

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМЕРДЕСТРУКТИВНЫХ СВОЙСТВ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

¹ А.С. Шелковникова, ^{1,2} Е.В. Сордонова, ^{1,2} Г.П. Ламажапова

¹Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, г. Улан-Удэ, Россия

²Бурятский государственный университет имени Д. Банзарова, г. Улан-Удэ, Россия

Почвенные микроорганизмы эволюционно направлены на приспособление к изменяющимся условиям окружающей среды. Появление новых нетипичных химических соединений, в основном «продуктов цивилизации», требуют от деструкторов приспосабливаться к их переработке, усиливать ферментные системы, способных к разрыву сложных химических связей, их окислению или восстановлению до простых биоразлагаемых соединений. Данное свойство почвенных бактерий, в настоящее время широко используется в создании препаратов для утилизации или переработки промышленных и бытовых отходов: получение микробных и ферментных препаратов.

Изучение механизмов деградации синтетических полимеров затруднено из-за их низкой скорости протекания процессов биокоррозии. Время жизни этих полимеров в природных условиях составляет десятки и сотни лет. Поэтому даже начальные результаты биокоррозии можно обнаружить только после длительного воздействия микроорганизмов, измеряемого неделями или месяцами.

Фактический процесс биodeградации пластика можно разделить на 4 этапа:

1) Биodeградация заключается в изменении свойств полимера, она изменяет свойства полимеров и способствует дальнейшей деградации;

2) Биофрагментация, приводящая к гидролизу и деградации углеродных цепей полимера и высвобождению промежуточных продуктов деградации;

3) Биоассимиляция, при которой метаболиты небольших углеводородных фрагментов метаболизируются клетками и включаются в микробную биомассу;

4) Минерализация: пластик полностью преобразуется в углекислый газ и воду [1].

Существует ряд методов, позволяющих надежно документировать изменения, происходящие в полимерах на каждом этапе. Первоначальная информация об изменениях, происходящих на пластиковых поверхностях, может быть получена с помощью различных видов микроскопии. Другие методы также могут быть использованы для изучения изменений в структуре пластмасс. Некоторые методы, например проверка образцов пластика, инкубированных в присутствии микробных культур, на изменение его механических свойств (прочность на разрыв, удлинение при разрыве модуль упругости и предел текучести).

Биоассимиляция пластика определяется по увеличению выхода биомассы клеток в культуре, растущей в присутствии пластика, например, по определению количества образовавшегося клеточного белка в сравнении с контролем.

Несмотря на трудоемкость исследований и сложность получения достоверных результатов, в последние два десятилетия появилось большое количество экспериментальных работ, демонстрирующих микробную деградацию пластиков, появилось большое количество экспериментальных работ. Биodeградация полиэтилена микроорганизмами была описана в ряде работ, опубликованных за последние 30 лет, и сейчас является одной из основных тем исследований в области разложения пластиков [2–5], общепризнанным является тот факт, что процесс биodeградации в нормальных условиях протекает чрезвычайно медленно. Ученые выяснили, что ПЭ, имеющий простую линейную структуру, чрезвычайно устойчив к биоразложению. Низкая скорость биоразложения ПЭ связана также с высокой гидрофобностью (в состав молекул входят только –CH₂-группы) и высокой молекулярной массой (более 30 кДа), что препятствует его транспорту непосредственно в клетки [6]. В случае, когда ПЭ был единственным источником энергии для микроорганизмов, фрагменты меньшего размера использовались быстрее, чем более крупные [7]. Для достижения значимой степени биоразложения за разумный период времени средняя молекулярная масса полиэтилена должна быть ниже 5000 Да [8].

Объектами исследований явились почвенные микроорганизмы, полученные в результате смывов с полиэтиленовых пленок, изъятых из почвы, засоренной полимерами.

Наиболее распространённый полимер для бытовых нужд – полиэтилен. В зависимости от метода получения производят несколько типов полиэтилена: низкой плотности (ПЭНП), полиэтилен высокой плотности (ПЭВП), сверхвысокомолекулярный полиэтилен (СВМПЭ). ПЭНП отличается сильно разветвленными цепями со степенью полимеризации ~50000, плотностью 910–935 кг/м³ и степенью кристалличности 50–60 %. ПЭВП представляет собой плотный полимер, молекулы которого линейны и степень полимеризации составляет до 300000, с плотностью 930–970 кг/м³ и степенью кристалличности 70–85 % [9].

Мы рассмотрели механизмы и методы детекции биокоррозии на примере полиэтилена высокой плотности, толщиной 25 мкм (ГОСТ 16377–77) и 200 мкм (ГОСТ 10354–82).

Полиэтилены как низкой (ПЭНП), так и высокой плотности (ПЭВП) широко используются и востребованы практически на всех промышленных, сельскохозяйственных или бытовых рынках, главным образом, для упаковки товаров.

Для оценки биокоррозии нами были использованы следующие физико-химические методы: измерение потери веса, анализ пределов прочности при растяжении и изменение гидрофобности.

Чистые культуры выводили методом последовательного разведения, с последующим пересевом на чашки Петри в среду МПА. Посев проводили поверхностным методом, распределяя посевной материал по стерильной среде стерильным стеклянным шпателем.

Культивирование для максимального обрастания микробной пленкой проводили в жидкой среде МПБ с внесением кусочков полиэтилена размером 20 на 30 мм с взвешенной массой точностью до 0,00001 г. на аналитических весах. Культивирование проводилось в термостате при 30 °C в течение 30 суток. У образца номер 4 изменений в массе полиэтиленовой пленки толщиной 25 мкм не произошло, данные не анализировались.

В данном эксперименте удалось выделить 6 чистых культур и 4 смешанные, неразделяемые культуры.

Анализ выделенных культур показал наличие колоний характерных почвенных микроорганизмов: палочки разных форм, кокки, грибы и т. д. Основные характеристики выделенных колоний микроорганизмов представлены в таблицах 1, 2.

Таблица 1 – Основные морфологические признаки почвенных микроорганизмов на твердых питательных средах (разведение 10⁵)

Характеристика	Номер культивируемой колонии									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Размер, мм	30	20	5–6	6–7	4	2–4	20	3–5	20	4–5
Цвет	с/б	с/б	ж	с/б	с/б	с/б	с/б	с/б	с/б	с/б
Форма колоний	круглая	бесформенная								
Поверхность	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Структура	однородная									
Консистенция	не тягучая, не вязкая					тягучая, вязкая	не тягучая, не вязкая			

Примечание: с/б-светло-бежевый, ж-желтый, S-круглые с гладкой поверхностью колонии

Неразделенные смешанные колонии микроорганизмов при дальнейших разведениях не образовали чистых изолированных колоний, исходя из этого мы выбрали 5 чистых изолированных культур. Характеристика морфологических признаков представлена в таблице 2.

Образцы номер 2 и 5 показали наименьшее изменение массы пленок за 30 суток инкубирования толщиной 200 мкм. На основании полученных данных нами были отобраны образцы под номерами 3, 8, 10.

Исследование влияния микроорганизмов на поверхность полиэтиленовых пленок полностью погруженных в культуральную жидкость с монокультурами № 3, 8, 10 проводили в течение 60 суток, и с взятием образцов через 30 суток. Пленки 25 и 200 мкм размерами 20×30 и 20×20 мм взвешивали на аналитических весах с точностью до 0,00001. По прошествии 30 и 60 суток образцы стерильно достали из культуральных сред, обработали 96 %-м этиловым спиртом, высушивали и обрабатывали раствором бихромата калия в серной кислоте. Обработка бихроматом калия в серной кислоте позволила очистить полиэтилен от микробного обрастания. Подсушенные полиэтиленовые пленки повторно взвешивали.

Таблица 2 – Характеристика микроорганизмов, образовавших изолированные колонии при инкубации на МПА 24 ч, 30 °С

Характеристики микроорганизмов	Номер изолированной колонии				
	2	3	5	8	10
Рост	Ровный по штриху	Ровный по штриху	Разрозненный	Ровный по штриху	Равномерный по штриху
Цвет	с/б	ж	с/б	с/б	с/б
Форма микроорганизмов	Закругленные палочки	Палочки	Вытянутые палочки	Палочки дуплеты	Удлиненные палочки
Окраска по Граму	+	–	+	+	–

Примечание: с/б-светло-бежевый, ж-желтый

Нами обнаружено достоверное снижение массы исследуемых пленок под воздействием культур под номерами 3, 8, 10. Для всех образцов тестируемых полимеров характерно обрастание микробной пленкой поверхности полимера. Микробная биопленка глубоко проникает в полимер, что затрудняет его отделение даже при использовании 5 %-ного раствора бихромата калия в серной кислоте.

Следует отметить, что сама по себе потеря веса полимера не может служить надежным критерием его биodeградации, поскольку состав пластиков, очень гетерогенен, и часть компонентов может теряться при воздействии факторов внешней среды независимо от присутствия микроорганизмов. Поэтому данный показатель должен обязательно дополняться другими методами тестирования, при этом тестируется степень деградации полимера, а также активность ферментной системы микроорганизма. Для оценки роста микробной массы монокультур 3, 8, 10 нами было проведено инкубирование на солесодержащей синтетической среде с кусочками полиэтилена и вазелина в качестве единственных источников углерода. Инкубирование исследуемых культур микроорганизмов на жидкой синтетической среде, где в качестве единственного источника углерода были кусочки полиэтилена показали накопление биомассы монокультур (3, 8, 10) с измельченными кусочками полиэтилена в качестве единственного источника углерода. Наибольшее увеличение оптической плотности наблюдалось у культур микроорганизмов образцов № 8 и 10.

Исследовано наличие каталазной, липолитической, протеолитической активностей, способность к выделению сероводорода, аммиака у монокультур 3, 8 и 10. При этом фосформинерализующие свойства для них не характерны. На основании изученности морфофункциональных характеристик выделенных монокультур бактерий по определителю Берджи данные микроорганизмы предположительно можно отнести к роду *Proteus*.

В результате проведенного исследования, можно сделать вывод о том, что при культивировании монокультур почвенных микроорганизмов на поверхности полиэтиленовых пленок происходят процессы деструкции полимеров, разрыхляющие и меняющие физические свойства полиэтилена.

Литература

1. Плакунов В.К., Ганнесен А.В., Мартянов С.В., Журина М.В. Биокоррозия синтетических пластмасс: механизмы деградации и способы защиты // Микробиология. – 2020. – Т. 89. – С. 631.
2. Ammala A. et al. An overview of degradable and biodegradable polyolefins // Prog. Polym. Sci. – 2011. – V. 36. – P. 1015–1049.
3. Harrison J.P., Boardman C., O'Callaghan K., Delort A.M., Song J. Biodegradability standards for carrier bags and plastic films in aquatic environments: A critical review // R. Soc. Open Sci. 2018. V. 5. Art. 171792.
4. Sen S., Raut S. Microbial degradation of low density polyethylene (LDPE): A review // J. Environ. Chem. Eng. 2015. V. 3. P. 462–473.
5. Shah A.A., Hasan F., Hameed A., Ahmed S. Biological degradation of plastics: a comprehensive review // Biotechnol. Adv. 2008. V. 26. P. 246–265.
6. Sivan A., Szanto M., Pavlov V. Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium *Rhodococcus ruber* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 72. P. 346–352.
7. Kawai F., Watanabe M., Shibata M., Yokoyama S., Sudate Y., Hayashi S. Comparative study on biodegradability of polyethylene wax by bacteria and fungi // Polym. Degrad. Stab. 2004. V. 86. P. 105–114.
8. Reddy M.M., Deighton M., Gupta R.K., Bhattacharya S.N., Parthasarathy R. Biodegradation of oxo-biodegradable polyethylene // J. Appl. Polym. Sci. 2009. V. 111. P. 1426–1432.
9. Галыгин В.Е., Баронин Г.С., Таров В.П., Завражин Д.О. Современные технологии получения и переработки полимерных и композиционных материалов. – Тамбов: Изд-во ФГБОУ ВПО "ТГТУ", 2012. – 180 с.