

Р. К. Нагорный, Е. М. Глушень, А. С. Самсонова

Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА МИКРОБНОГО «ТЭАМИН» НА ЕГО ДЕСТРУКТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ ТРЕТИЧНЫХ АМИНОВ

*В статье приведены результаты изучения деструктивной активности культур *Rhodococcus qingshengii* НСТ-32, *Rhodococcus jialingiae* НСТ-91 и препарата «Тэамин» в отношении триэтиламина, триметиламина и диметилэтиламина. Установлено, что уровень деструктивной активности исследуемых культур и препарата, полученных на среде Мейнелла ниже, чем у культур, полученных на средах с аминами, но является достаточным для эффективной регенерации абсорбционных растворов, образующихся при абсорбционно-биохимической очистке воздушных потоков от данных ксенобиотиков. Обоснование возможности использования среды Мейнелла для получения исследуемых штаммов и препарата «Тэамин» исключает необходимость использования дорогих и токсичных сред, содержащих амины.*

► **Ключевые слова:** триэтиламин, триметиламин, диметилэтиламин, микроорганизм-деструктор.

Введение

Загрязнение природных и производственных сред триметиламином (ТМА), триэтиламином (ТЭА) и диметилэтиламином (ДМЭА) отрицательно сказывается на здоровье персонала промышленных предприятий, на которых реализуются технологические процессы с использованием данных веществ. Выбросы токсикантов в атмосферу, наряду с другими поллютантами, вредят жителям населенных пунктов, расположенных вблизи предприятий [1–3]. Тенденция к распространению в литейном производстве cold-box-amin процесса обуславливает актуальность данной проблемы [4]. Локальная биологическая очистка сточных вод и абсорбционных растворов от ТМА, ТЭА и ДМЭА с использованием высокоактивных микроорганизмов-деструкторов является перспективным способом удаления данных ксенобиотиков, значительно превосходящим по эффективности традиционные физико-химические методы [1]. В связи с вышесказанным, разработка технологии микробной очистки водных растворов от ТМА, ТЭА и ДМЭА представляется актуальной задачей.

Для решения данной проблемы нами из природной среды выделены штаммы *Rhodococcus qingshengii* НСТ-32 и *Rhodococcus jialingiae* НСТ-91 – высокоактивные деструкторы ТМА, ТЭА и ДМЭА [5–9]. На их основе разработан не имеющий мировых аналогов препарат микробный «Тэамин», предназначенный для очистки сточных вод и абсорбционных растворов от данных ксенобиотиков [10].

Одним из важнейших этапов разработки экономически эффективных технологий производства микробных препаратов являются оптимизация качественного и количественного состава питательных сред, обеспечивающих достижение максимального выхода биомассы составляющих их микроорганизмов. С экономической точки зрения наиболее приемлемым источником углерода является сахароза в составе мелассы свекловичной – отхода сахарного производства. По этой причине широко используемая в микробной биотехнологии питательная среда Мейнелла с мелассой в качестве источника углерода является оптимальной для культивирования штаммов *Rh. qingshengii* НСТ-32 и *Rh. jialingiae* НСТ-91.

С другой стороны, в мировой практике получения биопрепаратов-деструкторов органических веществ установлено, что для культивирования составляющих их микроорганизмов оптимальным является использование питательных сред, содержащих подлежащий удалению ксенобиотик в качестве единственного источника углерода. Такой подход позволяет получить культуры с наибольшей начальной деструктивной активностью и исключить длительный период адаптации к новому расточному субстрату. Однако получение значительных объемов таких культур, основанное на использовании сред с ТМА, ТЭА и ДМЭА, сопряжено с рядом проблем:

1) высокая стоимость ТМА, ТЭА и ДМЭА по сравнению с традиционно используемыми в биотехнологии источниками углерода (сахароза в составе мелассы) и азота (соли аммония и нитраты);

2) токсичность и высокая летучесть данных ксенобиотиков, обуславливает необходимость принятия мер по созданию особых условий для безопасной работы персонала биотехнологического производства, что требует материальных затрат;

3) основность ТМА, ТЭА и ДМЭА, приводящая к коррозии оборудования и обуславливающая необходимость использования минеральных кислот в значительных количествах для обеспечения оптимального количества водородных ионов в составе питательных сред;

4) ТМА, ТЭА и ДМЭА не являются универсальными ростовыми субстратами для различных культур, в то время как традиционные источники углерода, такие как меласса свекловичная, могут быть использованы для получения широкого спектра биопрепаратов.

В связи с вышесказанным, нами рассмотрена возможность использования для культивирования исследуемых штаммов дешевой и нетоксичной среды Мейнелла с мелассой свекловичной в качестве источника углерода, а также минеральных сред с ТМА, ТЭА и ДМЭА с последующим сравнением деструктивной активности полученных культур в отношении данных ксенобиотиков.

Таким образом, целью работы является изучение влияния состава среды культивирования штаммов *Rh. qingshengii* НСТ-32, *Rh. jialingiae* НСТ-91 и созданного на их основе препарата микробного «Тэамин» на их деструктивную активность в отношении ТМА, ТЭА и ДМЭА.

Объекты и методы исследований

Объектами исследования явились: штамм-деструктор ТЭА *Rh. qingshengii* НСТ-32; штамм-деструктор ТЭА, ТМА и ДМЭА *Rh. jialingiae* НСТ-91; микробный препарат «Тэамин».

Получение культур *Rh. qingshengii* НСТ-32, *Rh. jialingiae* НСТ-91 и микробного препарата «Тэамин» проводили с использованием жидких и агаризованных питательных сред:

1. Полусинтетическая среда Мейнелла с мелассой свекловичной в качестве источника углерода (в г/дм³): меласса свекловичная – 30,0; К₂НРО₄ – 7,0; КН₂РО₄ – 3,0; MgSO₄×7H₂O – 0,1; (NH₄)₂SO₄ – 1,5; цитрат натрия – 0,5; pH 7,0–7,2. Использовалась меласса с массовой долей сахарозы 43,0 %.

2. Разработанные нами синтетические среды, содержащие ТМА, ТЭА либо ДМЭА, где каждый из ксенобиотиков является единственным источником углерода и азота. Минеральная основа среды (в г/дм³): NaH₂PO₄×2H₂O – 1,6; КН₂РО₄ – 1,0; MgSO₄×7H₂O – 0,8; pH 7,0–7,5.

Изучение процесса деструкции ТМА, ТЭА и ДМЭА культурами *Rh. qingshengii* НСТ-32, *Rh. Jialingiae* НСТ-91 и микробным препаратом «Тэамин» проводили в периодических условиях культивирования в колбах Эрленмейера (объем 500,0 см³) на термостатированных орбитальных шейкерах при частоте колебания платформы 160 об/мин. и температуре 28,0 °С. Исследуемые культуры и препарат «Тэамин» вносились в очищаемую среду до достижения исходного титра клеток 1×10⁷ КОЕ/см³.

О деструктивной активности препарата «Тэамин» в отношении ТМА, ТЭА и ДМЭА судили на основании снижения концентрации токсикантов в среде культивирования. Образцы для контроля отбирали с интервалом 10 мин. Отобранные образцы подвергали воздействию ультразвука с использованием прибора Sonifier-450 (Branson, США) при следующих режимах: мощность – 0,05 кВт; температура – 4,0 °С; продолжительность – 600 импульсов по 0,5 с; после чего их центрифугировали 15 мин. при 15 000 g. Остаточное содержание ксенобиотиков в супернатанте определяли на жидкостном хроматографе Agilent 1200 с масс-детектором Agilent 6410 Triple Quad. Разделение компонентов в анализируемых образцах проводили на колонке Zorbax XDB C18 (4,6×50 мм; 1,8 мкм) при температуре 25,0 °С. Объем инъекции составлял 0,002 см³. Подвижные фазы: А – 0,1 %-й водный раствор трифторуксусной кислоты, фаза В – ацетонитрил. Использовали изократический режим элюирования 2,0 % фазы В. Скорость течения элюента – 0,5 см³/мин. Интерфейс ионизации – электроспрей Agilent G1948В API-ES в режиме положительных ионов. Для проведения анализа использовали режимы полного сканирования (MS2-Scan) в диапазоне масс от 30,0 до 200,0 Да. Параметры работы детектора: температура осушающего газа – 300,0 °С, скорость потока осушающего газа – 10,0 дм³/мин., давление на распылителе – 30 psi, напряжение на капилляре – 4000,0 В, напряжение на фрагменторе – 60,0 В. Анализ хроматограмм и масс-спектров проводили с использованием компьютерного обеспечения Agilent MassHunter Workstation Software version B.01.03 (Agilent Technologies Inc., США).

Результаты и их обсуждение

Изучение деструктивной активности штамма *Rh. qingshengii* НСТ-32 в отношении ТЭА позволило установить, что она зависит от способа культивирования данного микроорганизма. Использование среды Мейнелла с мелассой позволяет получить культуру, утилизирующую данный ксенобиотик в концентрации 100,0 мг/см³ за 10 часов (рис. 1). Культура *Rh. qingshengii* НСТ-32, полученная на среде с ТЭА утилизирует, ксенобиотик в 2 раза быстрее (за 5 часов).

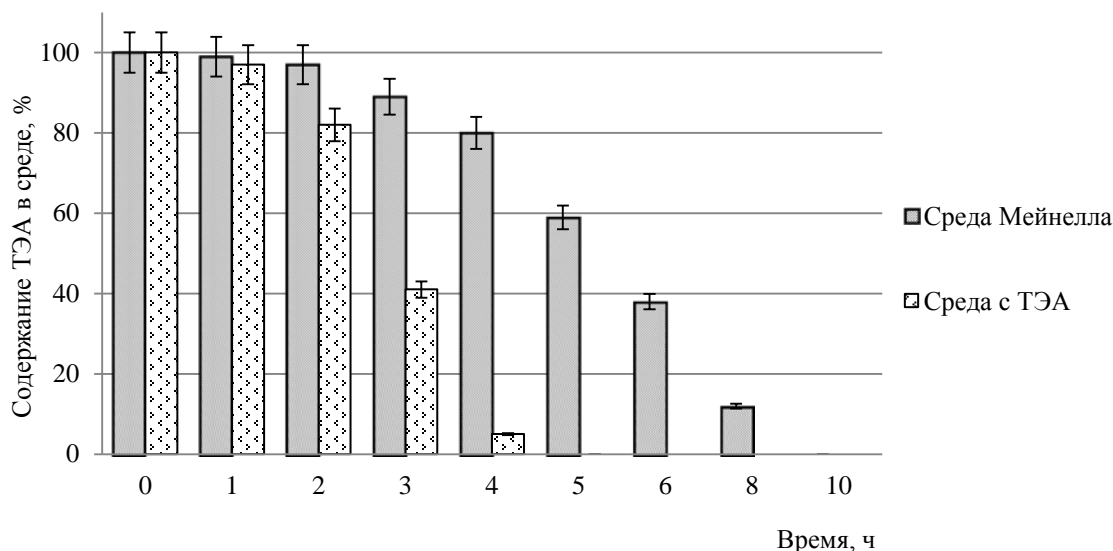


Рисунок 1 – Утилизация ТЭА в концентрации 100,0 мг/см³ культурами *Rh. qingshengii* НСТ-32, полученными на среде Мейнелла и минеральной среде с ТЭА

Следует отметить, что культура *Rh. qingshengii* НСТ-32 полученная на среде Мейнелла, несмотря на меньшую деструктивную активность, в сравнении с культурой, полученной на среде с ТЭА, превосходит по данному показателю мировые аналоги. Анализ состава абсорбционных растворов в абсорбционно-биохимических установках по очистке воздушных потоков от ТЭА, функционирующих на крупных машиностроительных предприятиях республики (ОАО «Минский автомобильный завод», ОАО «Тракторный завод», ОАО «Могилевлифтмаш»), позволил установить, что концентрация токсиканта 100,0 мг/см³ является характерной для данных очистных сооружений. В связи с вышесказанным, уровень деструктивной активности культуры *Rh. qingshengii* НСТ-32 полученной на среде Мейнелла является достаточным для эффективной регенерации абсорбентов, содержащих данный ксенобиотик.

В результате проведенных исследований установлено, что ТЭА в концентрациях 1000,0 и 10 000,0 мг/л утилизируется культурой *Rh. qingshengii* НСТ-32, полученной на среде Мейнелла, за 48 и 144 часа, соответственно. Использование среды с ТЭА позволяет получить культуру *Rh. qingshengii* НСТ-32, утилизирующую токсикант в аналогичных концентрациях за 20 и 72 часа, соответственно (рис. 2, 3).

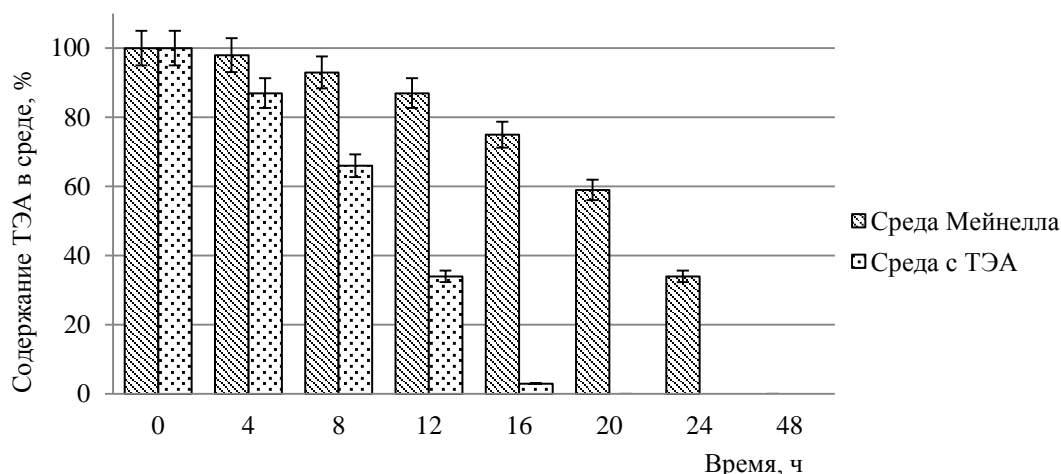


Рисунок 2 – Утилизация ТЭА в концентрации 1000,0 мг/см³ культурами *Rh. qingshengii* НСТ-32, полученными на среде Мейнелла и минеральной среде с ТЭА

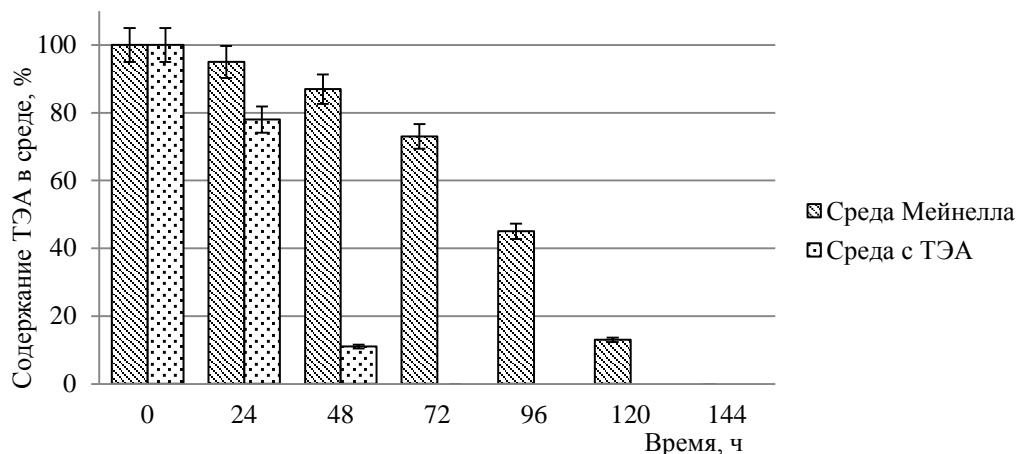


Рисунок 3 – Утилизация ТЭА в концентрации 10000,0 мг/см³ культурами *Rh. qingshengii* НСТ-32, полученными на среде Мейнелла и минеральной среде с ТЭА

Изучение деструктивной активности штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 в отношении ТЭА, ТМА и ДМЭА позволило выявить аналогичную закономерность: культуры, полученные на среде Мейнелла, характеризуются меньшей деструктивной активностью (табл. 1).

Таблица 1

Сроки утилизации ТЭА, ТМА и ДМЭА культурой *Rh. jialingiae* НСТ-91 в зависимости от способа ее получения

Утилизируемый ксенобиотик	Концентрация, мг/дм ³	Сроки полной утилизации, ч	
		Культура <i>Rh. jialingiae</i> НСТ-91, полученная на среде Мейнелла	Культура <i>Rh. jialingiae</i> НСТ-91, полученная на среде с соответствующим амином
ТЭА	100	12	6
	1000	72	48
	10 000	144	96
ТМА	100	12	6
	1000	72	48
	10 000	144	96
ДМЭА	100	10	6
	1000	72	48
	10 000	120	96

Препарат микробный Тэамин, полученный в результате совместного глубинного культивирования штаммов *Rh. qingshengii* НСТ-32 и *Rh. jialingiae* НСТ-91 на среде Мейнелла, также уступает по уровню деструктивной активности препарат, полученный на средах с аминами (табл. 2).

Таблица 2

Сроки утилизации ТЭА, ТМА и ДМЭА препаратом «Тэамин» в зависимости от способа его получения

Утилизируемый ксенобиотик	Концентрация, мг/дм ³	Сроки полной утилизации, ч	
		Препарат «Тэамин», полученный на среде Мейнелла	Препарат «Тэамин», полученный на среде с соответствующим амином
ТЭА	100	10	5
	1000	72	18
	10 000	120	96
ТМА	100	14	8
	1000	72	30
	10 000	144	96
ДМЭА	100	12	8
	1000	72	30
	10 000	144	96

Несмотря на превосходящую деструктивную активность в отношении ТМА, ТЭА и ДМЭА культур *Rh. qingshengii* НСТ-32, *Rh. jialingiae* НСТ-91 и препарата «Тэамин», полученных на средах с данными ксенобиотиками, использование среды Мейнелла для культивирования предпочтительнее, так как существенно упрощает технологию производства.

Таким образом, обоснована возможность использования питательной среды Мейнелла с мелас-сой свекловичной в качестве источника углерода для глубинного культивирования штамма-деструктора ТЭА *Rh. qingshengii* НСТ-32; штамма-деструктора ТМА, ТЭА и ДМЭА *Rh. jialingiae* НСТ-91; совместного глубинного культивирования исследуемых штаммов для получения микробного препарата «Тэамин».

Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что уровень деструктивной активности культур *Rh. qingshengii* НСТ-32, *Rh. jialingiae* НСТ-91 и микробного препарата «Тэамин» в отношении ТЭА, ТМА и ДМЭА зависит от используемой при их получении среды культивирования. Использование среды Мейнелла с мелассой свекловичной в качестве источника сахарозы позволяет получить исследуемые культуры и препарат с меньшей деструктивной активностью, уровень которой, однако, достаточен для эффективной очистки абсорбционных растворов, образующихся при абсорбционно-биохимической очистке воздушных потоков от данных ксенобиотиков.

Обоснование возможности использования среды Мейнелла с мелассой для получения исследуемых штаммов и микробного препарата «Тэамин» исключает необходимость использования дорогих и токсичных сред, содержащих амины.

Список литературы

1. Шаповалов, Ю. П. Очистка вентиляционного воздуха – прогрессивный выбор / Ю. П. Шаповалов // *Металл-Инфо*. – 2007. – №4. – С.20–21.
2. Albrecht, W. Health hazards of tertiary amine catalysts / W. Albrecht, R. Stephenson // *Scand. J. Work. Environ. Health* – 1988. – Vol. 14. – P. 209–19.
3. Akesson, B. Visual disturbances after experimental human exposure to triethylamine / B. Akesson, T. Floren, S. Skerfving, // *Br. J. Ind. Med.* – 1988. – Vol. 45. – P. 262–268.
4. Бусби, Э. Д. Получение отливок повышенной точности в формах, изготовленных с использованием технологии cold-box / Э.Д. Бусби, Дж. Дж. Арчибальд // *Литейщик России*. – 2008. – № 10. – С. 13–18.
5. Нагорный, Р. К. Штамм *Rhodococcus qingshengii* В-823Д – деструктор триэтиламина // *Материалы международной научно-практической конференции «Молодежь в науке – 2013»* / Р.К. Нагорный // *Молодежь в науке – 2013*. Прил. к журн. «Вес. Нац. акад. навук Беларусі». – 2013. – Ч. 3. – С. 114–118.
6. Нагорный, Р. К. Деструкция триэтиламина штаммом *Rhodococcus qingshengii* В-823Д / Р.К. Нагорный, А.С. Самсонова // *Сб. науч. трудов «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты»* под ред. Э.И. Коломиец [и др.]. – Минск: РУП «Издательский дом «Беларуская навука», 2014. – Т. 6. – С. 301–316.
7. Нагорный, Р. К. Штамм *Rhodococcus jialingiae* НСТ-91 – деструктор триэтиламина и диметилэтиламина // *Материалы международной научно-практической конференции «Молодежь в науке – 2014»* / Р.К. Нагорный, А.С. Самсонова // *Молодежь в науке – 2014*. Прил. к журн. «Вес. Нац. акад. навук Беларусі». – 2014. – Ч. 4. – С. 75–78.
8. Нагорный, Р. К. Деструкция триэтиламина штаммом *Rhodococcus jialingiae* НСТ-91 / Р. К. Нагорный, А. С. Самсонова // *Экологический вестник, МГЭУ им. А.Д. Сахарова*. – 2015. – № 1(31) – С. 20–24.
9. Нагорный, Р. К. Деструкция триметиламина штаммом *Rhodococcus jialingiae* НСТ-91 / Р. К. Нагорный, А. С. Самсонова // *Известия Нац. акад. наук Беларуси*. – 2015. – № 3 – С. 42–45.
10. Нагорный, Р. К. Микробный препарат «Тэамин» для очистки растворов от третичных аминов / Р. К. Нагорный, А. С. Самсонова // *Биология – наука XXI века: тез. докл. 19-ой Пущинской шк.-конф. молодых ученых*. – Пущино, 2015 г. – С.32.

R. K. Nagorny, A. S. Samsonova, E. M. Hlushen

DEGRADATION OF TRIETHYLAMINE BY STRAIN *RHODOCOCCUS JIALINGIAE* НСТ-91

*The article describes the results of the study destructive activity of *Rhodococcus qingshengii* НСТ-32, *Rhodococcus jialingiae* НСТ-91 cultures and preparation «Teamin» against triethylamine, trimethylamine and dimethylethylamine. It was determined that the level of the destructive activity of the cultures and the preparation obtained on the Meynell medium is lower than in cultures obtained on the media containing amines, but is sufficient for effective regeneration of the absorptive solutions formed in the absorptive-biochemical purification of air streams received from xenobiotics data. Justification for the possibility of using the Meynell medium for «Teamin» test strains and the drug eliminates the need for utilizing of expensive and toxic media containing amines.*