

DOI 10.17516/1997-1389-0370

УДК 577.121.2:628.47

Microbiological Degradation of Poly(3-Hydroxybutyrate) Films in Different Edaphoclimatic Zones of Siberia

Svetlana V. Prudnikova*
*Siberian Federal University
Krasnoyarsk, Russian Federation*

Received 10.08.2021, received in revised form 25.09.2021, accepted 12.11.2021

Abstract. The urgency of handling plastic waste is escalating every year and the problem can be only solved using an integrated approach. Replacing non-degradable materials synthesised from fossil fuels with carbon-neutral biopolymers can reduce non-biodegradable waste, CO₂ emissions and energy use. However, even completely biodegradable biopolymer materials will stay in the environment for a long time since the rate of their biodegradation depends on many factors. The paper evaluates the influence of edaphoclimatic and microbiological factors on the biodegradation rate of biopolymer films from the poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] when exposed to soddy-carbonate, cryogenic, and agrogenically transformed Siberian soils. A principal component analysis showed that in different soils, characterised by specific temperature, moisture content, pH values, biogenicity and abundance of microorganisms, the kinetics of mass loss of P(3HB)-films were primarily determined by the temperature- precipitation ratio and it increased as the content of humus in soil increased. The maximum rates of film mass loss of 0.63 ± 0.09 and 0.93 ± 0.01 mg · day⁻¹ were detected in agrogenic soils. No correlation between mass loss of the films and the total number of microorganisms was found. A phylogenetic analysis revealed differences in the composition of primary P(3HB)-degrading microorganisms in different soil types.

Keywords: poly-3-hydroxybutyrate, biopolymers, biodegradation, soil conditions, soil microbiology, P(3HB)-degrading microorganisms.

Acknowledgements. The research was carried out in accordance with the State Assignment by the Ministry of Science and Higher Education of Russian Federation to Siberian Federal University in 2020 (Project № FSRZ-2020-0006 “Biologically active substances in ecological, biotechnological and medical systems”).

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: sprudnikova@sfu-kras.ru

ORCID: 0000-0001-8990-3043

Микробиологическая деградация пленок из поли(3-гидроксibuтирата) в различных почвенно-климатических зонах Сибири

С. В. Прудникова

*Сибирский федеральный университет
Российская Федерация, Красноярск*

Аннотация. Проблема обращения с пластиковыми отходами ежегодно обостряется и требует комплексного подхода к ее решению. Замена синтетических материалов, полученных из ископаемого топлива, на углеродно-нейтральные биополимеры позволит уменьшить объем стойких к биоразложению отходов, снизить выбросы CO₂ и количество потребляемой энергии. Однако темпы биodeградации изделий из биополимеров в окружающей среде зависят от многих факторов, поэтому в природных условиях даже полностью биоразлагаемые материалы могут сохраняться длительное время. В работе проведена оценка влияния почвенно-климатических и микробиологических характеристик на темпы биodeградации пленок из биополимера поли(3-гидроксibuтирата) [П(ЗГБ)] при экспозиции в сибирских почвах: дерново-карбонатной, криогенной и агрогенно-преобразованной. Анализ, проведенный методом главных компонент, показал, что в почвах разного типа, характеризующихся определенной температурой, увлажненностью, значениями pH, биогенностью и обилием микроорганизмов, скорость убыли массы пленок из П(ЗГБ) в первую очередь определялась соотношением температуры и количества осадков и увеличивалась при повышении содержания гумуса в почве. Максимальные темпы убыли массы пленок – $0,63 \pm 0,09$ и $0,93 \pm 0,013$ мг·сут⁻¹ – были зарегистрированы в агрогенных почвах. Показано отсутствие корреляции убыли массы пленок с общей численностью микроорганизмов. Филогенетический анализ выявил отличия в наборе первичных деструкторов в разных типах почв.

Ключевые слова: поли-3-гидроксibuтират, биополимеры, биodeградация, почвенные условия, микробиология почвы, П(ЗГБ)-разрушающие микроорганизмы.

Благодарности. Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации Сибирскому федеральному университету на 2020 год (проект № FSRZ-2020–0006, тема проекта «Биологически активные вещества в экологических, биотехнологических и медицинских системах»).

Введение

Высокие темпы роста количества полимерных отходов, получаемых из невозобновляемого сырья и стойких к биоразложению, побуждают исследователей искать новые экологически чистые и безопасные материалы – биополимеры, произведенные биологическим путем и способные к биодegradации. Использование биополимеров уменьшает зависимость от ископаемого топлива, сокращает выбросы углекислого газа и, таким образом, снижает углеродный след (Meereboer et al., 2020).

Полигидроксиалканоаты (ПГА), в том числе поли(3-гидроксибутират) [П(ЗГБ)], – это уникальный класс химических соединений, в полной мере соответствующий определению «биополимеры» (Koller, Mukherjee, 2020; Nandakumar et al., 2021). Несмотря на то что П(ЗГБ) активно продвигается в качестве заменителя синтетических пластмасс, его биодegradация в окружающей среде зависит от многих факторов и требует определенных условий (Meereboer et al., 2020). Время разложения изделий из биополимеров может зависеть от их морфологии, пористости, степени кристалличности полимера, температуры окружающей среды, рН, концентрации солей, микробной плотности, биоразнообразия и пр. (Fernandes et al., 2020; Koller, Mukherjee, 2020). Анализ литературы показывает, что идеальные условия для естественного разложения ПГА очень ограничены, что затрудняет выделение ключевых факторов, определяющих скорость биоразложения полимерных изделий.

Цель работы – оценка влияния условий экспозиции на темпы биодegradации пленок из П(ЗГБ) в сибирских почвах разного типа.

Материалы и методы

Образцы П(ЗГБ) в виде пленок помещали в сетчатые пакеты из органзы и разме-

щали в охарактеризованную почву. Общую численность микроорганизмов в исходной почве (ОМЧ) учитывали на мясопептонном агаре общепринятыми методами почвенной микробиологии, бактерии-деструкторы П(ЗГБ) выделяли из изолированных колоний методом прозрачных зон на минеральном агаре с добавлением порошкообразного полимера (Mergaert et al., 1993). Полимерные пленки экспонировали в почвах разного типа: лесная дерново-карбонатная (два участка с разной кислотностью почвы в районе г. Красноярска), криогенная почва (пос. Тура, Центральная Эвенкия), полевая почва агрочернозем криогенно-мицеллярный (пос. Минино, Красноярский край) и огородная сильно агрогенно-преобразованная почва (с. Субботино, Красноярский край). Срок экспозиции зависел от интенсивности дegradации и степени разложения пленок: в контролируемых условиях опыта с агрогенными почвами в теплице эксперимент длился 1 месяц, в естественных условиях натурного эксперимента – от 3 до 15 месяцев. В ходе эксперимента регистрировали среднесуточную температуру, суммарное количество осадков, рН почвенного раствора (по ГОСТ 26423–85), содержание гумуса (по ГОСТ 26213–9); убыль массы пленок определяли на аналитических весах 4-го класса точности Adventurer AR2140 (Ohaus, США) и рассчитывали по разности исходной и конечной массы за время экспозиции ($\text{мг}\cdot\text{сут}^{-1}$). Идентификацию видов бактерий-деструкторов проводили методом секвенирования гена 16S рРНК по Сэнгеру и используя программу поиска гомологичных последовательностей BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Филогенетический анализ бактерий-деструкторов П(ЗГБ) выполнен методом ближайших соседей (Saitou, Nei, 1987) в пакете программ MEGA версии X (Kumar et al., 2018). Статистическую обработку ре-

зультатов проводили с применением пакетов программ Excel MS Office 2019, R версия 4.0.3 и RStudio версия 1.3.1093.

Результаты и обсуждение

Преыдушие исследования показали, что биоразрушение ПГА зависит от почвенно-климатических условия среды, микробной составляющей почвы, а также типа полимера и формы полимерного изделия (Boyandin et al., 2012). Биодegradация ПГА в почвах Средней Сибири может значительно варьироваться, что обусловлено резко континентальным климатом региона и большими амплитудами температуры и количества осадков в разные годы. Даже при высокой среднесуточной температуре воздуха дефицит влаги может существенно снижать скорость биодegradации. Так, в дерново-карбонатной почве, характеризующейся

невысоким содержанием гумуса (2,6 %), при благоприятных для роста микроорганизмов условиях и достаточной увлажненности почвы (20–25 %) численность бактерий была высокой – от 10^8 до 10^9 КОЕ·г⁻¹ почвы (табл. 1). Это привело к быстрой убыли массы пленок П(ЗГБ) – от 0,17 до 0,36 мг·сут⁻¹. Если температура была выше среднеголетних значений, а количество осадков меньше нормы, это приводило к снижению численности бактерий на 2–3 порядка и медленному разрушению полимерных пленок – 0,06–0,07 мг·сут⁻¹ (табл. 1). Следовательно, характер биодegradации полимерных изделий в природных условиях отличается от теоретически возможного.

Другая ситуация складывается в контролируемых условиях: в агрочерноземах, богатых гумусом и с доступными формами азота, при стабилизированной температуре

Таблица 1. Характеристика условий экспозиции полимерных пленок в сибирских почвах

Table 1. Characteristics of exposure conditions of polymer films in Siberian soils

Район/ тип почвы	Содержание гумуса, %	Срок экспозиции	Количество осадков, мм	Средне-месячная температура, °С	pH	ОМЧ ^a , млн КОЕ·г ⁻¹ почвы (n=5)	Убыль массы П(ЗГБ)-пленок, мг·сут ⁻¹ (n=6)
г. Красноярск / дерново-карбонатная	2,6	3 месяца (2010 г.)	190	17,0±1,3	6,9 7,5	0,27±0,02 3,2±0,2	0,06±0,01 0,07±0,02
		3 месяца (2007 г.)	231	15,8±3,4	6,1 7,3	133,0±47,0 1470,0±80,0	0,17±0,03 0,36±0,06
пос. Минино / агро-чернозем криогенно-мицеллярный	8,7	1 месяц (2016 г.)	750	21,0±1,0	7,5	16,3±5,2	0,63±0,09
с. Субботино / сильно агрогенно-преобразованная	17,4	1 месяц (2016 г.)	750	21,0±1,0	6,6	66,3±29,5	0,93±0,01
пос. Тура / криогенная	8,8	15 месяцев (2017–2018 гг.)	288 ^b	9,5±5,7 ^b	5,1	1,9±0,2 ^c	0,004±0,001 ^c
						2,4±0,3 ^d	0,008±0,001 ^d

^a ОМЧ – общее микробное число.

^b Учитывается за летний период (июнь-август).

^c Северный склон экспозиции.

^d Южный склон экспозиции

21 °С и влажности почвы около 50 % (дополнительный полив почвы) активность микробных деполимераз возрастала и П(ЗГБ) пленки быстро разрушались – в 1,7–14,7 раза быстрее по сравнению с биодеградацией в естественных условиях в дерново-карбонатных почвах. Становится вполне ожидаемым, что в почвах в районе пос. Тура при низкой среднемесячной температуре в летний период даже в условиях достаточного увлажнения почвы и обеспеченности микроорганизмов азотом ферментативная активность оставалась на низком уровне и убыль массы пленок за два вегетационных сезона была крайне малозначительна – 4–8 мкг·сут⁻¹.

Анализ биоразрушения пленок П(ЗГБ), проведенный методом главных компонент, показал, что две первые главные компоненты в сумме покрывают 83,8 % дисперсии. Наибольший вклад в первую компоненту вносят переменные убыль массы пленок, температура и количество осадков (табл. 2). Во вторую главную компоненту вносит вклад содержание гумуса в почве и значение pH. Общая численность микроорганизмов (ОМЧ) вносит максимальный вклад в третью компоненту. На графике главных компонент (рис. 1) показано, что проекции почв разного типа распределяются на разных участ-

ках графика. Направление стрелки убыли массы образцов П(ЗГБ) совпадает с проекцией точек, соответствующих агрогенно-трансформированным почвам. Дерново-карбонатные почвы в районе г. Красноярска формируют общий кластер; зона криогенных почв располагается обособленно. Ряд авторов подтверждают, что тип почвы влияет на деградацию ПГА. Например, в песчаной почве с низкой влажностью и дефицитом органического вещества деградация биополимерных материалов протекает гораздо медленнее, чем в других почвенных тестах, тогда как в полевых почвах разложение ПГА может достигать 100 % (Meereboer et al., 2020).

Скорость ферментативных реакций почвенных микроорганизмов коррелирует с температурой, причем наилучшие показатели деполимеразной активности наблюдаются при оптимальных для микроорганизмов сочетаниях температуры и влажности (Mtibe et al., 2021). Расчет коэффициентов корреляции показал, что убыль массы пленок коррелировала ($p < 0,001$) с температурой ($r = 0,80$), количеством осадков ($r = 0,89$) и содержанием гумуса ($r = 0,75$). Корреляция с pH была слабой ($r = 0,40$; $p = 0,02$). Несмотря на то что деградация образцов П(ЗГБ) пленок в почве происходит под действием

Таблица 2. Вклад переменных в главные компоненты

Table 2. Contribution of variables to the principal components

Переменные	Вклад, %			
	Dim.1	Dim.2	Dim.3	Dim.4
pH	7.87	35.43	7.57	8.27
Гумус	13.34	26.48	6.41	5.80
Температура	22.47	9.85	9.81	20.64
Осадки	26.71	5.27	0.20	56.08
ОМЧ	0.07	22.96	70.09	0.19
Убыль массы	29.54	0.004	5.91	9.01

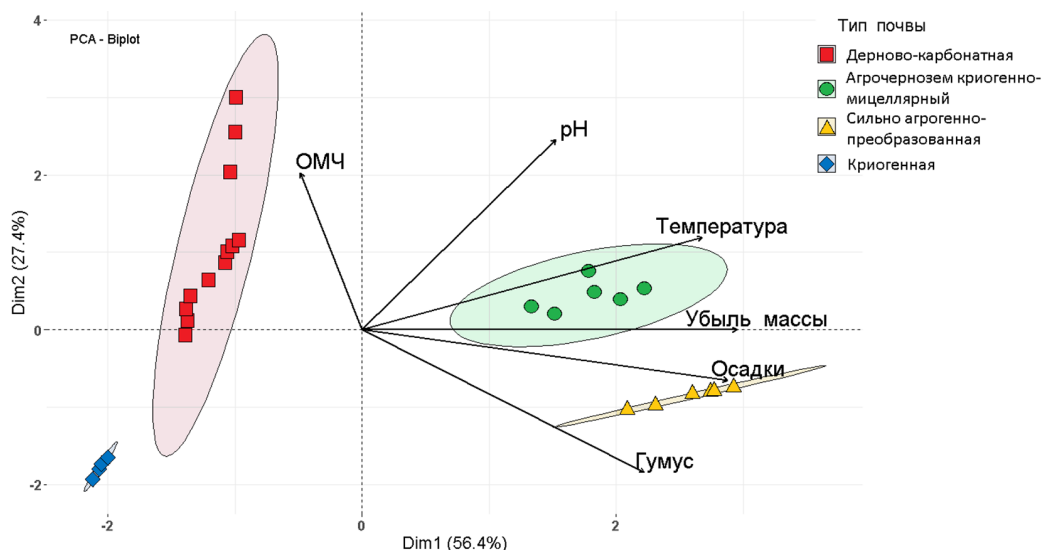


Рис. 1. Анализ физико-химических свойств почвы и убыли массы образцов П(ЗГБ) в разных районах Сибири методом главных компонент

Fig. 1. Principal component analysis of soil physical and chemical properties and mass loss of P(3HB)-samples in different soil types in Siberia

микробных ферментов, интенсивность разрушения пленок не показала корреляцию с численностью микроорганизмов ($r=0,01$; $p=0,95$). Это указывает на необходимость принимать во внимание не только численность, но и активность микроорганизмов, а также наличие в микробном сообществе первичных деструкторов, продуцирующих ПГА-деполимеразы. Проведенный филогенетический анализ выявил отличия в наборе первичных деструкторов в разных почвах (рис. 2).

Наиболее разнообразным был состав деструкторов в агрогенных почвах, он включал представителей классов *Actinobacteria*, *Bacilli*, *β -Proteobacteria*, *γ -Proteobacteria*. В дерново-карбонатных почвах преобладали протеобактерии и представители рода *Bacillus*. Следует отметить, что видовой состав деструкторов в криогенных почвах также был разнообразным и включал представителей из разных классов. Это указывает на высокий микробный потенциал криогенных почв к биодеградации изделий из П(ЗГБ).

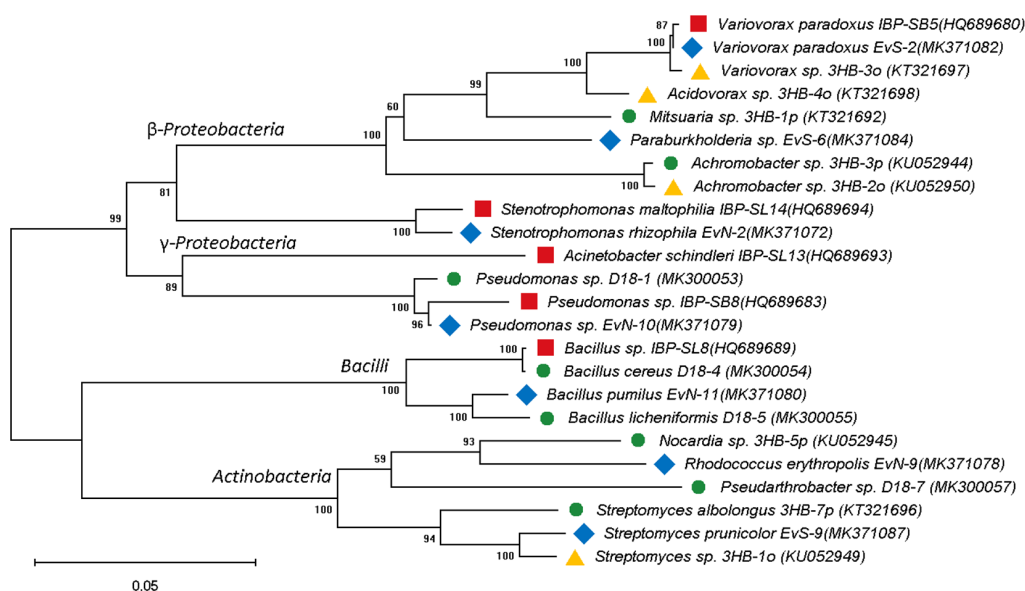


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе последовательностей 16S рРНК бактерий-деструкторов П(ЗГБ), распространенных в разных типах почв в Сибири; масштаб указывает количество замен нуклеотидов на сайт; цифры показывают достоверность ветвления, установленную с помощью бутстреп-анализа; обозначение маркеров для типа почвы как на рис. 1

Fig. 2. Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences of P(3HB)-degrading bacteria common in different types of soils in Siberia; the scale bar indicates the number of nucleotide substitutions per site; the numbers show the branching accuracy determined using bootstrap analysis; markers for soil types as in Fig. 1

Заклучение

Результаты исследований показали, что наиболее благоприятные условия для деградации П(ЗГБ) складываются в агрогенных почвах, характеризующихся достаточным увлажнением, высокой биогенностью и широким спек-

тром бактерий-деструкторов П(ЗГБ). Несмотря на крайне незначительную убыль массы пленок в криогенной почве, таксономическое разнообразие видов, обладающих деполимеразной активностью, указывает на наличие потенциала криогенных почв к биодegradации П(ЗГБ).

Список литературы / References

- Boyandin A. N., Rudnev V. P., Ivonin V. N., Prudnikova S. V., Korobikhina K. I., Filipenko M. L., Volova T. G., Sinskey A. J. (2012) Biodegradation of polyhydroxyalkanoate films in natural environments. *Macromolecular Symposia*, 320(1): 38–42
- Fernandes M., Salvador A., Alves M. M., Vicente A. A. (2020) Factors affecting polyhydroxyalkanoates biodegradation in soil. *Polymer Degradation and Stability*, 182: 109408
- Koller M., Mukherjee A. (2020) Polyhydroxyalkanoates-linking properties, applications, and end-of-life options. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 34(3): 115–129
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6): 1547–1549

Meereboer K. W., Misra M., Mohanty A.K. (2020) Review of recent advances in the biodegradability of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics and their composites. *Green Chemistry*, 22(17): 5519–5558

Mergaert J., Webb A., Anderson C., Wouters A., Swings J. (1993) Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(10): 3233–3238

Mtibe A., Motloug M.P., Bandyopadhyay J., Ray S.S. (2021) Synthetic biopolymers and their composites: advantages and limitations – an overview. *Macromolecular Rapid Communications*, 42(15): 2100130

Nandakumar A., Chuah J.A., Sudesh K. (2021) Bioplastics: A boon or bane? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 147: 111237

Saitou N., Nei M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4): 406–425