Б16/8

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т.Г. Волова
« 27 » июня 2016 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 -Биология

Видовое разнообразие микроорганизмов-деструкторов сополимеров поли(3-гидроксибутирата) с поли(3-гидроксивалератом) и поли(3-гидроксигексаноатом)

Руководитель 27.06.16 Д-р биол. наук С. В. Прудникова

Студент ББ12-04Б Ю.А. Коленчукова

Красноярск 2016

СОДЕРЖАНИЕ

Введение **3**

Глава 1. Обзор литературы **5**

1.1 Биополимеры 5

1.2 Биодеградация полигидроксиалканоатов в окружающей среде 8

Глава 2. Материалы и методы **12**

2.1 Объекты и материалы исследования 12

2.2 Методы выделения почвенных микроорганизмов-деструкторов 12

2.3 Методы идентификации микроорганизмов 14

Глава 3. Глава 3. Результаты исследования **17**

3.1 Микробиологические показатели образцов почвы до и после экспозиции полигидроксиалканоатов 17

3.2 Таксономическое разнообразие микроорганизмов-деструкторов сополимеров поли(3-гидроксибутирата) с 3-гидроксивалератом и 3-гидроксигексаноатом 21

3.3 Молекулярно-генетический анализ микроорганизмов-деструкторов 27

Выводы **36**

Список литературы **37**

Приложение А **40**

Приложение Б **41**

ВВЕДЕНИЕ

Широкомасштабное применение пластмасс в самых разных областях человеческой деятельности ведет к ежегодному накоплению до 300 млн. тонн пластиковых отходов, требующих утилизации или переработки [9]. Под полигоны для захоронения каждый год выделяются гектары плодородных земель [6]. При сжигании синтетических пластмасс в атмосферу уходят ядовитые диоксины, нанося непоправимый вред здоровью человека и экологии в целом [6]. Для преодоления возникающих трудностей необходим переход к новым технологиям и средствам утилизации отходов, не наносящим вред природе.

К одному из таких средств снижения антропогенного давления на экосистемы стал переход от синтетических полимеров к природным, подверженным биологической деградации и разлагающихся в естественной среде до безвредных продуктов – углекислого газа и воды, которые после могут беспрепятственно вовлекаться в глобальные круговоротные циклы [6].

Главную роль в деструкции и разложении природных полимеров играют микроорганизмы, которые способны ассимилировать разнообразные органические соединения, вовлекаемые в круговорот, обеспечивая самоочищение окружающей среды от загрязняющих веществ [6].

На сегодняшний день установлено, что наиболее активно микроорганизмы потребляют полимеры монокарбоновых кислот, среди которых лидирующие позиции занимают полигидроксиалканоаты (ПГА), обладающие спектром полезных свойств таких как биосовместимость и биоразрушаемость [6].

ПГА уже активно внедряется в производство изделий биомедицинского назначения, разрушаемой упаковки пищи и напитков, изделий и препаратов для сельского хозяйства [16]. С расширением использования ПГА важным аспектом стало также исследование механизмов их разрушения в

окружающей среде, включая определение видового разнообразия микроорганизмов-деструкторов, их биохимических свойств, а также мест и условий обитания.

В связи с актуальностью проблемы целью настоящей работы было изучение видового разнообразия микроорганизмов-деструкторов сополимеров поли(3-гидроксибутирата) с 3-гидроксивалератом и 3-гидроксигексаноатом.

Исходя из цели, были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние сополимеров П3ГБ/3ГВ и П3ГБ/3ГГ на количественный и качественный состав почвенной микрофлоры

2. Выделить с поверхности полимерных пленок в чистую культуру бактерий-деструкторов сополимеров

3. Исследовать морфофизиологические свойства бактерий-деструкторов и определить их таксономическое положение.

Работа выполнялась на базовой кафедре биотехнологии ИФБиБТ.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Биополимеры

Развитие современного общества требует увеличения производства продуктов, создание высокотехнологичных материалов, совершенствование и модификацию устаревших моделей. В погоне за увеличением продуктивности люди увеличивают добычу полезных ископаемых, забывая, что огромное количество химических веществ производится из невозобновляемых природных ресурсов. Активная хозяйственная деятельность приводит к нарушению нормального функционирования биотических и абиотических факторов окружающей среды. Сбои в круговоротах природы наносят урон не только дикой природе, но ставят под угрозу и человеческое существование.

По статистике в мире ежегодно образуется до 85 млрд. тонн твердых бытовых отходов, почти 300 млн. тонн из которых составляют неразрушаемые синтетические пластмассы [9].

Пластик распространен повсеместно. Это самый популярный и дешевый вид упаковки. Несмотря на положительное качество этого материала – долговечность, срок его употребления человеком крайне мал. Полиэтиленовые пакеты, пластиковая посуда, бутылки и контейнеры – все это оказывается на свалках после одноразового использования и остается там на сотни лет [4]. А мусор, что остается в городе, засоряет канализации и дренажные системы, отравляет водоемы, оказывая губительное влияние на чистоту употребляемой нами воды.

В современном мире рост потребления пластиков неизбежно будет только расти. Таким образом, задачей ученых является заменить основной поток синтетических пластмасс на биологические, разрушаемые [6]. Такие полимеры получаются из природного сырья или синтезируются микроорганизмами, помогают в обновлении «углеродного цикла».

Несколько лет тому назад даже упоминание о биоразлагаемых полимерах и производстве биотоплива казались далекими от практического применения. Однако, внезапный резкий рост цен на углеводороды и нынешний неимоверный обвал привели к тому, что биологическое сырье для производства пластиков стало вполне конкурентоспособным (цены на сельскохозяйственное сырье и продукты его производства, не столь подвержены мировым колебаниям) [8].

В то время как разложение синтетических тароупаковочных материалов может длиться десятилетиями, биоразрушаемые биопластики нового поколения под воздействием почвенных и водных микроорганизмов трансформируются до гумуса и далее до CO_2 и H_2O максимум за несколько месяцев [6].

Учеными было выделено три основных направления по разработке и освоению биодеградируемых пластиков:

Первое – получение биопластмасс на основе природных биоразлагаемых полимеров типа крахмала и целлюлозы, представляющих собой создание композиционных материалов с различными добавками. Такие полимеры сейчас широко применяются для производства одноразовых изделий, упаковки и предметов первой необходимости.

Второе направление ориентированно на придание свойства биоразрушимости синтетическим полимерам, выпускаемым в огромных количествах.

Третье направление получения разрушаемых биопластиков ориентировано на производство полимеров на основе гидроксикарбоновых кислот как химическим, так и биотехнологическим синтезом [7].

Биополимеры (биоразлагаемые полимеры) имеют ряд отличий от остальных пластиков, в первую очередь возможностью разложения на микроорганизмы путем химического, физического или биологического воздействия. Это является определяющим свойством в решении проблемы накопления отходов [1].

Первые попытки создания биополимеров не были успешны. Образцы не разлагались надлежащим образом, так, в ходе дальнейших исследований, Американское общество по испытанию материалов сформулировало понятие «биоразлагаемость». Биоразлагаемость – свойство полимера, означающее, что продукт «способен подвергаться разложению на углекислый газ, метан, воду, неорганические компаунды или биомассы, при котором преобладающим механизмом является энзимное действие микроорганизмов, которое можно измерить с помощью стандартизированных испытаний в течение определенного периода времени с отражением имеющихся условий утилизации» [9].Таким образом, некоторые так называемые биоразлагаемые полимеры на самом деле являются биоэродируемыми, гидробиоразлагаемыми или же фотобиоразлагаемыми [9].

Примером природных соединений в биоразлагаемых упаковочных материалах является крахмал. Пластмассы на основе крахмала экологичны, а также обладают способностью разлагаться в компосте при 30 °C в течение двух месяцев.

Наряду с крахмалом также используются другие природные полисахариды: целлюлоза, хитин, хитозан. Изделия, полученные из растительных волокон и целлюлозы, до недавнего времени доминировали на рынке среди биоразрушаемых полимеров. Сегодня для создания биоразлагаемых пластиков используют уже не только целлюлозу, но и другие продукты растительного мира, такие как лигнин и лигниносодержащие вещества в сочетании с протеином и другими добавками [7].

В настоящее время все чаще стали использовать полиэфиры, обладающие хорошей способностью к биоразложению. Полимер молочной кислоты – полилактид (ПЛА), биопластик, линейный алифатический полиэфир, обладающий по сравнению с крахмалом более высокими прочными свойствами. Примером изделия из ПЛА служат контейнеры для фруктов. Недостатком ПЛА является меньшая, по сравнению с синтетическими полимерами, теплостойкость. При температуре выше 50°C

он начинает деформироваться. К тому же, барьерные характеристики ПЛА в отношении кислорода хуже, чем у полиэтилентерефталата (ПЭТ), полипропилена, поливинилхлорида (ПВХ), а высокий коэффициент диффузии CO_2 не позволяет применять бутылки из ПЛА для розлива газированных напитков [7].

Одним из самых перспективных путей производства биопластиков является использование микроорганизмов, способных синтезировать в специфических условиях роста полимерный материал, подобный полипропилену. Этим материалом является термопластичный полиэфир – полигидроксиалканоат (ПГА), который в последнее время становятся лидирующим классом даже среди биопластиков [6].

Такие материалы из смеси растительных и натуральных продуктов, применяются в качестве исходного сырья для изготовления одноразовых изделий, а также для упаковки и предметов первой необходимости.

1.2 Биодеградация полигидроксиалканоатов в окружающей среде

ПГА подвергаются деградации в биологических средах, образуя безвредные для окружающей среды продукты, такие как диоксид углерода и воду в аэробных условиях, и метан и воду – в анаэробных. [6] Бактерии выделяют ферменты, расщепляющие полимер на отдельные строительные блоки – гидроксикислоты, которые используются в качестве источника углерода для роста. Основным ферментом для расщепления являются специальные внутри- или внеклеточные ПГА-деполимеразы [6]. На сегодняшний день ученые идентифицировали порядка 600 ПГА-деполимераз из различных микроорганизмов. Сравнив аминокислотные последовательности последних, было 8 суперсемейств с 38 семействами. Исследования показали, что один штамм может содержать несколько генов, кодирующих ПГА-деполимеразы с различной специфичностью [9].

В биологических средах ПГА разрушаются при внутриклеточной деградации, с участием эндодеполимераз. Ученые предполагают, что внутриклеточные деполимеразы не гидролизуют полукристаллические полимеры, которые выделяются из биомассы, в то время как внеклеточные деполимеразы не обладают субстратной специфичностью по отношению к внутриклеточному полимеру, который ассоциируется в гранулах внутри клеток. Возможно, все это связано с тем, что ПГА, выделенный из клетки и находящийся внутри нее, находится в двух различных состояниях. Было установлено, что внутриклеточный полимер находится в подвижном аморфном (беспорядочном) состоянии; а поверхностный слой гранулы составляют протеины и фосфолипиды [6].

Существует большая зависимость между свойствами микроорганизмов и конкретной природной средой, в которой они обитают. В связи с этим для полного изучения их свойств необходимо проведение всесторонних экологических и таксономических исследований многообразия микроорганизмов – деструкторов полимеров в различных биологических средах.

Опыты показали, что микроорганизмы могут синтезировать и накапливать ПГА при росте на некоторых средах, при содержании в них питательных углеродных веществ, имеющих дефицит азота или фосфора. Полимеры служат им резервом энергии и углерода. И при неблагоприятном изменении окружающей среды микроорганизмы могут разлагать ПГА, используя образующиеся продукты для питания. Такое свойство бактерий помогло ученым использовать их для промышленного получения полигидроксиалканоатов [9]. Важнейшими представителями являются полигидроксибутират (ПГБ) и его сополимеры с полигидроксивалератом (ПГВ) и полигидроксигегсаноатом (ПГГ) [6].

Уже доказано, что полигидроксиалканоаты – являются полностью биодеградируемыми пластиками. Они разлагаются на воду и углекислый газ за 7-10 недель, при влажности 85% и температуре 20-60 °C [6].

Изначально наибольшая часть ПГБ-разлагающих микроорганизмов была выделена при комнатной или мезофильной температуре, и, как выяснилось, очень немногие из них смогли разрушить полимер при более высокой температуре. Самой перспективной технологией переработки при высокой температуре стало компостирование. Так основной интерес ученых переключился на микроорганизмы, устойчивые к высоким температурам. Например, термофильные виды *Streptomyces*, выделенные из почвы, как оказалось, могут разрушать не только ПГБ, но и другие биополимеры, а термотолерантный *Aspergillus sp*. за 5 суток смог разрушить 90% пленки ПГБ при 50 °C [2].

Создание таких биополимеров направлено на быструю деградацию применяемых в быту продуктов: пластмассы и пленочных материалов. Разложение должно происходить достаточно быстро под воздействием факторов окружающей среды:

- химических (кислород, воздух, вода);
- физических (солнечный свет, тепло);
- биологических (бактерии, грибы, дрожжи, насекомые) [2].

Действуя вместе эти факторы в конечном итоге приводят к фрагментации полимера, происходящей за счет деструкции макромолекул, которые превращаются их в низкомолекулярные соединения, вовлекающиеся в круговорот веществ в природе.

Большинство исследуемых штаммов, способных разрушать ПГБ принадлежат к разным таксонам грамположительных и грамотрицательных бактерий, рода *Streptomyces*, а также некоторых грибов. Учеными было доказано, что около 39 штаммов бактерий классов *Firmicutes* и *Proteobacteria* могут разлагать ПГБ, ПКЛ и ПБС, но не ПЛА [2].

Также удалось установить, что первые микроорганизмы-деструкторы, разлагающие ПГБ и его сополимеры, были виды родов *Bacillus, Pseudomonas* и *Streptomyces*. Позднее было идентифицировано еще несколько микроорганизмов из почвы (*Pseudomonas lemoigne, Comamonas sp.,*

Acidovorax faecalis, Aspergillus fumigatus и Variovorax paradoxus), активного и анаэробного ила (*Alcaligenes faecalis, Pseudomonas, Illyobacter delafieldi*) и морской и озерной воды (*Comamonas testosterone, Pseudomonas stutzeri*) [2].

Исследования ПГА в экосистемах с разными климатическими условиями показали, что их биодеградация может варьировать в зависимости от видовой принадлежности и физиологической активности микроорганизмов, живущих в почвах с разным температурным режимом и влажностью. Скорость и характер биодеградации зависит и от состава полимера. Установлено, что сополимеры быстрее разлагаются в сибирских почвах, а гомополимеры в тропических [13].

Детальное исследование тропических почв из Вьетнама показало, что деградация ПГА сопровождалась уменьшением молекулярной массы полимера и увеличением степени кристалличности, что свидетельствует о разрушении аморфной фазы. Микроорганизмы-деструкторы относились к бактериям родов *Bacillus*, *Cupriavidus* и *Mycobacterium* [14].

В сибирских почвах к микроорганизмам деструкторам относились бактерии родов *Variovorax*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* и *Xanthomonas* [14].

Глава 2. Объекты и методы исследования

2.1 Объекты и материалы исследования

Объектом исследования были чистые культуры бактерий, выделенные с поверхности полимерных пленок, экспонированных в почвенных микроэкосистемах в лабораторных условиях. Образцы полимеров были синтезированы штаммом водородных бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 по технологии Института биофизики СО РАН [4]. Пленки (диаметр 30 мм) были изготовлены в лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза Института биофизики СО РАН методом полива из 2% раствора полимера в хлороформе. Для приготовления пленок использовали высокоочищенные сополимеры поли(3-гидроксибутирата) с 3-гидроксивалератом (П3ГБ/3ГВ) и 3-гидроксигексаноатом (П3ГБ/3ГГ). Содержание сополимера в образцах составляло 12 мол.%

2.2 Методы выделения почвенных микроорганизмов деструкторов

Бактерии деструкторы П3ГБ/3ГВ и П3ГБ/3ГГ были выделены из полевой почвы (Красноярский край, пос. Минино). Почва – агрочернозем криогенно-мицелярный, характеризуется высоким содержанием гумуса в слое 0-20 см (7,9-9,6%), слабощелочной реакцией среды (pH 7,1-7,8), высокой суммой обменных оснований (40,0-45,2 м-экв/100 г). Содержание нитратного азота $N\text{-}NO_3$ – 6 мг/кг, а P_2O_5 – 6 и K_2O – 22 мг/100 г почвы (по Мачигину). Плотность почвы имеет рыхлое и нормальное сложение пахотного слоя (0,85-1,11г/см^3), что несколько ниже рекомендуемых оптимальных для них значений (1,1-1,2 г/см^3).

Для выделения микроорганизмов-деструкторов, образцы полимера в виде пленочных дисков диаметром 30 мм помещали в чехлы из мельничного газа и размещали в контейнерах, заполненных почвой (рис. 1). Контейнеры

инкубировали в термостате при постоянной температуре 21±0,1°С и влажности почвы – 50%. Длительность эксперимента составляла 56 суток.

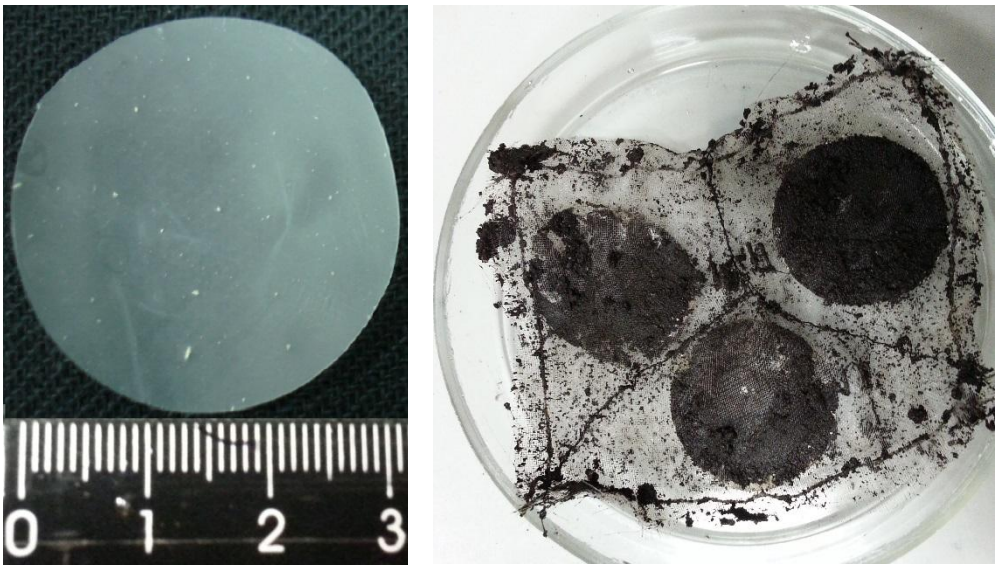


Рисунок 1. Внешний вид пленок полимера до и после экспонирования в почве

Выявление микроорганизмов-деструкторов проводили по окончании экспонирования. Для этого из биопленки, сформированной на поверхности полимера, методом соскоба были взяты микробиологические пробы, которые высевали на специализированную питательную среду следующего состава:

KH_2PO_4 – Na_2HPO_4 буфер (1:1) – 0,033 М;

NH_4Cl – 1г; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,5 г;

цитрат железа – 0,05 г;

$CaCl_2 \times 2H_2O$ – 0,005;

дрожжевой экстракт – 0,05 г;

гидролизат казеина – 0,1г;

0,25% порошкообразного полимера П3ГБ/3ГВ или П3ГБ/3ГГ

агар – 20 г;

вода водопроводная – 1 л.

Рост микроорганизмов, обладающих деполимеразной активностью, сопровождался образованием вокруг колоний на поверхности агаризованной среды характерных прозрачных зон (рис. 2).

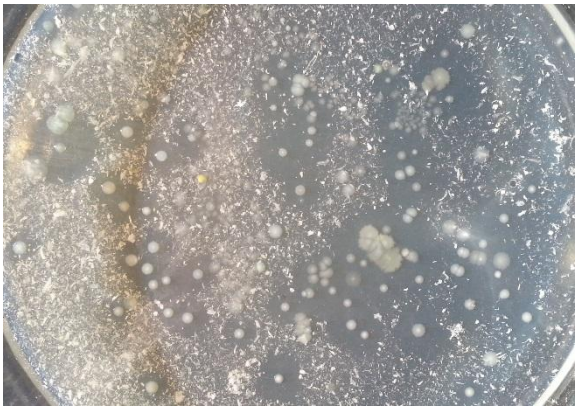
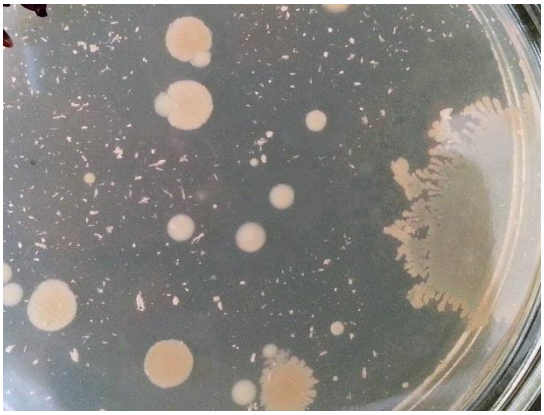
1  2 

Рисунок 2. Деполимеразная активность бактерий (метод прозрачных зон) на плотной среде с порошкообразным полимером: 1 – П(3ГБ/3ГВ), 2 – П(3ГБ/3ГГ)

2.3 Методы идентификации микроорганизмов

Изучение фенотипических признаков микроорганизмов-деструкторов проводили стандартными микробиологическими методами [3,5]. При идентификации бактериальных изолятов проводили сравнительный анализ их морфологических, культуральных, биохимических свойств [7]. Определяли морфологию вегетативных клеток, спорообразование, подвижность, окраску по Граму, каталазную, амилазную, липазную, лецитиназную, и протеазную активность, образование кислоты из глюкозы, лактозы, сахарозы, мальтозы и маннита.

Принадлежность изучаемых культур к группе грамположительных или грамотрицательных бактерий определяли экспресс-методом Грезерсона. Определение каталазной активности проводили с 3 %-ным раствором пероксида водорода.

Для выявления амилолитической активности использовали среду следующего состава (г/л):

пептон – 10.0;

KH_2PO_4 – 5.0;

растворимый крахмал - 2.0;

агар – 15.0;

pH среды 6,8 – 7.0.

Среду стерилизовали при температуре 121 ºС 30 минут и разлили в стерильные чашки Петри. Исследуемые микроорганизмы высевали штрихом по диаметру чашки, культивировали 3-5 суток при 30 ºС. Гидролиз крахмала обнаруживали по йодкрахмальной реакции после обработки агаровой поверхности раствором Люголя.

Протеолитическую активность определяли по способности гидролизовать желатину. К 100 мл мясопептонного бульона (МПБ) добавили 15 г желатины, оставили на 15 минут, чтобы она набухла, затем нагрели на водяной бане до полного растворения желатины и разлили в пробирки по 10 мл. Стерилизовали при температуре 121 ºС 15 минут. Посев проводили уколом. Продолжительность культивирования 2-5 суток при комнатной температуре. Разжижение желатины отмечали визуально.

Для выявления липазной и лецитиназной активности использовали желточно-солевую среду следующего состава: к 100 мл расплавленного и охлажденного до 60-70 ºС стерильного МПА (pH 7,2), содержащего 10 г NaCl, добавляли 10-20 мл желточной взвеси, перемешивали и разливали в чашки Петри. Исследуемые микроорганизмы высевали штрихом по диаметру чашки. Продолжительность культивирования составила 3 суток, при температуре 27 ºС. Визуально отмечали при лецитиназной активности помутнение вокруг колоний, а при липазной активности радужную пленку на поверхности колоний.

Способность исследуемых культур ферментировать углеводы изучали на универсальных средах Гисса (с глюкозой, сахарозой, лактозой, мальтозой,

маннитом). Засев проводили уколом в столбик агаризованной среды, культивировали в течение 3 дней. Визуально отмечали образование газа и кислоты.

Кроме морфофизиологических признаков для штаммов-деструкторов также были определены последовательности нуклеотидов гена 16S рРНК. Анализ проведен на базе Лаборатории Фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины (г. Новосибирск).

Глава 3. Результаты исследования

3.1 Микробиологические показатели образцов почвы до и после экспозиции полигидроксиалканоатов

Микробиологический анализ исходной почвы показал значительные различия в составе эколого-трофических групп микроорганизмов (табл. 1). Количество копиотрофных бактерий было ниже, чем прототрофов и азотфиксаторов. Лидирующими микроорганизмами в исходной почве стали олиготрофы, следовательно, коэффициент олиготрофности в несколько раз больше коэффициента минерализации.

Довольно высокие показатели обоих коэффициентов, минерализации и олиготрофности, свидетельствуют о том, что почва зрелая, процессы минерализации в почве закончены, а содержание доступных форм азота низкое.

Таблица 1 – Микробиологические показатели образцов почвы до и после экспозиции пленок из разных типов ПГА

Тип почвы	Численность микроорганизмов, млн. КОЕ в 1 г					Коэффициент минерализации	Коэффициент олиготрофности
	Аммонификаторы	Прототрофы	Олиготрофы	Азотфиксаторы	Микромицеты		
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
После экспозиции П(3ГБ/3ГВ)	46,5±5,2	35,8±7,6	21,5±4,4	63,7±8,7	0,08±0,02	0,77	0,46
После экспозиции П(3ГБ/3ГГ)	54,6±9,4	48,4±6,3	18,4±8,7	51,9±7,6	0,12±0,03	0,88	0,34

После экспозиции в почве пленок сополимеров П3ГБ/3ГВ и П3ГБ/3ГГ количественный и качественный состав микробного сообщества изменился.

Численность амонификаторов и азотфиксаторов выросла в среднем в 3 раза, количество прототрофов возросло в 1,5, а вот количество олиготрофов, напротив, резко снизилось в 9,5 раз (рис. 3). Это свидетельствует о поступлении органического вещества в почву и активизации процессов минерализации.

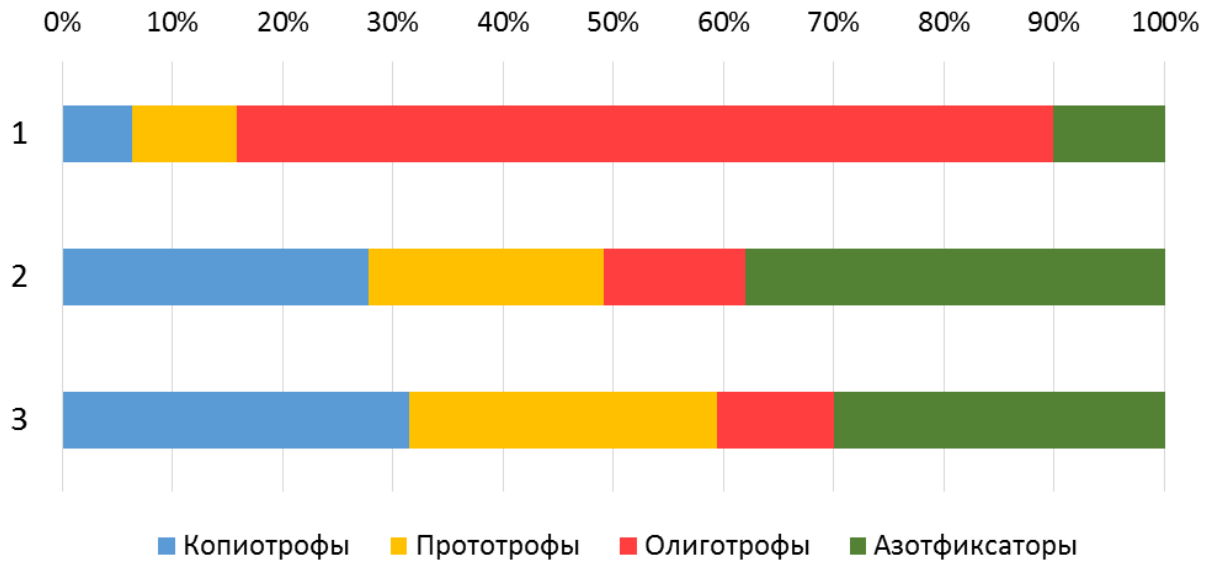


Рисунок 3. Соотношение эколого-трофических групп микроорганизмов при экспозиции разных типов ПГА в почве: 1 – исходная почва; 2 – почва после экспозиции П3ГБ/3ГВ; 3 – почва после экспозиции П3ГБ/3ГГ

Исследование микробного сообщества образца исходной почвы также определило различных доминирующих представителей. В исходной почве общая численность копиотрофов была ниже, однако видовое разнообразие сообщества высокое. На рисунке 4 показано процентное соотношение представителей разных родов бактерий. Доминирующими являлись актинобактерии, а также представители родов *Arthrobacter*, *Terrabacter* и *Corynebacterium*. Наименьшее количество микроорганизмов в исходной почве принадлежит родам *Pseudomonas*, *Bacillus* и *Agromyces*. Микрофотографии доминирующих в исходной почве бактерий представлены на рис. 5.

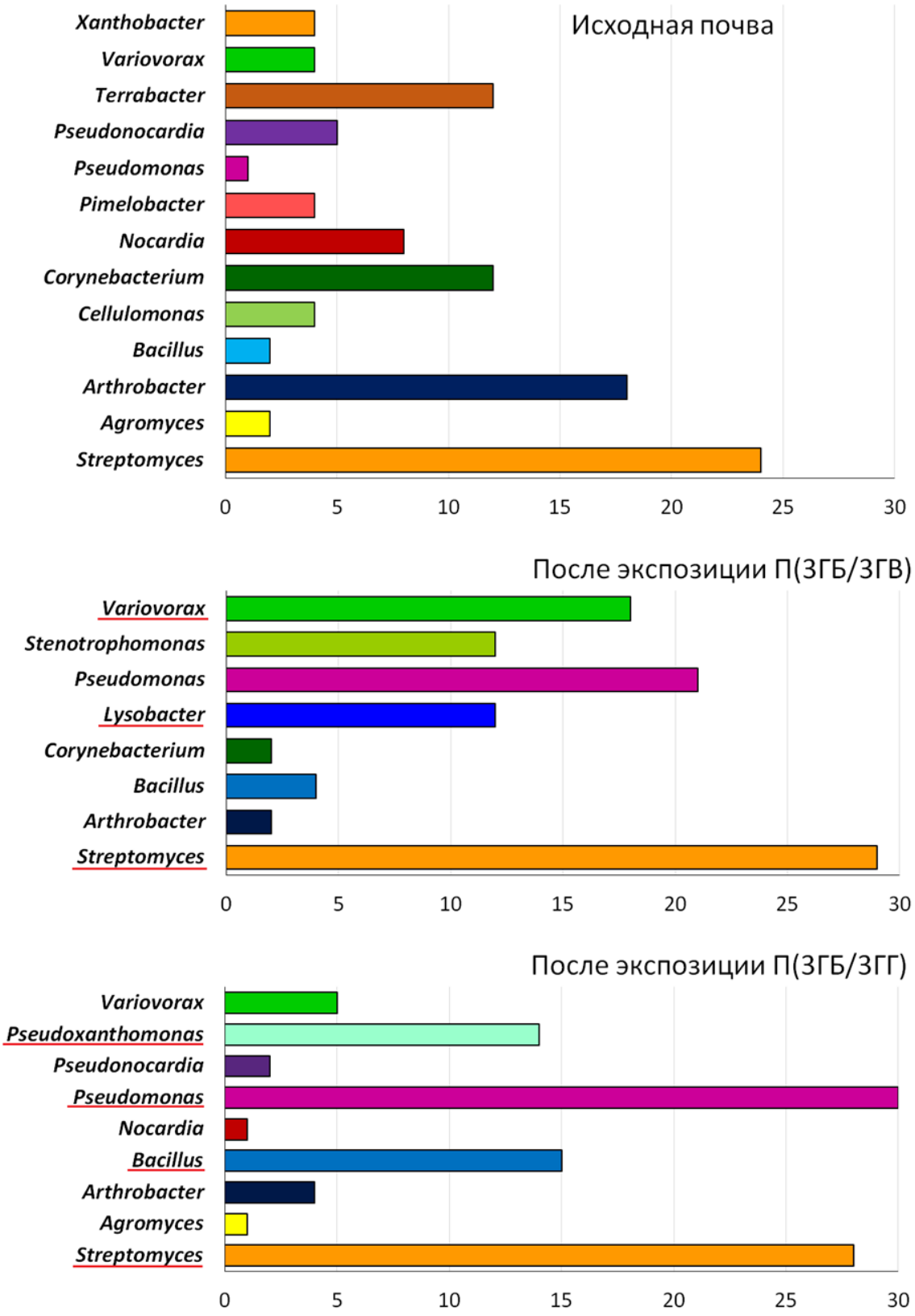


Рисунок 4. Соотношение доминирующих представителей микроорганизмов в почве до и после экспозиции разных типов ПГА (красным подчеркиванием выделены представители бактерий-деструкторов).

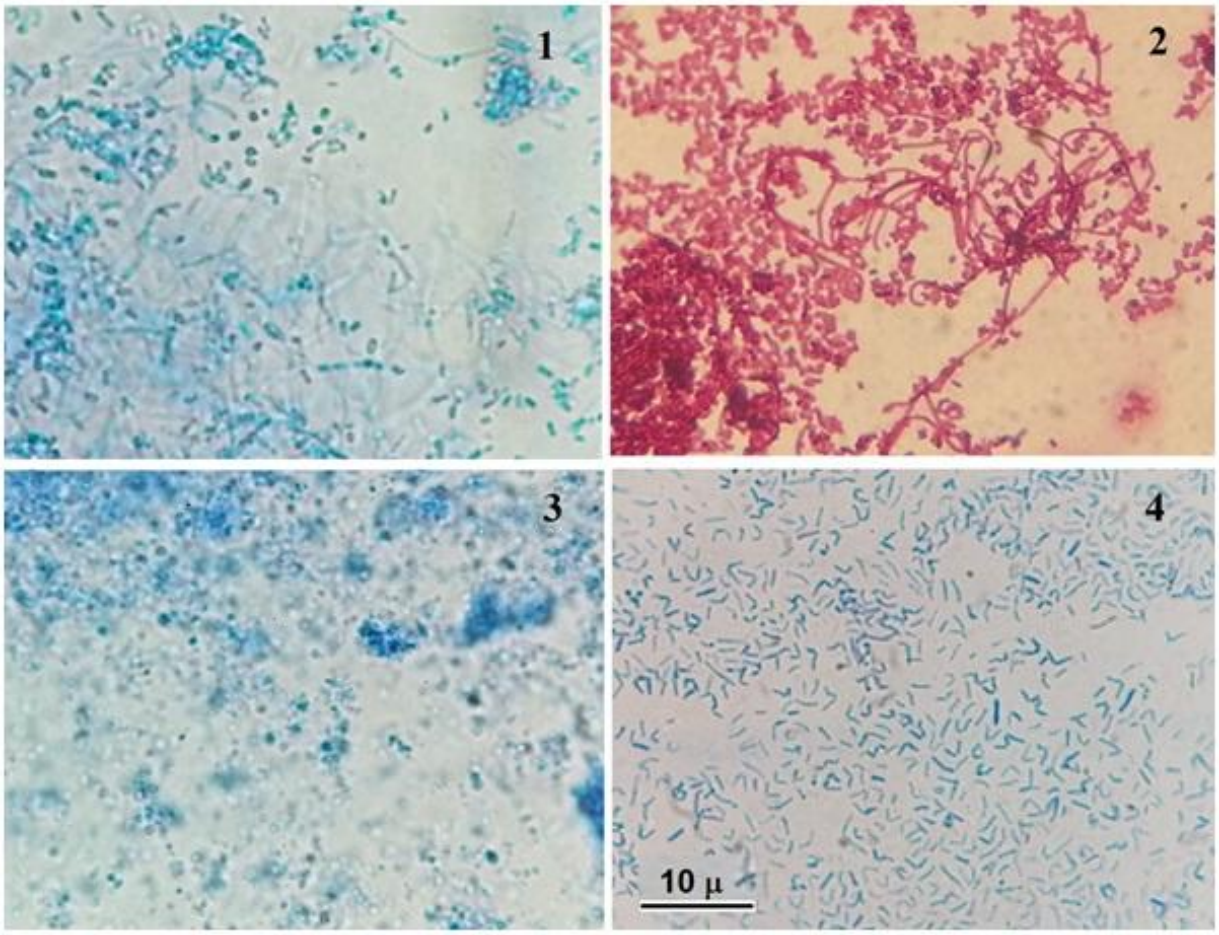


Рисунок 5. Микрофоторграфии доминирующих микроорганизмов исходной почвы. 1 – *Arthrobacter*, 2 – *Streptomyces*, 3 – *Terrabacter*, 4 – *Corynebacterium*

После экспозиции образцов с ПЗГБ/ЗГВ в микробном сообществе образцов почвы с полимером произошла смена доминирующих бактерий. Помимо *Streptomyces* доминирующими представителями стали бактерии родов *Pseudomonas* и *Variovorax*, также довольно активный рост наблюдается среди *Lysobacter* и *Stenotrophomonas*. Доминирующий в исходной почве род *Arthobacter* наряду с *Corynebacterium* и *Bacillus*, напротив, в почве с сополимером практически не встречается (Рис. 4).

Почва с ПЗГБ/ЗГГ также претерпела изменения в микробном составе. *Streptomyces* и *Pseudomonas* по-прежнему относятся к доминирующим родам, однако помимо них резко возрастает активность *Bacillus* и *Pseudoxanthomonas*. Бактерий рода *Variovorax* встречается гораздо меньше по сравнению с почвой с ПЗГБ/ЗГВ, в сравнении с ней же увеличивается число

Arthrobacter, но все равно недостаточно, чтобы снова занять место доминирующего представителя, как в исходной почве. Помимо вышеперечисленных в почве с П3ГБ/3ГГ встречаются представители родов *Pseudonocardia*, *Nocardia* и *Agromyces* (Рис. 4).

Из всех вышеперечисленных бактерий, выделенных на образцах с сополимерами П3ГБ/3ГВ и П3ГБ/3ГГ к микроорганизмам-деструкторам, относятся представители родов *Variovorax*, *Lysobacter* и *Streptomyces* для П3ГБ/3ГВ, и *Pseudoxanthomonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus* и *Streptomyces* для П3ГБ/3ГГ.

3.2 Таксономическое разнообразие микроорганизмов-деструкторов сополимеров поли(3-гидроксибутирата) с 3-гидроксивалератом и 3-гидроксигексаноатом

Из образцов почвы с поверхности полимерных пленок были выделены доминирующие бактерии, способные к гидролизу полимера. По совокупности морфофизиологических и молекулярно-генетических признаков была установлена принадлежность штаммов к следующим родам и видам, приведенным в таблице 2.

Таблица 2. Таксономическое разнообразие бактерий-деструкторов на разных типах полимера.

Тип полимера	П3ГБ/3ГВ	П3ГБ/3ГГ
Виды-деструкторы	*Lysobacter gummosus* 3HV-1 *Lysobacter sp*. 3HV-4 *Achromobacter sp*. 3HV-2 *Streptomyces omiyaensis* 3HV-3 *Variovorax paradoxus* 3HV-5 *Roseomonas massiliae* 3HV-6 *Delftia acidovorans* 3HV-9	*Pseudoxanthomonas mexicana* 3HH-1 *Pseudoxanthomonas sp*. 3HH-2 *Pseudoxanthomonas sp*. 3HH-4 *Pseudomonas fluorescens* 3HH-3 *Streptomyces sp*. 3HH-5 *Ensifer adhaerens* 3HH-6 *Bacillus pumilus* 3HH-7 *Bacillus cereus* 3HH-8

3.2.1 Таксономическое разнообразие микроорганизмов-деструкторов, выделенных из почвы с полимером П3ГБ/3ГВ

Lysobacter gummosus 3HV-1 (рис. 6а)

Тонкие и гибкие палочки. Грамотрицательные. Передвигаются за счет скольжения. Слизистые колонии кремового цвета. Производят коричневый, растворимый в воде пигмент. Аэробы. Оптимальная температура для роста 20-40 C^0. Хемоорганотрофы. Используют глутаминовую и аспарагиновую кислоты в качестве источника азота. Обладает сильной протеолитической активностью. Спор не образуют. Из гексоз используют маннит, а также усваивают дисахариды. Каталазоположительные.

Lysobacter sp. 3HV-4 (рис. 6в)

Тонкие палочки. Грамотрицательные. Подвижные, жгутиков не имеют. Передвигаются скольжением. Аэробы. Колонии очень слизистые, кремовые, розовые или желто-коричневые. Могут производить коричневый водорастворимый пигмент. Устойчивы к антибиотику актиномицину D. Обладают сильной протеолитической активностью. Спор не образуют. Амилазоположительные. Из гексоз используют глюкозу и мальтозу.

Achromobacter sp. 3HV-2

Прямые палочки с закругленными концами. Грамотрицательные. Спор не образуют. Подвижные. Количество жгутиков 1-20, расположены по периметру клетки. Неферментирующие, облигатные аэробы. Оксидаза и каталаза положительные. Уреаза, ДНКза, фенилаланин дезаминаза, лизин и орнитин декарбоксилаза и желатиназа – отрицательные. Непигментированные. Хемоорганотрофы, используют различные органические кислоты и аминокислоты в качестве источника углерода. Углеводы обычно не используют.

Streptomyces omiyaensis 3HV-3 (рис. 6б)

Аэробы. Грамположительные, кислотоустойчивые бактерии. Образуют широко разветвленный субстрат и воздушный мицелий. Хемоорганотрофы. Гифы не фрагментированы. Споры расположены в цепочках от 3 и клеток. Изначально колонии гладкие, но после разрастания мицелия становятся хлопьевидными. Производит широкий спектр пигментов. Каталазоположительные. Могут восстанавливать нитраты до нитритов. Усваивают глюкозу, сахарозу и маннит. Амилазоположительные.

Variovorax paradoxus 3HV-5 (рис. 6г)

Прямые, слегка изогнутые палочки одиночные или парные. Грамотрицательные. Подвижные. Передвигаются за счет жгутиков. Колонии желтого цвета, присутствуют пигменты каротиноиды. Аэробы. Оксидаза и каталаза положительные. Хемоорганотрофы. Колонии блестящие, желтые или зеленоватые. Хорошо растут на средах, содержащих углеводы, органические кислоты, аминокислоты или пептон. Липаза и лецитиназа положительные. Протеаза отрицательная. Спор не образуют. Образуют кислоту из маннита.

Roseomonas massiliae 3HV-6 (рис. 6д)

Короткие палочки. Организованы одиночно, реже в парах или коротких цепочках. Грамотрицательные. Аэробы. Точечные колонии, часто слизистые. Бледно-розовый пигмент. Каталаза и уреаза положительные. Неподвижные. Спор не образуют. Обладают лецитиназной активностью. Образуют кислоты из лактозы, мальтозы и сахарозы. Липаза, амилаза и протеаза отрицательные. Оксидазоположительные.

Delftia acidovorans 3HV-9 (рис. 6е)

Прямые, слегка изогнутые палочки. Расположены одиночно или парами. Подвижные. Жгутиков 1-5. Споры не образуют. Грамотрицательные. Оксидаза и каталаза положительные. Пигментов нет. Аэробы, строго респираторный тип обмена веществ. Неферментирующие. Хорошо растут на средах с органическими кислотами, аминокислотами, пептоном и

углеводами. Используют маннит и фруктозу в качестве источника углевода. Липаза положительная.

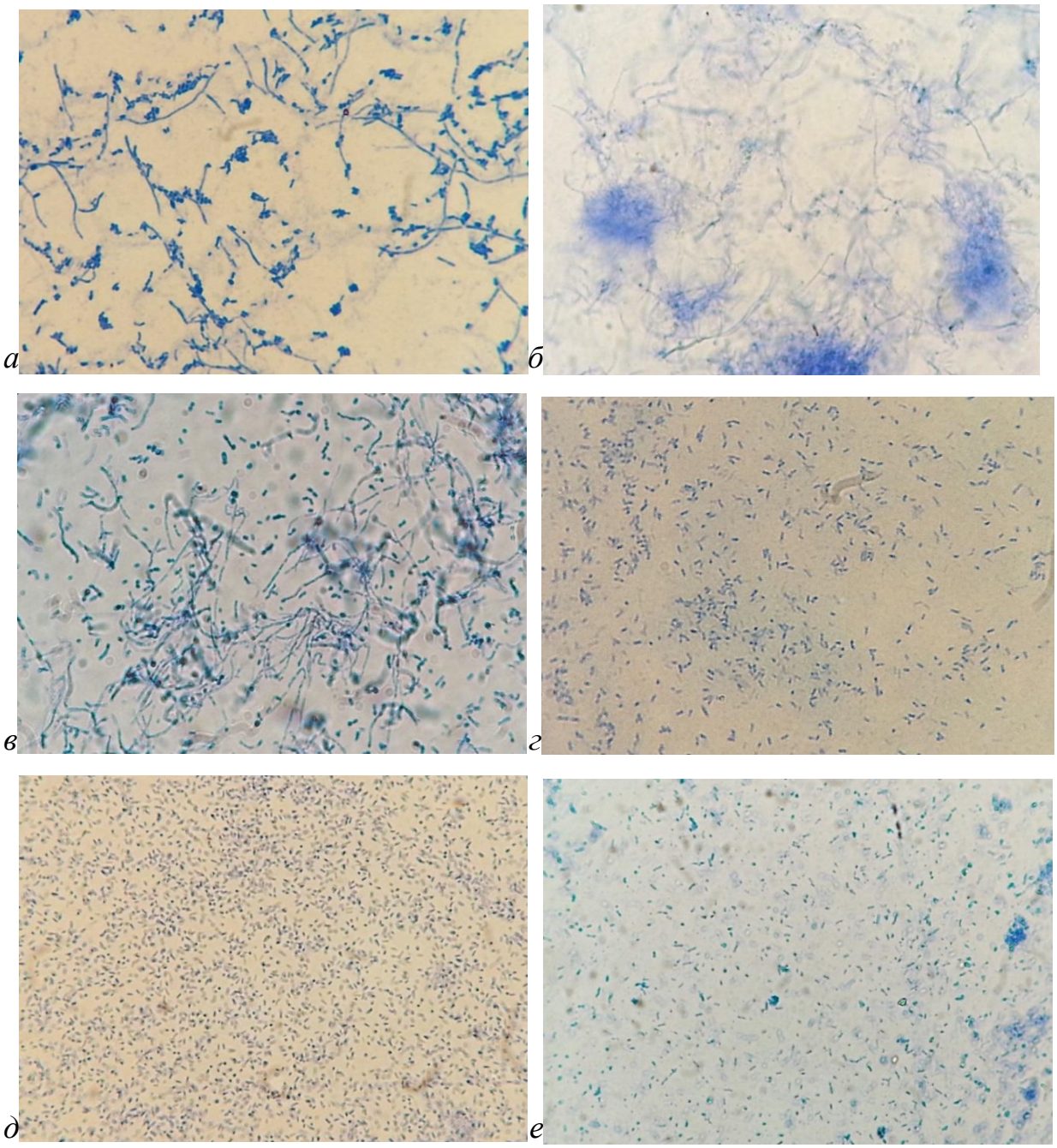


Рисунок 6. Микрофотографии бактерий-деструкторов, выделенных с поверхности полимера П(3ГБ/3ГВ) (увеличение ×1000); *а - Lysobacter gummosus 3HV-1, б - Streptomyces omiyaensis 3HV-3, в - Lysobacter sp. 3HV-4, г - Variovorax paradoxus 3HV-5, д - Candidatus Roseomonas massiliae 3HV-6, е - Delftia acidovorans 3HV-9*

3.2.2 Таксономическое разнообразие микроорганизмов-деструкторов, выделенных из почвы с полимером П3ГБ/3ГГ

Pseudoxanthomonas mexicana ЗНН-1 (рис. 7а)

Грамотрицательные палочки. Аэробы. Колонии желтого цвета. Гетеротрофы. Уреазаположительные. Лецитиназаотрицательные. В качестве источника углевода используют глюкозу, лактозу и мальтозу. Не растут на средах с содержанием NaCl. Неподвижные. Спор не образуют. Пигментов нет. Обладают каталитической и амилолитической активностью. Оксидазоположительные.

Pseudoxanthomonas sp. ЗНН-2 и ЗНН-4 (рис. 7б)

Грамотрицательные палочки. Аэробы. Колонии желтого цвета. Гетеротрофы. Уреазаположительные. Лецитиназаотрицательные. В качестве источника углевода используют глюкозу, лактозу и мальтозу. Не растут на средах с содержанием NaCl. Неподвижные. Спор не образуют. Пигментов нет. Обладают каталитической и амилолитической активностью. Оксидазоположительные.

Pseudomonas fluorescens ЗНН-3 (рис. 7 д)

Слегка изогнутые палочки. Грамотрицательные. Одиночные. Подвижные. Имеют один или несколько полярных жгутиков. Аэробы. Не растут на кислых средах. Оксидазо и каталазоположительные. Используют сахарозу и мальтозу в качестве источника углеводов.

Streptomyces sp. ЗНН-5 (рис. 7ж)

Аэробы. Грамположительные, кислотоустойчивые бактерии. Образуют широко разветвленный субстрат и воздушный мицелий. Хемоорганотрофы. Гифы не фрагментированы. Споры расположены в цепочках от 3 и клеток. Изначально колонии гладкие, но после разрастания мицелия становятся хлопьевидными. Производит широкий спектр пигментов. Каталазоположительные. Могут восстанавливать нитраты до нитритов. Усваивают глюкозу, сахарозу и маннит. Амилазоположительные.

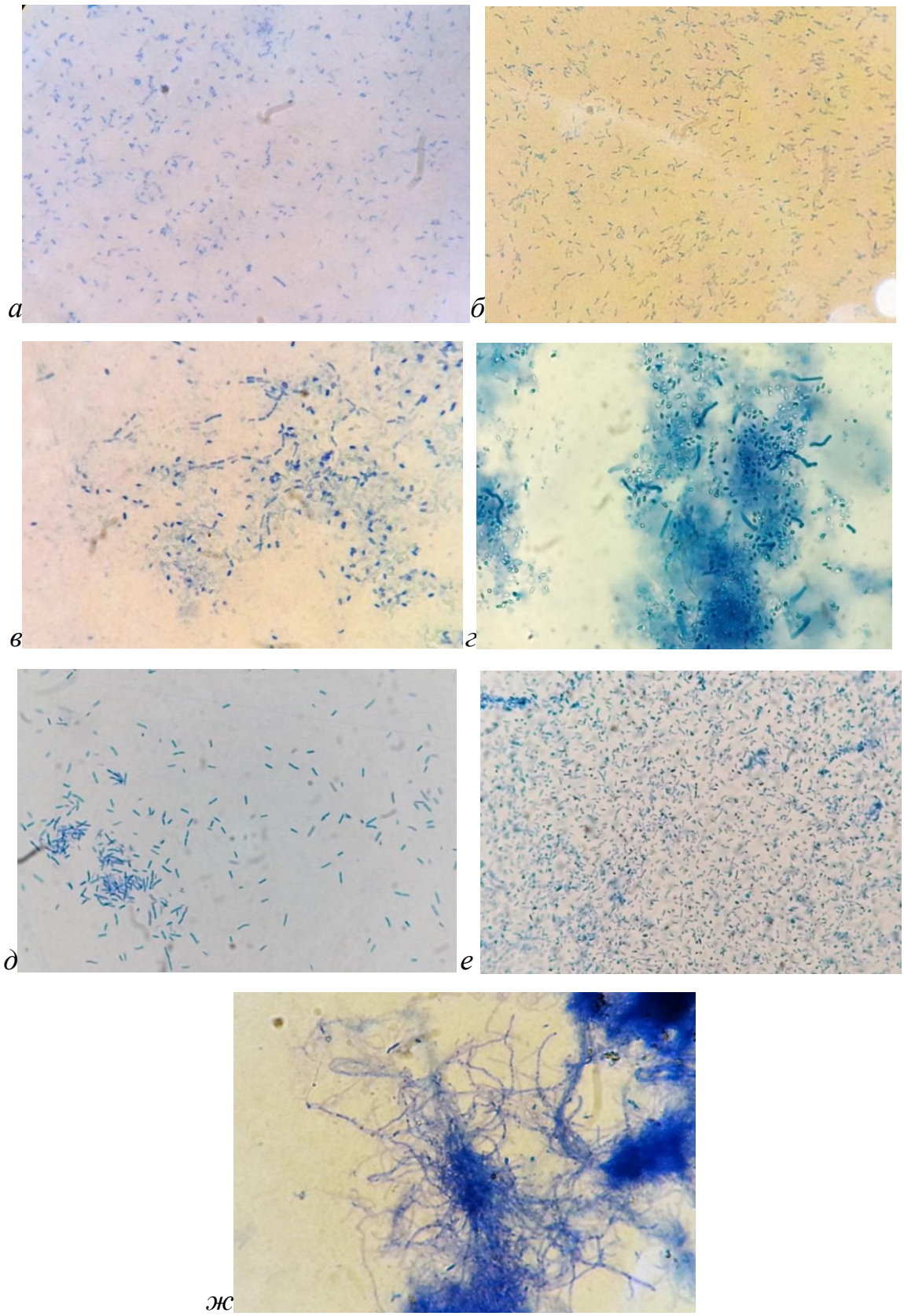


Рисунок 7. Микрофотографии бактерий-деструкторов ПЗГБ/ЗГГ (увеличение ×1000); *а* - *Pseudoxanthomonas sp*. ЗНН-1, *б* - *Pseudoxanthomonas sp*. ЗНН-4, *в* - *Bacillus pumilus* ЗНН-7, *г* - *Bacillus sp*. ЗНН-8, *д* - *Pseudomonas fluorescens* ЗНН-3, *е* - *Ensifer adhaerens* ЗНН-6, *ж* - *Streptomyces sp*. ЗНН-5

Ensifer adhaerens 3НН-6 (рис. 7е)

Короткие палочки, собраны в цепочки разной длины. Грамотрицательные. Образуют споры. Неподвижные. Пигментов не имеют. Каталазоотрицательные. Обладают протеолитической активностью. В качестве источников углеводов используют лактозу, мальтозу и сахарозу. Лецитиназоположительные.

Bacillus pumilus 3НН-7 (рис. 7в)

Длинные палочки. Одиночные или собраны в цепочки по 2-3 клетки. Грамположительные. Подвижные. Образуют споры. Колонии круглые, с неровными волнистыми краями. Пигментов нет. Каталазоположительные. Обладают амилолитической и протеолитической активностью. Образуют кислоты из сахарозы. Лецитиназоположительные.

Bacillus cereus 3НН-8 (рис. 7г)

Длинные, слегка изогнутые палочки. Одиночные. Грамположительные. Подвижные. Образуют споры. Колонии круглые, слизистые бежевого цвета. Пигментов нет. Каталазоположительные. Обладают амилолитической и протеолитической активностью. Образуют кислоты из сахарозы. Липаза и лецитиназа положительные.

3.3 Молекулярно-генетический анализ микроорганизмов-деструкторов

Для штаммов-деструкторов были определены последовательности нуклеотидов гена 16S рРНК. Анализ был проведен на базе Лаборатории Фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины (г. Новосибирск).

Сиквенс штамма 3HV-1

cgtcagagtgaacgctggcggcaggcctaacacatgcaagtcgaacggcagcacagaggagcttgctccttgggtg
gcgagtggcggacgggtgaggaatacgtcggaatctgcctatttgtgggggataacgtagggaaacttacgctaatac
cgcatacgacctacgggtgaaagcggaggaccttcgggcttcgcgcagatagatgagccgacgtcggattagctagt

tggcggggtaaaggcccaccaaggcgacgatccgtagctggtctgagaggatgatcagccacactggaactgagac
acggtccagactcctacgggaggcagcagtggggaatattggacaatgggcgcaagcctgatccagccatgccgcg
tgtgtgaagaaggccttcgggttgtaaagcacttttgtccggaaagaaaagcattgggttaataccccgatgtcatgacg
gtaccggaagaataagcaccggctaacttcgtgccagcagccgcggtaatacgaagggtgcaagcgttactcggaat
tactgggcgtaaagcgtgcgtaggtggtttgttaagtctgatgtgaaagccctgggctcaacctgggaatggcattgga
aactggcttactagagtgcggtagagggtagtggaattcccggtgtagcagtgaaatgcgtagatatcgggaggaaca
tctgtggcgaaggcgactacctggaccagcactgacactgaggcacgaaagcgtggggagcaaacaggattagata
ccctggtagtccacgccctaaacgatgcgaactggatgttgggagcaacttggctctcagtatcgaagctaacgcgtta
agttcgccgcctgggaagtacggtcgcaagactgaaactcaaaggaattgacgggggcccgcacaagcggtggag
tatgtggtttaattcgatgcaacgcgaagaaccttacctggccttgacatccacggaactttccagagatggattggtgc
cttcgggaaccgtgagacaggtgctgcatggctgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgcaacga
gcgcaacccttgtccttagttgccagcacgtaatggtgggaactctaaggagaccgccggtgacaaaccggaggaag
gtggggatgacgtcaagtcatcatggcccttacggccagggctacacacgtactacaatggtagggacagagggctg
caaacccgcgagggcaagccaatcccagaaaccctatctcagtccggatcggagtctgcaactcgactccgtgaagt
cggaatcgctagtaatcgcagatcagcattgctgcggtgaatacgttcccgggccttgtacacaccgcccgtcacacc
atgggagtttgttgcaccagaagcaggtagcttaaccttcgggagggcgcttgccacggtgtggccgatgactggggt
gaatcacaa

Сиквенс штамма 3HV-4

cgtggcaagcgccctcccgaaggttaagctacctgcttctggtgcaacaaactcccatggtgtgacgggcggtgtgta
caaggcccgggaacgtattcaccgcagcaatgctgatctgcgattactagcgattccgacttcacggagtcgagttgc
agactccgatccggactgagatagggtttctgggattggcttgccctcgcgggtttgcagccctctgtccctaccattgt
agtacgtgtgtagccctggtcgtaagggccatgatgacttgacgtcatccccaccttcctccggtttgtcaccggcggtc
tccttagagttcccaccattacgtgctggcaactaaggacaagggttgcgctcgttgcgggacttaacccaacatctcac
gacacgagctgacgacagccatgcagcacctgtctcacggttcccgaaggcaccaatccatctctggaaagttccgtg
gatgtcaagaccaggtaaggttcttcgcgttgcatcgaattaaaccacatactccaccgcttgtgcgggcccccgtcaat
tcctttgagtttcagtcttgcgaccgtacttcccaggcggcgaacttaacgcgttagcttcgatactgagagccaagttgc
tcccaacatccagttcgcatcgtttagggcgtggactaccagggtatctaatcctgtttgctccccacgctttcgtgcctca
gtgtcagtgctggtccaggtagtcgccttcgccacagatgttcctcccgatatctacgcatttcactgctacaccgggaat
tccactaccctctaccgcactctagtaagccagtttccaatgccattcccaggttgagcccagggctttcacatcagactt
aacaaaccacctacgcacgctttacgcccagtaattccgagtaacgcttgcacccttcgtattaccgcggctgctggca

cgaagttagccggtgcttattcttccggtaccgtcatgacctcggggtattaacccgaagcttttctttccggacaaaagt
gctttacaacccgaaggccttcttcacacacgcggcatggctggatcaggcttgcgcccattgtccaatattccccactg
ctgcctcccgtaggagtctggaccgtgtctcagttccagtgtggctgatcatcctctcagaccagctacggatcgtcgcc
ttggtgggcctttaccccgccaactagctaatccgacgtcggctcatctatctgcgcgaagcccgaaggtcctccgcttt
cacccgtaggtcgtatgcggtattagcgtaagtttccctacgttatcccccacaaataggcagattccgacgtattcctca
cccgtccgccactcgccacccaaggagcaagctcctctgtgctgccgttcgacttgcatgtgttaggc

Сиквенс штамма 3HV-3

cccttcggggtggattagtggcgaacgggtgagtaacacgtgggcaatctgcccttcactctgggacaagccctgga
aacggggtctaataccggataacaccggcttccgcatgggggctggttgaaagctccggcggtgaaggatgagccc
gcggcctatcagcttgttggtggggtaatggcctaccaaggcgacgacgggtagccggcctgagagggcgaccgg
ccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggaggcagcagtggggaatattgcacaatgggcgaaagc
ctgatgcagcgacgccgcgtgagggatgacggccttcgggttgtaaacctctttcagcagggaagaagcgagagtg
acggtacctgcagaagaagcgccggctaactacgtgccagcagccgcggtaatacgtagggcgcaagcgttgtccg
gaattattgggcgtaaagagctcgtaggcggcttgtcacgtcgggtgtgaaagcccggggcttaaccccgggtctgca
tccgatacgggcaggctagagtgtggtaggggagatcggaattcctggtgtagcggtgaaatgcgcagatatcagga
ggaacaccggtggcgaaggcggatctctgggccattactgacgctgaggagcgaaagcgtggggagcgaacagg
attagataccctggtagtccacgccgtaaacgttgggaactaggtgttggcgacattccacgtcgtcggtgccgcagct
aacgcattaagttccccgcctggggagtacggccgcaaggctaaaactcaaaggaattgacgggggcccgcacaag
cagcggagcatgtggcttaattcgacgcaacgcgaagaaccttaccaaggcttgacatataccggaaagcattagag
atagtgcccccccttgtggtcggtatacaggtggtgcatggctgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtccc
gcaacgagcgcaacccttgtcctgtgttgccagcatgcccttcggggtgatggggactcacaggagaccgccggggt
caactcggaggaaggtggggacgacgtcaagtcatcatgccccttatgtcttgggctgcacacgtgctacaatggccg
gtacaaagagctgcgatgccgcgaggcggagcgaatctcaaaaagccggtctcagttcggattggggtctgcaactc
gaccccatgaagtcggagttgctagtaatcgcagatcagcattgctgcggtgaatacgttcccgggccttgtacacacc
gcccgtcacgtcacgaaagtcggtaacacccgaagccggtggcccaacccccttgtgggagggagctgtcgaaggtg
ggaccagcgattgggacgaagtcgtaacaaggtaac

Сиквенс штамма 3HV-5

gattgaacgctggcggcatgccttacacatgcaagtcgaacggcagcgcgggagcaatcctggcggcgagtggcg
aacgggtgagtaatacatcggaacgtgcccaatcgtgggggataacgcagcgaaagctgtgctaataccgcatacga
tctacggatgaaagcaggggatcgcaagaccttgcgcgaatggagcggccgatggcagattaggtagttggtgaggt

aaaggctcaccaagccttcgatctgtagctggtctgagaggacgaccagccacactgggactgagacacggcccag
actcctacgggaggcagcagtggggaattttggacaatgggcgaaagcctgatccagccatgccgcgtgcaggatg
aaggccttcgggttgtaaactgcttttgtacggaacgaaacggtcttttctaatacagaaggctaatgacggtaccgtaa
gaataagcaccggctaactacgtgccagcagccgcggtaatacgtagggtgcaagcgttaatcggaattactgggcg
taaagcgtgcgcaggcggttatgtaagacagttgtgaaatccccgggctcaacctgggaactgcatctgtgactgcata
gctagagtacggtagagggggatggaattccgcgtgtagcagtgaaatgcgtagatatgcggaggaacaccgatgg
cgaaggcaatcccctggacctgtactgacgctcatgcacgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggta
gtccacgccctaaacgatgtcaactggttgttgggtcttcactgactcagtaacgaagctaacgcgtgaagttgaccgc
ctggggagtacggccgcaaggttgaaactcaaaggaattgacggggacccgcacaagcggtggatgatgtggttta
attcgatgcaacgcgaaaaaccttacccacctttgacatgtacggaattcgccagagatggcttagtgctcgaaagaga
accgtaacacaggtgctgcatggctgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgcaacgagcgcaacc
cttgtcattagttgctacattcagttgggcactctaatgagactgccggtgacaaaccggaggaaggtggggatgacgt
caagtcctcatggcccttataggtggggctacacacgtcatacaatggctggtacaaagggttgccaacccgcgagg
gggagctaatcccataaaaccagtcgtagtccggatcgcagtctgcaactcgactgcgtgaagtcggaatcgctagta
atcgtggatcagaatgtcacggtgaatacgttcccgggtcttgtacacaccgcccgtcacaccatgggagcgggttctg
ccagaagtagttagcttaaccgcaaggagggcgattaccacggcagggttcgtgactggggtgaa

Сиквенс штамма 3HV-6

tgatcctggctcagagcgaacgctggcggcatgcttaacacatgcaagtcgcacgggcagcaatgtcagtggcgga
cgggtgagtaacgcgtaggaacgtgtcctgaggtgggggacaaccccgggaaactggggctaataccgcatatgg
gctgaggcccaaagccgagaggcgcctttggagcggcctgcgtccgattaggtagttggtggggtaaaggcctacc
aagcctgcgatcggtagctggtctgagaggacgaccagccacactgggactgagacacggcccagactcctacgg
gaggcagcagtggggaatattggacaatgggcgaaagcctgatccagcaatgccgcgtgggtgaagaaggtcttcg
gatcgtaaagccctttcgacggggacgatgatgacggtacccgtagaagaagccccggctaacttcgtgccagcagc
cgcggtaatacgaagggggctagcgttgctcggaattactgggcgtaaagggcgcgtaggcggcggcccaagtca
ggcgtgaaattcctgggctcaacctggggactgcgcttgatactgggttgcttgaggatggaagaggctcgtggaattc
ccagtgtagaggtgaaattcgtagatattgggaagaacaccggtggcgaaggcggcgagctggtccattactgacgc
tgaggcgcgacagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgccgtaaacgatgtgcgctggatgt
tggggcccatagggtctcagtgtcgtagccaacgcggtaagcgcaccgcctggggagtacggccgcaaggttgaaa
ctcaaaggaattgacgggggcccgcacaagcggtggagcatgtggtttaattcgaagcaacgcgcagaaccttacca
gcccttgacatggtcacgaccggtccagagatggactttcctagcaataggcgtgatgcacaggtgctgcatggctgt

cgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgcaacgagcgcaaccctcgcctctagttgccagcatgttcggg
tgggcactctagaggaactgccggtgacaagccggaggaaggtggggatgacgtcaagtcctcatggcccttatgg
gctgggctacacacgtgctacaatggcggtgacagagggaagccaggtcgcgaggccgagccgatcccgaaaag
ccgtctcagttcggattgcactctgcaactcgggtgcatgaaggtggaatcgctagtaatcgcggatcagcacgccgc
ggtgaatacgttcccgggccttgtacacaccgcccgtcacaccatgggagttggttctaccttaagtcgttgcgctaacc
agcaatgggggcaggcgaccacggtagggtcagcgactggggtgaagtcgtaacaaggtaac

Сиквенс штамма 3HV-9

gccttacacatgcaagtcgaacggtaacaggtcttcggacgctgacgagtggcgaacgggtgagtaatacatcggaa
cgtgcccagtcgtgggggataactactcgaaagagtagctaataccgcatacgatctgaggatgaaagcgggggac
cttcgggcctcgcgcgattggagcggccgatggcagattaggtagttggtgggataaaagcttaccaagccgacgat
ctgtagctggtctgagaggacgaccagccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggaggcagcagt
ggggaattttggacaatgggcgaaagcctgatccagcaatgccgcgtgcaggatgaaggccttcgggttgtaaactg
cttttgtacggaacgaaaaagcttctcctaatacgagaggcccatgacggtaccgtaagaataagcaccggctaactac
gtgccagcagccgcggtaatacgtagggtgcgagcgttaatcggaattactgggcgtaaagcgtgcgcaggcggtta
tgtaagacagatgtgaaatccccgggctcaacctgggaactgcatttgtgactgcatggctagagtacggtagagggg
gatggaattccgcgtgtagcagtgaaatgcgtagatatgcggaggaacaccgatggcgaaggcaatcccctggacct
gtactgacgctcatgcacgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgccctaaacgatgtc
aactggttgttgggaattagttttctcagtaacgaagctaacgcgtgaagttgaccgcctggggagtacggccgcaagg
ttgaaactcaaaggaattgacggggacccgcacaagcggtggatgatgtggtttaattcgatgcaacgcgaaaaacct
tacccacctttgacatggcaggaagtttccagagatggattcgtgctcgaaagagaacctgcacacaggtgctgcatg
gctgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgcaacgagcgcaacccttgtcattagttgctacatttagtt
gggcactctaatgagactgccggtgacaaaccggaggaaggtggggatgacgtcaagtcctcatggcccttataggt
ggggctacacacgtcatacaatggctggtacagagggttgccaacccgcgagggggagctaatcccataaaaccag
tcgtagtccggatcgcagtctgcaactcgactgcgtgaagtcggaatcgctagtaatcgcggatcagcatgccgcggt
gaatacgttcccgggtcttgtacacaccgcccgtcacaccatgggagcgggtctcgccagaagtaggtagcctaacc
gcaaggagggcgcttaccacggcggg

Сиквенс штамма 3HH-2

agagtttgatcctggctcagagtgaacgctggcggtaggcctaacacatgcaagtcgaacggcagcacaggagagc
ttgctctcgggtggcgagtggcggacgggtgaggaatacatcggaatctacctttcgtgggggataacgtagggaa
acttacgctaataccgcatacgacctacgggtgaaagtgggggaccgcaaggcctcacgcgattagatgagccgatg

tccgattagctagttggcggggtaatggcccaccaaggcgacgatcggtagctggtctgagaggatgatcagccaca
ctggaactgagacacggtccagactcctacgggaggcagcagtggggaatattggacaatgggcgcaagcctgatc
cagccataccgcgtgggtgaagaaggccttcgggttgtaaagccctttgttgggaaagaaatcctatcggttaataac
cggtggggatgacggtacccaaagaataagcaccggctaacttcgtgccagcagccgcggtaatacgaagggtgca
agcgttactcggaattactgggcgtaaagcgtgcgtaggtggtggtttaagtctgctgtgaaagccctgggctcaacct
gggaattgcagtggatactggattactagagtgtggtagagggatgcggaatttctggtgtagcagtgaaatgcgtaga
gatcagaaggaacatccgtggcgaaggcggcatcctgggccaacactgacactgaggcacgaaagcgtggggag
caaacaggattagataccctggtagtccacgccctaaacgatgcgaactggatgttgggtgcaacttggcacccagtat
cgaagctaacgcgttaagttcgccgcctggggagtacggtcgcaagactgaaactcaaaggaattgacgggggccc
gcacaagcggtggagtatgtggtttaattcgatgcaacgcgaagaaccttacctggtcttgacatccacggaactttcca
gagatggattggtgccttcgggaaccgtgagacaggtgctgcatggctgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggtt
aagtcccgcaacgagcgcaacccttgtccttagttgccagcacgtaatggtgggaactctaaggagaccgccggtga
caaaccggaggaaggtggggatgacgtcaagtcatcatggcccttacgaccagggctacacacgtactacaatggta
gggacagagggctgcaaacccgcgagggtgagccaatcccagaaaccctatctcagtccggattggagtctgcaac
tcgactccatgaagtcggaatcgctagtaatcgcagatcagcattgctgcggtgaatacgttcccgggccttgtacaca
ccgcccgtcacaccatgggagtttgttgcaccagaagcaggtagcttaaccttcgggagggcgcttgccacggtgtg
gccgatgactggggtgaagtcgtaacaaggtaac

Сиквенс штамма 3НН-4

agagtttgatcctggctcagagtgaacgctggcggtaggcctaacacatgcaagtcgaacggcagcacaggagagc
ttgctctcgggtggcgagtggcggacgggtgaggaatacatcggaatctacctttcgtgggggataacgtagggaa
acttacgctaataccgcatacgacctacgggtgaaagtgggggaccgcaaggcctcacgcgattagatgagccgatg
tccgattagctagttggcggggtaatggcccaccaaggcgacgatcggtagctggtctgagaggatgatcagccaca
ctggaactgagacacggtccagactcctacgggaggcagcagtggggaatattggacaatgggcgcaagcctgatc
cagccataccgcgtgggtgaagaaggccttcgggttgtaaagccctttgttgggaaagaaatcctatcggttaataac
cggtggggatgacggtacccaaagaataagcaccggctaacttcgtgccagcagccgcggtaatacgaagggtgca
agcgttactcggaattactgggcgtaaagcgtgcgtaggtggtggtttaagtctgctgtgaaagccctgggctcaacct
gggaattgcagtggatactggatcactagagtgtggtagagggatgcggaatttctggtgtagcagtgaaatgcgtag
agatcagaaggaacatccgtggcgaaggcggcatcctgggccaacactgacactgaggcacgaaagcgtgggga
gcaaacaggattagataccctggtagtccacgccctaaacgatgcgaactggatgttgggtgcaacttggcacccagt
atcgaagctaacgcgttaagttcgccgcctggggagtacggtcgcaagactgaaactcaaaggaattgacgggggc

ccgcacaagcggtggagtatgtggtttaattcgatgcaacgcgaagaaccttacctggtcttgacatccacggaactttc
cagagatggattggtgccttcgggaaccgtgagacaggtgctgcatggctgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgg
gttaagtcccgcaacgagcgcaacccttgtccttagttgccagcacgtaatggtgggaactctaaggagaccgccggt
gacaaaccggaggaaggtggggatgacgtcaagtcatcatggcccttacgaccagggctacacacgtactacaatg
gtagggacagagggctgcaaacccgcgagggtgagccaatcccagaaaccctatctcagtccggattggagtctgc
aactcgactccatgaagtcggaatcgctagtaatcgcagatcagcattgctgcggtgaatacgttcccgggccttgtac
acaccgcccgtcacaccatgggagtttgttgcaccagaagcaggtagcttaaccttcgggagggcgcttgccacggt
gtggccgatgactggggtgaagtcgtaacaaggtaac

Сиквенс штамма 3НН-3

ctgcagaattgcccttgcaggcctaacacatgcaagtcgagcggtagagaggtgcttgcacctcttgagagcggcgg
acgggtgagtaatgcctaggaatctgcctggtagtgggggataacgctcggaaacggacgctaataccgcatacgtc
ctacgggagaaagcaggggaccttcgggccttgcgctatcagatgagcctaggtcggattagctagttggtgaggtaa
tggctcaccaaggcgacgatccgtaactggtctgagaggatgatcagtcacactggaactgagacacggtccagact
cctacgggaggcagcagtggggaatattggacaatgggcgaaagcctgatccagccatgccgcgtgtgtgaagaag
ggtttttcttcggattgtaaagcactttaagttgggaggaagggcattaacctaatacgttagtgttttgacgttaccgaca
gaataagcaccggctaactctgtgccagcagccgcggtaatacagagggtgcaagcgttaatcggaattactgggcg
taaagcgcgcgtaggtggttcgttaagttggatgtgaaagccccgggctcaacctgggaactgcattcaaaactgtcg
agctagagtatggtagagggtggtggaatttcctgtgtagcggtgaaatgcgtagatataggaaggaacaccagtggc
gaaggcgaccacctggactgatactgacactgaggtgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggta
gtccacgccgtaaacgatgtcaactagccgttgggagccttgagctcttagtggcgcagctaacgcattaagttgaccg
cctggggagtacggccgcaaggttaaaactcaaatgaattgacgggggcccgcacaagcggtggagcatgtggttta
attcgaagcaacgcgaagaaccttaccaggccttgacatccaatgaactttccagagatggattggtgccttcgggaac
attgagacaggtgctgcatggctgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgtaacgagcgcaaccctt
gtccttagttaccagcacgttatggtgggcactctaaggagactgccggtgacaaaccggaggaaggtggggatgac
gtcaagtcatcatggcccttacggcctgggctacacacgtgctacaatggtcggtacagagggttgccaagccgcga
ggtggagctaatcccacaaaaccgatcgtagtccggatcgcagtctgcaactcgactgcgtgaagtcggaatcgctag
taatcgcgaatcagaatgtcgcggtgaatacgttcccgggccttgtacacaccgcccgtcacaccatgggagtgggtt
gcaccagaagtagctagtctaaccttcgggggacggttaccacggtgtgattcatgactggggtgaagtcgtaacaa
ggtaac

Анализ последовательностей с использованием программы поиска https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch в базе данных нуклеотидов выявил виды с наиболее близкими последовательностями нуклеотидов в геноме (табл. 4).

Таблица 4. Степень гомологии генов 16S рРНК бактерий-деструкторов с наиболее близкими последовательностями, включенными в базу данных NCBI GenBank.

Тип ПГА	ПГА-деструкторы, № в базе	Штамм, уже существующий в базе данных NCBI	Идентичность
ПЗГБ/ЗГГ	KT321684	*Bacillus pumilus* strain PRE14 (EU880532.1)	100%
	KT321685	*Bacillus cereus* strain FJM4 (KR493006.1)	100%
	KT321683	*Ensifer adhaerens* (*Sinorhizobium morelense*) strain BB2 (KP314234.1)	100%
	KT321681	*Pseudomonas fluorescens* strain JK15 (KF148637.1)	99%
	KT321679	*Pseudoxanthomonas mexicana* strain HX-N01 (KF501482.1) Cellulose-degrading bacteria	99%
	KT321680 KT321682	*Pseudoxanthomonas sp.* 11_4K (EF540482.1)	100%
	KU052942	*Streptomyces albolongus* strain CSSP414 (NR_115372.1)	99%
ПЗГБ/ЗГВ	KU052943	*Achromobacter insuavis* strain G.W-CD.23 (KP645387) Cellulose-degrading bacteria	99%
	KT321690	Candidatus *Roseomonas massiliae* 1461A (AF531769.1) *Roseomonas sp.* BZ44 (HQ588850.1) isolated from hydrocarbon-contaminated soil	100% 99%
	KT321691	*Delftia acidovorans* strain B201 (KJ781877.1)	100%
	KT321686	*Lysobacter gummosus* strain KCTC 12132 (NR_041005.1)	100%
	KT321688	*Lysobacter sp.* HX1 (EF601813.1)	100%
	KT321687	*Streptomyces omiyaensis* strain NBRC 13449 (NR_112403.1)	100%
	KT321689	*Variovorax paradoxus* DSM 30162 (AB622223.1) Xenobiotic compounds degrading bacteria *Variovorax sp.* GG6b (GQ337855.2) Parathion-degrading bacteria	100%

Среди уже известных близкородственных штаммов были обнаружены бактерии, обладающие способностью к деструкции различных веществ, а

также устойчивые к загрязнениям углеводородам или тяжелым металлам. Так, например, штамм *Variovorax paradoxus* DSM 30162 способен деградировать ксенобиотики, а штамм *Variovorax sp*. GG6b деградирует паратион. Штаммы *Roseomonas sp*. BZ44 и *Pseudoxanthomonas sp*. 11_4K были выделены из почвы, загрязненной нефтепродуктами. Штаммы *Achromobacter insuavis* G.W-CD.23 и *Pseudoxanthomonas mexicana* HX-N01 способны к деградации целлюлозы. Штамм *Delftia sp*. SR27 был выделен из сообщества микроорганизмов в металлосодержащих осадках.

Выводы:

1. После экспозиции образцов пленок сополимеров П3ГБ/3ГВ и П3ГБ/3ГГ в почве увеличилось количество копиотрофов и азотфиксаторов в среднем в 3 раза, а количество олиготрофов снизилось в 9,5 раз. Это свидетельствует о том, что полимерные пленки являлись привлекательным субстратом для микроорганизмов и подвергались активной деградации.

2. Качественный состав доминирующих микроорганизмов на поверхности пленок сополимеров П3ГБ/3ГВ и П3ГБ/3ГГ изменился по сравнению с контрольной почвой: увеличилось количество грамотрицательных бактерий (*Pseudomonas*, *Pseudoxantomonas*, *Stenotrophomonas*, *Variovorax*) и уменьшилось количество грамположительных (*Terrabacter*, *Cellulomonas*, *Pimelobacter*, *Corynebacterium*).

3. Было выделено и идентифицировано 15 штаммов первичных деструкторов. Общими деструкторами для обоих типов полимеров определены бактерии рода *Streptomyces*; специфичными для П3ГБ/3ГВ – представители родов *Lysobacter*, *Achromobacter*, *Variovorax*, *Roseomonas* и *Delftia*; специфичными для П3ГБ/3ГГ – представители родов *Pseudoxanthomonas*, *Pseudomonas*, *Ensifer* и *Bacillus*.

Список литературы

1. Волова Т. Г. Разрушаемые микробные полигидроксиалканоаты в качестве технического аналога неразрушаемых полиолефинов / Т.Г. Волова // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2015. – Т. 8, №2. – С. 131-151.
2. Закономерности биоразрушения полигидроксиалканоатов на территории Вьетнама и Центральной Сибири / С.В. Прудникова, К.И. Коробихина, А.Н. Бояндин, Т.Г. Волова // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2012. – Т. 3, №5. – С. 311-321.
3. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Д.Г. Звягинцев. – МГУ, 1991. – 209 с.
4. Потапов А.Г. Биоразлагаемые полимеры – вперед в будущее / Потапов А.Г., Пармон В.Н. // ЭКиП России. – 2010. – №5 спец. выпуск. – С. 4-8.
5. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. – Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
6. Прудникова С.В. Экологическая роль полигидроксиалканоатов - аналога синтетических пластмасс: закономерности биоразрушения в природной среде и взаимодействия с микроорганизмами / Прудникова С.В., Волова Т.Г. – Красноярск: Красноярский писатель, 2012. – 184с.
7. Современные проблемы и методы биотехнологии электрон. учеб. пособие / Н. А. Войнов, Т. Г. Волова, Н. В. Зобова и др.; под науч. ред. Т. Г. Воловой. – Электрон. дан. (12 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2009.
8. Таскаев М.С. Производство биополимеров как один из путей решения проблем экологии и АПК: Аналит. обзор / М.С. Таскаев, Л.М. Еремеева. – Алматы: НЦ НТИ, 2009. – 200с.

9. Фомин В.А. Биоразлагаемые полимеры, состояние и перспективы использования: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / В.А. Фомин, В.В Гузеев. – Москва, 2001. – 42с.
10. Asrar J. Biopolymers: polyesters 3: applications and commercial products / J.Asrar, K.J. Gruys, Y. Doi. – Biopol. Wiley-VCH, Weinheim, 2002. – 53p.
11. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2 / G.M. Garrity, D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley. – Berlin: Springer, 2005. – 2648p.
12. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 3 / P. De Vos, Garrity G.M., D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.H. Schleifer, W.B. Whitman. – Berlin: Springer, 2009. – 1989p.
13. Biodegradation of Polyhydroxyalkanoate Films in Natural Environments / A.N. Boyandin, V.P. Rudnev, V.N. Ivonin, S.V. Prudnikova, K.I. Korobikhina, M.L. Filipenko, T.G. Volova, A.J. Sinskey // Macromol. Symp. – 2012. – №320. – P. 38-42.
14. Biodegradability of plastics / Tokiwa Y., Calabia B. P., Ugwu C. U., Aiba S. // International Journal of Molecular Sciences. – 2009. – №10. – P. 3722-3742.
15. Cell growth and accumulation of polyhydroxyalkanoates from CO2 and H2 of a hydrogen-oxidizing bacterium, Cupriavidus eutrophus B-10646 / Volova T.G., Kiselev E.G., Shishatskaya E.I., Zhila N.O., Boyandin A.N., Syrvacheva D.A., Vinogradova O.N., Kalacheva G.S., Vasiliev A.D., Peterson I.V. – Bioresource Technology, 2013. – P. 215-222.
16. Holt J. G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology/ J.G. Holt, N.R Krage. – Williams and Wilkins, 1984. – 2648p.
17. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils / A.N. Boyandin, S.V. Prudnikova, V.A. Karpov, V.N. Ivonin,, N.L. Filichev, A.L. Levin, M.L. Filipenko, T.G. Volova // International Biodeterioration and Biodegradation . – 2013. – №83. – P. 77-84.

18. Scott G. Degradable polymers. Principles and applications / G Scott. – Nederlands: Kluwer Academic. Publ., 2002. – 293p.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Рост бактерий-деструкторов ПЗГБ/ЗГВ на скошенном агаре (РПА)

Рост бактерий-деструкторов ПЗГБ/ЗГГ на скошенном агаре (РПА)

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Фенотипические свойства ключевых бактерий-деструкторов, доминирующих в почвенных микроэкосистемах

Признаки	3HH-1	3HH-2	3HH-3	3HH-4	3HH-5	3HH-6	3HH-7	3HH-8	3HV-1	3HV-2	3HV-3	3HV-4	3HV-5	3HV-6	3HV-9
Морфология	п	п	п	п	м	п	п	п	п	п	м	п	п	п	п
Окраска по Граму	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
Подвижность	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Образование спор	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-		-	-
Пигмент	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-
Каталаза	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Оксидаза	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Лецитиназа	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
Липаза	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
Амилаза	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
Протеаза	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
Образование кислоты из: глюкозы	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
лактозы	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
мальтозы	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-
сахарозы	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
маннита	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
п – палочки, м – мицелий															