

Р. К. Нагорный, А. С. Самсонова

ДЕСТРУКЦИЯ ТРИЭТИЛАМИНА ШТАММОМ *RHODOCOCCLUS JIALINGIAE* НСТ-91

В статье приведены результаты изучения деструкции триэтиламина штаммом *Rhodococcus jialingiae* НСТ-91. Показано, что клетки штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 осуществляют полную минерализацию молекулы ксенобиотика, токсичные продукты окисления не выделяются в среду культивирования. Разработана схема катаболизма триэтиламина. Выявленная нами способность штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 осуществлять полную минерализацию ксенобиотика с высокой скоростью позволяет рассматривать возможность создания на его основе микробного препарата «Тэамин», предназначенного для очистки сточных вод и абсорбционных растворов.

➤ **Ключевые слова:** триэтиламин, катаболизм, деструкция, микроорганизм-деструктор.

Введение

На современных литейных производствах широко применяется изготовление форм и стержней по «cold-box-amin» процессу, при котором отверждение песчано-смоляной смеси осуществляется путем продувки газообразными катализаторами – третичными аминами. В 2010 году в США по данной технологии были произведены более 70% стержней и форм. С подавляющим преимуществом в качестве катализаторов используются триэтиламин (ТЭА) и диметилэтиламин (ДМЭА). На большинстве машиностроительных предприятий стран СНГ амины, используемые для продувки песчаной формы, адсорбируются раствором разбавленной серной кислоты, который с общим стоком отправляется на локальные биологические очистные сооружения [1]. Активный ил, обеспечивающий биологическую очистку сточных вод, обладает низкой деструктивной активностью в отношении третичных аминов, его рост ингибируется ТЭА в концентрации 50 мг/дм³ [2, 3]. Взаимодействие продукта микробной трансформации ТЭА – диэтиламина (ДЭА) с нитритом сопровождается образованием канцерогена N-нитрозодиэтиламина [4, 5]. Это обуславливает необходимость локальной очистки растворов, содержащих ТЭА, до поступления в общий сток предприятия с использованием высокоактивных микроорганизмов-деструкторов, обеспечивающих полную минерализацию токсиканта.

Локальная очистка сточных вод от третичных аминов с помощью микроорганизмов с экологической точки зрения является наиболее эффективной [6]. Технология очистки воздуха рабочей зоны предприятий от ТЭА, разработанная УП «Промышленные экологические системы» совместно с ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», основана на использовании абсорбционно-биохимических установок (АБХУ) [1]. Одним из основных показателей, определяющих эффективность данной технологии, является деструктивная активность микроорганизмов, иммобилизованных на носителе в биореакторе, являющемся конструктивным элементом АБХУ.

Нами выделен штамм *Rh. jialingiae* НСТ-91 – активный деструктор ТЭА. Для обоснования возможности использования данной культуры в разработке технологии очистки сточных вод и абсорбционных растворов от ТЭА, необходимо экспериментально доказать ее способность осуществлять полную минерализацию токсиканта.

Таким образом, целью работы является изучение катаболизма ТЭА в клетках штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91.

Методы исследований

Посевной материал штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 выращивали в колбах Эрленмейера объемом 1000 см³ с 500 см³ жидкой среды следующего состава (в г/дм³): NaCl – 0,5; KН₂РO₄ – 0,7; MgSO₄×7H₂O – 0,8; ТЭА – 1,0 (рН = 7). Культуру вносили петлей с косяков, посевной материал инкубировали на орбитальном шейкере Infors HT (Ecotron, Швейцария), с аэрацией (160 об/мин) при 30 °С в течение 96 ч. Клетки дважды промывали и ресуспендировали в фосфатном буфере (рН = 7) до достижения ОП₆₀₀ = 1,0. Использовали фосфатный буфер следующего состава (г/дм³): KН₂РO₄ – 3,4; Na₂НРO₄×12H₂O – 8,9. Бактериальный рост контролировали путем измерения ОП₆₀₀ на спектрофотометре UV-2401 PC (Shimadzu, Япония).

Деструктивную активность клеток исследуемого штамма в условиях периодического культивирования изучали в колбах Эрленмейера объемом 500 см³. В колбы вносили 247,5 см³ жидкой среды следующего состава (г/дм³): NaH₂РO₄×2H₂O – 1,6; KН₂РO₄ – 0,7; MgSO₄×7H₂O – 0,8 (рН = 7). ТЭА

вносили в концентрации 100 мг/дм³. В колбы со средой добавляли 2,5 см³ культуральной жидкости исследуемого штамма с титром 1×10⁹ КОЕ/см³. Конечный титр клеток в растворе составлял 1×10⁷ КОЕ/см³. Деструкцию ТЭА изучали при культивировании на орбитальном шейкере (160 об./мин., 30 °С).

О деструктивной активности клеток штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 судили на основании снижения концентрации ТЭА в среде культивирования. Отбор образцов культуральной жидкости для анализа содержания ксенобиотиков осуществляли каждый час. Отобранные образцы подвергали воздействию ультразвука на дезинтеграторе Sonifier-450 (Branson, США) при следующих режимах: мощность – 0,05 кВт; температура – 4 °С; продолжительность – 600 импульсов по 0,5 с. Клеточный лизат центрифугировали 15 минут при 15 000 g. Остаточное содержание ТЭА 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 x 50 мм; 1,8 мкм) при температуре 25 °С. Объем инъекции составлял 0,002 см³. Подвижная фаза: А – 0,1 % водный раствор трифторуксусной кислоты и фаза В – ацетонитрил. Использовали изократический режим элюирования 2 % фазы В. Скорость течения элюента – 0,5 см³/мин. Интерфейс ионизации – электроспрей Agilent G1948B API-ES в режиме положительных ионов. Для проведения анализа использовали режимы полного сканирования (MS2-Scan) в диапазоне масс от 30 до 200 Da. Параметры работы детектора: температура осушающего газа +300 °С; скорость потока осушающего газа 10 дм³/мин; давление на распылителе 30 psi; напряжение на капилляре 4000 В; напряжение на фрагменторе – 60 В. Анализ хроматограмм проводили с использованием компьютерного обеспечения Agilent MassHunter Workstation Software version B.01.03 (Agilent Technologies Inc., США).

Результаты и их обсуждение

Исследования деструктивной активности клеток штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 в отношении ТЭА показали, что данная культура способна использовать ксенобиотик в качестве единственного источника углерода, азота и энергии. На минеральной безазотистой среде с добавлением ТЭА наблюдается активный рост штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91, который не фиксирует молекулярный азот из воздуха. Единственным источником азота является аммоний, образуемый при полной минерализации молекулы ксенобиотика.

Для доказательства способности клеток штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 осуществлять полную минерализацию молекулы ТЭА, нами изучена последовательность реакций катаболизма ксенобиотика. Вероятные продукты окисления (триэтиламин-N-оксид (ТЭАО), ДЭА, этилэтаноламин, этиламин (ЭА)) обнаружены в клетках штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91, но отсутствуют в среде культивирования. При внесении ТЭА в супернатант, полученный в результате осаждения клеток штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 в культуральной жидкости, деструкция не наблюдалась. В вариантах опыта, когда перед центрифугированием проводили ультразвуковую дезинтеграцию клеток, в супернатанте наблюдалось снижение концентрации ксенобиотика. Полученные результаты указывают на внутриклеточную локализацию ферментов, участвующих в процессе катаболизма ТЭА.

В результате деструкции ТЭА в концентрации 100 мг/дм³, через 4 часа культивирования концентрация ТЭАО составила 7 мг/дм³, через 5 часов он был полностью утилизирован. ДЭА, этилэтаноламин и ЭА обнаружены в следовых количествах (рис. 1).

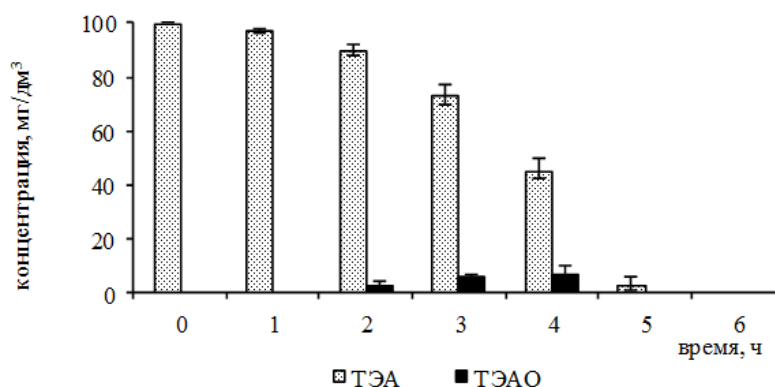


Рис. 1. Образование ТЭАО в процессе деструкции ТЭА клетками штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91

Таким образом, в процессе деструкции ТЭА промежуточные продукты в клетках штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 не накапливаются и не поступают в среду культивирования, что является важным преимуществом данной культуры при ее использовании в очистных сооружениях.

Клетки штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91, выращенные на среде с ТЭА, обладают высокой деструктивной активностью в отношении ТЭАО, ДЭА и ЭА (рис. 2), что также свидетельствует о том, что данные вещества являются продуктами катаболизма ксенобиотика.

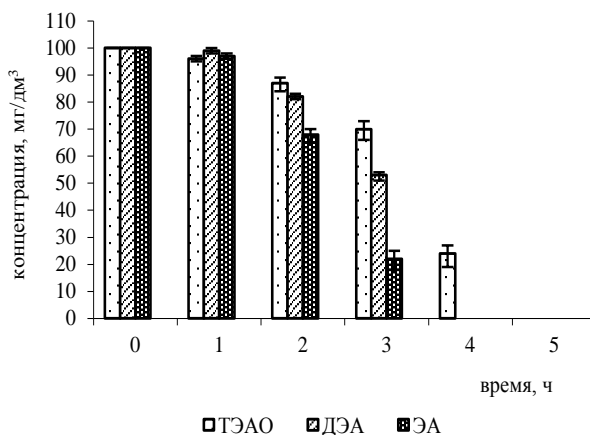


Рис. 2. Деструкция продуктов катаболизма ТЭА клетками штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91

На основании полученных данных, предложена схема катаболизма ТЭА в клетках штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 (рис. 3):

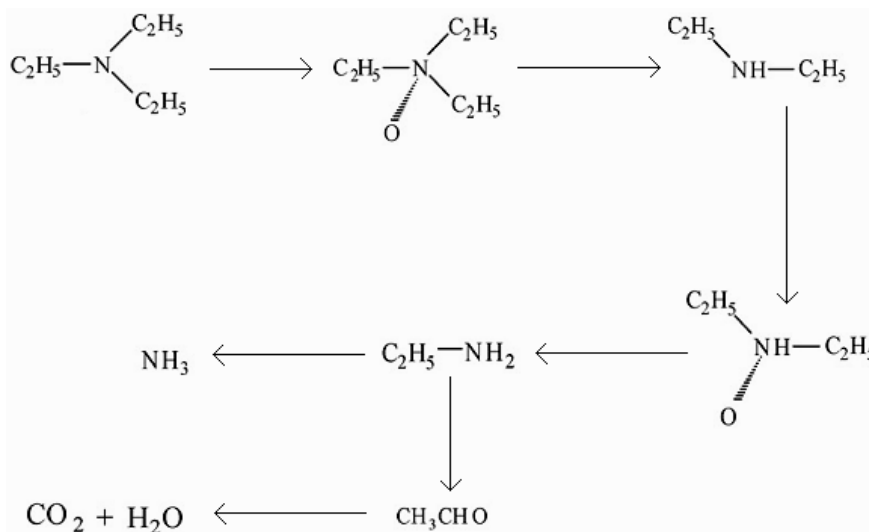


Рис. 3. Схема катаболизма ТЭА в клетках штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91

В процессе исследования выявлено, что клетки штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91, выращенные на среде с ДЭА в качестве единственного источника углерода и азота, обладают высокой начальной деструктивной активностью в отношении ДЭА и ЭА, но демонстрируют продолжительную лаг-фазу в процессе роста на среде с ТЭА (рис. 4). При внесении ТЭА в буфер с разрушенными клетками, выращенными на ТЭА, наблюдается деструкция. Если используются клетки, выращенные на ДЭА, деструкция ТЭА не осуществляется. Это свидетельствует о том, что деэтилирование ТЭА и ДЭА осуществляется разными ферментами, которые являются индуцибельными. Клетки штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91, выращенные на среде с ЭА, длительно адаптируются к росту на средах с ТЭА и ДЭА. При внесении ТЭА и ДЭА в буфер с разрушенными клетками, выращенными на ЭА, деструкция не наблюдается. Таким образом, все 3 реакции деэтилирования катализируются разными индуцибельными ферментами.

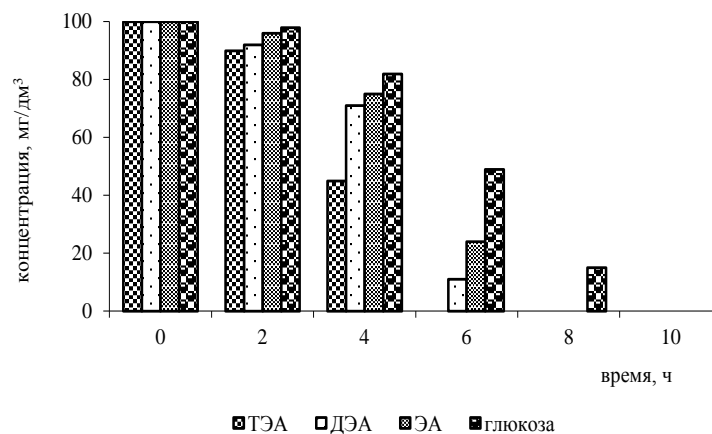


Рис. 4. Динамика деструкции ТЭА в концентрации 100 мг/дм³ клетками штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91, выращенными на различных субстратах

Изучение влияния сопутствующих органических веществ в растворе на деструкцию ТЭА клетками штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 провели с использованием минеральной среды Е-8, в которую вносили токсикант и глюкозу в концентрации 100 мг/дм³. В процессе культивирования снижение концентрации глюкозы в среде не сопровождалось снижением концентрации амина, однако после утилизации углевода наблюдалась деструкция токсиканта. Глюкоза в концентрации 100 мг/дм³ окисляется исследуемой культурой, выращенной на минеральной среде с добавлением ТЭА, за 4 часа, при этом концентрация токсиканта остается неизменной. После полной утилизации углевода начинается рост культуры на ТЭА с продолжительной лаг-фазой. Деструкция ксенобиотика завершилась через 12 часов культивирования. Таким образом, выявлена катаболитная репрессия, ограничивающая возможность применения штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 для очистки от ТЭА сточных вод, содержащих глюкозу. Данный факт свидетельствует о том, что при использовании штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 в очистных сооружениях необходимо учитывать состав сточных вод и изучать влияние всех обнаруженных органических веществ на процесс деструкции ксенобиотика.

Выявленная нами способность штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 осуществлять полную минерализацию ТЭА с высокой скоростью позволяет рассматривать возможность создания на его основе микробного препарата «Тэамин», предназначенного для очистки сточных вод и абсорбционных растворов от ксенобиотика.

Заключение

ТЭА – один из основных загрязнителей в газообразных выбросах литейных производств, в которых используется «Cold-box-amin» процесс. Наиболее эффективным способом очистки воздуха рабочей зоны предприятий от токсиканта является использование АБХУ. Эффективность работы АБХУ, определяется уровнем метаболической активности микроорганизмов-деструкторов ТЭА, иммобилизованных на носителе в биореакторе.

Нами из природной среды выделен штамм *Rh. jialingiae* НСТ-91, способный использовать ТЭА в качестве единственного источника углерода и азота. Культура разрушает токсикант в концентрации 100 мг/дм³ за 6 часов, в процессе деструкции в клетках образуются интермедиаты: ТЭАО, ДЭА, этилэтаноламин, ЭА.

Разработана схема катаболизма ТЭА штаммом *Rh. jialingiae* НСТ-91. Показано, что при окислении молекулы ТЭА образуется ТЭАО, разложение которого приводит к образованию молекул ДЭА и ацетальдегида. ДЭА окисляется до ЭА, который разлагается до ацетальдегида и аммония. Таким образом, клетки штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 осуществляют полную минерализацию ТЭА.

Полученные результаты позволили включить штамм *Rh. jialingiae* НСТ-91 в состав препарата «Тэамин», использование которого позволит интенсифицировать очистку абсорбционных растворов от ТЭА в биореакторах АБХУ.

Список литературы

1. Шаповалов Ю. П. Очистка вентиляционного воздуха – прогрессивный выбор // *Металл-Инфо*. – 2007. – № 4. – С. 20–21.

2. Zhu J., Bundy D., Li X., Rashid N. Reduction of odor and volatile substances in pig slurries by using pit additives // *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. – 1997. – № 32. – P. 605–619.
3. Calamari D., Gasso R., Galassi S., Provini A., Vighi M. Biodegradation and toxicity of selected amines on aquatic organisms // *Chemosphere*. – 1980. – № 9. – P. 753–762.
4. Lijinsky W, Singer G. Formation of nitrosamines from tertiary amines and nitrous acid // *IARC Scientific Publications Series*. – 1974. – № 9. – P. 111–114.
5. Mirvish S. Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics, and in vivo occurrence // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 1975. – № 31. – P. 325–351.
6. Kim S., Bae H., Lee S. A novel denitrifying bacterial isolate that degrades trimethylamine both aerobically and anaerobically via two different pathways // *Archives of Microbiology*. – 2001. – № 176. – P. 271–277.

R. K. Nagorny, A. S. Samsonova

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

Strain Rhodococcus jialingiae HCT-91 isolated from natural sources is capable to utilize triethylamine as a sole source of carbon and nitrogen. Hypothetical pathway of triethylamine catabolism by strain HCT-91 was proposed. It was demonstrated that triethylamine is oxidized to triethylamine-N-oxide further split up to diethylamine, acetaldehyde and water. Diethylamine is degraded to ethylamine and the latter is cleaved into acetaldehyde, water and ammonium. Acetaldehyde is broken down to carbon dioxide and water. As a result cells of strain HCT-91 carry out complete triethylamine mineralization.