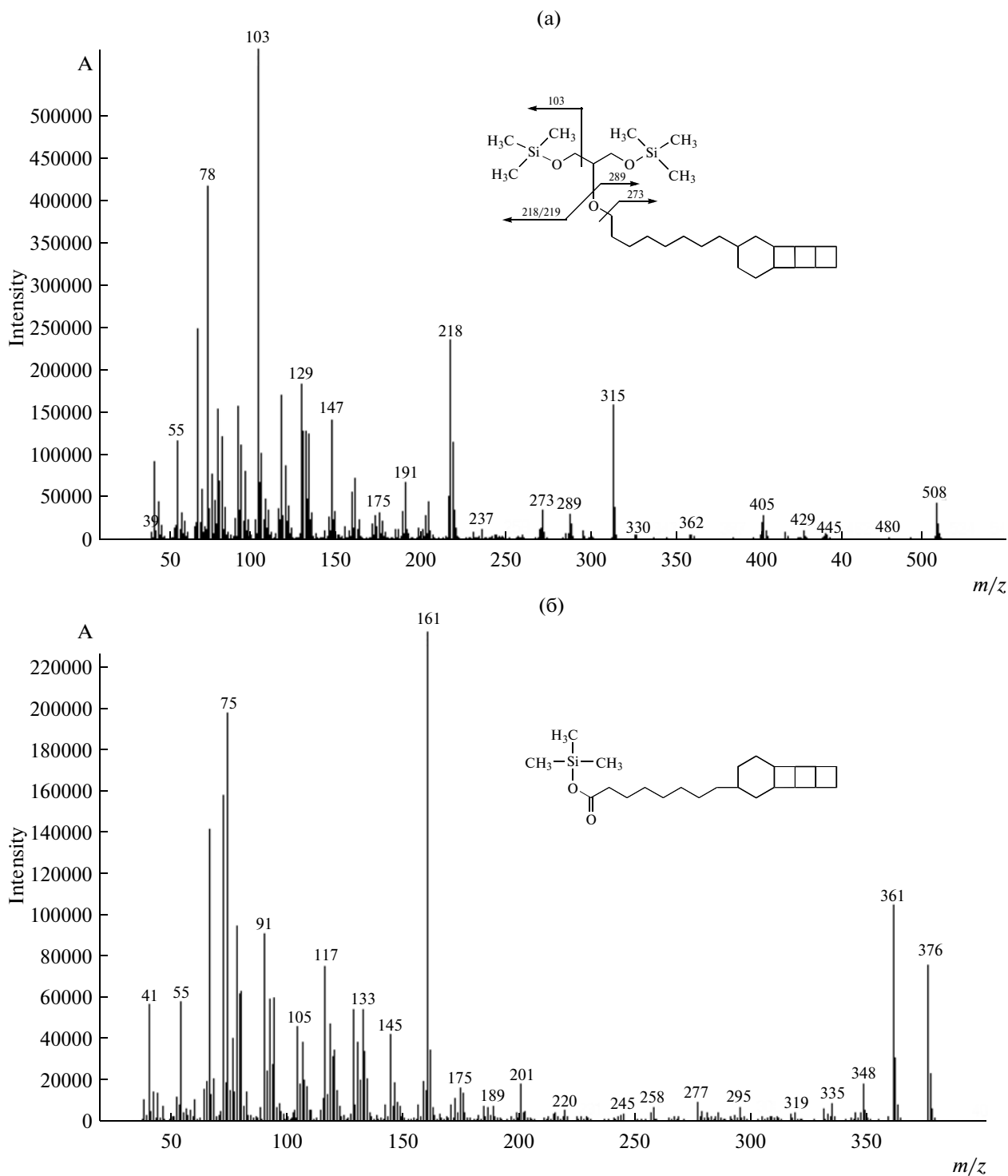


Рис. 4. Масс-спектры ТМС-производного веществ с $t_{уд} = 18.15$ мин, соответствует эфиру глицерина и C_{20} -[3]-ладдеранового спирта [9], (а) и ТМС-производного C_{20} -[3]-ладдерановой кислоты, (б).

торых приведены на рис. 2 и 3, при этом содержание [5]-ладдерановых кислот ниже, чем [3]-ладдерановых кислот.

При исследовании силильных производных обнаружены: эфир глицерина и C_{20} -[3]-ладдеранового спирта (рис. 4а) и свободная C_{20} -[3]-ладдерано-

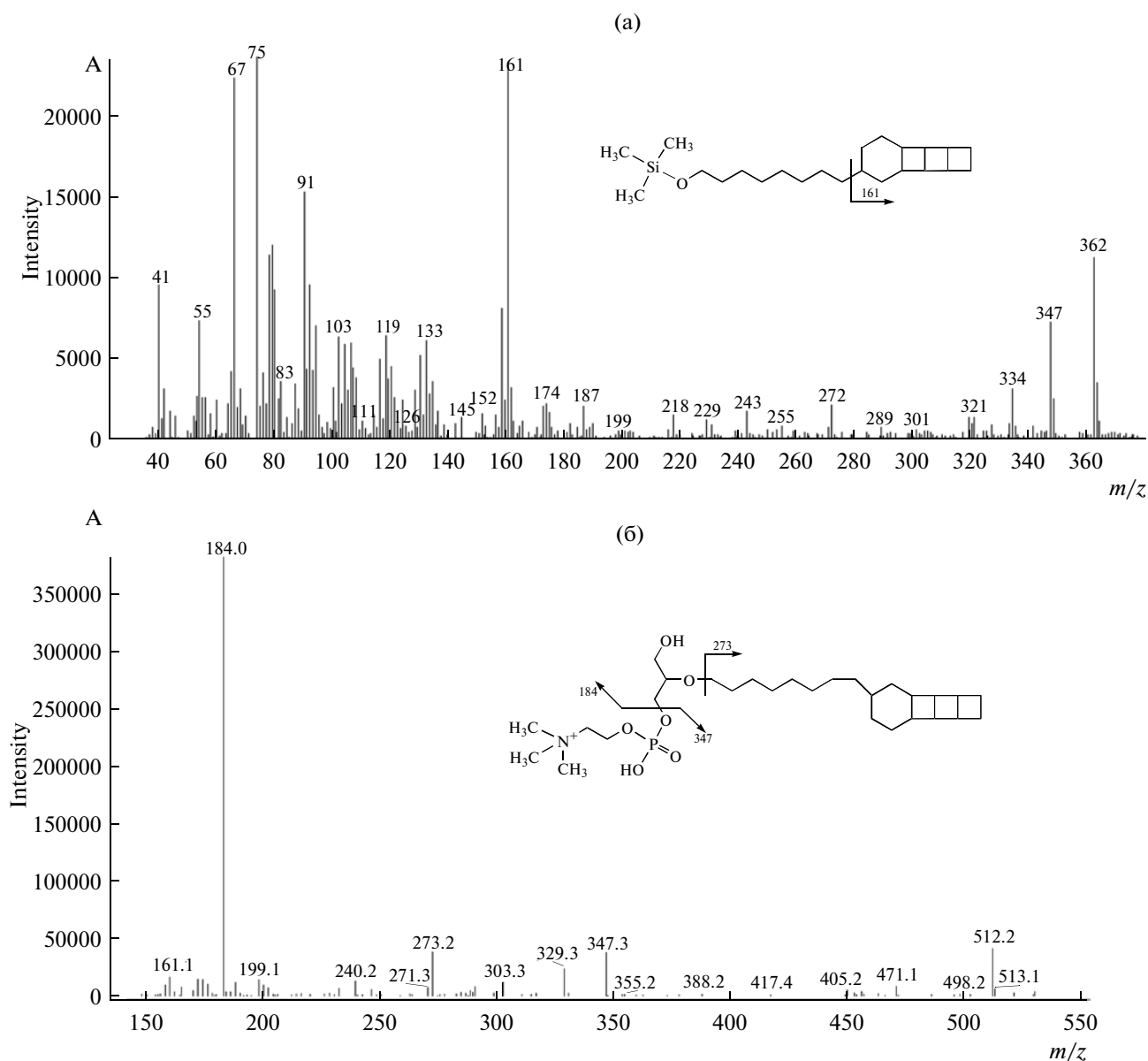


Рис. 5. Масс-спектр ТМС-производного C_{20} -[3]-ладдеранового спирта [9], (а) и спектр МС/МС глицерофосфолинового эфира C_{20} -[3]-ладдеранового спирта ($M^+ m/z = 530.3$), (б).

вая кислота (рис. 46). Последнее вещество также содержится в омыляемой фракции липидов.

Аналогичным образом были идентифицированы изомеры C_{20} -[5]-ладдерановой кислоты с молекулярной массой 374 Да и характеристичными ионами в спектре: 132, 104, 91 ($c t_{уд} = 15.5-15.6$ мин).

При анализе липидных экстрактов активного ила с использованием жидкостной хроматографии был применен метод тандемной масс-спектрометрии (МС/МС или МС², МС³ и т.д.), когда наиболее интенсивные ионы в спектре подвергаются фрагментации соударением (т.н. collision induced dissociation), при этом получившиеся дочер-

ние ионы также могут подвергаться дальнейшей фрагментации. Данный метод позволяет устанавливать наличие тех или иных относительно простых фрагментов с известной структурой в молекулах более сложной структуры.

Этим методом были обнаружены фосфолипиды на основе ладдерановых кислот и C_{20} -[3]-ладдеранового спирта (рис. 5а). На ВЭЖХ-МС хроматограммах обнаружены вещества с молекулярными ионами 382, 488, 519 и 530 а.е.м. При анализе спектров МС/МС монозамещенных глицерофосфо-[3]-ладдеранов сделан вывод, что ха-

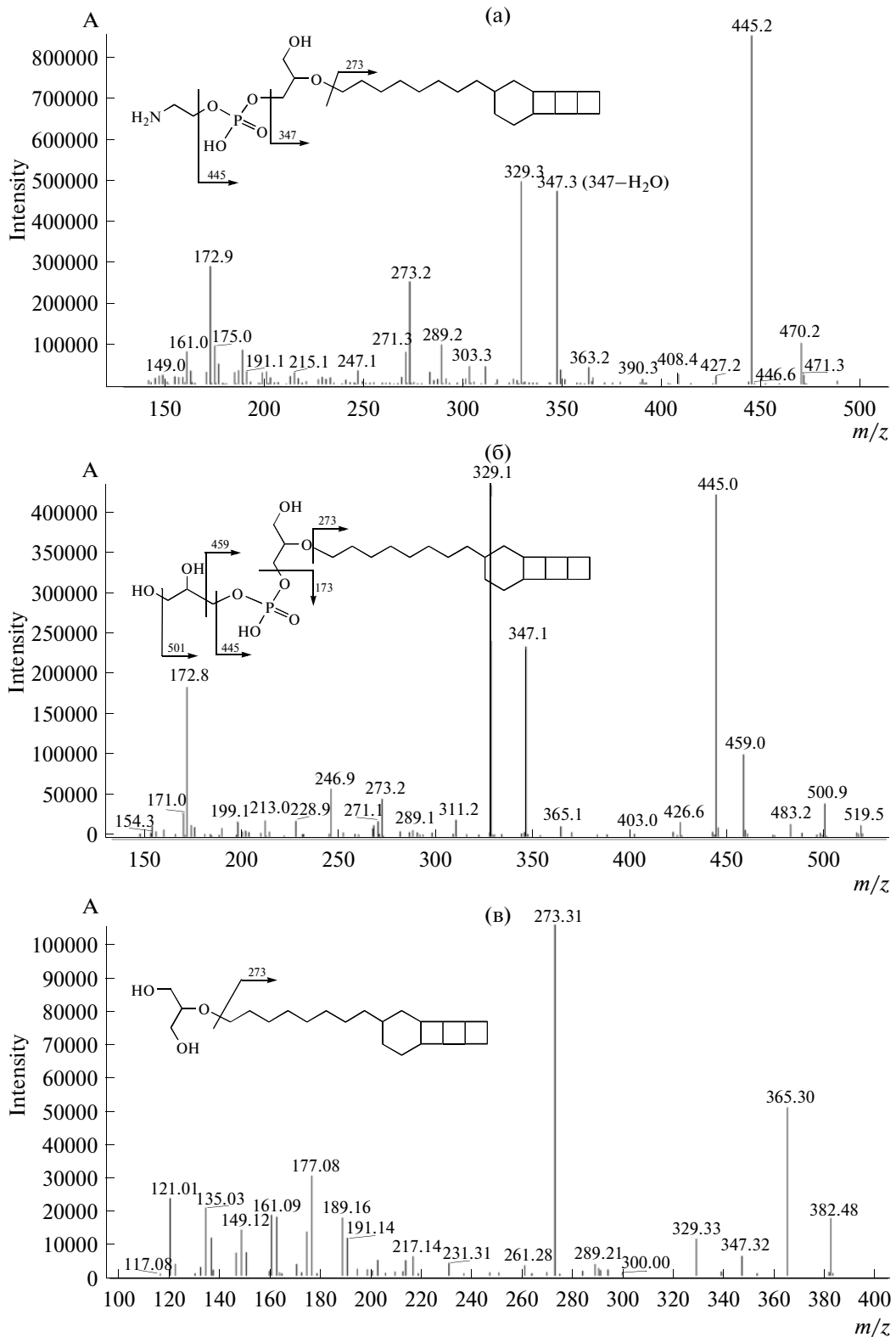


Рис. 6. Спектры МС/МС глицерофосфоэтаноламинового эфира C₂₀-[3]-ладдеранового спирта (а, [M + H]⁺ m/z = 488.3), глицерофосфоглицеринового эфира C₂₀-[3]-ладдеранового спирта (б, [M + H]⁺ m/z = 519, характерный отрыв глицерофосфата: 519–172 = 347), глицеринового эфира C₂₀-[3]-ладдеранового спирта (в, [M + NH₄]⁺ m/z = 382).

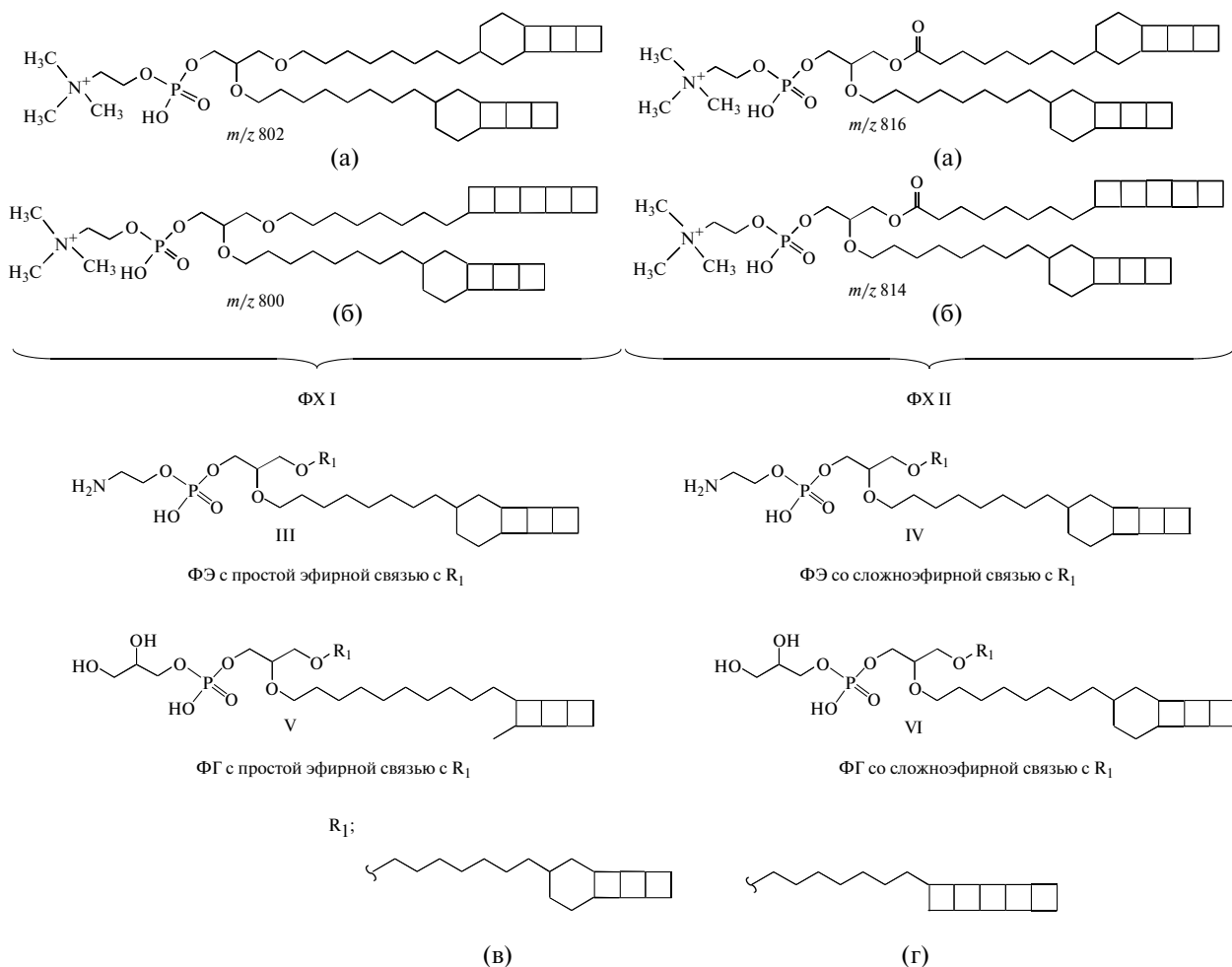


Рис. 7. Структурные формулы ладдерановых липидов фосфатидного ряда (см. таблицу) [12, 13].

рактистичными ионами для них являются ионы с m/z 273, 329 и 347 (рис. 5б).

Согласно литературным данным [10, 11], интенсивный ион m/z 184 для вещества, спектр которого представлен на рис. 5б, и МС/МС – расщепление этого иона указывает на присутствие в составе молекулы остатка фосфохолина. Потеря нейтральной частицы с массой 141 ($488 \rightarrow 347$) характерна для остатка фосфоэтаноламина. Таким образом были идентифицированы вещества с $t_{уд} = 14.73$ мин (глицерофосфохолиновый эфир C_{20} -[3]-ладдеранового спирта – рис. 5б) и с $t_{уд} = 14.15$ мин (глицеро-фосфоэтаноламинный эфир C_{20} -[3]-ладдеранового спирта – рис. 6а). При записи ВЭЖХ-МС-хроматограммы по ионам с m/z 519.3 и 382.3 идентифицированы глицерофосфоглицериновый эфир C_{20} -[3]-ладдеранового спирта (рис. 6б) и глицериновый эфир C_{20} -[3]-ладдеранового спирта (рис. 6в).

В литературе описаны ладдерановые липиды фосфатидного ряда [12, 13], которые были обнаружены методом ВЭЖХ-МС (рис. 7) в анаммокс-бактериях различных видов.

Нами были предприняты попытки поиска таких соединений с использованием метода ВЭЖХ-МС/МС. Мы также учитывали возможность присутствия в экстрактах диглицеридов, не содержащих фосфатную группу, т.е. простых или сложных эфиров. На основе данных [12, 13] были определены целевые ионы с отношением m/z , характерные для фосфолипидных производных ладдеранов. В таблице представлены результаты поиска ладдерановых липидов в экстрактах активного ила биореактора анаммокс. Хроматограмма и спектр МС/МС некоторых фосфатидных производных (предположительно, фосфатидилхолин- C_{20} -[3]-ладдерана – IIа и фосфатидилхолин- C_{20} -[5]-ладдерана – IIб) приведены на рис. 8.

Таким образом, в биомассе активного ила пилотной установки анаэробного окисления аммо-

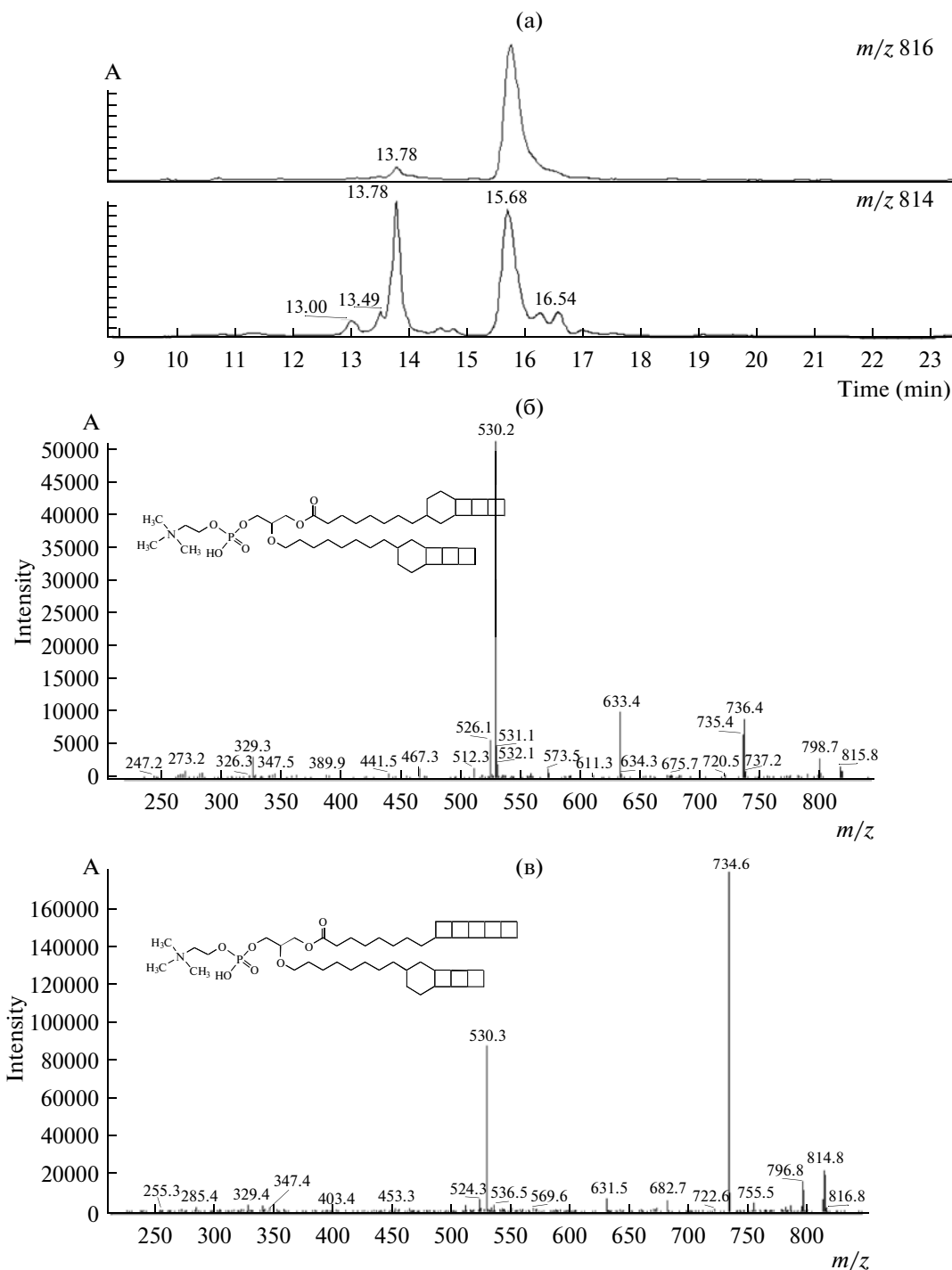


Рис. 8. Хроматограммы, записанные по характерным ионам m/z 816 и 814 (а), и спектры МС/МС веществ с молекулярными ионами m/z 816 (б) (соответствует веществу Ia) и 814 (в) (соответствует веществу Ib).

ния обнаружены липиды ладдеранового ряда, составляющие по массе до 5% всех липидов. Обнаружение ладдерановых липидов согласуется с наличием значительного количества биомассы анаэробных бактерий. В работе впервые приведены масс-спектры электронного удара и тандемной масс-спектрометрии ряда ладдерановых ли-

пидов, их метильных и триметилсилильных производных.

Несмотря на то что содержание ладдерановых липидов было невелико, не более 5% от общего содержания липидов, с учетом того факта, что они входят в состав активного ила, который на

Химические формулы и молекулярные массы различных ладдерановых производных фосфатидной кислоты

| Тип липида* (по рис. 7) | Брутто-формула радикала R ₁ | Молекулярная масса, Да | Вещество обнаружено или не обнаружено** |
|----------------------------|---|------------------------|---|
| ФХ (Ia) | C ₂₀ H ₃₃ | 802 | + |
| ФХ (Iб) | C ₂₀ H ₃₁ | 800 | + |
| ФХ (IIa) | C ₂₀ H ₃₁ O | 816 | + |
| ФХ (IIб) | C ₂₀ H ₂₉ O | 814 | + |
| ФЭ (IIIв) | C ₂₀ H ₃₃ | 759 | – |
| ФЭ (IIIг) | C ₂₀ H ₃₁ | 757 | – |
| ФЭ (IVв) | C ₂₀ H ₃₁ O | 773 | + |
| ФЭ (IVг) | C ₂₀ H ₂₉ O | 771 | + |
| ФГ (Vв) | C ₂₀ H ₃₃ | 790 | + |
| ФГ (Vг) | C ₂₀ H ₃₁ | 788 | – |
| ФГ (VIв) | C ₂₀ H ₃₁ O | 804 | – |
| ФГ (VIг) | C ₂₀ H ₂₉ O | 802 | – |
| ДГ (в) | C ₂₀ H ₃₃ | 636 | + |
| ДГ (г) | C ₂₀ H ₃₁ | 634 | + |
| ДГ (в) | C ₂₀ H ₃₁ O | 650 | – |
| ДГ (г) | C ₂₀ H ₂₉ O | 648 | – |

* ФХ – фосфохолин, ФЭ – фосфоэтаноламин, ФГ – фосфоглицерин, ДГ – диглицерид.

** “+” – вещество обнаружено, “–” – вещество не обнаружено в настоящей работе.

очистных сооружениях образуется в больших количествах и является отходом, можно прогнозировать возможность получения таких липидов в значимых количествах как для целей их исследования, так и практического применения. Прогнозируется возможность применения ладдерановых липидов в оптоэлектронике [14].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ardern E., Lockett W.T.* // J. Soc. Chem. Ind. 1914. V. 33. № 10. P. 523–539.
2. *Kuenen J.G.* // Microbiology. 2008. V. 6. № 4. P. 320–326.
3. *Jetten M.S.M., Strous M., van de Pas-Schoonen K.T., Schalk J., van Dongen U.G.J.M., Van De Graaf A.A., Logemann S., Muyzer G., van Loosdrecht M.C.M., Kuenen J.G.* // FEMS Microbiology Reviews. 1999. № 2. V. 22. P. 421–437.
4. *Humbert S., Tarnawski S., Fromin N., Mallet M.-P., Aragno M., Zopfi J.* // ISME J. 2010. V. 4. № 2. P. 450–454.
5. *Николаев Ю.А., Данилович Д.А., Козлов М.Н., Мойжес О.В., Дедыш С.Н., Казакова Е.А., Грачев В.А., Дорофеев А.Г., Асеева В.Г.* // Вода: химия и экология. 2009. № 12. С. 10–15.
6. *Данилович Д.А., Козлов М.Н., Мойжес О.В., Николаев Ю.А., Казакова Е.А.* // Водоснабжение и санитарная техника. 2010. № 4. С. 49–54.
7. *Sinninghe Damsté J.S., Strous M., Rijpstra W.I.C., Hopmans E.C., Geenevasen J.A.J., Van Duin A.C.T., Van Niftrik L.A., Jetten M.S.M.* // Nature. 2002. V. 419. № 5. P. 708–712.
8. *Hopmans E.C., Kienhuis M.V.M., Rattray J.E., Jaeschke A., Schouten S., Sinninghe Damsté J.S.* // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2006. V. 20. № 14. P. 2099–2103.
9. *Sinninghe Damsté J.S., Rijpstra W.I.C., Geenevasen J.A.J., Strous M., Jetten M.S.M.* // FEBS J. 2005. V. 272. № 16. P. 4270–4283.
10. *Welti R.* // The Arabidopsis Book. Rockville: MD. Amer. Soc. Plant Biol. 2010. doi: 10.1199/tab.0133, www.aspb.org/publications/arabidopsis.
11. *Little J.L., Wempe M.F., Buchanan C.M.* // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2006. V. 833. № 2. P. 219–230.
12. *Boumann H.A., Hopmans E.C., van de Leemput I., Op den Camp H.J.M., van de Vossenberg J., Strous M., Jetten M.S.M., Sinninghe Damsté J.S., Schouten S.* // FEMS Microbiol. Lett. 2006. V. 258. № 2. P. 297–304.
13. *Lanekoff I.* Analysis of Phospholipids in Cellular Membranes with LC and Imaging Mass Spectrometry // Thesis Doc. Philos. Department of Chemistry, University of Gothenburg, Göteborg, Sweden, 2011.
14. *Shivaraman N., Shivaraman G.* // Curr. Sci. 2003. V. 84. № 12. P. 1507–1508.

Lipid Composition of Activated Sludge in a Pilot Plant for Anaerobic Ammonium Oxidation

M. N. Kozlov, M. V. Kevbrina, A. G. Dorofeev, E. A. Kazakova, V. A. Grachev, D. Yu. Polyakov, V. G. Aseeva, and Yu. A. Nikolaev

OAO Mosvodokanal, Moscow, Russia

Received February 12, 2013

Abstract—The lipid composition of the microbial community inhabiting activated sludge in a pilot reactor for the anaerobic oxidation of ammonium (anammox) at the Kur'yanovo Treatment Plant (Moscow) has been studied. The fatty acid composition is mostly based on common fatty acids C₁₄–C₁₈ (95%) with both normal and isomeric structures. The biomass of activated sludge was found to contain lipids with the so-called ladderane substances (ladder alcohols and fatty acids) that are common for anammox bacteria: C₂₀-[3]-ladderane and C₂₀-[5]-ladderane alcohols and C₁₈- and C₂₀-[3]-ladderane and C₁₈- and C₂₀-[5]-ladderane acids. In addition, the native extract contained both simple and compound ethers of the above-mentioned substances with residues of phosphocholine, phosphoethanolamine, and phosphoglycerine. The spectra of the electron impact and tandem mass spectrometry of certain substances have been obtained and published for the first time.