

ШТАММ *BACILLUS THURINGIENSIS* X7 – ДЕСТРУКТОР ТРИЭТИЛАМИНА

А.С. Самсонова

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

e-mail:samsonova@mbio.bas-net.by

Введение

Триэтиламин (ТЭА) применяется в качестве растворителя, ингибитора коррозии, сырья в производстве различных химических веществ, включая антибиотики и пестициды, а также широко используется в литейном производстве в «Cold-box-amin» процессе в качестве катализатора реакции образования полиуретана, являясь одним из основных загрязнителей в газообразных выбросах предприятий химической металлургической промышленности [1].

Высокая химическая реакционная способность ставит ТЭА в ряд потенциально опасных веществ, вызывающих острые отравления. Пары ТЭА раздражают слизистые оболочки верхних дыхательных путей, вызывают возбуждение ЦНС, а затем ее угнетение, нарушение дыхания. Эксперименты на животных показали, что ТЭА обладает тератогенным действием [2].

До настоящего времени очистка сточных вод от ТЭА производилась преимущественно физико-химическими методами. Для очистки сточных вод от ТЭА они дороги и трудоемки, значительно уступают по эффективности биологическим.

Локальная микробная очистка сточных вод от ТЭА с экологической точки зрения считается наиболее эффективной. Она основана на использовании высокоактивных микроорганизмов-деструкторов, иммобилизованных на носителе в биореакторе. Значительное количество публикаций свидетельствует о явном преимуществе иммобилизованных систем, где клетки микроорганизмов закреплены на невымываемом, нерастворимом в воде носителе [2]. Показано, что иммобилизованные микроорганизмы более устойчивы к действию токсикантов, размножаются быстрее, чем во взвешенном состоянии и характеризуются повышенной метаболической активностью [3].

Активный переход предприятий литейной промышленности на использование «Cold-box-amin» процесса изготовления литейных форм сопровождается поступлением в воздух рабочей зоны высокотоксичных соединений, в частности ТЭА. Эффективная технология очистки воздуха рабочей зоны предприятий от ТЭА разработана УП «Промышленные экологические системы» совместно с лабораторией деградации ксенобиотиков и биоремедиации природных и производственных сред Института микробиологии НАН Беларуси. Она основана на использовании абсорбционно-биохимических установок (АБХУ). Применение АБХУ на предприятиях экономически целесообразно в связи с использованием минимального количества расходных материалов. Степень улавливания установкой вредных газов из вентиляционного воздуха составляет 70,0–99,9% в зависимости от входных концентраций и физико-химических свойств вещества. Техническое обслуживание АБХУ, как правило, связано только с ремонтом вентилятора и насоса [4].

Очистка вентиляционного воздуха от ТЭА с помощью АБХУ осуществляется в настоящее время на Чебоксарском агрегатном заводе, Мариупольском заводе тяжелого машиностроения, Ровненском литейном заводе, Лебедянском машиностроительном заводе, Ярославском моторном заводе. Опыт использования установок показывает их превосходство над традиционными скрубберами по экономическим и эксплуатационным показателям. На Лебедянском машиностроительном заводе с 2003 года функционирует комплекс по очистке вентиляционного воздуха участков заливки, охлаждения и выбивки стопочных форм. Проводимые заводской лабораторией анализы показали, что эффективность удаления ТЭА из воздуха рабочей зоны составляет 97% [4].

Одним из основных показателей, определяющих эффективность работы АБХУ, является деструктивная активность микроорганизмов, иммобилизованных на носителе в биореакторе. Поэтому поиск высокоактивных микроорганизмов-деструкторов ТЭА, способных к активной иммобилизации на волокнистых носителях, представляется актуальной задачей.

Немецкими учеными выделены штаммы микроорганизмов-деструкторов ТЭА *Pseudomonascitronellolis* RA1 и *Mycobacteriumdienthoferi* RA2, способные за 4 суток полностью утилизировать его из водных растворов с концентрацией 50 мг/л [5].

Исследователи из Тайваня предлагают использовать смешанную бактериальную культуру для очистки воды от ТЭА. Культура способна к росту в среде с концентрацией ТЭА 650 мг/л, а при концентрации токсиканта 200 мг/л эффективность его удаления приближается к 100% [6].

Сотрудниками Нанкинского аграрного университета из активного ила фармацевтического предприятия выделен штамм *Arthrobacter protophormiae* R4, способный полностью утилизировать ТЭА в концентрации 100 мг/л за 32 часа [7].

Сотрудниками лаборатории деградации ксенобиотиков и биоремедиации природных и производственных сред Института микробиологии НАН Беларуси выделены штаммы-деструкторы ТЭА *Rhodococcuserythropolis* В-301Д и *Rhodococcusruber* В-300Д. При культивировании на минеральной среде с ТЭА они не требуют стимуляторов роста и деструкции, способны использовать токсикант в качестве единственного источника углерода и азота [8].

Широкое распространение «Cold-box-amin» процесса в литейном производстве, требует поиска более активных штаммов микроорганизмов, способных полностью разлагать ТЭА в высокой концентрации при локальной очистке сточных вод.

Целью настоящей работы явился поиск активных микроорганизмов-деструкторов, пригодных для локальной очистки сточных вод и абсорбционных растворов от триэтиламина.

Методы исследования

Объектом исследования служил штамм X7, выделенный нами методом накопительного культивирования. Культуры накопления в процессе поиска активного деструктора ТЭА рассеивали на поверхности агаризованной минеральной среды с ТЭА. Для выявления микроорганизмов-деструкторов изолированные колонии вносили в жидкую минеральную среду с ТЭА (1000 мг/л). Отобранную культуру проверяли на чистоту, рассеивая на мясопептонную агаризованную питательную среду с последующим микроскопированием. Чистую культуру получали путем шестикратной реинокуляции микроорганизма из одной колонии.

Адаптивную селекцию выделенного штамма-деструктора ТЭА проводили в условиях периодического культивирования в колбах Эрленмейера объемом 500 мл на орбитальном шейкере InforsHT (Ecotron, Швейцария), обеспечивающем 160 об/мин при 28°C, а также в полимерных емкостях объемом 5 л, в которые подавался воздух с помощью насосов (интенсивность аэрации составляла 20 л/ч).

Родовую принадлежность выделенного микроорганизма определяли по результатам анализа морфологических особенностей и физиолого-биохимических свойств. Морфологию и структуру колоний регистрировали на МПА. Форму, подвижность клеток, окраску по Граму, наличие спор и параспоральных кристаллов определяли методом световой микроскопии. Способность штамма X7 использовать различные углеводы и спирты определяли на пептонно-фосфатной среде с бромтимоловым синим, содержащей 1% изучаемого субстрата. Анаэробное окисление глюкозы проверяли на среде Хью-Лейфсона. Протеолитические свойства устанавливали по разжижению желатины, пептонизации молока. Оксидазу, каталазу и амилазу выявляли общепринятыми методами.

Для установления нуклеотидной последовательности 16S рРНК исследуемого штамма проводили реакцию секвенирования по методу Сэнгера [9] с использованием набора

реагентов для секвенирования USB ThermoSequenaseCycleSequencingKit (Li-COR) согласно прилагаемой к набору инструкции. Разделение и анализ продуктов секвенирования проводили с помощью анализатора Li-COR 4300 DNA Analyzer. Компьютерную обработку результатов секвенирования, их редактирование и предоставление в форматах FASTA, Genbank, Plaintext осуществляли с помощью программы e-Seq™ Software.

Штамм X7 выращивали в колбах Эрленмейера объемом 1000 мл с 500 мл жидкой среды с ТЭА в качестве единственного источника углерода и азота следующего состава (г/л): $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 1,6; KH_2PO_4 – 0,7; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8; ТЭА – 10,0 (pH=7,0). Культуру вносили в колбы петлей с косяков, посевной материал инкубировали на орбитальном шейкере, обеспечивающем 160 об/мин при 30°C в течение 72 ч. Клетки дважды промывали и ресуспендировали в фосфатном буфере (pH=7,0) до достижения $\text{ОП}_{600}=1,0$. Использовали фосфатный буфер следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 3,4; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 8,9. Бактериальный рост контролировали путем измерения ОП_{600} на спектрофотометре UV – 2401 PC (Shimadzu, Япония).

Для иммобилизации клеток штамма X7 на искусственном носителе использовали стеклянную колонку объемом 1 л. Носитель (полиамидная нить и полиэтилентерефталат) помещали в колонку в количестве 20г и добавляли 810 мл среды следующего состава (г/л): $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 1,6; KH_2PO_4 – 0,7; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8 и 90 мл культуральной жидкости штамма В-823Д с титром 1×10^9 КОЕ/мл. Иммобилизацию проводили в течение 48 часов при температуре 25°C и интенсивной аэрации (20 л воздуха/ч). Носитель извлекали из колонки и высушивали при температуре 105°C. Сухой вес иммобилизованной культуры определяли по разнице в весе нити до и после иммобилизации и рассчитывали в мг/г носителя.

Деструктивную активность свободноплавающих клеток исследуемого штамма в условиях периодического культивирования изучали в колбах Эрленмейера объемом 500 мл. В колбы вносили 225 мл жидкой среды следующего состава (г/л): $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 1,6; KH_2PO_4 – 0,7; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8 с добавлением ТЭА (pH=7,0). В колбы со средой добавляли 25 мл культуральной жидкости исследуемого штамма с титром 1×10^9 КОЕ/мл. Конечный титр клеток в среде составлял 1×10^8 КОЕ/мл, а конечные концентрации ТЭА – 100, 1000 и 10 000 мг/л. Деструкцию ТЭА изучали при культивировании на орбитальном шейкере.

Для изучения деструктивных свойств иммобилизованных клеток штамма X7 в условиях протока в биореактор с носителем (20г) добавляли 810 мл минеральной среды следующего состава (г/л): $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 1,6; KH_2PO_4 – 0,7; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8 и 90 мл культуральной жидкости штамма В-823Д с титром 1×10^9 КОЕ/мл. Иммобилизацию проводили в течение 48 часов при температуре 25°C и интенсивной аэрации (20 л воздуха/ч).

Деструктивную активность клеток штамма X7 определяли по снижению концентрации ТЭА в среде культивирования. Отбор образцов для анализа содержания ТЭА в культуральной жидкости осуществляли через фиксированные промежутки времени (от 5 минут до 8 часов, в зависимости от исходной концентрации ТЭА). Отобранные образцы подвергали воздействию ультразвука на дезинтеграторе Sonifier-450 (Branson, США) при следующих режимах: мощность – 0,05 кВт; температура – 4°C; продолжительность – 600 импульсов по 0,5 с. Клеточный лизат центрифугировали 15 минут при 15 000g. Остаточное содержание ТЭА в супернатанте определяли на жидкостном хроматографе Agilent 1200 с масс-детектором Agilent 6410 TripleQuad. Разделение компонентов в анализируемых образцах проводили на колонке Zorbax XDB C18 (4,6x50 мм; 1,8 мкм) при температуре +25°C. Объем инъекции составлял 2 мкл. 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 мл/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°C; скорость потока осушающего газа 10 л/мин; давление на распылителе 30 psi; напряжение на капилляре

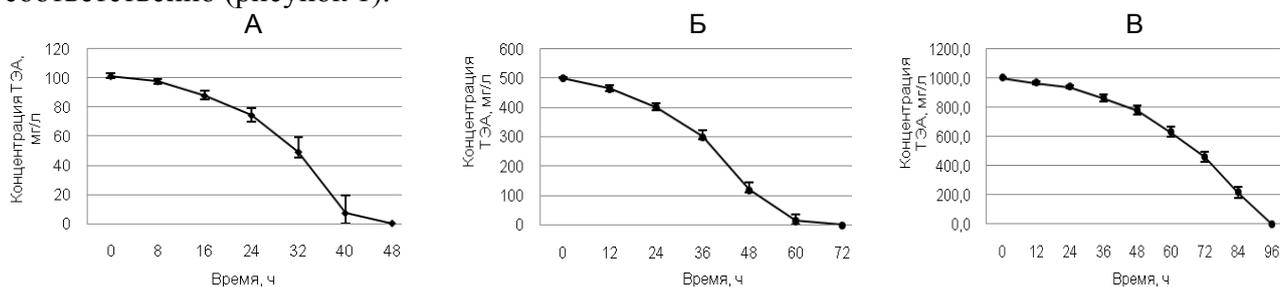
4000 вольт; напряжение на фрагменторе – 60 вольт. Анализ хроматограмм и масс-спектров проводили с использованием компьютерного обеспечения Agilent MassHunter Workstation Software version B.01.03 (Agilent Technologies Inc., США).

Результаты и обсуждение

Из дерново-подзолистой почвы выделен штамм X7, способный использовать ТЭА в качестве единственного источника углерода и азота. В результате изучения морфологических, культуральных, физиолого-биохимических свойств и нуклеотидной последовательности 16S рРНК выделенная культура идентифицирована нами как *Bacillus thuringiensis* X7.

Колонии штамма *B. Thuringiensis* X7 на мясо-суловомагаресветло-розовые, диаметром 3 мм, круглые с волнистым краем, выпуклые, гладкие; на минеральной агаризованной среде с ТЭА – беловато-серые, диаметром 1 мм, круглые с ризоидным краем, выпуклые, гладкие. Клетки грамположительные крупные палочковидные, подвижны, образуют термоустойчивую спору, расположенную субтерминально. В центре клетки располагается кристалл токсина, прокрашивающийся красителем анилиновым чёрным. Штамм *B. thuringiensis*X7 является аэробом. Обнаружены каталаза, оксидаза, уреазы и гидролитические ферменты (разжижает желатин, гидролизует крахмал, разлагает казеин). Анаэробное окисление глюкозы выявлено. Штамм *B. Thuringiensis* X7 окисляет глюкозу, трегалозу, фруктозу и глицерин, но не использует арабинозу, ксилозу, галактозу, лактозу, маннит, дульцит. Оптимальными условиями для роста являются pH=7,0 и температура 30°C.

Штамм *B. Thuringiensis* X7 при культивировании на минеральной среде с ТЭА не требует стимуляторов роста и деструкции. Клетки штамма *B. Thuringiensis* X7 способны полностью разрушать ТЭА в концентрации 100,0; 500,0 и 1000,0 мг/л за 48, 72 и 96 часов соответственно (рисунок 1).



А – 100, Б – 500, В – 1000

Рисунок 1 – Деструкция ТЭА культурой *B. Thuringiensis* X7 концентрация ТЭА в среде (мг/л)

Иммобилизационная способность клеток штамма *B. Thuringiensis* X7 изучена на наиболее часто используемых волокнистых носителях: полиамидной нити (капроне), полиэтилен терефталате (лавсане) и полипропилене (таблица 1).

Таблица 1 – Иммобилизация клеток штамма *B. Thuringiensis* X7 на различных носителях

Тип волокнистого носителя	Абсолютно сухая биомасса, мг/г носителя	
	клетки выращены на среде МПА	клетки выращены на минеральной среде с ТЭА
Полиамидная нить	149,0 \pm 2,4	140,2 \pm 3,8
Полиэтилен терефталат	97,9 \pm 2,2	94,6 \pm 1,8
Полипропилен	110,2 \pm 2,8	117,4 \pm 2,2

Установлено, что клетки штамма *B. Thuringiensis* X7 эффективнее иммобилизуются на полиамидной нити (149 мг/г). Источник углерода при культивировании штамма не оказывает влияния на его иммобилизационные свойства. Полученные результаты послужили основанием для исследования деструкции ТЭА клетками штамма *B. Thuringiensis* X7, иммобилизованными на полиамидной нити.

Исследование процесса деструкции ТЭА иммобилизованными клетками штамма *B. Thuringiensis* X7 на протоке осуществили в условиях созданной нами лабораторной модели очистной установки. Процесс деструкции ТЭА контролировали при различной скорости протока модельной сточной воды через биореактор – от 10 до 100 мл/ч. Установлено существенное влияние на деструкцию ТЭА скорости протока очищаемой воды в установке (рисунок 2). Полная утилизация ТЭА при его концентрации в среде 100 мг/л осуществлялась при скорости протока 10 мл/ч. Полученные результаты могут быть положены в основу разработки опытно-промышленной технологии очистки сточных вод от ТЭА, а также для расчёта объёма опытно-промышленного биореактора.

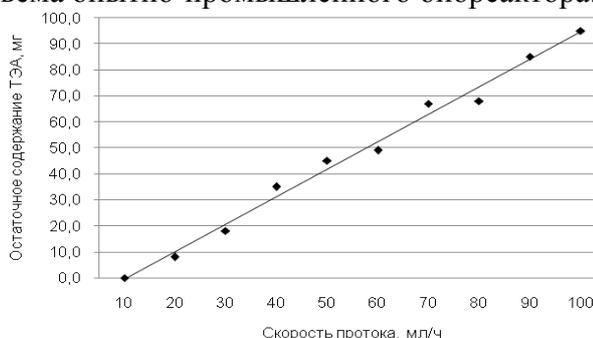


Рисунок 2 – Зависимость остаточного количества ТЭА в сточной воде от скорости протока

Выводы

Из природной среды выделен и идентифицирован высокоактивный штамм-деструктор ТЭА *B. Thuringiensis* X7, способный использовать данный амин в качестве единственного источника углерода и азота. В условиях периодического культивирования штамм *B. thuringiensis* X7 разрушает токсикант в концентрации 100, 500 и 1000 мг/л за 48, 72 и 96 часов соответственно. В условиях проточного культивирования штамм *B. thuringiensis* X7 осуществляет деструкцию 100 мг/л ТЭА при скорости протока 10 мл/ч. Клетки штамма *B. thuringiensis* X7 наиболее эффективно иммобилизуются на полиамидной нити (149 мг/г носителя). Установлено, что источник углерода при культивировании штамма не оказывает значительного влияния на адгезивные свойства.

Результаты проведенных исследований обосновывают возможность использования штамма *B. thuringiensis* X7 для локальной очистки сточных вод от ТЭА до поступления их в общий сток предприятия.

Литература

1. Photocatalytic degradation of triethylamine on titaniumoxide thinfilms / Н. Aimin [et al.] // Journal of Catalysis. – 1999. – Vol. 188. – P. 40 – 47.
2. Семочкина, Н.Ф. Адгезия микроорганизмов-деструкторов эфиров о-фталевой кислоты на капроновом носителе / Н.Ф. Семочкина // Микробиология и биотехнология на рубеже XXI столетия: Материалы междунар. конф., Минск, 1–2 июня 2000 г. / Ин-т микробиологии НАНБ. – 2000. – С. 92–94.
3. Dunny, G.M. Multicellular behavior in bacteria: communication, cooperation, competition and cheating / G.M. Dunny, T.J. Brickman, M. Dworkin // Bioessays. – 2008. – Vol. 4, № 30 – P. 296–298.
4. Шаповалов, Ю.П. Очистка вентиляционного воздуха – прогрессивный выбор / Ю.П. Шаповалов // Информационно-аналитический журнал Металл-Инфо. – 2007. – №4 – С. 20–21.
5. Biologischer abbau von geruchsaktiven einzelstoffen und von realen vielstoffgemischen / S. Rappert [et al.] // Messung und Minimierung von Gerüchen, Hamberger Berichte. – 2004. – P. 203–220.
6. Wang, C. Removal of triethylamine from synthetic wastewater by acclimated mixed bacteria cultures / C. Wang, K. Lu, X. Chen // International Biodeterioration and Biodegradation. – 2007. – Vol. 59. – P. 202–205.
7. Микроорганизмы-деструкторы триэтиламина для очистки сточных вод / А.С. Самсонова [и др.] // Сборник научных трудов Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. Минск, Изд. И.П. Логвинов, 2007. – С. 366–373.
8. The biodegradation pathway of triethylamine and its biodegradation by immobilized *Arthrobacter protophormiae* cells / T. Cai [et al.] // Journal of Hazardous Materials. – 2010. – Vol. 186, № 1. – P. 59–66.
9. Sanger, F.A. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase / F.A. Sanger, A.R. Coulson // J. Mol. Biol. – 1975. – Vol. 94. – P. 444 – 448.