

### МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДЕГРАДАЦИЯ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ В МОДЕЛЬНЫХ ПОЧВЕННЫХ СРЕДАХ\*

Исследована биодegradация полигидроксиалканоатов (ПГА) различного химического состава в модельных почвенных средах. Показано, что менее кристаллические сополимерные образцы разрушаются быстрее гомополимерных. Установлено, что на поверхности образцов ПГА формируется специфичный микробный комплекс и определены первичные деструкторы ПГА: бактерии *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* и микромицеты *Penicillium*, *Acremonium* и *Trichoderma*.

**Ключевые слова:** полигидроксиалканоаты (ПГА), деградация полимеров, микроорганизмы-деструкторы ПГА.

S.V. Prudnikova

### MICROBIOLOGICAL DEGRADATION OF POLYHYDROXYALKANOATES IN MODEL SOIL ENVIRONMENTS

The degradation of polyhydroxyalkanoates (PHA) with different chemical composition in model soil environments is studied in the article. It is shown that less crystalline co-polymer samples are destroyed faster than homopolymer ones. It is determined that the specific microbial complex is formed on PHA-surfaces and initial PHA-degrading microorganisms are identified such as: bacteria *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* and micromycetes *Penicillium*, *Acremonium* and *Trichoderma*.

**Key words:** polyhydroxyalkanoates (PHA), polymers degradation, PHA-degrading microorganisms.

**Введение.** Развитие науки и техники приводит к все более широкому внедрению в практику целевых продуктов, синтезируемых микроорганизмами. Ценным продуктом биотехнологии являются микробные полигидроксиалканоаты (ПГА) – полимеры гидроксипроизводных жирных кислот, синтезируемые бактериями в качестве внутриклеточного запасного вещества. Эти соединения обладают ценными свойствами: по ряду физико-химических свойств они близки к синтетическим полимерам, но в то же время способны быстро разлагаться, не выделяя токсических веществ в окружающую среду [9, 10]. Начинает формироваться рынок изделий из ПГА бытового, пищевого и сельскохозяйственного назначения: разрушаемая упаковка пищи и напитков, предметы гигиены и санитарии, системы контролируемой доставки удобрений и гербицидов и т.д. [1, 8, 12]. С увеличением объемов выпуска и расширением сфер применения ПГА становится актуальным изучение способности окружающей среды к ассимиляции таких соединений. Ключевую роль в этих процессах играют микроорганизмы, поэтому необходимо проведение всесторонних исследований последствия взаимодействия ПГА с микроорганизмами в процессе биоразрушения.

**Цель исследований.** Сравнительный анализ биодеструкции изделий из полигидроксиалканоатов различного химического строения в почве в условиях модельного эксперимента и выделение микроорганизмов-деструкторов.

**Методы исследований.** В работе исследовали образцы пленок и прессованных объемных компактов из полигидроксиалканоатов различного химического состава, полученных по технологии Института биофизики СО РАН в культуре водородных бактерий *Wautersia eutropha* ВКПМ-5786 [5]: гомополимера поли-3-гидроксибутирата – ПЗГБ, степень кристалличности ( $C_x$ ) 76 %, и двухкомпонентных сополимеров поли-3-гидроксибутирата/3-гидроксивалерата – ПЗГБ/ЗГВ ( $C_x$  50 %, включение валерата 13 мол%) и поли-3-гидроксибутирата/3-гидроксигексаноата – ПЗГБ/ЗГГ ( $C_x$  36 %, включение гексаноата 10,2 мол%). Пленки изготавливали методом полива из 4 %-го раствора полимера в хлороформе на стеклянные поверхности и последующего испарения растворителя. Из пленок высекали диски: диаметр 30 мм, толщина  $0,1 \pm 0,02$  мм, масса  $73 \pm 5$  мг. Объемные компакты получали методом холодного прессования порошка полимера под давле-

\* Работа выполнена при поддержке проекта по Постановлению Правительства РФ для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования (договор №11.G34.31.0013).

нием (120 кг/см<sup>2</sup>) на лабораторном прессе AutoPellet 3887 (Carver, США); диаметр образцов 5 мм, толщина 2 мм, масса 150±10 мг.

Сравнительное исследование биоразрушаемости ПГА различного химического состава выполнено в лабораторных условиях: в стерильном фосфатном буфере (рН 5,2; 5,9; 7,0), водопроводной воде и почвенных микроекосистемах. В пластиковые контейнеры с почвой объемом 400–500 мм<sup>2</sup> были помещены предварительно взвешенные образцы полимеров, упакованные в чехлы из мелкоячеистого мельничного газа. Контейнеры инкубировали в термостате при температуре 25±0,1 °С и влажности почвы 55–60 %. Длительность эксперимента составляла 120 суток, уменьшение массы образцов определяли в динамике.

Для анализа почвенных проб использовали общепринятые микробиологические методы [2]. Экологотрофические группы микроорганизмов определяли методом высева на диагностические среды: мясопептонный агар (МПА) – для бактерий-копиотрофов, сусло-агар (СА) – для микромицетов, крахмалоаммиачный агар (КАА) – для прототрофов, почвенный агар (ПА) – для олиготрофов, агар Эшби – для аэробных азотфиксаторов и олигонитрофилов. По соотношению основных групп микроорганизмов в пробах рассчитывали коэффициенты минерализации и олиготрофности. Выделение бактерий, доминирующих в исследуемых образцах, и их идентификация проводились по общепринятым методам на основании культуральных, морфологических и физиологических признаков [3]; идентификация микромицетов – по микро- и макроморфологическим признакам [4, 13]. Способность микроорганизмов к гидролизу ПГА определяли методом прозрачных зон на минеральном агаре с добавлением 0,25 % порошкообразного полимера в качестве источника углерода [11].

**Результаты исследований.** Было установлено, что, независимо от химического строения, все образцы начинали разрушаться после латентного периода, за которым следовал период резкой потери массы образцов. Вероятно, требуется некоторое время для адаптации микроорганизмов к новому субстрату и синтезу деполимеризующих ферментов. Исследование биоразрушения пленок ПГА показало, что сополимерные образцы, имеющие пониженную степень кристалличности, разрушались в исследованных условиях быстрее, нежели гомополимер, при этом наиболее активно – сополимер с 3-гидроксигексаноатом с самыми низкими значениями кристалличности (*S*<sub>х</sub> 36 %). Периоды уменьшения массы образцов на ½ от исходной составили для ПЗГБ – 20 суток, для сополимеров ЗГБ/ЗГВ и ЗГБ/ЗГГ – 15 и 12 суток соответственно (рис. 1). Прессованные объемные образцы ПГА разрушались в почвенных микроекосмах аналогично пленкам, но более медленно. Для полимеров различного строения потеря массы образцов на 50 % от исходной была зарегистрирована через 50–80 суток.

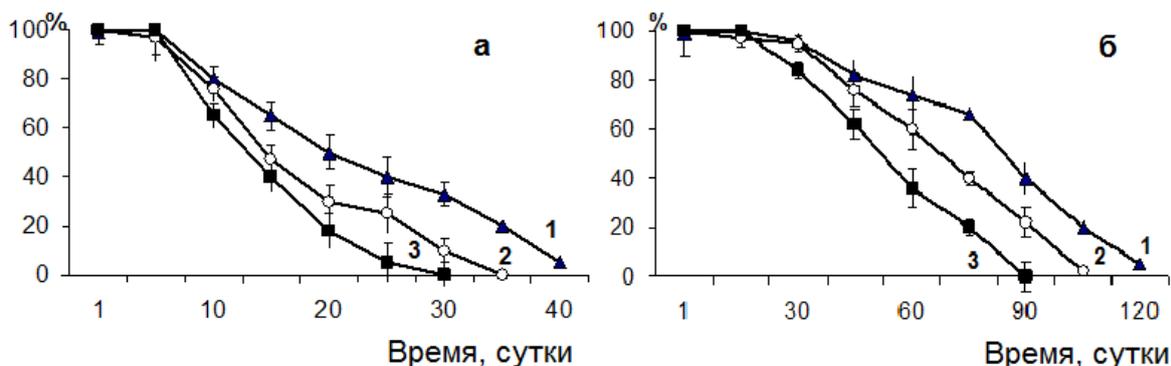


Рис. 1. Динамика уменьшения массы пленок (а) и прессованных объемных форм (б) в почве: 1 – гомополимер ПЗГБ; 2 – сополимер ПЗГБ/ЗГВ; 3 – сополимер ПЗГБ/ЗГГ

В ряде работ показано, что микробные ПГА-экзодеполимеразы гидролизуют преимущественно межфибрилярную аморфную фазу ПГА и затем разрушают высокоупорядоченные цепи в кристаллическом состоянии [6, 9]. Поэтому сополимеры, обладающие большей площадью аморфных регионов в структуре полимерного материала, как правило, разрушаются быстрее. Данными рентгеноструктурного анализа подтверждено преимущественное разрушение аморфной фазы в сополимерах ЗГБ/ЗГВ, степень кристалличности которых возросла до 60–68% по сравнению с исходными значениями. Более медленную разрушаемость объемных образцов по сравнению с пленками можно объяснить меньшей площадью поверхности, следовательно, их меньшим контактом с почвой, а также более плотной структурой поверхности, что, по всей види-

мости, затрудняло адгезию и развитие микроорганизмов, а также их проникновением во внутренний объем полимерного материала, в особенности в начальный период.

Независимо от химического состава и формы образцов ПГА, они не деградировали в стерильных условиях в фосфатном буфере (рН 5,2) при 37 °С. Достоверного изменения массы образцов в течение 90 суток не зафиксировано. Аналогичная картина получена при других значениях рН (5,9 и 7,0). Результаты согласуются с представлениями о том, что ПГА не подвержены небиологической гидролитической деструкции [7, 12].

При использовании для сравнения в качестве модельной среды водопроводной воды, содержащей  $1,4 \times 10^5$  КОЕ/мл, разрушаемость пленок из ПГА толщиной 0,07 мм была сравнима с разрушением в данных условиях писчей бумаги. В течение 40 суток при комнатной температуре (18–20 °С) зафиксировано снижение веса пленок из ПЗГБ на 56 %, из сополимера ЗГБ/ЗГВ – на 70 %, бумаги – на 62 % от исходных величин. Это подтверждает биологическую природу разрушаемости ПГА.

Проанализированы последствия внесения образцов ПГА в почвенные лабораторные микрокосмы и влияние полимера в процессе биоразрушения на численность и состав микроорганизмов. Анализ контрольных проб фоновой почвы и соскобов с поверхности полимерных образцов на 30-е сутки экспонирования выявил различия в количественном и качественном составе микробиоценозов. Обнаружено увеличение количества органотрофных бактерий на поверхности полимерных образцов на 2 порядка по сравнению с контрольной почвой. Полимер как дополнительный источник углеродного питания в почве стимулировал развитие бактерий. По соотношению функциональных групп микроорганизмов исходная почва характеризовалась законченностью процессов минерализации и зрелым микробным сообществом: коэффициент минерализации составлял 1,25, олиготрофности – 0,03 (табл.).

#### Количественные показатели эколого-трофических групп микроорганизмов в почвенных образцах

Численность микроорганизмов, КОЕ в 1 г почвы:	Фоновая почва	Поверхность ПЗГБ (пленки)	Поверхность ПЗГБ (прессованные формы)
копиотрофы	$(3,4 \pm 0,3) \times 10^6$	$(7,1 \pm 0,1) \times 10^8$	$(5,3 \pm 0,1) \times 10^8$
прототрофы	$(4,3 \pm 0,8) \times 10^6$	$(4,6 \pm 0,05) \times 10^7$	$(5,5 \pm 0,01) \times 10^7$
олиготрофы	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^5$	$(2,3 \pm 0,6) \times 10^5$	$(1,9 \pm 0,4) \times 10^5$
азотфиксаторы	$(5,6 \pm 0,1) \times 10^5$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^7$	$(7,6 \pm 0,8) \times 10^6$
Коэффициент минерализации (КАА/МПА)	1,25	0,04	0,02
Коэффициент олиготрофности (ПА/МПА)	0,04	0,0003	0,0004

Сравнительный анализ показал изменение соотношения функциональных групп в структуре микробиоценозов, сформировавшихся на поверхности образцов ПГА, относительно микробиоценоза фоновой почвы. Установлено, что присутствие полимера в почве стимулировало развитие копиотрофов, численность которых увеличилась на два порядка по сравнению с контрольной почвой. Отмечено также увеличение количества прототрофных микроорганизмов; в результате чего коэффициенты минерализации уменьшились до 0,04 и 0,02. Это свидетельство активных процессов деструкции органического вещества в почве и накопления продуктов распада ПГА в виде ди- и мономеров в качестве дополнительного и доступного для микроорганизмов субстрата.

Абсолютная численность олиготрофов в образцах почвы достоверно не различалась, однако коэффициенты олиготрофности на поверхности полимерных образцов значительно снизились по сравнению с контрольными пробами почвы до 0,0003–0,0004.

В почве на поверхности образцов полимера увеличивалось количество азотфиксаторов: в 20 раз – на пленках и в 13,5 раза – на объемных формах. Вероятно, это связано с изменением соотношения углерод/азот в почве в результате обогащения углеродсодержащими продуктами биораспада ПГА.

В сравнительном аспекте исследован качественный состав микробных комплексов. Установлено, что в фоновой почве доминировали грамотрицательные палочки *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, доля которых суммарно составила 50 %; доля спорообразующих палочек рода *Bacillus* составила около 12 %, грамположительных кокков *Micrococcus* – 9 %. Во всех образцах с поверхности полимеров зафиксиро-

вано увеличение количества представителей родов *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Mycobacterium* на фоне снижения относительно контроля грамотрицательных палочек (рис. 2).

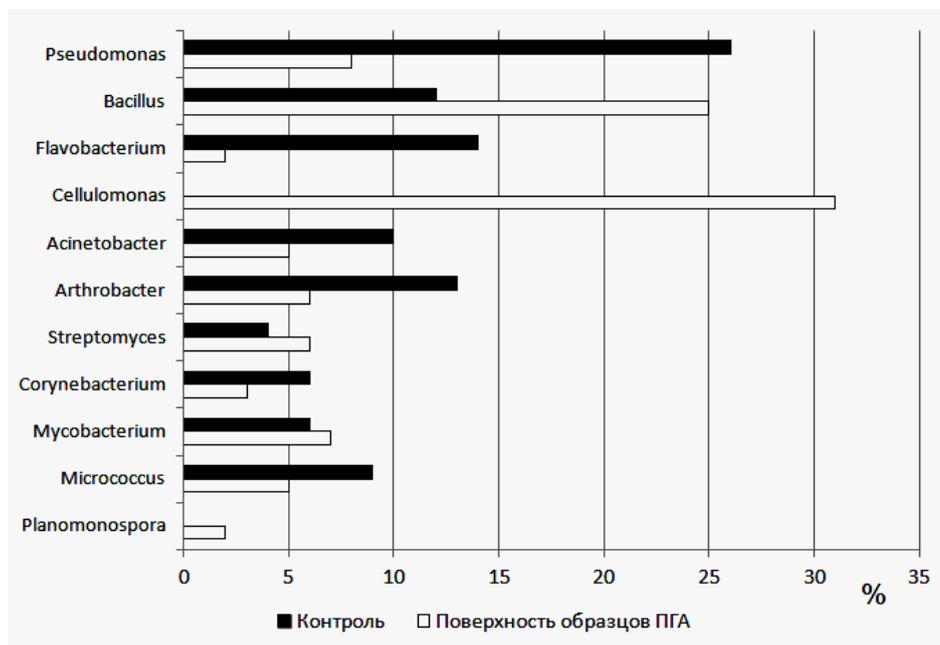


Рис. 2. Соотношение представителей доминирующих родов бактерий в пробах почвы

Оценка влияния ПГА в почве на комплекс микромицетов показала, что их численность в контрольной почве и на поверхности образцов полимера достоверно не различалась, однако в качественном составе обнаружены изменения (рис. 3). В контрольной почве преобладали грибы из рода *Penicillium* (67 %); встречались также *Aspergillus* (12 %), *Trichoderma* (9 %), *Mucor* (7 %), *Cladosporium* (5 %). На поверхности образцов полимера сообщество микромицетов было более разнообразным, тем не менее грибы рода *Penicillium* сохранили доминирование, составляя 56 % от всех обнаруженных в данных пробах видов; на втором месте были грибы рода *Acremonium* (11 %); помимо этого выделялись *Trichoderma*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Monilia*, *Mucor*, *Cladosporium*.

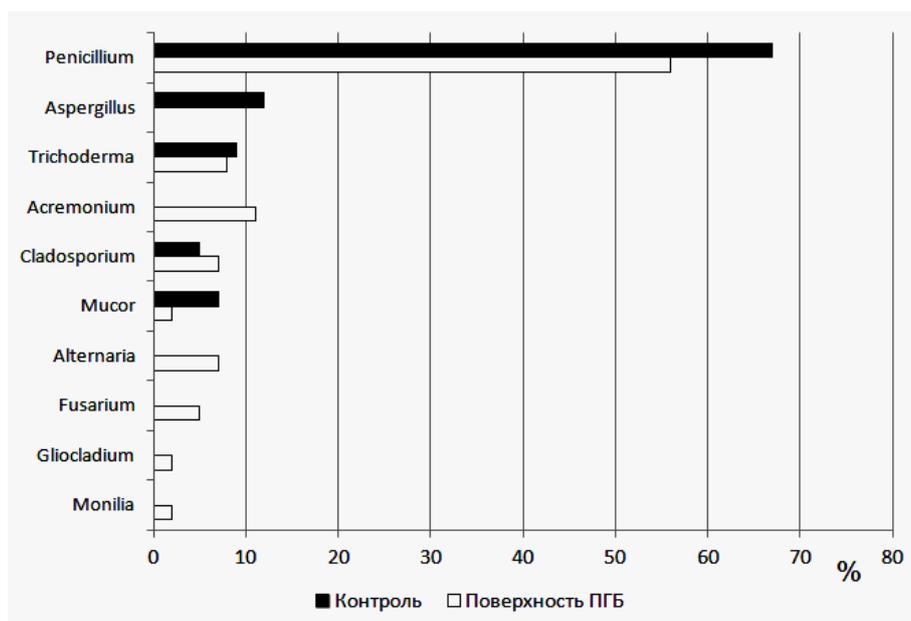


Рис. 3. Соотношение представителей доминирующих родов микромицетов в пробах почвы

Из почвенных образцов всего было выделено в чистую культуру и проанализировано 40 изолятов бактерий и 28 изолятов микроскопических грибов. Исследование деполимеразной активности микроорганизмов методом прозрачных зон на диагностической среде с единственным источником углерода – мелкодисперсным порошком ПЗГБ, позволило выявить истинных (первичных) деструкторов. Было показано, что не все микроорганизмы, концентрирующиеся на поверхности образцов, обладают способностью к гидролизу данного полимера. Доля истинных деструкторов в фоновой почве составляла около 4 % от общей численности; на экспериментальных образцах – возросла до 38 %. Среди ПГА-деструкторов идентифицированы бактерии из родов *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, а также микромицеты из родов *Penicillium*, *Acremonium* и *Trichoderma*. Остальные микроорганизмы, выделенные из пленок обрастания, не обладали ПГА-экзодеполимеразой. Вероятно, они могли усваивать продукты биораспада полимера, представляя, таким образом, второй и последующие трофические уровни в микробиоценозе.

**Выводы.** Результаты исследования биодegradации образцов ПГА в модельных экспериментах показывают, что на процесс биоразрушения влияют химический состав полимера, метод изготовления и форма экспериментального изделия. Менее кристаллические сополимерные образцы разрушаются быстрее гомополимерных; период, за который масса образцов уменьшается на 50 %, для пленок, имеющих большую площадь контакта с почвой и более развитую поверхность, был в 4–4,5 раза короче, чем для прессованных форм.

Подтверждена истинная биологическая природа разрушения полигидроксиалканоатов и показана позитивная роль ПГА для развития почвенных микроорганизмов. Установлено, что на поверхности полимерных образцов селективно формируется микробиоценоз, качественно и количественно отличающийся от такового в фоновой почве. Обнаруженный факт значительного увеличения количества первичных деструкторов ПГА в микробиоценозах, формирующихся на поверхности образцов полимера в течение короткого периода времени, позволяет рассматривать индуцибельную природу экзофермента ПГА-деполимеразы.

### Литература

1. Волова Т. Г., Шишацкая Е. И. «Биоразрушаемые полимеры: синтез, свойства, применение» / под ред. Э.Дж. Сински. – Красноярск: Красноярский писатель, 2011. – 329 с.
2. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. – М.: Изд-во МГУ, 1990. – 303 с.
3. Определитель бактерий Берджи: пер. с англ. / под ред. Дж. Хоулт [и др.]. – М.: Мир, 1997. – 800 с.
4. Определитель патогенных и условно патогенных грибов / под ред. Д. Самтон, А. Фотергилл, М. Рунальди. – М.: Мир, 2001. – 468 с.
5. Патент РФ № 2053292. Штамм *Alcaligenes eutrophus* ВКПМ В-5786 – продуцент белковой биомассы и других биологически активных макромолекул / Г.Н. Стасишина, Т.Г. Волова. – 1996.
6. Abe H., Doi Y. Enzymatic and environmental degradation of racemic poly(3-hydroxybutyric acid)s with different stereoregularities // *Macromol.* – 1996. – Vol. 29. – P. 8683–8688.
7. Amass W., Amass A., Tighe B. A Review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies // *Polymer Int.* – 1998. – Vol. 47. – P. 89–144.
8. Hazer B., Steinbüchel A. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 74. – P. 1–12.
9. Jendrossek D., Handrick R. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2002. – Vol. 56. – P. 403–432.
10. Jendrossek D., Schirmer A., Schlegel H. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1996. – Vol. 46. – P. 451–463.
11. Mergaert J., Webb A., Anderson C. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1993. – Vol. 59. – P. 3233–3238.
12. Sudesh K., Abe H., Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters // *Prog. Polym. Sci.* – 2000. – Vol. 25. – P. 1503–1555.
13. Watanabe T. Pictorial atlas of soil fungi: morphologies of fungi and key species. – CRC Press, 2002. – 486 p.