

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОЧВЕННЫХ БАКТЕРИЙ – БИОДЕСТРУКТОРОВ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ

**Коробихина К.И.**

**Научный руководитель – к. б. н, доцент Прудникова С.В.**

*Сибирский федеральный университет*

Широкое использование синтетических полимеров в жизни и деятельности человека, наряду с несомненными преимуществами, привело и к определенным негативным последствиям, наиболее очевидным из которых является загрязнение окружающей среды использованными полимерными изделиями. Масштабы ущерба причиняемого окружающей среде высоки, это связано, прежде всего, с крайне медленными скоростями естественного разложения синтетических полимеров, что приводит к накоплению их в различных природных средах. Одним из способов преодоления данной проблемы является использование полимерных материалов, способных к химической или биологической деградации до нетоксичных минеральных веществ в окружающей среде.

Перспективными полимерами данного типа являются полигидроксиалканоаты (ПГА). Это группа полиэфиров, синтезируемых многими бактериями в качестве источника внутриклеточного углерода и запасаемого источника энергии. Важной особенностью этих полимеров является их высокая биосовместимость и способность к биодegradации. В окружающей среде они гидролизуются до мономеров, а затем разлагаются до воды и углекислого газа. Биологическая деградация ПГА осуществляется под воздействием ферментов-деполимераз, продуцируемых микроорганизмами, которые используют растворимые продукты расщепления полимеров в качестве субстрата для роста. Среди эффективных деструкторов ПГА – разнообразные бактерии, относящиеся к широко распространенным почвенным и водным представителям (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Streptomyces*, *Hyobacter*).

С ростом перспектив применения ПГА все большую актуальность приобретает исследование закономерностей разрушаемости ПГА в естественных природных условиях. Тем более что результаты по биоразрушаемости ПГА в лабораторных условиях с использованием чистых микробных культур, выделенных из природных источников, а также под воздействием деполимеризующих ферментов, не позволяют предвидеть картину разрушения данного биопластика в природной среде, в многокомпонентных и разнообразных естественных экосистемах.

Целью настоящей работы являлось исследование микроорганизмов, осуществляющих биодеструкцию ПГА в почве (территория дендрария Института леса СО РАН). Для изучения процессов биодеструкции ПГА в почве, образцы полимера в виде пленочных дисков в нейлоновых сетчатых контейнерах, размещали в почве на глубине 5 см в прикорневой зоне лиственницы (*Larix sibirica* L.) и березы (*Betula pendula* L.).

Эксперимент проведен в течение полевого сезона 2010 года в период с 7 июня по 7 сентября. Выявление микроорганизмов-деструкторов ПГА проводили в два этапа через 30 суток и 90 суток экспонирования. Для этого из биопленки, сформированной на поверхности полимера, методом соскоба были взяты микробиологические пробы,

которые высевали на специализированную питательную среду. Среда содержала в качестве источника углерода 0,25% порошкообразного полимера (ПГБ). Рост микроорганизмов, обладающих деполимеразной активностью, сопровождался образованием вокруг колоний на поверхности агаризованной среды характерных прозрачных зон.

Из анализируемых групп микроорганизмов были выделены доминирующие бактерии, способные к гидролизу полимера. В результате скрининга было проверено более 40 изолятов бактерий и выделено по 10 изолятов из прикорневой зоны лиственницы и березы, обладающих гидролитической активностью в отношении полимера. На основании сходных морфотипов были отобраны 14 штаммов, способных к биодеструкции ПГА, которые в последующем были идентифицированы по совокупности морфологических, культуральных, биохимических и молекулярно-генетических признаков.

Культуры штаммов SB3 и SB5 на агаризованной среде формировали гладкие колонии желтого цвета. Грамотрицательные, подвижные палочки. Спор не образовывали. Оксидазоположительные и каталазоположительные. Амилазу не продуцировали. Обладали протеолитической активностью. Испытывали потребность в факторах роста. Глюкозу, мальтозу, маннит ферментировали с образованием кислоты, а также усваивали лактозу и сахарозу. По совокупности признаков штаммы SB3 и SB5 были отнесены к роду *Variovorax* (рис.1).

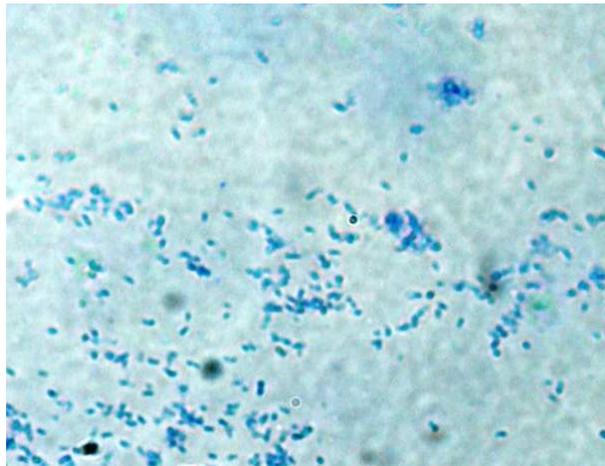


Рисунок 1 – Морфология бактерий рода *Variovorax*

Культуры штаммов SB6 и SB8 в нативных препаратах представляли собой прямые палочки. Подвижные, грамотрицательные. Неспорообразующие. Каталазоположительные и оксидазоположительные. Обладали амилолитической и протеолитической активностью. Аэробные микроорганизмы. Испытывали потребность в факторах роста. Ферментировали с образованием кислоты глюкозу и сахарозу, а также усваивали лактозу, мальтозу и маннит. По совокупности признаков штаммы SB6 и SB8 были отнесены к роду *Pseudomonas* (рис.2).



Рисунок 2 – Морфология бактерий рода *Pseudomonas*

Бактерии штаммов SL12 на агаризованной среде формировали гладкие маслянистые колонии желтого цвета. В нативных препаратах были представлены бесспорные прямые подвижные палочки, преимущественно одиночные. Грамотрицательные. Каталазоположительные, оксидазоотрицательные. Нитрат не восстанавливали. Обладали слабой амилитической и протеолитической активностью. Испытывали потребность в факторах роста. Глюкозу, сахарозу и маннит ферментировали с образованием кислоты, а также усваивали такие углеводы как мальтоза и лактоза. По совокупности признаков штаммы *SL12* были отнесены к роду *Xanthomonas*.

Бактерии штаммов SL8 и SL11 отличались способностью к образованию эндоспор. На агаризованной среде формировали гладкие матовые колонии. В нативных препаратах были представлены прямые палочки, подвижные. Грамположительные. Бактерии штаммов SL8 и SL11 проявляли сходство и по другим признакам: каталазо- и оксидазоположительные, активно продуцировали амилазу и протеазу. Нитратредуктазу не образовывали. Потребность в факторах роста испытывали. Глюкозу, сахарозу, лактозу, мальтозу ферментировали с образованием кислоты, а также усваивали маннит. По совокупности признаков штаммы *SL8* и *SL11* были отнесены к роду *Bacillus* (рис.3).

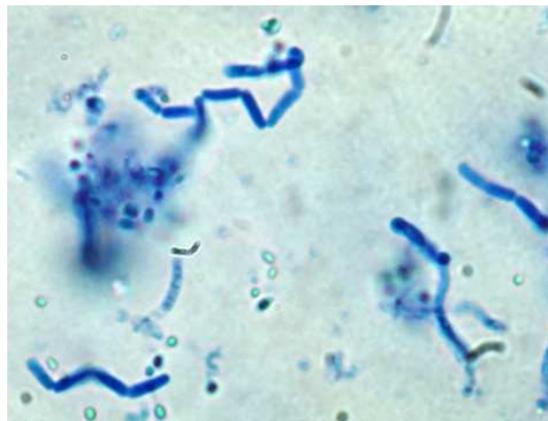


Рисунок 3 – Морфология бактерий рода *Bacillus*

На агаризованной среде культуры штаммов SB14, SL6 и SL13 формировали гладкие колонии светло – желтого цвета. Грамотрицательные неподвижные палочки.

Неспорообразующие. Каталазоположительные, оксидазоотрицательные. Аэробы. Амилазу не продуцировали. Обладали протеолитической активностью. Ферментировали с образованием кислоты глюкозу и сахарозу, а также усваивали мальтозу, лактозу и маннит. В дополнительных факторах роста не нуждались. По совокупности признаков штаммы *SB14*, *SL6* и *SL13* были отнесены к роду *Acinetobacter* (рис.4).

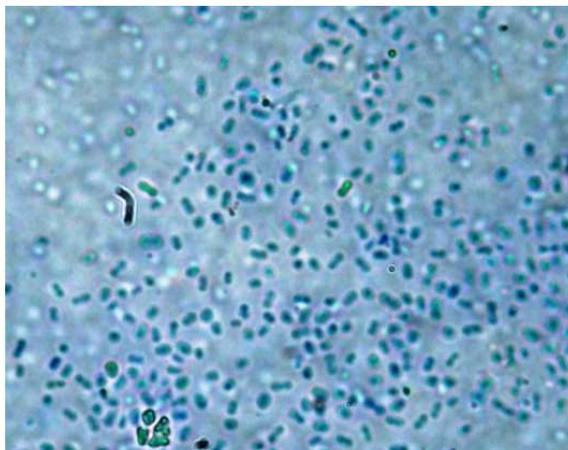


Рисунок 4 – Морфология бактерий рода *Acinetobacter*

Бактерии штаммов *SB4*, *SB7*, *SB9* и *SL14* в нативных препаратах представляли собой неподвижные палочки, грамотрицательные. Спор не образовывали. Культуры данных штаммов проявляли сходство и по биохимическим признакам: каталазоположительные, оксидазоотрицательные. Обладали амилолитической и протеолитической активностью. Испытывали потребность в факторах роста. Глюкозу, мальтозу, сахарозу ферментировали с образованием кислоты, также усваивали лактозу и маннит. По совокупности признаков штаммы *SB4*, *SB7*, *SB9* и *SL14* были отнесены к роду *Stenotrophomonas* (рис.5).

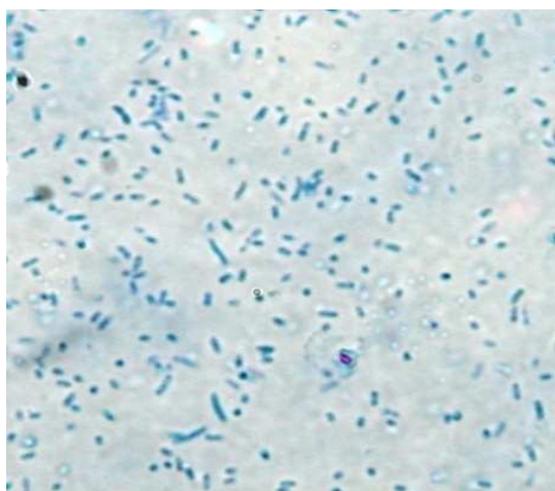


Рисунок 5 – Морфология бактерий рода *Stenotrophomonas*

Таким образом, в наших исследованиях были выделены бактерии деструкторы полигидроксиалканоатов относящиеся к родам *Stenotrophomonas*, *Variovorax*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Xanthomonas*.