

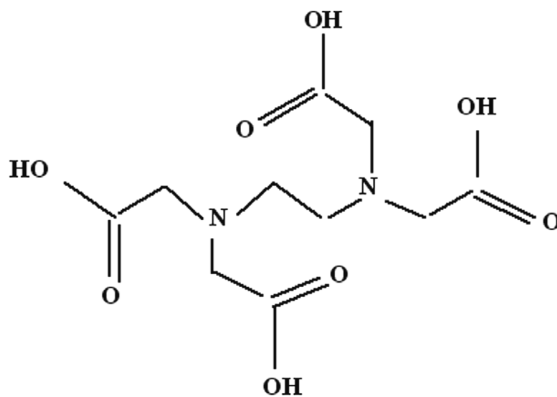
Е.А. Фарберова, А.В. Виноградова, Е.В. Шульц

Пермский национальный исследовательский
политехнический университет

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭДТА НА РОСТ И РАЗВИТИЕ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

Изучено влияние ЭДТА на жизнедеятельность микроорганизмов. Получены адаптированные к ЭДТА клетки микроорганизмов и изучена возможность их использования в процессах биохимической очистки.

Этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) относится к группе аминополикарбоновых кислот, характерной особенностью которых является способность связывать ионы металлов путем образования многочленных колец. Это обуславливает более высокую стабильность комплексов по сравнению с обычными металл-лигандными комплексами, так называемый «хелатный» (клешневидный) эффект. Молекула ЭДТА содержит четыре карбоксильные группы, соединенные с двумя атомами азота:



Благодаря способности образовывать стабильные водорастворимые комплексы (хелаты) со многими металлами, ЭДТА используется в промышленных процессах для удаления ионов металлов. Известно, что при очистке атомных реакторов на одну операцию расходуется до нескольких сотен килограммов ЭДТА [1].

В целлюлозно-бумажной промышленности ЭДТА используется для стабилизации перекиси водорода, которая легко разлагается в присутствии ионов металлов (главным образом, марганца и железа), со-

держаться в древесине. ЭДТА широко применяется для промывки теплоэнергетического оборудования, труб, котлов при водоподготовке в котельных и теплосетях; в производстве бытовой химии и синтетических моющих средств; в виде стабилизатора в процессах полимеризации; при производстве каучука; в аналитической химии и во многих других областях [1–4]. В последнее время ЭДТА находит широкое применение в сельском хозяйстве как стимулятор фиторемедиации почв, так как способствует десорбции тяжелых металлов (меди, цинка, кадмия, хрома) из почвы, переводит их в растворимую форму и делает доступными для поглощения растениями [5]. В ряде стран ЭДТА используется в качестве добавок в фармацевтические препараты, косметику и пищу [6]. Применение ЭДТА в медицине связано с удалением тяжелых металлов из организма при лечении отравлений и использовании в качестве антидота при радиоактивном поражении.

Промышленное производство ЭДТА было начато в 1939 г. в Германии. Потребление ЭДТА в Европе возросло с 26 000 т в 1992 г. до 34 550 т в 1999 г.; в 2000 г. суммарное мировое производство аминополикарбоновых кислот, главным образом ЭДТА, достигло 200 000 т [2, 4, 7].

70–80 % от потребляемого количества ЭДТА попадает в окружающую среду. В настоящее время ЭДТА считается одним из наиболее распространенных антропогенных загрязнителей [2, 4, 8]. В России ПДК ЭДТА в воде составляет 4,0 мг/л.

Отрицательное влияние ЭДТА в окружающей среде обусловлено, главным образом, хелатообразующим свойством этого соединения. Накопление ЭДТА в почве и воде рек и водоемов крайне нежелательно, так как это приводит к ремобилизации ионов металлов (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{3+}) из почвы, ила и донных осадков и загрязнению ими грунтовых вод и питьевой воды.

Накопление ЭДТА в природе обусловлено тем, что ЭДТА является чрезвычайно биоустойчивым соединением. Единственным абиотическим путем разрушения ЭДТА в естественных водоемах является фотохимическое разложение комплекса Fe (III)-ЭДТА под воздействием УФ-лучей на поверхности воды [1, 9, 10]. Однако этот процесс зависит от климатических условий, сезона, освещенности и не может рассматриваться в качестве существенного фактора разрушения ЭДТА в природе [6].

Фильтрация и озонирование воды не приводят к снижению в ней уровня ЭДТА, заметной деградации ЭДТА не происходит и в биоочистных сооружениях [11, 12]. Микроорганизмы, способные к деградации

ЭДТА, обнаруживаются в природе довольно редко. Имеются данные о выделении из активного ила промышленных очистных сооружений смешанной культуры ЭДТА-разрушающих микроорганизмов, состоящей из 14 видов бактерий, относящихся к родам *Methylobacterium*, *Variovorax*, *Enterobacter*, *Aureobacterium*, *Bacillus* [13]. В результате исследований, ведущихся уже более 40 лет, было выделено лишь несколько чистых культур ЭДТА-деградирующих бактерий. Поэтому закономерен интерес исследователей к процессу биологической деградации ЭДТА.

Целью данного исследования является изучение поведения микроорганизмов, выделенных из природных сред, по отношению к ЭДТА; выявление оптимальных условий, влияющих на потребление его микроорганизмами.

Для проведения исследования микроорганизмы выделяли из разных источников: воды рек Ирень (г. Кунгур) и Данилиха (г. Пермь), почвы вдоль проезжей части и вдали от нее. В процессе культивирования были выделены отдельные колонии микроорганизмов, из которых выбраны три, наиболее активно развивающиеся на среде МПА (мясопептонный агар). Проведено морфологическое описание микроорганизмов этих колоний и окрашивание выделенных культур по методу Грама (табл. 1).

Таблица 1

Морфологическая характеристика выделенных микроорганизмов

Источник	Цвет	Форма	Оптические свойства	Край колонии	Форма клеток	Окраска по Граму
Вода р. Данилиха (культура I)	Белый	Круглая	Прозрачная	Ровный	Палочковидные	Варибельная
Вода р. Ирень (культура II)	Белый	Неправильная	Непрозрачная	Лопастной	Палочковидные	Отрицательная
Почва садовая (культура III)	Белый	Круглая с фестончатым краем	Прозрачная	Волнистая	Кокки	Отрицательная

Изучено влияние различных концентраций ЭДТА на рост микроорганизмов в жидкой питательной среде. Для сравнения в качестве источника углерода в контрольном эксперименте использовалась глюкоза в количестве 10 г/л. Установлено, что между концентрацией ЭДТА и скоростью роста микроорганизмов (μ , $ч^{-1}$) существует четкая корреляция: с увеличением концентрации ЭДТА, удельная скорость роста

всех использованных микроорганизмов уменьшается. Добавка ЭДТА в среду, содержащую глюкозу, оказывает ингибирующее действие на рост микроорганизмов (табл. 2, рис. 1).

Таблица 2

Определение времени генерации (g) и удельной скорости роста микроорганизмов (μ), выделенных из различных источников

Концентрация ЭДТА, г/л	Культура I		Культура II		Культура III	
	μ , ч ⁻¹	g , ч	μ , ч ⁻¹	g , ч	μ , ч ⁻¹	g , ч
0,000	0,113	6,133	0,083	8,349	0,088	7,875
0,930	0,066	10,500	0,077	9,000	0,058	11,948
1,861	0,063	11,000	0,045	15,400	0,042	16,500
9,300	0,025	27,720	0,027	25,667	0,039	17,769
18,610	0,021	33,000	0,023	30,130	0,039	17,769

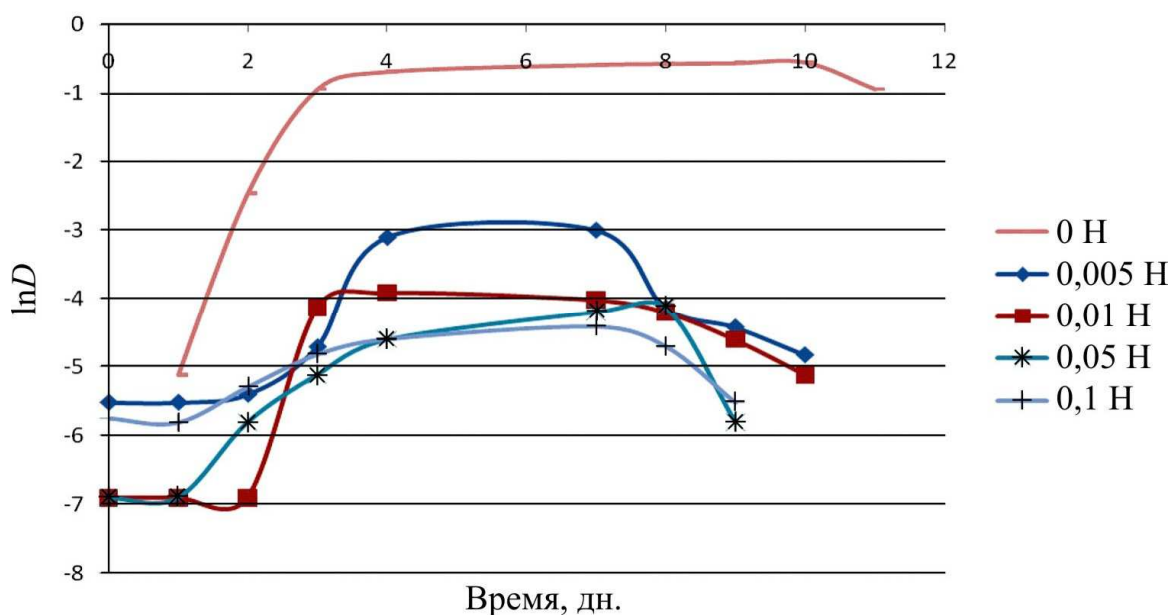


Рис. 1. Кривые роста культуры микроорганизмов (культура I)

Были проведены исследования влияния ЭДТА как единственного источника углерода на жизнедеятельность микроорганизмов, выделенных в стационарной фазе их роста, на среде, содержащей смесь глюкозы с ЭДТА. Отмечено потребление ЭДТА и прирост биомассы, о чем свидетельствует увеличение оптической плотности (рис. 2). Кривые их роста существенно отличаются от кривых роста исходных микроорганизмов. В результате проведенного культивирования, очевидно, произошел процесс адаптации микроорганизмов к ЭДТА как источнику

углерода. На кривых роста адаптированных микроорганизмов практически отсутствует лаг-период. Однако следует отметить короткий период стационарной фазы (2–3 сут), после чего наступает отмирание биомассы (см. рис. 2).

Дальнейшая адаптация микроорганизмов путем многократных пересевов на среде, содержащей ЭДТА, привела к увеличению времени стационарной фазы до 6–8 сут для исследуемой культуры (рис. 3).

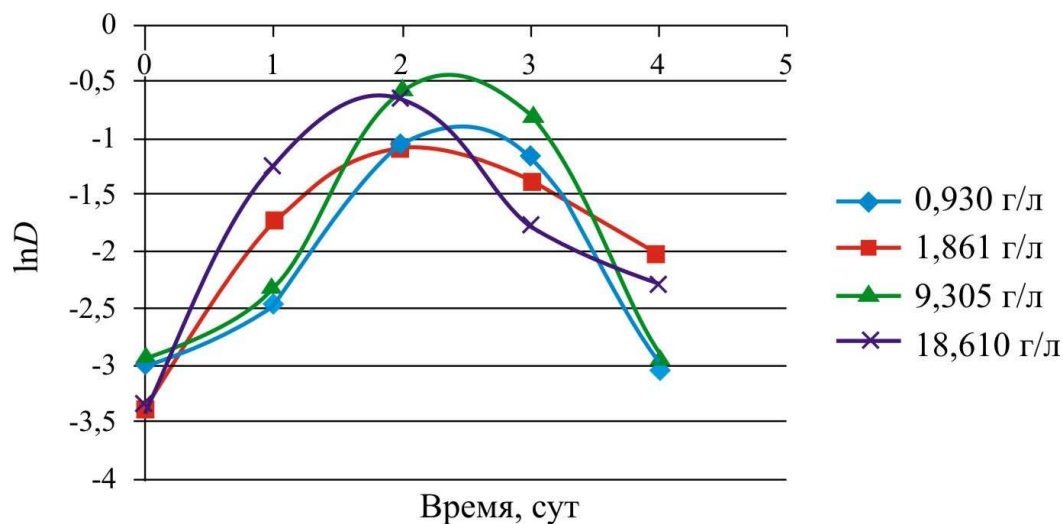


Рис. 2. Кривые роста адаптированных микроорганизмов на среде, содержащей в качестве источника углерода ЭДТА (культура I)

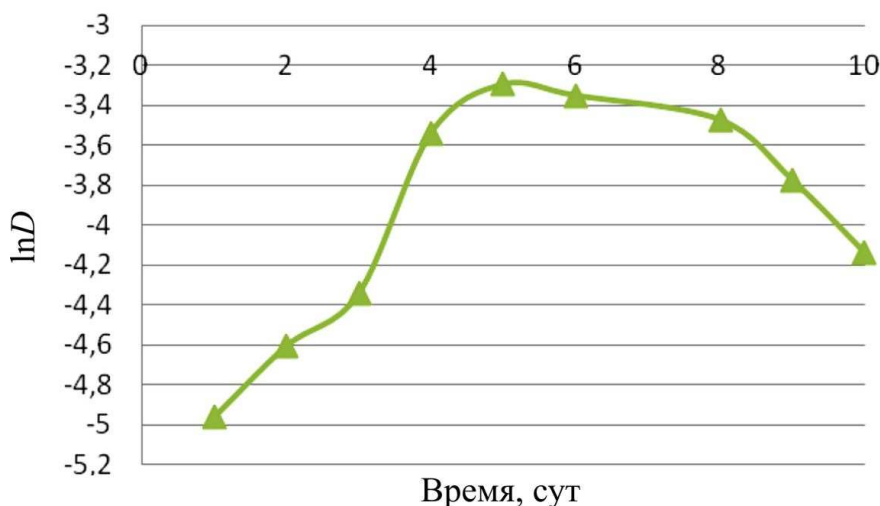


Рис. 3. Кривая роста адаптированных микроорганизмов на среде с ЭДТА в количестве 9,3 г/л (культура I)

Аналогичные закономерности наблюдались и при использовании культур II и III.

Изучение оптимальных условий культивирования адаптированных микроорганизмов показало, что скорость роста микроорганизмов

и потребление ЭДТА максимальны для культуры III при температуре 40 °С; для культуры II – 26–30 °С, а для культуры I – 34–40 °С.

Влияние величины рН среды изучали в диапазоне от 5 до 9. Показано, что для всех исследованных культур микроорганизмов оптимальное значение рН среды, при котором скорость роста и потребление субстрата максимальны, находится в пределах 5–7.

На следующем этапе работы изучен процесс биохимического удаления ЭДТА из водной среды, с использованием адаптированных штаммов микроорганизмов. Микроорганизмы культивировались в качалочных колбах на среде с ЭДТА (15,854 г/л) в качестве единственного источника углерода и азота. Время культивирования варьировалось от 1 до 13 сут. По истечении заданного времени биомассу отделяли от модельного раствора путем центрифугирования. В надосадочной жидкости и биомассе определяли содержание ЭДТА. Анализ изменения остаточного содержания ЭДТА в модельном растворе показал, что степень извлечения ЭДТА из водной среды возрастает с увеличением времени контакта и достигает 55–72 % в зависимости от используемой адаптированной культуры (рис. 4). Более высокую (70–72 %) степень извлечения ЭДТА из модельного раствора обеспечивает культура I при культивировании в течение 10–13 сут. Дальнейшее увеличение времени контакта биомассы с очищаемым модельным раствором приводит к гибели клеток.

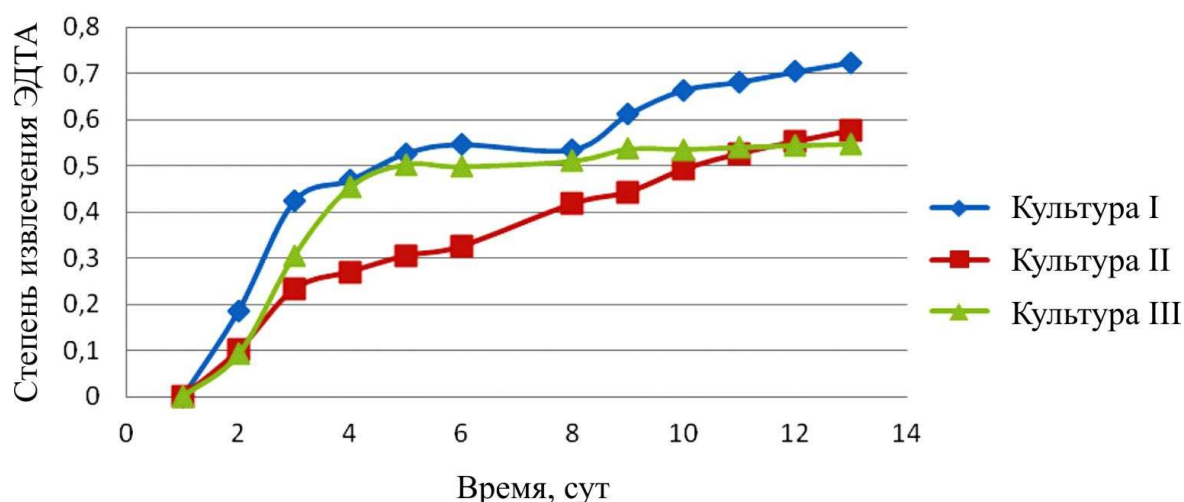
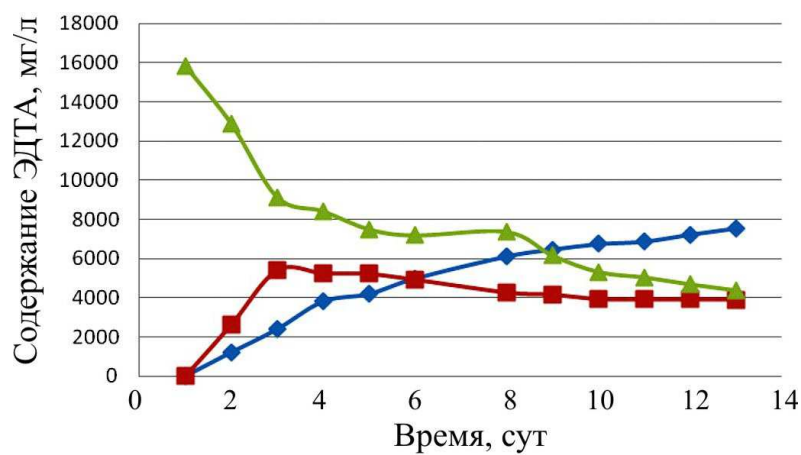
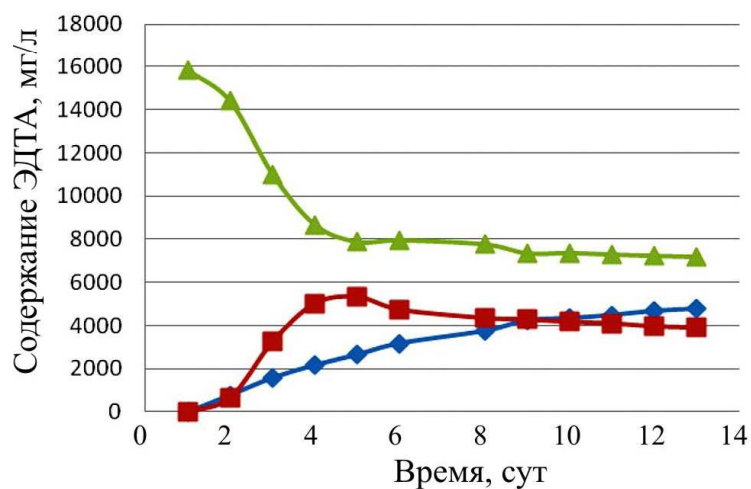


Рис. 4. Зависимость степени извлечения ЭДТА из модельного раствора от времени культивирования

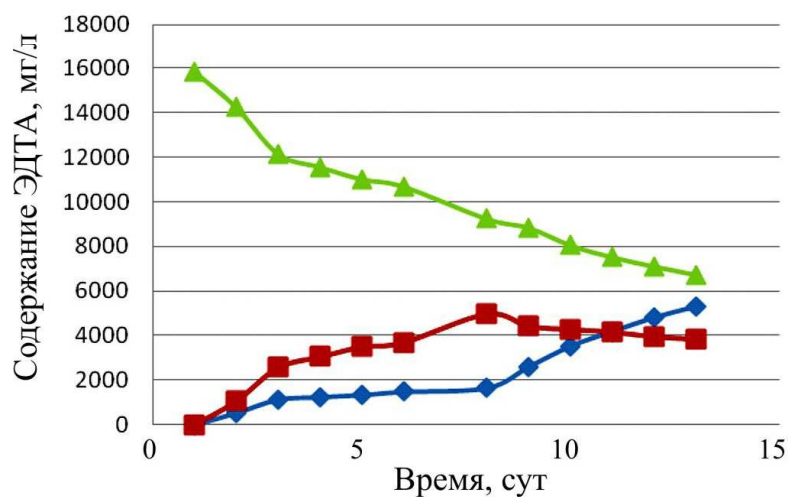
В биомассе обнаружено достаточно высокое содержание ЭДТА (5,3 г/л), однако его количество в сумме с остаточной концентрацией ЭДТА в модельном растворе значительно меньше, чем в исходном растворе (рис. 5). Это может указывать на то, что ЭДТА вначале накапливается



a



б



в

◆ 1 ■ 2 ▲ 3

Рис. 5. Зависимость изменения содержания ЭДТА в модельном растворе и биомассе от времени культивирования при использовании адаптированной культуры I (*a*), II (*б*), III (*в*): 1 – количество ЭДТА, подвергнувшегося биодegradации; 2 – содержание ЭДТА в биомассе; 3 – остаточное содержание ЭДТА в модельном растворе

в клетках микроорганизмов, а затем происходит его постепенное биоокисление. На рис. 5 представлены зависимости изменения содержания ЭДТА в модельном растворе и в биомассе, а также количество биоокисленного субстрата в процессе протекания биоочистки.

Как видно на рис. 5, *а*, в течение первых 3 сут концентрация ЭДТА в культуральной жидкости резко снижается. Происходит накопление этого компонента в биомассе клеток, после чего начинается его биодegradация. По истечении 6 сут культивирования процессы биодegradации ЭДТА в клетках микроорганизмов превалируют над процессами накопления. Общее же содержание ЭДТА в надосадочной жидкости в течение 13 сут снижается примерно в 4 раза (с 15,854 до 4,382 г/л).

Аналогичная картина наблюдается и при использовании штаммов II и III.

Адаптированная культура II (рис. 5, *б*) обеспечивает снижение содержания ЭДТА в растворе с 15,854 до 7,875 г/л. При этом наибольшая скорость извлечения поллютанта из раствора зафиксирована в первые 5 сут.

Наращение содержания ЭДТА в биомассе происходит в течение первых 5 сут. Одновременно наблюдается постепенное его биоокисление, о чем свидетельствует снижение содержания ЭДТА в биомассе клеток.

Применение адаптированной культуры III (рис. 5, *в*) позволило снизить концентрацию ЭДТА в модельном растворе в 2,4 раза при этом увеличение концентрации ЭДТА в биомассе наблюдалось в течение первых 8 сут. Одновременно с этим протекал процесс биодegradации ЭДТА.

Равенство концентраций в биомассе и биоокисленного ЭДТА установилось на 11 сут культивирования.

Из трех исследованных адаптированных к ЭДТА культур наиболее эффективной является культура I, микроорганизмы которой выделены из проб воды, отобранной из р. Данилихи (г. Пермь).

В результате проведенных исследований выделены и адаптированы культуры микроорганизмов, способные потреблять ЭДТА, как единственный источник углерода и азота; определены оптимальные значения pH и температуры их культивирования; изучены закономерности потребления ЭДТА штаммами микроорганизмов, адаптированными к изучаемому поллютанту.

Список литературы

1. Bucheli-Witschel M., Egli T. Environmental fate and microbial degradation of aminopolycarboxylic acids // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2001. – Vol. 25. – P. 69–106.
2. Sillanpaa M. Environmental fate of EDTA and DTPA // *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* – 1997. – Vol. 152. – P. 85–111.
3. Sillanpaa M. Distribution and fate of chelating agents in the environment // *Biogeochemistry of Chelating Agents* / eds. B. Nowack, J.M. VanBriesen / ACS Symposium Series 910. – N.Y.: Washington, DC, 2005. – P. 226–233.
4. Nowack B., VanBriesen J.M. Chelating agents in the environment // *Biogeochemistry of Chelating Agents* / eds. B. Nowack, J.M. VanBriesen / ACS Symposium Series 910. – N.Y.: Washington, DC, 2005. – P. 1–18.
5. Song J., Luo Y.M., Wu L.H. Chelate-enhanced phytoremediation of heavy metal contaminated soil // *Biogeochemistry of Chelating Agents* / eds. B. Nowack, J.M. VanBriesen / ACS Symposium Series 910. – N.Y.: Washington, DC, 2005. – P. 366–382.
6. Wolf K., Gilbert P.A. EDTA–Ethylenediaminetetraacetic acid // *The Handbook of Environmental Chemistry* / ed. O. Hutzinger. – Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1992. – P. 241–259.
7. Henneken L., Noertemann B., Hempel D.C. Influence of physiological conditions on EDTA degradation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1995. – Vol. 44. – P. 190–197.
8. Gardiner J. Complexation of trace metals by ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in natural waters // *Water Res.* – 1976. – Vol. 10. – P. 507–514.
9. Means J.L., Kucak T., Crerar D.A. Relative degradation rates of NTA, EDTA and DTPA and environmental implications // *Environ. Pollut. (Series B)*. – 1980. – P. 45–60.
10. Kari F.G., Giger W. Modeling the photochemical degradation of ethylenediaminetetraacetate in the river Glatt // *Environ. Sci. Technol.* – 1995. – P. 2814–2827.
11. Hinck M.L., Ferguson J., Puhaakka J. Resistance of EDTA and DTPA to aerobic biodegradation // *Wat. Sci. Tech.* – 1997. – Vol. 35. – P. 25–31.
12. Kari F.G., Giger W. Speciation and fate of ethylenediaminetetraacetate (EDTA) in municipal wastewater treatment // *Water Res.* – 1996. – Vol. 30. – P. 122–134.
13. Thomas R.A.P., Lawlor K., Bailey M., Macaskie L.E. Biodegradation of metal-EDTA complexes by an enriched microbial population // *Environ. Microbiol.* – 1998. – Vol. 64. – P. 1319–1322.

Получено 20.06.2012