

УДК 504.53:579.26

Microbial Degradation of Poly-3-Hydroxybutyrate in Samples of Agrogenically Changed Soils

**Olga N. Vinogradova*, Svetlana V. Prudnikova,
Natalya V. Zobova and Valentina L. Kolesnikova**

*Institute of Biophysics of SB RAS
50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia*

Received 11.02.2015, received in revised form 19.03.2015, accepted 09.06.2015

*Degradation of poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) under laboratory conditions was investigated in field and garden soils with different structure of microbial communities. In the vegetable garden soil with a high content of nutrients the total number of organotrophic bacteria and micromycetes was significantly higher than in field soil. The differences in microbial communities of soil samples were estimated. Domination of actinobacteria of *Arthrobacter* and *Corynebacterium* genera was found in field soil. In the vegetable garden soil representatives of the genera *Bacillus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* and *Pseudomonas* dominated. Microbial composition of both soils was changing during the exhibition of P3HB films, with increasing the number of Gram-negative rods. The rate of biodegradation of P3HB film samples in garden soil was 1.5-1.7 times higher than in field soil.*

Keywords: polyhydroxyalkanoates (PHA), poly-3-hydroxybutyrate (P3HB), biodegradation, degrading microorganisms, agrogenically changed soils.

DOI: 10.17516/1997-1389-2015-8-2-199-209.

© Siberian Federal University. All rights reserved

* Corresponding author E-mail address: olgav88@mail.ru

Микробиологическая деградация поли-3-гидроксибутирата в образцах агрогеннопреобразованных почв

**О.Н. Виноградова, С.В. Прудникова,
Н.В. Зобова, В.Л. Колесникова**

*Институт биофизики СО РАН
Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50*

*Исследована деградация поли-3-гидроксибутирата (ПЗГБ) в лабораторных условиях в полевой и огородной почвах с различной структурой микробиоценозов. В огородной почве с высоким содержанием элементов питания общая численность органотрофных бактерий и микромицетов существенно превосходила аналогичные показатели в полевой почве. Выявлены различия в микробных сообществах образцов почв, показано, что в полевой почве доминировали актинобактерии, *Arthrobacter* и *Corynebacterium*. В огородной почве доминировали представители родов *Bacillus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* и *Pseudomonas*. В ходе экспозиции плёнок ПЗГБ в почвах микробный состав менялся, в обоих образцах почв увеличивалось количество грамотрицательных палочек. Процесс биоразрушения плёночных образцов ПЗГБ в огородной почве протекал в 1,5-1,7 раза активнее по сравнению с полевой почвой (по различию времени достижения одного уровня деградации).*

Ключевые слова: полигидроксиалканоаты (ПГА), поли-3-гидроксибутират (ПЗГБ), биодеградация, микроорганизмы-деструкторы, агрогеннопреобразованные почвы.

Введение

Микробная составляющая почвы является активным агентом гидролитических и деградационных процессов. Многие почвенные микроорганизмы активно утилизируют различные природные соединения, включая микробные полимеры – полигидроксиалканоаты (ПГА) (Wang et al., 2005). Интенсивность процесса разрушения полимерных изделий из ПГА в природных средах зависит от многих факторов, в том числе от климатических условий, pH, влажности, концентрации питательных веществ, температуры и активности микроорганизмов (Jendrossek and Handrick, 2002; Yew et al., 2006; Philip, 2007). Биодеградация ПЗГБ

была оценена во многих экосистемах, таких как почва (Doi, 1992; Mergaert, 1993), осадок сточных вод (Mergaert, 1994), морская вода (Mukai, 1994; Mergaert, 1995) и других. Кроме того, в течение последнего десятилетия было проведено много исследований биодеградации полимера ПЗГБ с использованием очищенной ПГБ-деполимеразы (Luo and Netravali, 2003).

Наши исследования направлены на изучение разрушаемости ПГА в почвах сибирского региона и в тропических условиях во взаимосвязи с климатом, погодными условиями и структурой микробиоценозов. Установлено, что в почве в условиях тропиков происходит более активное разрушение образцов из гомо-

полимера (поли-3-гидроксибутирата) по сравнению с сополимерными образцами (поли-3-гидроксибутирата-со-3-гидроксиивалерата), в то время как в почвах Сибири быстрее разрушаются образцы из сополимера. Активное разрушение ПГА имеет место при обсемененности среды не менее 10^7 КОЕ в 1 г. Установлено, что ПГА стимулируют развитие микрофлоры. Впервые показано, что на поверхности полимерных образцов формируется микробиоценоз, специфичный для конкретной природной среды, качественно и количественно отличающийся от микробиоценозов контрольных образцов почвы. По совокупности культуральных, морфологических, физиологических признаков и результатов анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S и 28S рРНК идентифицированы первичные микроорганизмы-деструкторы ПГА. Во всех исследованных регионах активными деструкторами ПГА являются представители родов *Bacillus*, *Paecilomyces* и *Penicillium*, остальные микроорганизмы специфичны для различных природных экосистем. Доминантными деструкторами ПГА в почвах Сибири являются бактерии родов *Variovorax*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* и *Xanthomonas* и микромицеты *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Verticillium* и *Zygosporium*; в тропических почвах – бактерии родов *Burkholderia*, *Bacillus*, *Cupriavidus*, *Streptomyces*, *Nocardioopsis*, *Mycobacterium* и микромицеты *Gongronella*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Paecilomyces* и *Trichoderma* (Прудникова, Волова, 2012; Boyandin et al., 2012a; 2012b; 2013).

Анализ данных литературы показывает, что к настоящему моменту проведены исследования биodeградации полимеров в природных средах – почвах, водоемах разного типа, однако практически отсутствуют данные об интенсивности процессов разрушения ПГА в

агрогеннопреобразованных почвах, что немаловажно при использовании ПГА в качестве матрицы для сельскохозяйственных препаратов.

Цель работы – исследование влияния типа, химического и микробиологического состава двух образцов агрогеннопреобразованных почв на процесс биodeградации пленочных форм гомополимера ПЗГБ.

Материалы и методы

В работе исследовали биodeградацию пленочных образцов гомополимера 3-гидроксимасляной кислоты (ПЗГБ), синтезированной культурой бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 в лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза Института биофизики СО РАН (Volova et al., 1998). Плёнки получали из 4%-ного раствора ПЗГБ в хлороформе методом полива. Для этого 0,4 г полимера растворяли в 10 мл хлороформа и выливали в стеклянные чашки Петри диаметром 9 см. Чашки Петри выдерживали в течение суток при комнатной температуре под стеклянным колпаком для предотвращения воздействия потоков воздуха и попадания пыли. Плёнки переносили в десикатор для досушивания и доведения до постоянного веса и выдерживали при комнатной температуре в течение недели для достижения равновесия кристалличности (Luo and Netravali, 2003). Из готовых плёнок высекали диски диаметром 30 мм, толщиной 0,035–0,045 мм, массой 35 ± 10 мг. Степень кристалличности (C_x) у исходных образцов определена как 76 %. Среднечисловая, средневесовая молекулярные массы и полидисперсность гомополимера ПЗГБ – 144 кДа, 598 кДа и 4,15 соответственно.

Сравнительное исследование профиля биodeградации плёнок ПЗГБ проводили в лабораторных условиях в почвенных микроэкосистемах. В пластиковые контейнеры

объемом 250 см³ помещали по 200 г агрогеннопреобразованных почв двух образцов – полевой (Красноярский край, пос. Минино) и огородной (Красноярский край, с. Субботино). В контейнеры с почвой каждого типа на глубину 2-2,5 см помещали предварительно взвешенные образцы плёнок ПЗГБ, упакованные в чехлы из мелкоячеистого мельничного газа, по 3 образца в каждом контейнере. Контейнеры инкубировали в термостате при постоянной температуре 21±0,1 °С и влажности почвы – 50 %. Длительность эксперимента составляла 56 суток, уменьшение массы образцов определяли в динамике. Влажность почвы в ходе эксперимента поддерживали на заданном уровне.

Динамику убыли массы образцов определяли гравиметрически. Молекулярную массу полимерных образцов определяли методом гельпроникающей хроматографии на жидкостном хроматографе 1260 Infinity (Agilent Technologies, США); определяли молекулярные массы (средневесовая молекулярная масса M_w и среднечисловая молекулярная масса M_n) и полидисперсность (D). Степень кристалличности определяли с использованием рентгеноспектрометра D8 ADVANCE (Bruker, Германия). Микроструктуру поверхности полимерных образцов исследовали методом растровой электронной микроскопии (РЭМ). Образцы размером 5×5 мм помещали на предметный столик и напыляли платиной с помощью установки Emitech K575X (10 мА, 2×40 секунд). РЭМ-снимки образцов получали с помощью электронного микроскопа S-5500 (Hitachi, Япония).

В момент размещения образцов ПЗГБ в почве и после экспозиции с ними анализировали почвенный микробоценоз в микроэкосистемах, высевая пробы почвы на плотные питательные среды. Микробиологический анализ проводили общепринятыми метода-

ми: численность копитрофных бактерий, аммонификаторов определяли на рыбопептонном агаре (РПА); прототрофных бактерий, усваивающих минеральный азот, – на крахмало-аммиачном агаре (КАА); азотфиксирующих бактерий – на среде Эшби, олиготрофных – на почвенном агаре (ПА), микромицетов – на суловом агаре (СА) (Нетрусов и др., 2005). Коэффициент минерализации определяли как соотношение микроорганизмов, усваивающих минеральные формы азота и аммонификаторов. Коэффициент олиготрофности – как соотношение олиготрофных и аммонифицирующих бактерий. Определяли численность микроорганизмов в исходной почве и после экспонирования образцов. Посев производили в трёхкратной повторности из разведений до 10⁷. Чашки с посевами выдерживали в термостате при температуре 30 °С для бактерий и 25 °С для грибов. Выделение доминантных микроорганизмов и их идентификацию проводили на основании культуральных, морфологических признаков и стандартных биохимических тестов (Хоулт и др., 1997; Boone et al., 2005).

В почвенных образцах определение рН в водной суспензии проводили по ГОСТ 26423-85, нитратного азота по методу ЦИНАО по ГОСТ 26488-85, подвижного фосфора и обменного калия по Мачигину в модификации ЦИНАО по ГОСТ 26204-91.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel. Результаты представлены как средние арифметические со стандартным отклонением.

Результаты и обсуждение

Исследование образцов почвы выявило следующие отличия. Полевая почва – агро-

чернозем криогенно-мицелярный, характеризуется высоким содержанием гумуса в слое 0-20 см (7,9-9,6 %), слабощелочной реакцией среды (рН 7,1-7,8), высокой суммой обменных оснований (40,0-45,2 м-экв/100 г). Содержание нитратного азота $N-NO_3$ – 6 мг/кг, а P_2O_5 – 6 и K_2O – 22 мг/100 г почвы (по Мачигину). Огородная сильно агрогенно-преобразованная почва с реакцией, близкой к нейтральной (рН 6,6), характеризуется очень высоким содержанием гумуса (17,4 %), нитратного азота $N-NO_3$ – 122,0 мг/кг, доступного фосфора и калия (P_2O_5 – 151,2 мг/100 г; K_2O – 80 мг/100 г почвы) (по Мачигину).

Микробиологический анализ исходных образцов почвы показал значительные различия в составе эколого-трофических

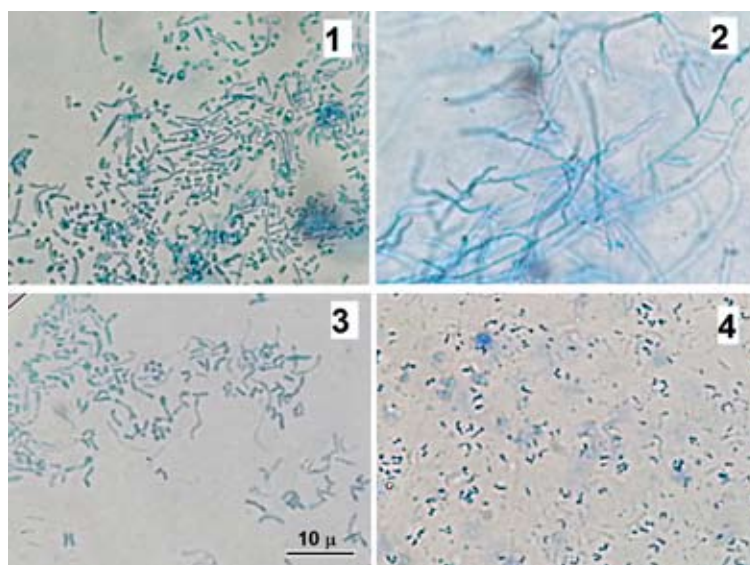
групп микроорганизмов в полевой и огородной почвах (рис. 1). В полевой почве количество копиотрофных бактерий было ниже, чем прототрофных и олиготрофных (табл. 1); численность азотфиксаторов, напротив, была высокой. Для полевой почвы характерны высокие значения коэффициентов минерализации и олиготрофности. Это свидетельствует о том, что в почве активно протекают процессы минерализации, содержание доступных форм азота низкое, без присутствия свежего органического вещества. Иные результаты получены при анализе огородной почвы. Численность копиотрофных бактерий была в 4 раза выше, чем в образцах полевой почвы. Высокая численность копиотрофов в сочетании с



Рис. 1. Доминирующие представители бактерий, выделенные из образцов полевой и огородной почвы до эксперимента (А) и после экспозиции с ПЗГБ (Б)

Таблица 1. Микробиологические показатели образцов почвы

Образцы почвы	Численность микроорганизмов, млн КОЕ в 1 г					Коэффициент минерализации	Коэффициент олиготрофности
	Копиотрофы	Протоотрофы	Олиготрофы	Азотфиксаторы	Микромицеты		
Полевая (исходная)	16,3±5,1	24,7±7,1	190,9±70,7	26,1±4,7	0,03±0,01	1,52	11,74
Полевая (после экспозиции с ПЗГБ)	48,8±5,7	44,9±4,5	22,9±7,7	79,1±5,9	0,09±0,02	0,92	0,47
Огородная (исходная)	66,3±29,5	5,0±2,0	30,9±4,4	3,8±1,4	0,25±0,06	0,07	0,46
Огородная (после экспозиции с ПЗГБ)	38,1±5,5	15,1±3,8	23,8±5,1	16,1±7,3	0,01±0,01	0,40	0,63

Рис. 2. Доминирующие бактерии в образцах полевой почвы: 1 – *Nocardia*, 2 – *Actinomycetes*, 3 – *Arthrobacter*, 4 – *Corynebacterium*

очень высокой концентрацией биогенных элементов (N, P, K) свидетельствует о поступлении свежего органического вещества и активно протекающих процессах его трансформации. Этот факт подтверждают низкие коэффициенты минерализации и олиготрофности. Наличие доступных форм азота уменьшало количество азотфиксаторов, которых было в 6,8 раза меньше, чем в полевой почве. Такие условия являются

наиболее благоприятными для быстрой биодеградации органического вещества.

Исследование микробного сообщества образцов исходной почвы также обнаружило различия среди доминирующих представителей. В полевой почве общая численность копиотрофов была ниже, но сообщество было более разнообразным (рис. 1). Доминировали актинобактерии, а также представители родов *Arthrobacter* и *Corynebacterium* (рис. 2). В ого-

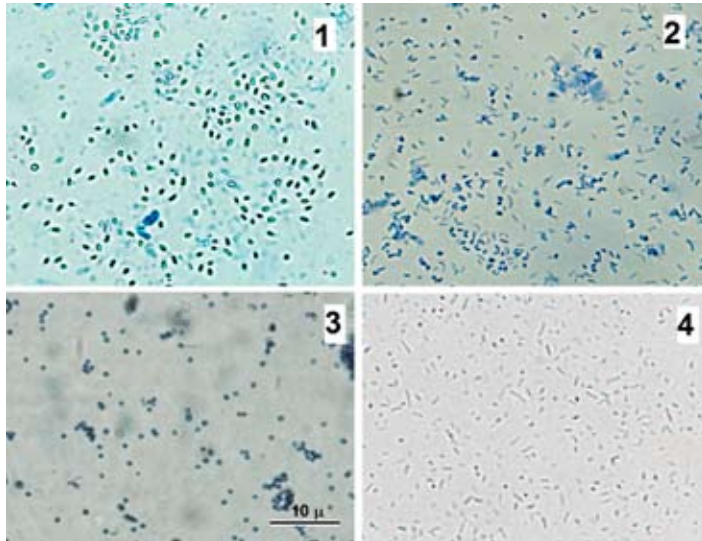


Рис. 3. Доминирующие бактерии в образцах огородной почвы: 1 – *Bacillus*, 2 – *Corynebacterium*, 3 – *Micrococcus*, 4 – *Pseudomonas*

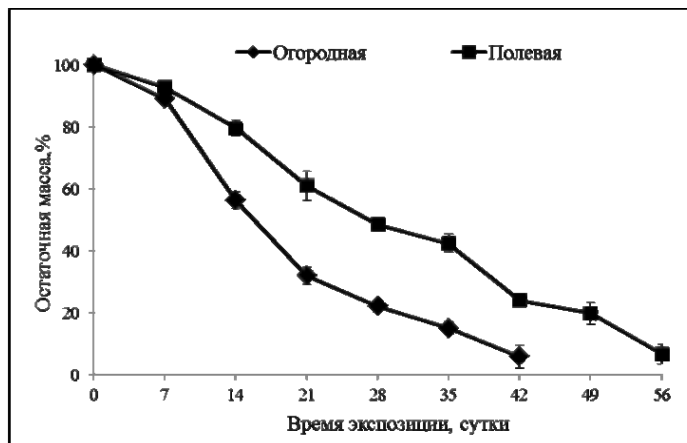


Рис. 4. Динамика изменения массы плёнок, полученных из ПЗГБ, при деградации в лабораторных условиях в огородной и полевой почвах

родной почве доминировали представители родов *Bacillus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* и *Pseudomonas* (рис. 3).

Выявленные различия общей численности и соотношения эколого-трофических групп микроорганизмов в исследованных образцах почвы оказывали влияние на процесс разрушения плёнок из ПЗГБ. Биодegradация полимера в разных почвах происходила с раз-

личной интенсивностью (рис. 4). Кривая убыли массы полимера в полевой почве была более пологой. За первые 7 суток эксперимента масса плёнок в полевой и огородной почвах снизилась на 7 и 11 % от исходной массы соответственно. Далее в огородной почве процесс разрушения плёнок активизировался и через 42 суток образцы ПЗГБ были разрушены на 94 %, тогда как в полевой почве в эти же

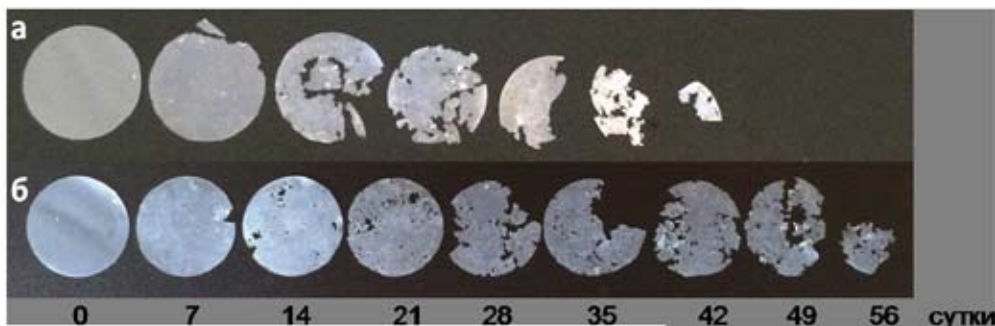


Рис. 5. Внешний вид пленок, полученных из ПЗГБ, при деградации в лабораторных условиях в огородной (а) и полевой (б) почвах

сроки остаточная масса полимера составила около 30 %. Близкие показатели деградации плёнок ПЗГБ в полевой почве (93,4 %) были зафиксированы только через 56 суток наблюдения. В целом, процесс разрушения ПЗГБ в огородной почве шел в 1,5-1,7 раза активнее.

Состояние пленочных образцов в динамике наблюдения показано на рис. 5. По мере деструкции пленок и убыли их массы поверхность становилась всё более шероховатой и неровной, толщина пленок уменьшалась. Наблюдали образование небольших пор, не характерных для исходных образцов, количество и размеры которых возрастали в течение эксперимента. С увеличением количества перфораций целостность пленок нарушалась и далее они распадались на отдельные фрагменты до полного исчезновения последних. Для пленок, экспонированных в полевой почве, характерно более длительное сохранение массы и формы.

В ряде работ показано, что на деградацию ПГА влияют не только физико-химические свойства полимеров, но и геометрия, и структура поверхности полимерных изделий. Так, сополимер ПЗГБ/ЗГГ с содержанием мономеров ЗГГ 12 мол. % с более пористой и шероховатой поверхностью деградировал быстрее, чем образец с гладкой поверхностью, изготов-

ленный из этого типа ПГА с содержанием ЗГГ 20 мол. % (Wang et al., 2004). Также установлено, что сополимер 3-гидроксибутирата с 3-гидроксигексаноатом разрушается быстрее по сравнению с гомополимером ПЗГБ и сополимерами ЗГБ/ЗГВ, более гладкая поверхность которых могла затруднять прикрепление и последующее развитие микроорганизмов-деструкторов, обладающих ПГА экзодеполимеразами (Sridewi et al., 2006). Эти результаты согласуются с проведенными ранее исследованиями (Molitoris et al., 1996; Tsuji and Suzuyoshi, 2002), в которых обнаружено, что скорость разрушения изделий из ПГА зависит от морфологии поверхности. При этом показано, что гидролиз начинается на поверхности и в местах дефектов полимера и продвигается вглубь изделия (Molitoris et al., 1996).

Электронная микроскопия показала изменение микроструктуры поверхности пленок в ходе разрушения в почве (рис. 6). Исходный образец имел слабовыраженный рисунок поверхности, без дефектов и трещин, с незначительным количеством микропор размером от 2 до 4 мкм (рис. 6, 1а и 1б). Спустя 28 суток в ходе разрушения поверхность пленок стала более рельефной, с хаотично расположенными резко очерченными структурами разной формы и размером более 2 мкм, что, вероят-

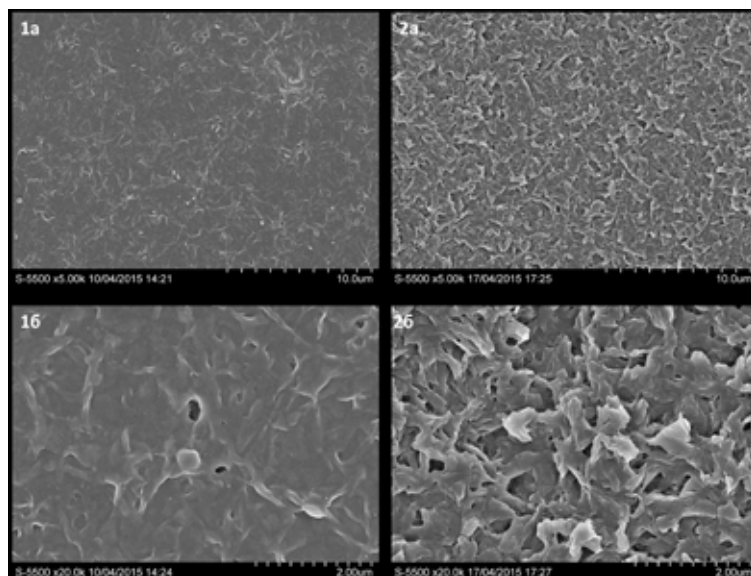


Рис. 6. РЭМ-снимки микроструктуры поверхности пленок из ПЗГБ: 1а – исходный образец ПЗГБ до деградации, маркер – 10 мкм; 1б – маркер – 2 мкм; 2а – тот же образец после 28 суток экспозиции в полевой почве, маркер – 10 мкм; 2б – маркер – 2 мкм

но, обусловлено более быстрым вымыванием аморфной фазы полимера; также отмечено увеличение количества микропор (рис. 6, 2а и 2б).

После экспозиции в почве плёнок ПЗГБ количественный и качественный состав микробного сообщества изменился. В полевой почве выросла в 3 раза численность аммонификаторов, увеличилось количество граммотрицательных палочек и уменьшилось количество актинобактерий. Доминировали представители родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и *Variovorax*. В огородной почве достоверных изменений численности органотрофных бактерий не установлено, однако была отмечена тенденция к её снижению. Это может быть связано с поступлением дополнительного источника углерода в виде полимерных плёнок ПЗГБ, что могло компенсировать избыток азота в почве и ускорить процессы минерализации органического вещества в замкнутом объёме. Это подтверждается более высокими коэффициентами

минерализации и олиготрофности после экспозиции ПЗГБ в огородной почве. В микробном сообществе образцов огородной почвы также произошла смена доминирующих бактерий: уменьшилось количество спорообразующих палочек и грамположительных кокков, увеличилось количество бактерий родов *Pseudomonas* и *Corynebacterium*.

В ходе экспозиции плёнок ПЗГБ в почве выявлено изменение процентного соотношения эколого-трофических групп микроорганизмов в образцах почвы. В полевой почве доля копиотрофов, азотфиксаторов и микромицетов увеличилась в 3 раза, прототрофов – в 1,8 раза; численность олиготрофов снизилась в 8,3 раза. Это свидетельствует об активизации процессов трансформации органического вещества в почве и стимулирующем влиянии ПЗГБ как источника углерода на почвенную органотрофную микрофлору. В огородной почве уменьшилась доля копиотрофных бактерий. Такие результаты указывают на ускоренные процессы минера-

лизации органического вещества и активно протекающую биodeградацию полимера, продукты распада которого служили дополнительным субстратом для почвенной микрофлоры. В результате быстрого распада и усвоения органического субстрата бактериями в условиях отсутствия лимитирования азотсодержащими органическими веществами происходила стабилизация численности органотрофной микрофлоры в почве и последующее увеличение доли прототрофов и азотфиксаторов.

Заключение

Установлено, что различия состава почв по обеспеченности элементами питания и

отличия в общей численности и структуре микробиоценозов оказывали значительное влияние на процесс разрушения пленок из ПЗГБ. В огородной почве, характеризующейся существенно более высоким содержанием органотрофных бактерий, к числу которых принадлежит большинство деструкторов биополимеров, разрушение пленок ПЗГБ происходило активнее, чем в полевой почве, в 1,5-1,7 раза. В процессе экспонирования ПЗГБ в образцах почвы таксономический состав доминирующих микроорганизмов изменялся: для полевой и огородной почвы было установлено увеличение доли граммотрицательных бактерий родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и *Variovorax*.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 14-26-00039.

Список литературы

1. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. (2005) Практикум по микробиологии Под ред. А.И. Нетрусова. М: Академия, 608 с. [Netrusov A.I., Egorov M.A., Zakharchuk L.M. (2005) Workshop on microbiology. Ed. A.I. Netrusov. M: Academy, 608 p. (In Russian)].
2. Прудникова С.В., Волова Т.Г. (2012) Экологическая роль полигидроксиалканоатов: закономерности биоразрушения в природной среде и взаимодействия с микроорганизмами. Красноярск: Красноярский писатель, 170 с. [Prudnikova S.V., Volova T.G. (2012) The ecological role of polyhydroxyalkanoates: laws biodegradation in the environment and interaction with microorganisms. Krasnoyarsk: Krasnoyarsk writer, 170 p. (In Russian)].
3. Хоулт Д., Криг Н., Снит П. (ред.) (1997) Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. М: Мир, 800 с. [Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. Eds. J. Holt, N. Krieg, P. Snit (1997). M: Mir, 800 p. (In Russian)].
4. Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. (Eds.). (2005). Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology (Vol. 2). Springer Science & Business Media, 1134 p.
5. Boyandin A.N., Prudnikova S.V., Filipenko M.L., Khrapov E.A., Vasil'ev A.D., Volova T.G. (2012a) Biodegradation of polyhydroxyalkanoates by soil microbial communities of different structures and detection of PHA degrading microorganisms. Applied Biochemistry and Microbiology 48 (1): 28–36.
6. Boyandin A.N., Prudnikova S.V., Karpov V.A., Ivonin V.N., Đỗ Ngọc Lanh, Nguyễn Thị Hoài, Lê Thị Mỹ Hiệp, Filipenko M.L., Volova T.G., Gitelson I.I. (2013) Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils. International Biodeterioration & Biodegradation 83: 77-84.

7. Boyandin A.N., Prudnikova S.V., Karpov V.A., Ivonin V.N., Prudnikova S.V., Korobohina K.I., Filipenko M.L., Volova T.G., Sinskey A.J. (2012b) Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils. *Macromol. Symposium* 320: 38-42.
8. Doi K., Kaneshawa Y., Tanahashi N. (1992) Biodegradation of microbial polyesters in the marine environments. *Polymer Degrad. Stab.* 36: 173-177.
9. Jendrossek D., Handrick R. (2002) Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annual Review of Microbiology* 56: 403-432.
10. Luo S., Netravali A.N. (2003) A study of physical and mechanical properties of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) during composting. *Polym. Degrad. Stab.* 80: 59-66.
11. Mergaert J., Wouters A., Swings J., Anderson C. (1995) In situ biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in natural waters. *Can J Microbiol* 41 (1):154-159.
12. Mergaert J., Anderson C., Wouters A., Swings J. (1994) Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-Co-3-hydroxyvalerate) in compost. *J. Environ. Polym. Degrade.* 2: 177-183.
13. 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (10): 3233-3238.
14. Molitoris H.P., Moss S.T., de Koning G.J.M., Jendrossek D. (1996) Scanning electron microscopy of polyhydroxyalkanoate degradation by bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46: 570-579.
15. Mukai K., Yamada K., Doi Y. (1994) Efficient hydrolysis of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* YM1414 isolated from lake water. *Polym Degrad Stab* 43: 319-327.
16. Philip S., Keshavarz T., Roy I. (2007) Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 82 (3): 233-247.
17. Sridewi N., Bhubalan K., Sudesh K. (2006) Degradation of commercially important polyhydroxyalkanoates in tropical mangrove ecosystem. *Polym. Degradation Stab.* 91(12): 2931-2940.
18. Tsuji H., Suzuyoshi K. (2002) Environmental degradation of biodegradable polyesters 1. Poly(ϵ -caprolactone), poly[(R)-3-hydroxybutyrate], and poly(L-lactide) films in controlled static seawater. *Polym Degrad Stab* 75: 347-355.
19. Volova T.G., Kalacheva G.S., Plotnikov V.F. (1998) Biosynthesis of heteropolymeric polyhydroxyalkanoates by chemolithoautotrophic bacteria. *Microbiology* 67 (4): 420-424.
20. Wang Y.-W., Mo W., Yao H., Wu Q., Chen J., Chen G.-Q. (2004) Biodegradation studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Polym Degrad Stab* 85: 815-821.
21. Yew S.P., Tang H.Y., Sudesh K. (2006). Photocatalytic activity and biodegradation of polyhydroxybutyrate films containing titanium dioxide. *Polymer Degradation and Stability* 91 (8): 1800-1807.