

Б 16/10

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой


 Волова Т.Г.

«27» июня 2016 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

Направление 06.03.01 - Биология

**Разнообразие микроорганизмов-деструкторов  
поли-3-гидроксibuтирата в почвах Центральной Эвенкии**

Руководитель  д-р биол. наук Прудникова С. В.

Выпускник  Клищенко Н. В.

Красноярск 2016

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>3</b>
<b>Глава 1. Обзор литературы .....</b>	<b>5</b>
1.1 <i>Негативные последствия накопления в биосфере синтетических полимерных материалов .....</i>	5
1.2 <i>Характеристика ПГА: синтез, свойства, распространение.....</i>	6
1.3 <i>Закономерности биодеградациии ПГА.....</i>	8
1.4 <i>Биодегградация полигидроксиалканоатов и выявление микроорганизмов-деструкторов.....</i>	10
<b>Глава 2. Объекты и методы исследования .....</b>	<b>14</b>
2.1 <i>Характеристика района исследования .....</i>	14
2.2 <i>Схема эксперимента.....</i>	15
2.3 <i>Методы микробиологического анализа.....</i>	16
<b>Глава 3. Результаты исследования.....</b>	<b>20</b>
3.1 <i>Дегградация образцов полимеров в почве Центральной Эвенкии .....</i>	20
3.2 <i>Определение общей численности микроорганизмов на поверхности образцов .....</i>	20
3.3 <i>Идентификация бактерий-деструкторов ПГБ.....</i>	21
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>23</b>
<b>Список использованной литературы.....</b>	<b>24</b>

## **ВВЕДЕНИЕ**

Развитие науки и техники приводит к все более широкому внедрению в практику целевых продуктов, синтезируемых микроорганизмами. Ценным продуктом биотехнологии являются микробные полигидроксиалканоаты (ПГА), полимеры гидроксипроизводных жирных кислот, которые обладают спектром полезных свойств, включая биосовместимость и биоразрушаемость. ПГА перспективны в качестве материала и изделий биомедицинского назначения, разрушаемой упаковки пищи и напитков, предметов гигиены и санитарии, изделий и препаратов для коммунального и сельского хозяйства. Наблюдаемое сегодня наращивание объемов выпуска и расширение сфер применения ПГА делают необходимым изучение способности окружающей среды к самоочищению от этого вида биологической продукции. Разрушаемость ПГА зависит от многих факторов: химический состав и структура полимера, численность и метаболическая активность микроорганизмов как главного агента их биodeградации, климатогеографические условия окружающей среды [1].

Скорость разрушения изделий из ПГА зависит от температуры и наличия сообщества первичных деструкторов, таксономический состав которых может отличаться в зависимости от региона. Центральная Эвенкия – регион, в котором продолжительность вегетационного периода незначительна, а колебания температур достигают от  $-60^{\circ}\text{C}$  до  $+39^{\circ}\text{C}$ . В таких условиях деструкция органического вещества в почве протекает со значительно меньшими скоростями, чем в средних широтах.

В связи с этим целью настоящей работы было исследование микробиологической деградации полимерных пленок из поли-3-гидроксибутирата (ПЗГБ) в почвах Центральной Эвенкии.

Были поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительный анализ почвенной деградации образцов из ПЗГБ и других наиболее часто используемых биоразрушаемых полимеров: целлюлозы и полиэтилена с деградирующими добавками.
2. Определить численность микроорганизмов на поверхности образцов изделий из ПЗГБ и других биоразрушаемых полимеров, экспонированных в почве.
3. Выделить микроорганизмы-деструкторы ПЗГБ с поверхности полимерных образцов и провести их идентификацию.

## **Глава 1. Обзор литературы**

### *1.1 Негативные последствия накопления в биосфере синтетических полимерных материалов*

Сегодня области применения пластмасс широки и включают практически все сферы человеческой деятельности. Самым крупным направлением переработки пластмасс является производство тары и упаковки. Удельный вес этого сегмента в объеме потребления пластмасс составляет около 60% от объемов выпуска; до 40% «упаковочного» пластика расходуется для затаривания продуктов питания и розлива напитков. Основная часть изделий из синтетических пластиков скапливается на свалках [1].

Под полигоны и свалки твердых бытовых отходов, в которых доля синтетических материалов уже приближается к 60-70%, ежегодно отчуждается до 10 тыс. га земель, в том числе и плодородных, изымаемых из сельскохозяйственного оборота. Полиэтиленовый мусор захламляет территории городов, выводит из строя канализационные и дренажные системы. По данным GreenPeace, ежегодно в воды Мирового океана попадает до 10% объемов выпускаемых пластиков [1].

Океан является конечным пунктом концентрации отходов. В нем образовались «острова», преимущественно состоящие из полиэтиленового пластикового мусора. На данный момент известно пять больших скоплений мусорных пятен – по два в Тихом и Атлантическом океанах, и одно в Индийском океане. Один из них достиг размеров Америки, и его масса за последние 40 лет возросла в 100 раз. По мере увеличения степени загрязнения Мирового океана, возрастает опасность не только снижения разнообразия живых организмов, но также нельзя будет употреблять продукты моря в пищу [2].

Для утилизации гигантских отходов синтетических пластиков, можно выделить ряд главных направлений: сжигание, пиролиз, рециклизация и переработка. Однако, как сжигание, так и пиролиз кардинально не улучшают

экологическую обстановку, тем более сжигание является дорогостоящим процессом, приводящих к образованию высокотоксичных соединений. Захоронение пластмассовых отходов является перекладыванием сегодняшних проблем на плечи будущего поколения. Повторная переработка также, в определенной степени требует значительных трудовых и энергетических затрат. Необходимость проведения мероприятий для рециклизации пластмассовых отходов, в ряде стран закреплена юридически. Связано это с тем что, захоронение и сжигание не решают проблемы рецикла многомиллионных синтетических отходов, и их аккумуляция в биосфере приводит к глобальной экологической катастрофе. Нельзя не отметить, что сбор и повторная переработка полимерной тары и упаковки приводят к ее удорожанию, а качество снижается. Выход из этого глобального экологического «тупика» - в постепенном переходе на новые типы материалов, безопасные для природы и человека [3, 4].

### *1.2 Характеристика ПГА: синтез, свойства, распространение*

Полигидроксиалканоаты являются резервными макромолекулами клетки и синтезируются прокариотами в специфических условиях несбалансированного роста, когда синтез основных соединений ограничен, но при избытке углерода в среде. Список микроорганизмов, способных аккумулировать ПГА, широк и включает природные и генетически модифицированные штаммы. Условия, обеспечивающие изменение направления конструктивного обмена клеток в сторону синтеза и аккумуляции ПГА, определяются окислительно-восстановительным состоянием цитоплазмы, внутриклеточной концентрацией ацетил-СоА. При несбалансированном росте, например, при отсутствии одного из конструктивных элементов в среде или при дефиците кислорода ацетил-СоА не включается в цикл трикарбоновых кислот; уровень свободного СоА при этом низок. Это является благоприятным условием для активизации ферментов синтеза ПЗГБ [1].

Полигидроксиалканоаты (ПГА) являются запасными веществами в клетках бактерий. Они аккумулируются внутриклеточно в форме включений (гранул) и их масса может составлять до 90% от сухого веса клетки [1].

Накапливается полигидроксибутират в клетках в виде гранул, которые образованы плотно упакованными тяжами, ограниченными фосфолипидными оболочками с включенными в них белками. По физическим свойствам ПГБ близок к полипропилену. Однако чистый ПГБ характеризуется очень низким растяжением на разрыв, а также более высокой температурой стеклования, чем полипропилен. Как и все полигидроксиалканоаты он устойчив к воздействию УФ излучения, но малоустойчив к растворителям, кислотам и щелочам. ПГБ нерастворим в воде и относительно устойчив к гидролитическому разложению, это отличает полигидроксибутират, как и прочие ПГА, от других биоразрушаемых пластиков, используемых в настоящее время. ПГБ подвергается растворению хлороформом и другими хлорпроизводными углеводородов [1, 31].

У полигидроксибутирата, аналогично многим полимерным материалам, температура, при которой происходит его деформация, ниже температуры кипения (температурной деградации), поэтому газовое состояние в полимерах не реализуется и основным видом фазового равновесия в них является конденсированное состояние – кристаллическое, стеклообразное, вязко-текучее и жидкое [1].

Субстратом для синтеза ПГБ могут служить сахара, спирты, ацетат, водород, органические кислоты. В настоящее время, с развитием технологий и увеличением объема наших знаний, появилась возможность получать полигидроксибутират и его сополимеры, используя широкий спектр исходных веществ, в том числе из промышленных отходов [1].

Из ПГА возможно получение гибких пленок различной толщины, в том числе полупроницаемых мембран, нитей, нетканых материалов, различных полых форм (бутылки, контейнеры, коробки и пр.), а также гелей и клеев. Совокупность свойств, характерных для ПГА, делает их перспективными для

применения в различных сферах – медицине, фармакологии, пищевой и косметической промышленности, сельском и коммунальном хозяйстве, радиоэлектронике и других сферах. ПГА активно исследуются с целью переработки в США, Скандинавии и Германии и Голландии. Большой интерес к биodeградируемым ПГА в настоящее время сформировался в США [1].

Безусловные перспективы и широкий рынок изделий из ПГА наметился в косметологии – это получаемые экструзией различной формы флаконы, банки, бутылки, контейнеры и коробки. Первой бутылкой из ПГА для шампуня стала использовать компания «WellaAG» в Германии [1].

Отдельные типы ПГА образуют прочные гелии и латексы, поэтому на их основе возможно изготовление клеев, наполнителей, в том числе для стабилизации красителей. Ламинаты ПГА с бумагой и другими полимерами хорошо зарекомендовала себя для изготовления мешков и пакетов для хранения разрушаемого мусора, а также одноразовой посуды. Помимо упаковочной тары, контейнеров для пищи и одноразовой посуды, ПГА используют также в качестве пищевых добавок, например, заменителя сливок, средств доставки ароматизаторов и отдушек [1, 32].

Таким образом, ПГА, которые были обнаружены сравнительно недавно и активно исследуются с середины 80-х-начала 90-х годов прошлого столетия, в настоящее время – одни из самых многообещающих биоматериалов 21 века [1].

### *1.3 Закономерности биodeградации ПГА*

Расширение масштабов производства и сфер применения делают необходимым изучение последствий применения ПГА, прежде всего, процессов их биоразрушения в окружающей среде. Большинство исследований по разрушению ПГА выполнено в лабораторных условиях, при этом значительная их часть посвящена изучению механизма взаимодействия надмолекулярной структуры ПГА с ПГА-деполимеризующими ферментами,



структуре и молекулярной организации ПГА-деполимераз разных типов, а также описанию микроорганизмов, обладающих внеклеточными ПГА-деполимеразами [1].

ПГА в биологических средах разрушаются в результате внутриклеточной деградации при участии эндополимераз. Полагают, что внутриклеточные деполимеразы не гидролизуют полукристаллические полимеры, выделенные из биомассы, а внеклеточные деполимеразы не обладают субстратной специфичностью по отношению к внутриклеточному полимеру, ассоциированному в гранулах внутри клеток. Это связано с тем, что внутриклеточный и выделенный из клетки ПГА находятся в двух различных состояниях. Во внутриклеточных гранулах высокомолекулярный полимер находится в подвижном аморфном состоянии; при этом поверхностный слой гранулы состоит из протеинов и фосфолипидов [1].

Полигидроксиалканоаты могут разрушаться под воздействием высоких температур (свыше 300°C), в результате кислотного и щелочного гидролиза, а также биологическим путем [1].

При термальном разложении происходит случайное разделение полимера. Под влиянием кислот или щелочей полигидроксиалканоаты разлагаются, как обычные эфиры. В разбавленных растворах процесс химического гидролиза полигидроксиалканоатов протекает крайне медленно, но увеличивается при высоких температурах. Биологическая деградация ПГА происходит гидролитически под воздействием специфических ферментов – деполимераз, продуцируемых микроорганизмами, а также ферментами крови и тканей высших животных [5, 33].

В естественных условиях ПГА разрушаются до конечных продуктов – диоксида углерода и воды в аэробных условиях, метана в анаэробных, причем процесс происходит довольно быстро. ПГА главным образом разрушаются за счет деятельности микроорганизмов [6].

Разрушение полиоксибутирата и сополимера ПГБ/ПГВ (с 10 мол.% гидроксивалерата) изучено при различной температуре (от 15 до 40°C) в

почве. Скорость деградации полимера варьировала от 0,03% до 0,64 % в сутки в зависимости от типа почвы, химического состава полимера и температуры. В основном, с увеличением температуры скорость деструкции возрастала. При исследовании биodeградации ПГБ в почвенном компосте при температуре 24 и 46°C наилучшие показатели деградации зафиксированы при 46°C [6].

Области применения ПГА в связи с его уникальными свойствами различны. ПГА с успехом может быть применен в качестве матрицы для получения лекарственных форм пролонгированного действия. На основе ПГА существует возможность создания макромолекулярных терапевтических систем – матриц, резервуарных мембран и микросфер для контролируемой доставки лекарственных веществ в организм широкого спектра применения (диабетические средства, антагонисты наркотиков, антиалкогольные средства и противоопухолевые препараты) [1].

В число применений ПГА входят биоразлагаемые упаковочные материалы и формованные товары, нетканые материалы, одноразовые салфетки и предметы личной гигиены, пленки и волокна, связывающие вещества и покрытия, связующие материалы для металлических и керамических порошков, водоотталкивающие покрытия для бумаги и картона [6, 35].

Таким образом, ограниченность натуральных исследований пока не дает возможности прийти к единому мнению относительно закономерностей биodeградации определенного типа полимера в конкретной биологической среде [1].

#### *1.4 Биodeградация полигидроксиалканоатов и выявление микроорганизмов-деструкторов*

Способность ПГА к разложению в биологических средах до безвредных продуктов является одним из главных преимуществ, отличающий этот класс соединений от небiorазрушаемых пластиков. ПГА

подвергаются биодеструкции как в экосистемах (в почве, водной среде), так и внутри организма. Скорость процесса может сильно варьировать, однако можно выделить несколько основных факторов, влияющих на биологическую деструкцию ПГА и их сополимеров:

- стереоконфигурация полимера (только эфирные соединения мономеров R-конфигурации гидролизуются микробными деполимеразами);
- степень кристалличности полимера (скорость деградации более кристаллических образцов ниже);
- молекулярная масса полимера (чем ниже молекулярная масса ПГА, тем быстрее происходит разложение);
- состав полимеров [10, 11].

Наиболее изучаемым аспектом биодegradации ПГА является способность микроорганизмов использовать данные полимеры в качестве субстратов для роста [34]. Поверхностный слой постепенно разрушается при выделении гранул или под действием других физических и химических факторов. Структуру и состав слоя изучают биохимически, с помощью молекулярной биологии и электронной микроскопии. Когда поверхностный слой гранул разрушен в течение процесса выделения, полимер агрегируется. Кристаллизованные ПГА не связываются с внутриклеточными ПГА-мобилизованными системами [12, 35].

В литературе изучена динамика разрушения сополимеров гидроксibuтирата и гидроксивалерата, с различной величиной включения последнего и установлено, что сополимерные образцы разрушаются быстрее [14].

Важным вопросом, решение которого необходимо для понимания закономерностей и механизма биоразрушения ПГА, является выявление и идентификация микроорганизмов-деструкторов этих полимеров. Среди деструкторов ПГА описаны представители бактерий разных родов: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Rhodococcus*, *Rhodocyclus*, *Syntrophomonas*, *Ilyobacter*, *Terrabacter*, *Terracoccus*, *Brevibacillus*,

*Agrobacterium*, *Duganella*, *Ralstonia*, *Gracilibacillus*, *Enterobacter*, *Matsuebacter*, *Rhodoferax*, *Variovorax* и *Acinetobacter*, *Azospirillum*, *Mycobacterium*, *Streptomyces* и др. [18, 28,30].

При описании и идентификации бактерий изучают их культуральные свойства – характерные особенности бактерий на плотных и жидких питательных средах. Морфологическая характеристика и организация клеток бактерий включают такие признаки, как форма и размеры клеток, их подвижность, наличие жгутиков и тип жгутикования, способность к спорообразованию. Полезным может оказаться также выявление в клетках характерных мембранных систем, присущих отдельным группам бактерий, а также включений. Первостепенное значение для систематики бактерий придается окраске клеток по Граму и строению их клеточных стенок. Изучение физиолого-биохимических свойств, включает установление способа питания и типа энергетического метаболизма исследуемых культур. Важно определить такие признаки, как отношение бактерий к молекулярному кислороду, температуре, рН среды, солености, освещенности и другим факторам среды. В данную группу признаков входит также перечень субстратов, утилизируемых в качестве источников углерода, азота и серы, потребность в витаминах и других факторах роста, образование характерных продуктов метаболизма, наличие некоторых ферментов [19].

Наиболее активными деструкторами ПГА признаны грибы, включая *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Deuteromycetes*, *Zygomycetes*, *Mixomycetes*, *Penicillium*, *Fusarium* [19]. Более высокий деградиционный потенциал грибов связывают с большей подвижностью грибных ПГА-деполимераз по сравнению с ПГА-деполимерами, экскретируемыми бактериями [19].

Авторы более ранних работ показали, что в изучаемых условиях в почве преобладают деструкторы короткоцепочечных ПГА, тогда как численность микроорганизмов, расщепляющих среднецепочечные ПГА невелика, от 0,8 до 18 % от обнаруженных деструкторов [20, 26, 30].

Следует отметить, что при выявлении деструкторов ПГА, анализируют среды (почва, компост, вода), в которых экспонировали образцы полимеров, и микроорганизмы, выделенные из пленок обрастания на поверхности полимеров, высевали их на стандартные микробиологические среды. При этом среди анализируемых микроорганизмов могут присутствовать организмы-комменсалы, утилизирующие мономеры и другие продукты разрушения высокомолекулярных ПГА, которые появляются в среде благодаря жизнедеятельности первичных и истинных ПГА-деструкторов. Для выделения истинных деструкторов ПГА необходимо использовать метод прозрачных зон, который предусматривает высеив проб на минеральный агар, содержащий в качестве единственного источника углерода ПГА. Рост на такой среде микроорганизмов, обладающих ПГА-деполимеразной активностью, сопровождается образованием вокруг колоний на поверхности агаризованной среды характерных прозрачных зон как результат разрушения полимера [21, 27].

## **Глава 2. Объекты и методы исследования**

Объектами исследования в настоящей работе являлись микроорганизмы почвы субарктической зоны (Центральная Эвенкия, п. Тура). Изучали таксономическое разнообразие выделенных штаммов микроорганизмов и их способность к образованию деполимераз, гидролизующих поли-3-гидроксibuтират и, следовательно, к участию в биодegradации этого полимера в окружающей среде.

### *2.1 Характеристика района исследования*

Эксперимент проводили на базе Эвенкийского стационара Института леса имени В.Н. Сукачева Сибирского отделения РАН. Стационар расположен в Эвенкийском районе Красноярского края, п. Тура. Географические координаты: 64°18' с.ш.; 100°11' в.д. (рис. 1)

Земельный участок, занятый стационаром, равен 0,8571 га и находится на территории муниципального образования п. Тура (северная часть); исследуемая территория в пределах доступности на мотолодках охватывает значительную часть бывшего Илимпейского района Эвенкийского автономного округа с распространением лесных и лесотундровых биогеоценозов [7].

Эвенкия занимает центральную часть Среднесибирского плоскогорья. Климат резко континентальный. Почвы Эвенкии характеризуются наличием вечной мерзлоты, которая к концу мая залегает на глубине 10-15 см от поверхности, низким содержанием гумуса и питательных элементов [7].

Почвенный покров представлен палео-подбурами (верхние склоны плато), криоземами гомогенными (склоны), палевыми гранулоземами, криоземами тиксотропными (террасовые поверхности). По теплообеспеченности почвы района относятся к мерзлотным сезонно-талым или очень холодным. Наблюдается незначительное оттаивание верхних горизонтов (максимум до 1 м) и низкие положительные температуры в верхних

горизонтах. По своим трофическим свойствам почвы региона относятся к кислым, их обменная рН колеблется от 4,2 до 5,6. При этом лучше прогреваемые почвы имеют более кислую среду. Отмечается низкая обеспеченность почв минеральными элементами. Количество доступных форм азота и фосфора в них почти на порядок ниже, чем в длительно-сезонно-промерзающих почвах средней и южной тайги Средней Сибири [36].



Рисунок 1 – Картографическая схема, п. Тура

## 2.2 Схема эксперимента

В ходе эксперимента изучали деструкцию образцов биоразлагаемого микробного полимера – ПЗГБ в субарктических климатических условиях. Для сравнения использовали два других типа разрушаемых полимеров: традиционный материал – целлюлозу (упаковка из бумаги крафт с логотипом М-Видео, одноразовая тарелка из картона), а также образцы полиэтилена (ПЭ) с деградирующими добавками – пакет с логотипом «Орифлейм» и пакет из супермаркета, произведенный в Италии, на которых были отметки «биоразлагаемые» (рис. 2). Из образцов исследуемых материалов вырезали диски диаметром 30 мм, высушивали до постоянного веса и взвешивали на аналитических весах «Adventurer»™ OH-AR2140 (США)



Рисунок 2 – Образцы деградируемых пленок в чехле до экспозиции

Образцы помещали в чехлы из мельничного газа и закапывали в почву на глубине 5-7 см на Северном и Южном склонах территории Эвенкийского стационара. Эксперимент длился с июня 2014 по август 2015 года.

### *2.3 Методы микробиологического анализа*

Микробиологический анализ почвы проводили стандартными методами. Определение общей численности бактерий проводили на рыбопептонном агаре (РПА), грибов – на агаре Сабуро. Производили посев почвенных суспензий смывов с поверхности образцов на чашки Петри из разведений  $10^2$ - $10^4$  в четырех повторностях.

Изучение фенотипических признаков микроорганизмов-деструкторов проводили стандартными микробиологическими методами [17, 37]. При идентификации бактериальных изолятов проводили сравнительный анализ их морфологических, культуральных, биохимических свойств [38, 39, 40]. Определяли морфологию вегетативных клеток, спорообразование, подвижность, каталазную, оксидазную, амилазную, липазную, лецитиназную и протеиназную активность, образование кислоты из глюкозы, лактозы, сахарозы, мальтозы и маннита. Принадлежность изучаемых культур к группе грамположительных или грамотрицательных бактерий определяли экспресс-методом Грезерсона.



При изучении физико-химических свойств культур, определяли их способность продуцировать каталазу. С помощью бактериологической петли клетки культур перенесли на предметное стекло. Поместили одну каплю 3% раствора пероксида водорода на материал на предметном стекле. Положительная реакция проявлялась быстрым появлением пузырьков газа. При отрицательной реакции в течение 20 секунд выделение газа не происходило.

Для выявления амилалитической активности использовали среду следующего состава (г/л): пептон – 10.0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 5.0; растворимый крахмал - 2.0; агар – 15.0; рН среды 6,8 – 7.0. Среду стерилизовали при температуре 121 °С 30 минут и разлили в стерильные чашки Петри. Исследуемые микроорганизмы высевали штрихом, культивировали 3-7 суток, при температуре 30°С. Гидролиз крахмала обнаруживали после обработки агаровой поверхности раствором Люголя (рис. 3).

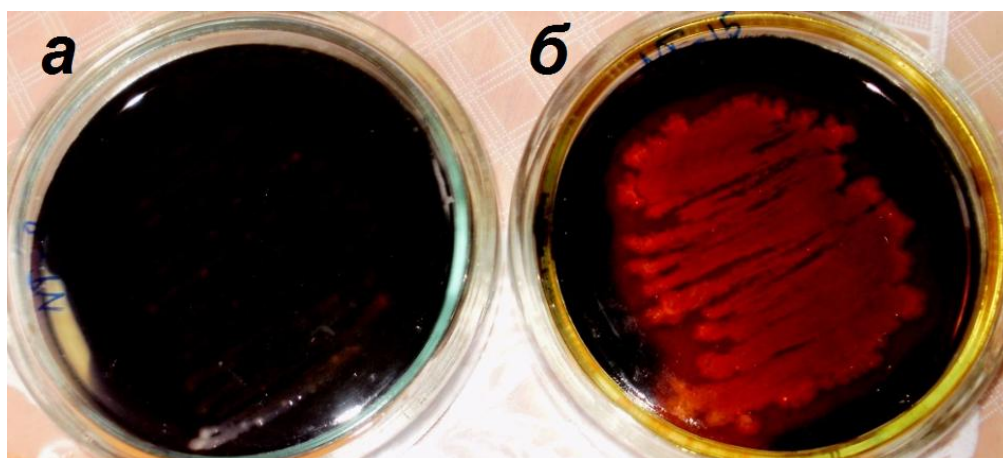


Рисунок 3 – Амилазная активность: *a* – отрицательная, *б* – положительная

Также изучали протеолитическую активность у микроорганизмов. Для этого культуры высевали на мясопептонную желатину (МПЖ). К 100 мл мясопептонного бульона (МПБ) добавили 15 г желатины, нагревали на водяной бане до полного растворения желатины и разливали в пробирки. Стерилизовали при температуре 121 °С 15 минут. Посев проводили уколом.

Продолжительность культивирования составила 2 суток при комнатной температуре. Разжижение желатины отмечали визуально.

Определение биодеструктивной способности бактерий изучали на среде следующего состава (г/л): ПЗГБ – 5,0;  $\text{NaNO}_3$  - 2,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{KCl}$ ,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,01; Пептон – 0,1; Дрожжевой экстракт - 0,1; Агар – 20,0. Среда содержала в качестве источника углерода 0,25% порошкообразного полимера (ПЗГБ).

Рост микроорганизмов, обладающих ПГА-деполимеразной активностью, сопровождался образованием вокруг колоний на поверхности агаризованной среды характерных прозрачных зон (рис. 4).

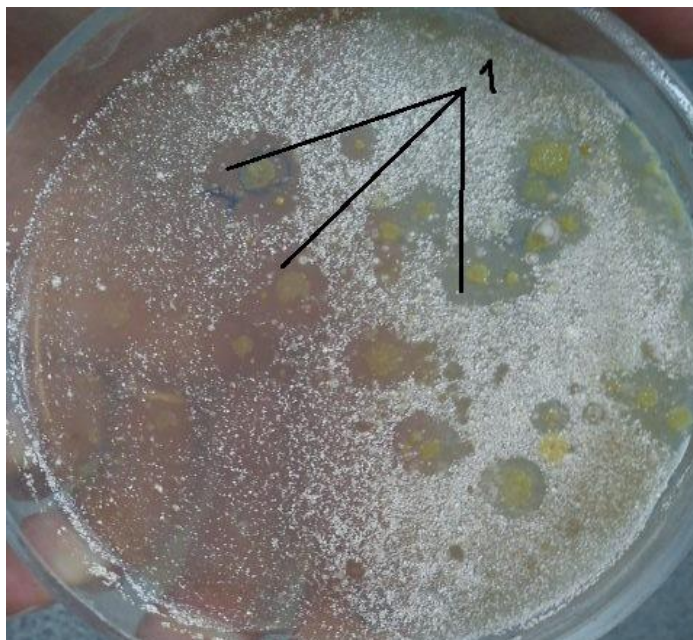


Рисунок 4 – Рост бактерий на среде с ПЗГБ; 1 – деполимеразная активность

Для выявления липазной и лецитиназной активности использовали желточно-солевую среду следующего состава: к 100 мл расплавленного и охлажденного до 60-70 °С стерильного МПА (рН 7,2), содержащего 10 г  $\text{NaCl}$ , 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 °С. Визуально отмечали при лецитиназной активности

помутнение среды под колониями, а при липазной активности радужную пленку вокруг колоний.

Оксидазную активность выделенных изолятов бактерий определяли с помощью тест-полосок окситест (MIKRO-LA-TEST) (рис. 5).

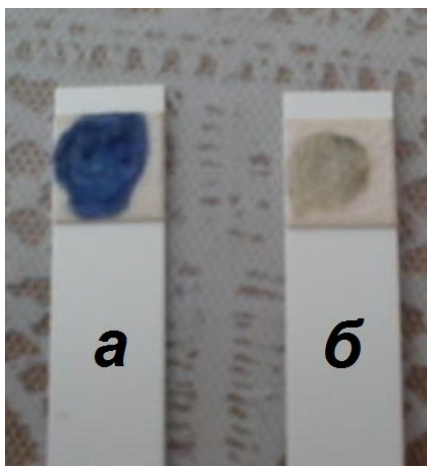


Рисунок 5 – Оксидазная активность:

*a* – отрицательная;

*б* – положительная

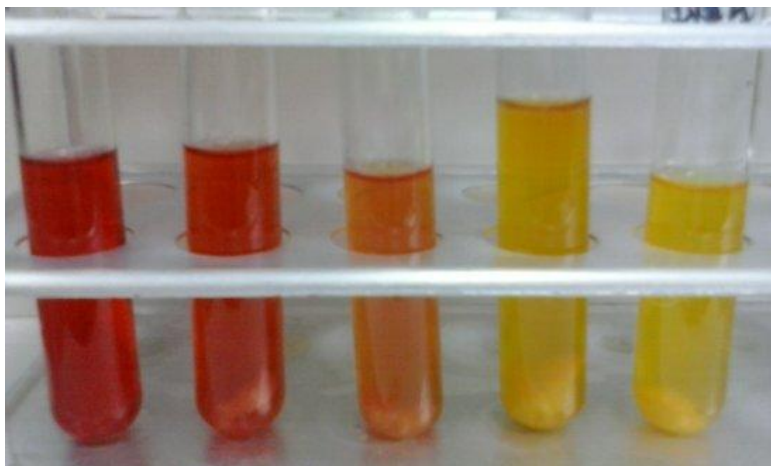


Рисунок 6 – Рост бактерий на средах Гисса

Способность исследуемых культур ферментировать углеводы изучали на универсальных средах Гисса с различными углеводами (глюкоза, сахароза, лактоза, мальтоза, манит). Среду готовили следующим образом – 15 г препарата размешивали в 1 л дистиллированной воды, кипятили до полного растворения. Разливали в стерильные пробирки. Засев проводили уколом, культивировали в течение 3 дней. Визуально отмечали образование газа и кислоты (рис. 6).

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 Деградация образцов полимеров в почве Центральной Эвенкии*

Пять видов полимерных образцов были экспонированы в почве в течение 15 месяцев на северном и южном склонах на территории Эвенкийского стационара Института леса имени В.Н. Сукачева СО РАН. После экспозиции для большинства образцов видимых повреждений обнаружено не было.

Исследование показало, что наибольшей деградации были подвержены образцы, выполненные из целлюлозы (крафт-бумага и картон). На южном склоне степень разрушения была более выражена, чем на северном, что связано с большей прогреваемостью почвы. Образцы из ПЗГБ и полиэтилена внешне не изменились.

[Изъято 2 страницы]

### *3.2 Определение общей численности микроорганизмов на поверхности образцов*

В ранее проведенных исследованиях на территории дендрария Института леса СО РАН г. Красноярска было показано, что скорость разрушения образцов полимеров зависела от численности бактерий, гидротермических условий в почве и видового состава деструкторов [1]. По результатам нашей работы выявлено, что на северном склоне численность микроорганизмов была выше на образцах из ПЗГБ и целлюлозы, максимальная – на ПЗГБ. На образцах из полиэтилена численность бактерий была минимальной.

[Изъято 3 абзаца]

На южном склоне самая высокая численность микроорганизмов была зарегистрирована на образцах полиэтилена с деградирующими добавками. На поверхности образцов из ПЗГБ и биodeградируемого полиэтилена (пакет Орифлейм) численность бактерий была низкая. На южном склоне вследствие

лучшей прогреваемости температура почвы была выше, чем на северном, что стимулировало развитие микроорганизмов. Так, в летний период максимальная температура на южном склоне достигала 9-11 °С, тогда как на северном – 5,6-6 °С. Однако, почва на южном склоне была более сухая, чем на северном. Поэтому на численность микроорганизмов, помимо температуры оказывали влияние такие факторы, как влажность и характер поверхности полимера. ПЗГБ – гидрофобный материал, поэтому в сухой почве адгезия микроорганизмов на его поверхности была затруднена. Полиэтилен биodeградируемого пакета Орифлейм, в отличие от второго образца полиэтилена, имел гладкую поверхность, что также ослабляло адгезию бактерий на поверхности. Влагоудерживающая способность образцов целлюлозы и их шероховатая поверхность создавали благоприятные условия для закрепления микроорганизмов на поверхности и их деструктивной активности.

Анализ микромицетов показал, что на южном склоне их численность была выше на всех образцах, следовательно, температура почвы оказывала существенное влияние на развитие микромицетов.

[Изъято 2 абзаца]

На образцах из ПЗГБ и картона численность грибов на разных склонах достоверно не различалась.

### *3.3 Идентификация бактерий-деструкторов ПЗБ*

В работе изучали таксономическое разнообразие бактерий-деструкторов ПЗБ, выделенных с поверхности пленок. С северного и южного склонов всего было выделено и исследовано 28 изолятов первичных деструкторов, обладающих деполимеразной активностью в отношении ПЗБ. Бактерии идентифицировали по совокупности их физиолого-биохимических, цитоморфологических и молекулярно-генетических признаков. Фенотипические признаки бактерий представлены в таблице 1.

[Изъято 5 страниц]

Сравнительный анализ последовательностей генов 16S рРНК выявил близкородственные виды с уровнем гомологии 99-100% (табл. 2). Большинство представителей относились к граммотрицательным палочкам. Идентифицированные виды по литературным данным [1] ранее уже определялись как деструкторы ПГА, но в субарктических почвах подобные исследования не проводились.

[Изъято 2 страницы]

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

По результатам работы были сделаны следующие выводы:

- 1) За 15 месяцев экспозиции биотазлагаемых полимеров в субарктических почвах Центральной Эвенкии заметному разрушению подверглись только образцы из целлюлозы.
- 2) Максимальная численность бактерий на поверхности образцов, экспонированных на южном склоне, была зарегистрирована для полиэтилена с деградирующими добавками (пакет из супермаркета) и целлюлозы; на северном склоне – для ПЗГБ. Численность микроорганизмов зависела от гидротермического режима почвы и свойств поверхности полимера.
- 3) В почвах Центральной Эвенкии выявлено и идентифицировано 28 штаммов бактерий первичных деструкторов ПЗГБ.

## Список использованной литературы

1. Прудникова С.В., Волова Т.Г. Экологическая роль полигидроксиалканоатов – аналога синтетических пластмасс: закономерности биоразрушения в природной среде и взаимодействия с микроорганизмами – Красноярск 2012.
2. Зайцев Ю.П. Введение в экологию Черного моря. – Одесса: «Эвен», 2006. – 224 с.
3. Потапов А.Г., Пармон В.Н. Биоразлагаемые полимеры – вперед в будущее // Экология и промышленность. – 2010. - №5. – С. 4-8.
4. Фомин В.А., Гузеев В.В. Биоразлагаемые полимеры, состояние и перспективы использования // Пластические массы. – 2001. - №2. – С. 42-46.
5. Cheng M.-L. Change of structure and free volume properties of semi-crystalline poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) during thermal treatments by positron annihilation lifetime// Polymer. – 2009.
6. Dawes, E.A. Novel biodegradable microbial polymers. Kluwer Academic, Dordrecht. – Netherlands, P.1990. – 287.
7. Словари и энциклопедии на академике. Эвенкийский округ: статья.
8. Официальный сайт Эвенкийского стационара ИЛ СО РАН. URL: <http://forest.akadem.ru/State/EVE.html>
9. Волова Т.Г., Беляева О.Г., Калачева Г.С. Исследование разрушаемости микробных полимеров //Сибирский экологический журнал – 1997, № 5 – С. 505-510.
10. Do Young Kim, Hyung Woo Kim, Moon Gyu Chung, Young Ha Rhee. Biosynthesis, modification and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates // The Journal of Microbiology. – 2007. – Vol.4, No.2. – P. 87-97.



11. Grassie, N., Murray E.J. The thermal degradation of poly(-D-)- $\beta$ -hydroxybutyric acid: part I – Identification and quantitative analysis of products // *Polym Degrad. and Stability*. – 1984. – V.6. – P.47-61.
12. Волова Т.Г., Калачева Г.С. Полиоксибутират – термопластичный биodeградируемый полимер (получение, свойства, применение). – Красноярск, 1990. – 47 с.
13. Cheng M.-L. Change of structure and free volume properties of semi-crystalline poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) during thermal treatments by positron annihilation lifetime// *Polymer*. – 2009.
14. Lee J.-C. Higher-order structural analysis of bacterial poly[*D*-3-hydroxybutyrate-co-*L*-3-hydroxyhexanate] highly oriented films// *Polymer*. – 2008.
15. Волова Т.Г., Беляева О.Г., Калачева Г.С. Исследование разрушаемости микробных полимеров // *Сибирский экологический журнал* – 1997, № 5 – С. 505-510.
16. Волова Т.Г., Калачева Г.С. Полиоксибутират – термопластичный биodeградируемый полимер (получение, свойства, применение). – Красноярск, 1990. – 47 с.
17. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. - М.: изд-во МГУ, 1990. 303 с.
18. Волова Т.Г., Бояндин А.Н., Васильев А.Д. [и др.]. Биodeградация поли-гидроксиалконатов(ПГА) в Восточном море и идентификация ПГА-деградирующих бактерий// *Микробиология*. – 2011. – Т.80, №2. – С.266-274
19. Мокеева В.Л., Чекунова Л.Н., Мышкина В.Л. [и др.] Биодеструкция поли- $\beta$ -гидроксибутирата микроскопическими грибами: испытание грибостойкости и фунгицидных свойств полимера// *Микология и фитопатология*. – 2002. – Т.36, вып.5. – С.59-63.
20. Suayama T., Tokiwa Y., Ouichanpagdee P. [et al.]. Phylogenetic affiliation of soil bacteria that degrade aliphatic polyesters available commercially as biodegradable plastics// *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – Vol.64, No.12. – P.5008-5011.

21. Волова Т.Г., Беляева О.Г., Калачева Г.С. Исследование разрушаемости микробных полимеров //Сибирский экологический журнал – 1997, № 5
22. Кузнецов А. Е., Градова Н. Б. Научные основы экобиотехнологии. – М.: Мир, 2006. – С. 504.
23. Могилевская И. В., Владимцева И. В. Современные проблемы загрязнения окружающей среды. Углекислородокисляющие микроорганизмы для биологической очистки сточных вод и загрязненных почв //Технические науки. – 2005. – С. 67-68
24. Мирчинк Т.Г. Почвенная микология. М.:Изд.-во МГУ, 1988. 220 с.
25. Успехи микробиологии. / Под редакцией А.А. Имшеницкого. – М.: «Наука», 1968б. – Т. 15. –225 с.
26. Никитина Е. В., Решетник О. А. Методы общей и специальной микробиологии. – 2007. – С.64.
27. Хенч Л., Джонс Д. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / под ред. А.А.Лушниковой. – М.: Техносфера. – Серия «Мир биологии и медицины», 2007. – 304 с.
28. Штильман М.И. Полимеры медико-биологического назначения. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006.-399 с.
29. Asrar J. and Gruys K. J. Biodegradable Polymer (Biopol®) // Series of Biopolymers in 10 vol. / A. Steinbuchel Ed. – Wiley-VCY Verlag GmbH. – 2002. – Vol. 4. – P. 55-86.
30. Pandey J.K., Reddy K.R., Kumar A.P., Singh R.P. An overview on the degradability of polymer nanocomposites. // Polymer Degradation and Stability. – 2005. – V.88. – P.234-250.
31. Bahri Z., Taverdet J.L. Elaboration and characterization of microparticles loaded by pesticide model// Powder Technology. – 2006. – Vol. 172. – P. 31-41.

32. Kasuya K.I. [et al.] Biochemical and molecular characterization of the polyhydroxybutyrate depolymerase of *Comamonas acidovorans* YM1609, isolated from freshwater//. *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – Vol.63, No.12. – P.4844-4852.
33. Bonartsev A.P., Zaikov G.E., Krylova L.P [et al.]. Biodegradation and medical application of microbial poly(3-hydroxybutyrate)// *Biotechnology, Biodegradation Water and Foodstuffs.* – Nova Science Publishers, Inc., 2009. – P.1-35.
34. Braunegg, G., Lefebvre G., Genzer K.F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects (Review article). - *of Biotechnol*,1998.-N 65.- P.127-161.
35. Brandl, H.J., Knee E. Ability of phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) potential sources for biodegradable polyesters. – *Int. J.Biol. Macromol.* – Vol 11. - Feb. - 1989. – P. 49-56.
36. Масягина О.В. Эмиссия CO<sub>2</sub> напочвенным покровом и почвой листовничников криолитозоны Средней Сибири: дисс. ... канд. биол. наук : 03.00.16/ Масягина Оксана Викторовна. Красноярск, 2003
37. Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М. (2005). Практикум по микробиологии /Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Академия.
38. Определитель бактерий Берджи = *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*/ Под ред. Д. Холт и др. Москва: Мир, 1997.
39. Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Vol. 2. Berlin: Springer, 2005.
40. De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H., Whitman W.B. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Vol. 3. Berlin: Springer, 2009.