

УДК 579.22 + 579.695

*Р. К. НАГОРНЫЙ, А. С. САМСОНОВА*

### **ДЕСТРУКЦИЯ ТРИМЕТИЛАМИНА ШТАММОМ *RHODOCOCCUS JIALINGIAE* НСТ-91**

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, e-mail: samsonova@mbio.bas-net.by*

*(Поступила в редакцию 21.01.2015)*

**Введение.** Триметиламин (ТМА) используется в ряде высокопроизводительных промышленных процессов, таких как производство пластмасс, гербицидов, смол, красителей и фотохимикатов, а кроме того, он применяется в качестве ингибитора коррозии [1]. Являясь продуктом микробной трансформации холина и бетаина, ксенобиотик образуется в процессе очистки сточных вод на биологических очистных сооружениях (БОС), при утилизации отходов и переработке навоза [2]. ТМА, образующийся при микробной трансформации триметиламин-N-оксида (ТМАО) в тканях морских рыб, выделяется при производстве рыбной муки [3].

ТМА является опасным загрязнителем воздуха производственных помещений и сточных вод из-за его токсичности и наличия потенциально канцерогенных свойств [4]. В связи с перечисленным возникла необходимость разработки технологии очистки от него объектов окружающей и производственной среды. Методы локальной микробной очистки сточных вод с точки зрения экологической составляющей процесса считаются наиболее эффективными [5]. Они основаны на использовании высокоактивных микроорганизмов-деструкторов, иммобилизованных на носителе в очистном сооружении типа биореактора [6].

Для очистки воздуха рабочей зоны предприятий от летучих органических соединений (ЛОС), в том числе от ТМА, применяются сорбционная, плазмокаталитическая и газоразрядно-каталитическая очистки. В последние десятилетия наметилась тенденция к увеличению доли биологических методов, таких как биофильтрация и абсорбционно-биохимическая очистка [7]. Эффективная технология очистки производственного воздуха от ЛОС, разработанная УП «Промышленные экологические системы» совместно с ГНУ «Институт микробиологии» НАН Беларуси, основана на использовании абсорбционно-биохимических установок (АБХУ) [8]. Эффективность работы АБХУ определяется деструктивной активностью микроорганизмов, которые иммобилизованы на носителе в биореакторе, являющимся составной частью установки. Поэтому поиск микроорганизмов высокоактивных деструкторов ТМА, способных к активной иммобилизации на волокнистых носителях, представляется актуальной задачей.

Микробоценоз активного ила БОС и водоемов производит частичную деструкцию молекулы ТМА до диметиламина (ДМА), который выделяется клетками в среду и взаимодействует с нитрит ионом с образованием канцерогенного диметилнитрозамина [9]. Таким образом, для разработки эффективных способов очистки сточных вод и абсорбционных растворов от ТМА, исключая образование более токсичных вторичных метаболитов, необходимо детальное изучение катаболизма ксенобиотика.

Интенсивное изучение микробной деструкции ТМА в различных природных средах позволило обнаружить штаммы-деструкторы ксенобиотика [10]. В частности, нами выделен штамм

*Rhodococcus jialingiae* НСТ-91, обладающий высокой деструктивной активностью в отношении третичных метил- и этиламинов, в том числе ТМА.

Цель работы – изучение катаболизма ксенобиотика в клетках штамма *Rhodococcus jialingiae* НСТ-91 с целью использования его в разработке экологически обоснованной технологии очистки сточных вод и абсорбционных растворов.

**Объекты и методы исследования.** Посевной материал штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 выращивали в колбах Эрленмейера объемом 1000 см<sup>3</sup> с 500 см<sup>3</sup> жидкой среды следующего состава (г/дм<sup>3</sup>): NaCl – 0,5; КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> – 0,7; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,8; ТМА – 1,0 (рН 7,0). Культуру вносили петлей с косяков, посевной материал инкубировали на орбитальном шейкере Infors НТ (Ecotron, Швейцария) с аэрацией (160 об/мин) при 30 °С в течение 96 ч. Клетки дважды промывали и ресуспендировали в фосфатном буфере (рН 7,0) до достижения ОП<sub>600</sub> = 1,0. Использовали фосфатный буфер следующего состава (г/дм<sup>3</sup>): КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> – 3,4; Na<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O – 8,9. Бактериальный рост контролировали путем измерения ОП<sub>600</sub> на спектрофотометре UV – 2401 РС (Shimadzu, Япония).

Деструктивную активность клеток исследуемого штамма изучали в условиях периодического их культивирования в колбах Эрленмейера объемом 500 см<sup>3</sup>. В колбы вносили 247,5 см<sup>3</sup> жидкой среды следующего состава (г/дм<sup>3</sup>): NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O – 1,6; КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> – 0,7; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,8 (рН 7,0). ТМА вносили в концентрации 100 мг/дм<sup>3</sup>. В среду культивирования добавляли 2,5 см<sup>3</sup> культуральной жидкости (КЖ) исследуемого штамма с титром 1·10<sup>9</sup> КОЕ/см<sup>3</sup>. Конечный титр клеток в растворе составлял 1·10<sup>7</sup> КОЕ/см<sup>3</sup>. Деструкцию ТМА изучали при культивировании исследуемого штамма на орбитальном шейкере (160 об/мин, 30 °С).

О деструктивной активности клеток штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 судили на основании снижения концентрации ТМА в среде культивирования. Отбор образцов КЖ для анализа содержания ксенобиотика 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 мин при 15 000 g. Остаточное содержание ТМА 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 °С. Объем инъекции составлял 0,002 см<sup>3</sup>. Подвижные фазы: А – 0,1 %-ный водный раствор трифторуксусной кислоты, фаза В – ацетонитрил. Использовали изократический режим элюирования 2 % фазы В. Скорость течения элюента – 0,5 см<sup>3</sup>/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 Да. Параметры работы детектора: температура осушающего газа – +300 °С, скорость потока осушающего газа – 10 дм<sup>3</sup>/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.** Как показали результаты исследования деструктивной активности клеток штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 в отношении ТМА, данная культура способна использовать ксенобиотик в качестве единственного источника углерода и азота. На минеральной безазотистой среде с добавлением ТМА наблюдали 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.

Полную утилизацию ТМА в концентрации 100 мг/дм<sup>3</sup> клетки штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 осуществляли через 5 ч культивирования (рис. 1).

Для доказательства способности клеток штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 осуществлять полную минерализацию молекулы ТМА нами изучена последовательность реакций катаболизма ксенобиотика. Вероятные продукты окисления (триметиламин-N-оксид (ТМАО), ДМА, метиламин (МА)) обнаружены в клетках штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91, но отсутствуют в среде культивирования. При внесении ТМА в супернатант, полученный в результате осаждения в культуральной жидкости клеток штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91, деструкции не наблюдалось. В вариантах опыта, в которых

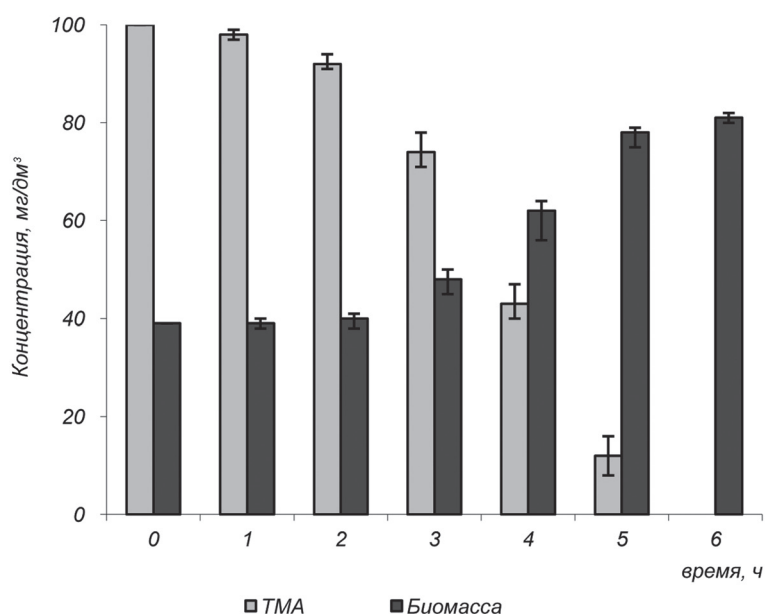


Рис. 1. Динамика накопления биомассы штаммом *Rh. jialingiae* НСТ-91 при деструкции ТМА в концентрации 100 мг/дм<sup>3</sup>

перед центрифугированием проводили ультразвуковую дезинтеграцию клеток, в супернатанте отмечалось снижение концентрации ксенобиотика, свидетельствующее о его ферментативном преобразовании. Полученные результаты указывают на внутриклеточную локализацию ферментов, участвующих в процессе катаболизма ТМА.

Через 5 ч культивирования концентрация ТМАО в результате деструкции ТМА (концентрация 100 мг/дм<sup>3</sup>) составила 5 мг/дм<sup>3</sup>, а через 6 ч он был полностью утилизирован. ДМА и МА обнаружены в следовых количествах (рис. 2).

Таким образом, в процессе деструкции ТМА в клетках штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 промежуточные продукты 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 ТМА, обладают высокой деструктивной активностью в отношении ТМАО, ДМА и МА, что также свидетельствует о том, что данные вещества являются продуктами катаболизма ксенобиотика.

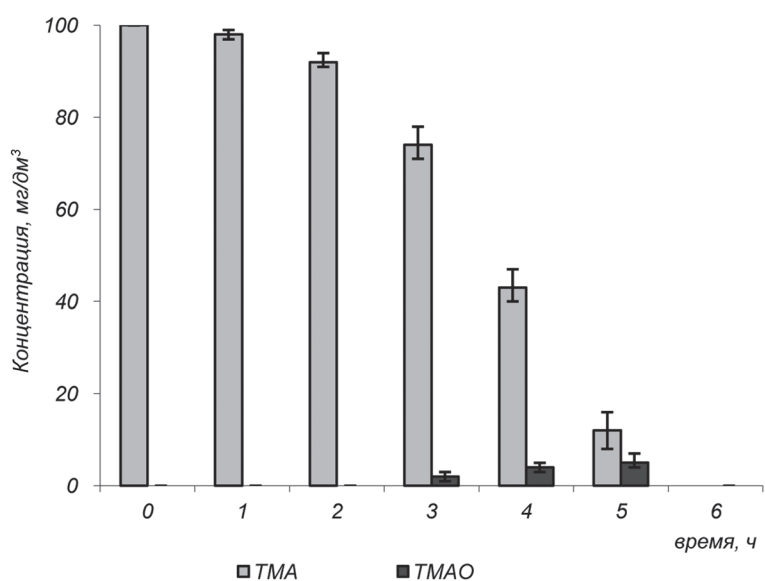


Рис. 2. Образование ТМАО в процессе деструкции ТМА клетками штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91

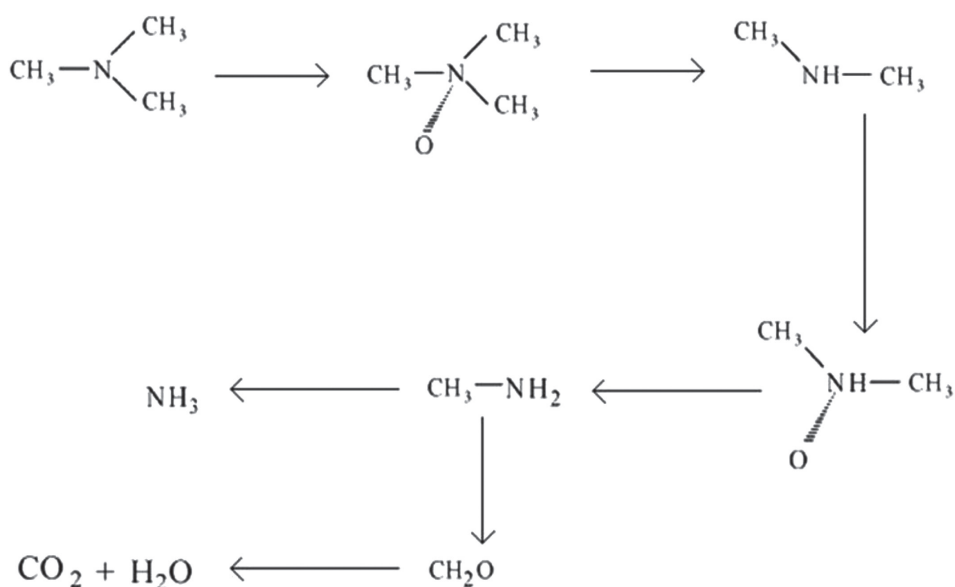


Рис. 3. Схема катаболизма ТМА в клетках штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91

На основании полученных результатов предложена схема катаболизма ТМА в клетках штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 (рис. 3). Показано, что при окислении молекулы ТМА образуется ТМАО, разложение которого приводит к образованию молекул ДМА и ацетальдегида. ДМА окисляется до МА, который разлагается до ацетальдегида, подвергающегося полному окислению, и аммония, используемого клеткой в качестве источника азота. Таким образом, клетки штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 осуществляют полную минерализацию ТМА.

Выявленная нами способность штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 осуществлять полную минерализацию ТМА с высокой скоростью является основанием для использования его в очистке сточных вод и абсорбционных растворов от ксенобиотика.

**Заключение.** В результате проведенных исследований выявлена способность штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 использовать ТМА в качестве единственного источника углерода и азота, в процессе деструкции которого в клетках образуются интермедиаты: ТМАО, ДМА, МА. Полная утилизация ксенобиотика в концентрации 100 мг/дм<sup>3</sup> осуществляется за 5 ч.

Разработана схема катаболизма ТМА штаммом *Rh. jialingiae* НСТ-91. Показано, что при окислении молекулы ТМА образуется ТМАО, разложение которого приводит к образованию молекул ДМА и ацетальдегида. ДМА окисляется до МА, который разлагается до ацетальдегида, подвергающегося полному окислению, и аммония, используемого клеткой в качестве источника азота. Таким образом, клетки штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 осуществляют полную минерализацию ксенобиотика.

Полученные результаты являются основанием для использования штамма *Rh. jialingiae* НСТ-91 в очистке сточных вод и абсорбционных растворов от ТМА.

## Литература

1. Clayton G., Clayton F. Patty's industrial hygiene and toxicology. 3<sup>rd</sup> ed. New York, 1982. Vol. 2B. P. 3135–3173.
2. Chang C. T., Chen B. Y., Shiu I. S. // Chemosphere. 2004. Vol. 55. P. 751–756.
3. Kim S. G., Bae H. S., Lee S. T. // Arch. Microbiol. 2001. Vol. 176. P. 271–277.
4. Roseiro J. C., Partidario P. J. et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. Vol. 52. P. 546–552.
5. Li T., Liu J. et al. // Water Res. 2007. Vol. 41. P. 3465–3473.
6. Dunny G. M. // Bioassays. 2008. Vol. 4, N 30. P. 296–298.
7. Шаповалов Ю. П. // Металл-Инфо. 2007. № 4. P. 20–21.
8. Torkian A., Keshavarzi H., Azimi A. // Iran. J. of Environ. Health Sci. and Eng. 2005. Vol. 2, N 2. P. 31–40.
9. Ayanaba A., Alexander M. // J. Environ. Qual. 1974. Vol. 3. P. 83–89.
10. Ho K. L., Chung Y. C. et al. // Chemosphere. 2008. Vol. 72. P. 250–256.

**DESTRUCTION OF TRIMETHYLAMINE BY STRAIN *RHODOCOCCUS JIALINGIAE* HCT-91**

**Summary**

Strain *Rhodococcus jialingiae* HCT-91 isolated from natural sources is capable to utilize trimethylamine as a sole source of carbon and nitrogen. In batch culture it degrades toxicant in concentration 100 mg/l by 6 hours. Hypothetical pathway of trimethylamine catabolism by strain *Rh. jialingiae* HCT-91 was proposed. It was demonstrated that trimethylamine is oxidized to trimethylamine-N-oxide further split up to dimethylamine and acetaldehyde. Dimethylamine is degraded to methylamine and the latter is cleaved into acetaldehyde and ammonium. Acetaldehyde is broken down to carbon dioxide and water. As a result cells of strain *Rh. jialingiae* HCT-91 carry out complete trimethylamine mineralization.