

УДК 502.171; 504.054; 631.618

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЦЕНКА ДЕСТРУКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ, УТИЛИЗИРУЮЩИХ АКРИЛОВЫЕ ПОЛИМЕРЫ

Сипулинов Р.Б., Карагайчева Ю.В., Козулина Т.Н., Рогачева С.М., Отраднова М.И.

*Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А., Саратов,
Российская Федерация
E-mail: smro13@land.ru*

Исследована деструктивная активность коллекционных культур и бактериальных штаммов, выделенных из контаминированного бурового раствора, в отношении полиакриламида и полиакрилата натрия. Определены наиболее перспективные культуры.

Ключевые слова: буровой раствор, полиакриламид, полиакрилат, микроорганизмы, деструктивная активность.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время на территории России происходит активное освоение нефтяных месторождений. Добыча и транспортировка нефти, а также хранение выбуренных шламов оказывают негативное влияние на окружающую среду, приводящее к изменению ландшафтов, деградации почв, загрязнению поверхностных и подземных вод [1, 2]. При бурении одной скважины образуется около 500-800 м³ отходов, 10% которых приходится на долю компонентов буровых растворов, содержащих полиакриламид и полиакриловую кислоту [3].

Таким образом, одной из проблем при восстановлении нарушенных и загрязненных шламами территорий является утилизация полимеров. Их деструкцию могут осуществлять различные микроорганизмы, в частности, бактерии из родов *Rhodococcus* и *Bacillus*, и микромицеты, например, представители из рода *Fusarium* [4, 5]. Хорошо известны штаммы-деструкторы акриламида и акриловой кислоты – исходных мономеров для получения акриловых полимеров, например, *Fusarium sp.* N56, *Bacillus subtilis* 1742Д, *Rhodococcus erythropolis* E84. [6, 7]. Всесторонне исследованы метаболические пути деструкции акриловой кислоты и ее производных [8, 9]. Но в доступной литературе ограничены сведения о путях деструкции акриловых полимеров и микробных штаммах, способных использовать эти полимеры в качестве единственного источника углерода и энергии.

Целью данной работы явилось выделение из образцов бурового раствора микроорганизмов и оценка их деструктивной активности в отношении акриловых полимеров, а также скрининг штаммов-деструкторов среди коллекционных культур.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

- выделить из проб бурового раствора доминирующие группы микроорганизмов в чистую культуру;

- оценить способность коллекционных и вновь выделенных бактериальных штаммов к деградации акриловых полимеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследованы штаммы бактерий родов *Brevibacterium species 13ПА*, *Alcaligenes faecalis KSV-21*, *Pseudomonas alcaligenes бн*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes 5з*, *Rhodococcus rhodochrous М8*, *Arthrobacter species 1-СМ*, *Kurtia species 2-14* – деструкторы акриламида и акриловой кислоты. В качестве источника выделения микроорганизмов-деструкторов использовали буровой раствор на основе частично гидролизованного полиакриламида (ПАА) и полиакрилата натрия (ПАН), подвергшийся микробной контаминации.

Выделение изолятов из бурового раствора проводилось методом прямого высева на плотную питательную среду. Способность использовать ПАА в качестве единственного источника углерода и энергии определяли методом посева исследуемых культур на агаризованную среду М9, содержащую 1 г/л ПАА [10]. Культивирование осуществляли при температуре 28⁰С в течение 7 суток. Обильный рост культур на голодной среде с ПАА, свидетельствовал об их способности утилизировать данное соединение.

Для изучения процессов биодegradации мономеров и полимеров производили посев выделенных изолятов и коллекционных штаммов в жидкую модифицированную среду М9, содержащую исследуемые соединения. Акриламид (АА) и акриловую кислоту (АК) вносили в концентрации 2 г/л, ПАА – 1 г/л, модельный буровой раствор – 0,725 г/л. Буровой раствор готовили из расчета 10 г/л ПАА и 4,5 г/л ПАН. Культивирование проводили в течение 6 суток при температуре 28⁰С и постоянном перемешивании.

О степени биодegradации акриловых полимеров и мономеров судили по уменьшению их количества, а также косвенно по увеличению биомассы. Концентрацию АК и АА определяли на спектрофотометре UNICO 2800 (США) при $\lambda=255$ нм для АК, и $\lambda=260$ нм для АА, толщина оптического слоя составляла 10 мм.

Содержание ПАА определялось спектрофотометрическим методом (при $\lambda = 480$ нм), основанным на измерении оптической плотности окрашенного комплексного соединения, образованного акриловыми полимерами и спиртовым раствором дитизона по предварительно построенному калибровочному графику. Рост бактерий оценивали по величине оптической плотности клеточной суспензии, измеряемой на том же приборе при $\lambda = 540$ нм и толщине оптического слоя 10 мм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследований среди коллекционных культур проводился поиск микроорганизмов, способных к деструкции акриловых полимеров. Основанием для выбора вышеперечисленных бактериальных штаммов послужила их способность использовать в качестве единственного источника углерода и энергии различные поллютанты, в том числе, акриламид и акриловую кислоту [6, 7]. Для скрининга использовали агаризованную среду, не содержащую никаких других источников углерода и азота, кроме АА, АК или акриловых полимеров. После культивирования

штаммов в течение 7 суток отмечали наличие или отсутствие роста колоний на агаре. Из результатов исследований, представленных в табл. 1, видно, что большинство исследуемых коллекционных культур способны утилизировать АА и АК, и только три штамма разрушали ПАА. Максимальную деструктивную активность проявили культуры *Brevibacterium species 13ПА* и *Arthrobacter species 1-СМ*, которые были использованы для дальнейших исследований.

Таблица 1.
Деструктивная активность исследуемых микроорганизмов

Исследуемая культура	Деструктивная активность		
	АА	АК	ПАА
<i>Brevibacterium species 13ПА</i>	++	-	++
<i>Alcaligenes faecalis KSV-21</i>	++	-	±
<i>Pseudomonas alcaligenes 6n</i>	±	+	-
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes 5z</i>	±	+	-
<i>Rhodococcus rhodochrous M8</i>	±	-	-
<i>Arthrobacter species 1-СМ</i>	++	±	++
<i>Kurtia species 2-14</i>	+	+	-

Учитывая незначительную деструктивную активность коллекционных культур в отношении ПАА, был проведен скрининг природных штаммов-деструкторов. В качестве источника выделения микроорганизмов-деструкторов использовали контаминированный буровой раствор, из которого был выделен консорциум микроорганизмов, представленный штаммами-деструкторами и их природными бактериями-спутниками. Консорциум состоял из шести изолятов, которые в дальнейшем были выделены в чистую культуру (БР-1 – БР-6).

Деструктивную активность коллекционных штаммов и полученных изолятов в отношении ПАА определяли по уменьшению концентрации полимера в культуральной среде, результаты исследований представлена на рисунке 1а. Косвенным подтверждением способности выделенных культур использовать ПАА в качестве единственного источника углерода и энергии является наличие роста микроорганизмов на данной среде, что проявляется в увеличении оптической плотности культуральной жидкости (рис. 1б).

Из данных, представленных на рис. 1а и 1б, видно, что наибольшей деструктивной активностью в отношении ПАА обладают штаммы БР-1 и БР-4, о чем свидетельствует снижение концентрации ПАА в среднем на 35% и скорости роста культур более, чем в 2 раза. Активность штаммов БР-2 и БР-6 была значительно ниже – 23%, что согласуется с данными по увеличению в 1,5 раза плотности культуральной жидкости.

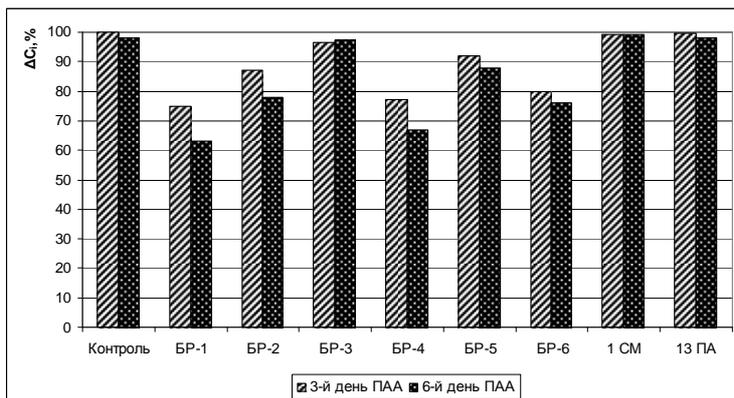


Рис. 1а. Относительное изменение концентрации ПАА в процессе его деструкции.

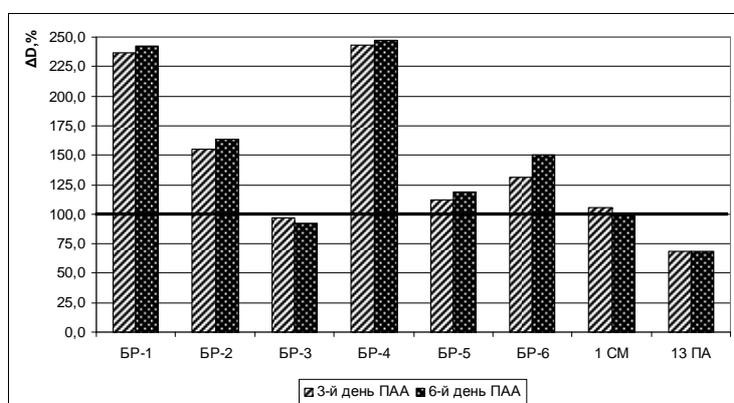


Рис. 1б. Относительное изменение оптической плотности культуральной жидкости в процессе деструкции ПАА.

Изучение деструктивной активности коллекционных культур и выделенных изолятов в отношении модельного бурового раствора подтвердило эффективность использования штаммов БР-1 и БР-4. Незначительную активность в отношении компонентов бурового раствора проявил коллекционный штамм 1-СМ, что объясняется способностью данной культуры утилизировать АК. Данные экспериментов представлены на рис. 2а и 2б.

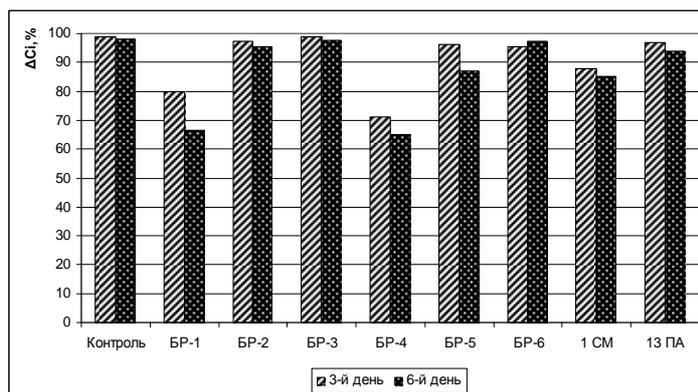


Рис. 2а. Относительное изменение концентрации компонентов бурового раствора в процессе их деструкции.

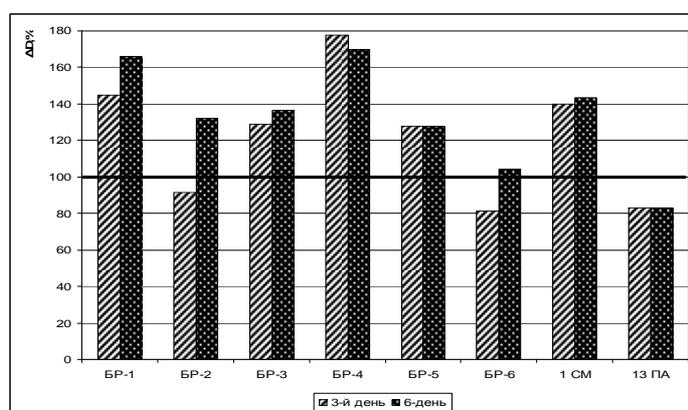


Рис. 2б. Относительное изменение оптической плотности культуральной жидкости в процессе деструкции компонентов бурового раствора.

Микроскопические исследования наиболее перспективных культур БР-1 и БР-4 показали, что штамм БР-1 представлен грамположительными мелкими коккобациллами, штамм БР-4 – грамположительными кокками.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Коллекционные штаммы *Brevibacterium species 13ПА* и *Arthrobacter species 1-СМ*, вызывающие биodeградацию акриламида и акриловой кислоты, обладали сравнительно низкой деструктивной активностью в отношении гидролизованного полиакриламида.
2. Из загрязненного бурового раствора выделен консорциум микроорганизмов, представленный шестью изолятами, способными к разложению ПАА.
3. Среди изолятов из бурового раствора выявлено два перспективных штамма бактерий, с лабораторными шифрами БР-1 (грамположительные коккобактерии) и БР-4 (грамположительные кокки), использующие полиакриламид в качестве единственного источника углерода и энергии.