



УДК 579.872:579.222.2
ББК 28.072
Биология

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПИРИДИНА КЛЕТКАМИ *Arthrobacter* sp. КМ-Р

Доктор биологических наук Ф. М. Хасаева
Доктор биологических наук Л. М. Захарчук
Доктор биологических наук А. И. Нетрусов
Кандидат биологических наук И. А. Паршиков

После длительного воздействия пиридина и его производных на образцы почвы был выделен бактериальный штамм *Arthrobacter* sp. КМ-Р, который был способен использовать незамещенный пиридин в качестве единственного источника углерода, азота и энергии.

Ключевые слова

Биодеструкция, микроорганизмы, пиридин, *Arthrobacter*

Введение

В результате деятельности человека в окружающую среду попадают токсичные соединения. Основными источниками загрязнения биосферы являются химические и фармацевтические предприятия. При этом, методы биотехнологии в настоящее время нашли широкое применение [1].

Наиболее успешная стратегия для биологической очистки сточных вод – это использование микроорганизмов-деструкторов, закрепленных на нерастворимых в воде носителях [2]. Серьезное место среди загрязнителей занимают пиридин и его производные. Впервые способность микроорганизмов утилизировать пиридин была обнаружена еще в начале XX века. Были выделены бактерии *Aerobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Bacterium herbicola*, которые росли на среде, содержащей 0,1-0,5% пиридина, используя его только в качестве источника азота [3].

Нами была выделена из почвы бактерия *Arthrobacter* sp. КМ-Р, способная к использованию пиридина [4] в качестве един-

ственного источника углерода, азота и энергии.

Цель работы – сравнение активности клеток штамма *Arthrobacter* sp. КМ-Р иммобилизованных в гель (альгината кальция) и клеток находящихся в суспензии по отношению к пиридину.

Материалы и методы исследования

Штамм *Arthrobacter* sp. КМ-Р, деструктор пиридина был выделен методом накопительных культур [4] из образцов почв загрязненных пиридинами. Для культивирования микроорганизмов использовали среду следующего состава (г/л): K_2HPO_4 – 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,002; Na_2MoO_4 – 0,001; 0,5М МОРS-бикарбонатный буферный раствор – 1 л, pH 7,0 – 7,2. Пиридин вносили в концентрациях 1,5 – 3,4 г/л. Культуры выращивали на качалке при 220 об/мин в колбах объемом 750 мл, содержащих 200 мл среды с пиридином. Рост культуры оценивали нефелометрически. Присутствие пиридина в

среде определяли по спектру поглощения на спектрофотометре «Hitachi-200-20» (Япония) при $\lambda=255$ нм.

В качестве ростового субстрата использовали коммерческий реактив пиридина марки «ч» (Россия). Для получения суспензионных клеток культуры *Arthrobacter* sp. КМ-Р выращивали до стационарной фазы роста (18 час), которую оценивали нефелометрически. Оптическая плотность суспензии клеток при этом составляла 0,9 единиц и соответствовала концентрации 2×10^8 кл/мл. Клетки отделяли от среды центрифугированием при 6000 г 10 мин.

Клетки *Arthrobacter* sp. КМ-Р иммобилизовали в альгинате кальция. Для этого суспензию клеток *Arthrobacter* sp. КМ-Р в объеме 100 мл приливали к 200 мл стерильного 3% раствора альгината натрия в дистиллированной воде для получения 2% раствора альгината натрия с клетками. Отдельно готовили 500 мл 0,2 М раствора CaCl_2 в дистиллированной воде и стерилизовали при 1 атм. Процесс иммобилизации клеток бактерий осуществляли стерильно. Для этого 2% раствор альгината натрия с клетками по каплям вносили в колбу с 0,2 М CaCl_2 . Полученные гранулы иммобилизованных в альгинате кальция клеток размером 1-1,5 мм выдерживали в 0,2 М растворе CaCl_2 от 10 до 12 часов. Затем раствор CaCl_2 сливали и помещали гранулы в 300 мл стерильного 0,9% раствора NaCl , в котором хранили иммобилизованные клетки *Arthrobacter* sp. КМ-Р при 4°C.

Для проведения деградации с помощью суспензионных и иммобилизованных клеток в минеральную среду вносили пиридин в концентрациях 1,5, 2,5, 3,0 и 3,4 г/л. В каждую из колб вносили по $1,0 \times 10^9$ клеток *Arthrobacter* sp. КМ-Р в виде 8,3 мл суспензии или 25 мл гранул альгината кальция. Пробы из колб с начальной концентрацией пиридина в среде 1,5 г/л отбирали через каждые 3 часа, а из колб, с другими концентрациями пиридина – через каждые 6 часов. Гранулы с иммобилизованными клетками отделяли от питательной среды фильтрованием.

Результаты исследования и их обсуждение

Первоначальная концентрация потребления пиридина культурой *Arthrobacter* sp. КМ-Р сразу после ее выделения из почвы была на уровне 1,5 г/л в течение 36 часов [5]. За время работы с культурой *Arthrobacter* sp. КМ-Р (2007-2012 гг.) ее активность значительно повысилась. К моменту настоящего исследования активность *Arthrobacter* sp. КМ-Р возросла почти в два раза и за 24 часа культура ассимилировала 2,5 г/л пиридина. Более высокие концентрации пиридина в среде (3,0 г/л) изначально замедляли, а содержание ксенобиотика 3,5 г/л и выше ингибировали рост культуры.

Повышение скорости расщепления пиридина культурой *Arthrobacter* sp. КМ-Р при продолжительной работе с ней можно объяснить процессами аутоиндукции клеток в результате многократных пересевов на жидкую минеральную среду содержащую более высокие концентрации этого соединения.

Таким образом, штамм *Arthrobacter* sp. КМ-Р способен расти на среде с высокой концентрацией пиридина, полностью его утилизирует и является одним из перспективных штаммов-деструкторов пиридина. Это открывает возможности для использования данного организма в очистке сточных вод от пиридина. Использование микроорганизмов в очистных сооружениях при периодическом и (или) непрерывном культивировании приводит к накоплению больших объемов биомассы, требующих утилизации. Использование иммобилизованных клеток микроорганизмов для очистки сточных вод может избавить от необходимости регулярной утилизации больших количеств биомассы [6]. Микроорганизмы, включенные в носитель, защищены от неблагоприятных воздействий. В тоже время, самому носителю может быть придана любая удобная для конкретного случая форма – гранула, диск, нить, трубка и др.[7].

В качестве носителя для иммобилизации клеток *Arthrobacter* sp. КМ-Р был ис-

пользован кальций-альгинатный гель. Выбор обусловлен относительно мягкими условиями иммобилизации клеток, а также возможностью их обеспечения питательными веществами и кислородом. Процесс иммобилизации клеток *Arthrobacter* sp. КМ-Р контролировали под микроскопом.

Скорость утилизации пиридина иммобилизованными клетками *Arthrobacter* sp. КМ-Р сравнивали со скоростью утилизации суспензионными клетками. Было выяснено, что суспензионные клетки по скорости утилизации пиридина несколько опережают иммобилизованные. Пиридин, в концентрации 1,5 г/л был полностью утилизирован суспензионными клетками за 6 часов. Иммобилизованные клетки ассимилировали такую концентрацию за 9 часов. Концентрация пиридина 2,5 г/л потребляется суспензионными клетками за 12 часов, а иммобилизованными в альгинате кальция клетками за 18 часов.

Концентрация пиридина 3,0 г/л была утилизирована суспензионными клетками за 18 часов, а 3,4 г/л – за 24 часа. Иммобилизованные клетки *Arthrobacter* sp. КМ-Р использовали те же в концентрации субстрата (3,0 и 3,4 г/л) медленнее суспензионных (30 и 32 часа, соответствен-

но).

Полученные результаты свидетельствуют о принципиальной возможности применения иммобилизованных в альгинате кальция клеток *Arthrobacter* sp. КМ-Р для очистки сточных вод от пиридина. Однако, каталитическая система с иммобилизованными клетками должна обеспечивать технологические и экономические преимущества по сравнению с микробиологическими процессами на основе суспензионных клеток. Реализация преимуществ иммобилизованных клеток возможна только при использовании их в биореакторах с периодическим или непрерывным режимом [6]. При этом в реакторе возможно использование более высоких концентраций иммобилизованных клеток *Arthrobacter* sp. КМ-Р. Для функционирования высоких концентраций аэробных бактерий в ферментере требуется создание высоких скоростей массопередачи за счет перемешивания гранул катализатора. Механическая прочность гранул альгината кальция допускает такую возможность [8].

Наиболее перспективным может стать проточный реактор с перемешиванием гранул альгината кальция, напоминающий вариант непрерывного культивирования сво-

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Паршиков И. А. Методы биотехнологии в синтезе лекарств. – Уфа, 2012. – 108 с.
2. Beshay U., Abd-El-Haleem D., Moawad H., Zaki S. Phenol biodegradation by free and immobilized *Acinetobacter* // *Biotechnol. Lett.* – 2002. – V. 24. – P. 1295-1297.
3. Moore F. W. The utilization of pyridine by microorganisms // *Journal of general microbiology.* – 1949. – V. 3. – P. 143-147.
4. Хасаева Ф. М., Воробьева Л. И., Модянова Л. В., Терентьев П. Б. *Arthrobacter crystallopoietes* КМ-4 – штамм-деструктор метил- и диметилпиридинов // *Биотехнология.* – 2007а. – № 3. – С. 58-63.
5. Хасаева Ф. М., Воробьева Л. И., Модянова Л. В., Терентьев П. Б. Утилизация штаммом *Arthrobacter crystallopoietes* КМ-4 метил- и диметилпиридинов // *Биотехнология.* – 2007б. – № 4. – С. 61-63.
6. Сеницын А. П., Райнина Е. И., Лозинский В. И., Спасов С. Д. Иммобилизованные клетки микроорганизмов. – М.: МГУ, 1994. – 288 с.
7. Park, J. K., Chang, H. N. Microencapsulation of microbial cells // *Biotechnol. Advances.* – 2000. – V. 18. – P. 303-319.
8. Liu R, Shen F. Impacts of main factors on bioethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* // *Bioresource Technol.* – 2008. – V. 99. – P. 847-854.