

УДК 579.64+541.64

Ю. Г. Максимова^{a,b}, А. А. Горшкова^c, В. А. Демаков^{a,b}

^a Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

^b Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

^c Пермский национальный исследовательский технический университет, Пермь, Россия

БИОДЕГРАДАЦИЯ ПОЛИАКРИЛАМИДОВ ПОЧВЕННОЙ МИКРОФЛОРОЙ И ШТАММАМИ АМИДАЗОСОДЕРЖАЩИХ БАКТЕРИЙ

Изучено влияние долговременной инкубации образцов дерново-луговой тяжелой суглинистой и аллювиальной луговой почв, а также песчаника нефтенасыщенного с полиакриламидами (ПАА) на количество амидазосодержащих бактерий в почве и общую амидазную активность почвенной вытяжки. Определено, что в аллювиальной и суглинистой почве при длительной инкубации с ПАА возрастает содержание микроорганизмов, обладающих амидазной активностью. Амидазная активность почвенной вытяжки за период с 6 до 34 недель возрастала на несколько порядков. Через 38 недель в аллювиальной почве отмечалась убыль ПАА, достигающая 10–37% от внесенного количества влагоудерживающего агента. Показано, что штаммы *Alcaligenes faecalis* 2 и *Acinetobacter guillouiae* 11h при росте на жидкой минеральной среде с источником углерода и ПАА как источником азота образуют биопленки на гранулах гидрогеля.

Ключевые слова: полиакриламид; полиакрилат; гидрогель; амидаза; почвенная микрофлора.

Yu. G. Maksimova^{a,b}, A. A. Gorshkova^c, V. A. Demakov^{a,b}

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch RAS, Perm, Russian Federation

^b Perm State University, Perm, Russian Federation

^c Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russian Federation

POLYACRYLAMIDE BIODEGRADATION BY SOIL MICROFLORA AND BACTERIA CONTAINING AMIDASE

The effect of long-term incubation of samples sod-meadow heavy loam and alluvial meadow soils, and oil-saturated sandstone with polyacrylamide (PAA) on the number of amidase containing bacteria in the soil and the total amidase activity of soil extract was studied. It was determined that in the alluvial and loamy soil during prolonged incubation with PAA content of microorganisms having amidase activity was increased. Amidase activity of soil extracts for the period from 6 to 34 weeks was increased by several orders of magnitude. After 38 weeks in the alluvial soil decline of PAA was marked, that achieved 10–37% of the introduced quantity of water-retaining agent. It was shown that *Alcaligenes faecalis* 2, and *Acinetobacter guillouiae* 11h on liquid mineral media with carbon source and the PAA as a source of nitrogen formed biofilms on the hydrogel beads.

Key words: polyacrylamide, polyacrylate, hydrogel beads, amidase, soil microflora.

Полиакриламиды и полиакрилаты – сополимеры акриламида и акриловой кислоты, широко используемые в различных областях деятельности человека. Это нефтехимическая [Минибаев, 2010], лакокрасочная, бумажная промышленность, водоподготовка [Куренков, Hartan, Лобанов, 2002] и сельское хозяйство [Смагин, 2012]. Полиакриламид (ПАА) считается экологически безвредным веществом, и в соответствии с ГОСТ 12.1.007.87 относится к группе малоопасных веществ. Одной из сфер применения сильнонабухающих полимерных гидрогелей является регуляция водного режи-

ма почв и грунтов в земледелии, озеленении городских ландшафтов, приусадебных хозяйствах и цветоводстве. Внесение полиакриламидных гелей в почву в качестве влагоудерживающих агентов должно производиться с учетом их биодеструкции. Разложение полиакриламидов микробиотой почвы изучено мало, хотя на практике может быть существенным. В лабораторных экспериментах получена зависимость интенсивности разложения гидрогелей от температуры [Смагин, Садовникова, Смагина, 2014], однако микробиологический аспект проблемы практически не изучен.

Полиакриламиды и полиакрилаты могут содержать следовые количества токсичных мономеров, кроме того, есть вероятность высвобождения этих мономеров при деградации полимеров. Так, известны случаи отравления акриламидом у пациентов, подвергнутых инъекциям препарата для пластической хирургии, содержащего полиакриламид [Wang, Du, Yu, 2013]. Использование акриловых полимеров в составе буровых растворов для увеличения нефтеотдачи пластов и укрепления стенок скважин может служить источником загрязнения окружающей среды. Поэтому проблема деградации полиакриламидов и полиакрилатов должна всесторонне изучаться, в том числе и в ракурсе биологической деструкции.

Немногочисленные сведения о штаммах бактерий, разлагающих полиакриламид, подтверждают возможность использования микроорганизмами этого полимера как источника азота [Matsuoka et al., 2002; Bao et al., 2010], либо углерода [Matsuoka et al., 2002; Wen et al., 2010; Сипулинов и др., 2014; Yu et al., 2015] для роста. Очевидно, что возможность утилизации полиакриламида в качестве источника энергии и/или азотного питания связана с наличием амидазной активности [Kay-Shoemake et al., 2000; Yu et al., 2015]. В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение влияния полиакриламидов на общую амидазную активность почвы и количество амидазосодержащих микроорганизмов и изучение особенностей роста штаммов, обладающих амидазной активностью, на полиакриламиде как источнике углерода и/или азота.

Материалы и методы исследования

Для изучения процесса долговременной биодеградации полиакриламида в колбы объемом 250 мл со 100 мл безазотистой минеральной среды (N) состава (г/л): KH_2PO_4 – 1.0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 1.6; NaCl – 0.5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, CaCl_2 – 0.005; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.01; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.01 (рН 7.2±0.2) внесли 1 г сырой дерново-луговой тяжелой суглинистой (1) и аллювиальной луговой (2) почвы (пробы отобраны в с. Чайковская Нытвенского р-на Пермского края) и песчаника нефтенасыщенного, кварцевого, мелкозернистого (3), отобранного из Черновского месторождения, в 15 км от пос. Шаркан Удмуртской республики, с глубины 1 405 м. В среду внесли полиакриламид марок «Биосорб» (ЗАО Ашленд – МСП) или ВУМ 36/0

(Институт технической химии УрО РАН, Пермь). Контролем служили почвенные вытяжки без добавления ПАА. Среды инкубировали на качалке со скоростью перемешивания 120 об/мин при 25°C в течение 38 недель.

Содержание амидазосодержащих микроорганизмов определяли по количеству КОЕ/мл при высеве из 10-кратных разведений почвенной вытяжки на агаризованную минеральную среду с 10 мМ ацетамидом как единственным источником углерода и азота.

Для определения общей амидазной активности почвенных микроорганизмов к 1 мл пробы почвенной вытяжки добавляли 10–50 мМ раствор ацетамида или акриламида в качестве субстрата, инкубировали при 30°C, через 1–48 ч останавливали реакцию добавлением HCl до концентрации 5%, центрифугировали 10 мин при 11 тыс. об/мин. Концентрацию акриламида и акриловой кислоты, ацетамида и уксусной кислоты в надосадочной жидкости определяли методом ВЭЖХ и ГХ соответственно.

После 38 недель инкубации почвенной вытяжки с ПАА остаточный ПАА высушивали при 70°C до постоянного веса и взвешивали на аналитических весах.

Суспензию штаммов амидазосодержащих бактерий *Alcaligenes faecalis* 2 и *Acinetobacter guillouiae* 11h инокулировали по 100 мкл в 50 мл среды N, содержащей 0.1 М ацетат натрия в качестве источника углерода и 50 мг ПАА (ВУМ 36/0) в качестве источника азота. Микроскопию гранул ПАА проводили через 4–7 сут в световом микроскопе Leica DM LS (Германия) с фазовым контрастом при увеличении 1 000 раз.

Результаты и их обсуждение

При долговременной инкубации почвенной вытяжки с ПАА разных типов было отмечено возрастание ацетамид-утилизирующих бактерий в суглинистой и аллювиальной луговой почвах, что выражалось в увеличении КОЕ/мл при высеве почвенной вытяжки на агаризованную синтетическую минеральную среду с ацетамидом как единственным источником углерода и азота (табл. 1) и в увеличении общей амидазной активности почвы (табл. 2).

Таблица 1

Содержание amid-утилизирующих микроорганизмов в почвах при длительной инкубации с ПАА, КОЕ/мл

Проба	Продолжительность эксперимента, недели						
	3	6	8	25	35	38	
1	Контроль	3.5×10^7	2×10^7	8×10^7	2×10^7	5×10^8	6×10^8
	«Биосорб»	1.2×10^8	1.7×10^8	6×10^8	8.3×10^8	-	1.6×10^9
	ВУМ 36/0	4.7×10^6	1.4×10^7	3×10^7	-	5×10^8	
2	Контроль	3.3×10^5	4.8×10^5	8×10^5	-	3×10^8	9×10^8
	«Биосорб»	1.1×10^6	1.6×10^6	-	4×10^7	4×10^8	2.8×10^9
	ВУМ 36/0	8×10^5	8×10^5	-	2×10^7	-	1.1×10^9

Таблица 2
**Общая амидазная активность почвенной
 вытяжки при долговременной инкубации с
 ПАА, мкмоль/мл/ч**

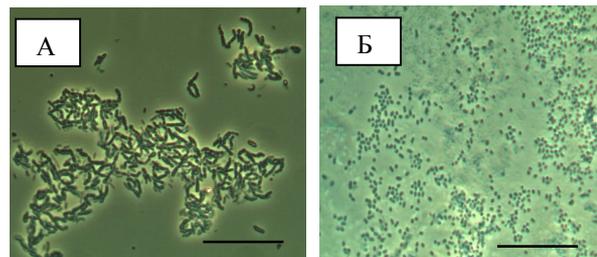
Проба		Продолжительность эксперимента, недели		
		6	27	34
1	Контроль	0.017	0.078	8.529
	«Биосорб»	0.046	0.256	9.077
	ВУМ 36/0	0.032	0.263	10.439
2	Контроль	0.010	0.248	6.003
	«Биосорб»	0.029	0.085	10.749
	ВУМ 36/0	0.012	0.249	9.443
		9	16	
3	Контроль	0.229	3.684	
	«Биосорб»	0.218	2.905	
	ВУМ 36/0	0.195	1.975	

Для образцов суглинистой почвы обнаружено повышение амидазной активности и увеличение числа жизнеспособных амид-утилизирующих бактерий при инкубации с ПАА по сравнению с контролем. Для аллювиальной почвы эта тенденция также заметна, за исключением пробы, взятой через 27 недель. Однако для песчаной почвы такой тенденции не наблюдалось, и общая амидазная активность почвенной вытяжки была даже ниже, чем контрольной. Следовательно, на микрофлору суглинистой и аллювиальной почвы оказывает воздействие как ПАА типа «Биосорб», так и ВУМ 36/0, влияя на общее содержание и активность амид-гидролизующих микроорганизмов. Нами ранее было показано, что ПАА марки ВУМ 36/0 не оказывает заметного влияния на почвенные бактерии *Bacillus subtilis* ATCC 6633 и *Pseudomonas fluorescens* C2 как в водной среде, так и в почве [Максимова и др., 2010], однако изученные ранее штаммы не обладали амидазной активностью.

До настоящего времени микробная деградация ПАА остается недостаточно исследованной. Так, существует мнение, что ПАА подвергается физико-химической деградации, после чего короткие отрезки полимера разрушаются микрофлорой почвы [Смагин, 2012, Смагин, Садовникова, Смагина, 2014]. В наших исследованиях гравиметрическим методом было определено, что только при инкубации с аллювиальной почвой в течение 38 недель заметно снижается масса ПАА. При инкубации с суглинистой почвой и песчаником убыль ПАА обеих марок не отмечалась. В аллювиальной почве убыль ВУМ 36/0 составила 37%, «Биосорба» – 10%.

С целью более детального изучения возможности использования ПАА бактериями в качестве источника углеродного или азотного питания штаммы *Al. faecalis* 2 и *Ac. guillouiae* 11h, обладающие

амидазной активностью, культивировали с ПАА ВУМ 36/0 на жидкой синтетической минеральной среде без источника азота и с ацетатом натрия как источником углерода, либо без дополнительных источников углерода и азота. На среде с ацетатом натрия наблюдали рост амидазосодержащих бактерий на гранулах ПАА. При микроскопировании гранул в фазовом контрасте с увеличением и 1000 раз было показано нарастание биопленки на поверхности гранул (рисунок). Изученные штаммы не использовали ПАА как источник углерода.



Образование биопленки на гранулах ПАА:

А – *Ac. guillouiae* 11h, Б – *Al. faecalis* 2.

Масштабная линейка соответствует 15 мкм

Таким образом, содержание бактерий, обладающих амидазной активностью, в аллювиальной и суглинистой почве при длительной инкубации с ПАА возрастает, причем за 38 недель убыль ПАА отмечается только в аллювиальной почве – от 10 до 37% от внесенного количества ПАА. Способность амидазосодержащих бактерий использовать ПАА в качестве источника азота подтверждается образованием биопленок на гранулах геля в отсутствии иного источника азота, но с внесением дополнительного источника углерода.

Работа поддержана Комплексной программой Уральского отделения РАН (0426-2015-0028), проект № 15-4-4-26 «Биосинтез и биокаталитическая трансформация полимерных соединений».

Библиографический список

- Куренков В.Ф., Hartan Н.-G., Лобанов Ф.И. Применение полиакриламидных флокулянтов для водоочистки // Химия и компьютерное моделирование. Бутлеровские сообщения. 2002. № 11. С. 31–40.
- Максимова Ю.Г. и др. Влияние гидрогелей полиакриламида на микрофлору почвы // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2010. Вып. 1(1). С. 45–49.
- Минибаяев В.В. Исследование и разработка промышленных жидкостей на основе акриловых реагентов многофункционального назначения: дис. ... канд. техн. наук. М., 2010. 141 с.

- Сипулинов Р.Б. и др. Выделение и оценка деструктивной активности микроорганизмов, утилизирующих акриловые полимеры // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. 2014. Т. 27 (66), № 2. С. 150–156.
- Смагин А.В. Теория и практика конструирования почв. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2012. 544 с.
- Смагин А.В., Садовникова Н.Б., Смагина М.В. Биодеструкция сильнонабухающих полимерных гидрогелей и ее влияние на водоудерживающую способность почв // Почвоведение. 2014. № 6. С. 716–723.
- Bao M. et al. Biodegradation of partially hydrolyzed polyacrylamide by bacteria isolated from production water after polymer flooding in an oil field // *J. Hazard. Mater.* 2010. Vol. 184. P. 105–110.
- Kay-Shoemake J.L. et al. Soil amidase activity in polyacrylamide-treated soils and potential activity toward common amide-containing pesticides // *Biol. Fertil. Soils.* 2000. Vol. 31. P. 183–186.
- Matsuoka H. et al. Isolation of polyacrylamide-degrading microorganisms from soil // *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2002. Vol. 7. P. 327–330.
- Wang Y., Du R., Yu T. Systematical method for polyacrylamide and residual acrylamide detection in cosmetic surgery products and example application // *Science and Justice.* 2013. Vol. 53. P. 350–357.
- Wen Q. et al. Biodegradation of polyacrylamide by bacteria isolated from activated sludge and oil-contaminated soil // *J. Hazard. Mater.* 2010. Vol. 175. P. 955–959.
- Yu F. et al. Isolation and characterization of polyacrylamide-degrading bacteria from dewatered sludge // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2015. Vol. 12. P. 4214–4230.
- Minibaev V.V. *Issledovanie i razrabotka promyvochnykh nizhdkostej na osnove akrilovykh reagentov mnogofunkcional'nogo naznacheniya. Diss. kand. techn. nauk* [Research and development of drilling fluids on the basis of acrylic multi-purpose reagents. Diss. PhD]. Moscow, 2010, 141 p. (In Russ.).
- Sipulinov R.B., Karagaicheva Yu.V., Kozulina T.N., Rogacheva S.M., Otradnova M.I. [Isolation and evaluation of the destructive activity of the microorganisms, utilizing acrylic polymers]. *Uchenye zapiski Tavricheskogo nacional'nogo universiteta imeni V.I. Vernadskogo*, V. 27 (66), N 2 (2014): pp. 150–156. (In Russ.).
- Smagin A.V. *Teoriya i praktika konstruirovaniya pochv* [Theory and practice of soil designing]. Moscow, 2012, 544 p. (In Russ.).
- Smagin A.V., Sadovnikova N.B., Smagina M.V. [Biodestruction of strongly swelling polymer hydrogels and its effect on the water retention capacity of soils]. *Pochvovedenie*, N 6 (2014): pp. 591–597. (In Russ.).
- Bao M., Chen Q., Li Y., Jiang G. Biodegradation of partially hydrolyzed polyacrylamide by bacteria isolated from production water after polymer flooding in an oil field. *J. Hazard. Mater.* V. 184 (2010): pp. 105–110.
- Kay-Shoemake J.L., Watwood M.E., Sojka R.E., Lentz R.D. Soil amidase activity in polyacrylamide-treated soils and potential activity toward common amide-containing pesticides. *Biol. Fertil. Soils*, V. 31 (2000): pp. 183–186.
- Matsuoka H., Ishimura F., Takeda T., Hikuma M. Isolation of polyacrylamide-degrading microorganisms from soil. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, V. 7 (2002): pp. 327–330.
- Wang Y., Du R., Yu T. Systematical method for polyacrylamide and residual acrylamide detection in cosmetic surgery products and example application. *Science and Justice*, V. 53 (2013): pp. 350–357.
- Wen Q., Chen Z., Zhao Y., Zhang H., Feng Y. Biodegradation of polyacrylamide by bacteria isolated from activated sludge and oil-contaminated soil. *J. Hazard. Mater.*, V. 175 (2010): pp. 955–959.
- Yu F., Fu R., Xie Y., Chen W. Isolation and characterization of polyacrylamide-degrading bacteria from dewatered sludge. *Int. J. Environ. Res. Public Health.*, V. 12 (2015): pp. 4214–4230.

References

- Kurenkov V.F., Hartan H.-G., Lobanov F.I. [The use of polyacrylamide flocculants for water treatment]. *Chimija i komp'juternoje modelirovanie. Butlerovskie soobshchenija*, N 11 (2002): pp. 31–40. (In Russ.).
- Maksimova Yu.G., Maksimov A.Yu., Demakov V.A., Budnikov V.I. [Effect of polyacrylamide hydrogels on soil microflora]. *Vestnik Permskogo universiteta. Ser. Biologija*, Iss. 1(1) (2010): pp. 45–49. (In Russ.).

Об авторах

Максимова Юлия Геннадьевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной

Поступила в редакцию 02.03.2017

About the authors

Maksimova Yuliya Gennad'evna, doctor of biology, Leading Researcher of the Laboratory of Molecular Microbiology and Biotechnology

микробиологии и биотехнологии
ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН

доцент кафедры микробиологии и иммунологии
ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»

ORCID: 0000-0003-1870-1369

614081, Пермь, ул. Голева, 13;
maks@iegm.ru; (342)2124476

Горшкова Анна Анатольевна, студентка
ФГБОУВО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет»

ORCID: 0000-0002-2362-660X

614990, Пермь, Комсомольский проспект, д. 29;
anna_gorshkova@bk.ru

Демаков Виталий Алексеевич, доктор
медицинских наук, профессор, чл.-корр. РАН,
директор, заведующий лабораторией
молекулярной микробиологии и биотехнологии
ФГБУН Институт экологии и генетики
микроорганизмов УрО РАН

профессор кафедры микробиологии и иммунологии

ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»

ORCID: 0000-0002-3392-7553

614081, Пермь, ул. Голева, 13;
demakov@iegm.ru; (342)2807442

Institute of Ecology and Genetics of
Microorganism UB RAS

associate professor of the Department of
Microbiology and Immunology
Perm State University

ORCID: 0000-0003-1870-1369

13, Golev str., Perm, Russia, 614081;
maks@iegm.ru; (342)2124476

Gorshkova Anna Anatol'evna, student
Perm National Research Polytechnic University

ORCID: 0000-0002-2362-660X

29, Komsomolsky av., Perm, Russia, 614990;
anna_gorshkova@bk.ru

Demakov Vitaliy Alekseevich, Doctor of Medicine,
Professor, Corresponding Member of the Russian
Academy of Sciences, Director, Head of the
Laboratory of Molecular Microbiology and
Biotechnology

Institute of Ecology and Genetics of Microorganism
UB RAS

professor of the Department of Microbiology and
Immunology

Perm State University

ORCID: 0000-0002-3392-7553

13, Golev str., Perm, Russia, 614081;
demakov@iegm.ru; (342)2807442

