

УДК: 575.4

## БИОДЕГРАДАЦИЯ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ ПОЧВЕННЫМИ МИКРОБИОЦЕНОЗАМИ РАЗЛИЧНОЙ СТРУКТУРЫ И ВЫЯВЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ

© 2012 г. А. Н. Бояндин\*, С. В. Прудникова\*\*, М. Л. Филипенко\*\*\*, Е. А. Храпов\*\*\*, А. Д. Васильев\*\*\*\*, Т. Г. Волова\*

\*Институт биофизики СО РАН, Красноярск, 660036

\*\*Сибирский федеральный университет, Красноярск, 660041

\*\*\*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 630090

\*\*\*\*Институт физики им. Л.В. Киренского СО РАН, Красноярск, 660036

e-mail: ab@ibp.krasn.ru

Поступила в редакцию 7.04.2011 г.

Исследовано биоразрушение микробных линейных полимеров гидроксипроизводных алкановых кислот (полигидроксиалканоатов, ПГА) почвенными микробиоценозами различной структуры в течение двух полевых сезонов, отличающихся погодными условиями. Показано, что на этот процесс оказывают влияние химический состав полимера, температура, влажность и микробная составляющая почвы. В процессе разрушения ПГА зафиксировано падение молекулярной массы полимеров, повышение степени кристалличности, свидетельствующее о преимущественном разрушении аморфной фазы по сравнению с кристаллической. Численность истинных деструкторов ПГА, развивающихся на поверхности полимерных образцов, ниже численности сопутствующих бактерий. В качестве доминантных деструкторов ПГА в исследованных условиях определены бактерии родов *Variovorax*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* и *Xanthomonas* и микромицеты — *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Verticillium* и *Zygosporium*.

Масштабы выпуска и применения неразрушаемых в природной среде синтетических полимеров достигли 200 млн тонн в год, что становится глобальной экологической проблемой. Биоразрушаемые полиэферы гидроксисалканоовых кислот (полигидроксиалканоаты, ПГА), синтезируемые микроорганизмами, наряду с полилактоидами — реальные кандидаты для постепенной замены синтетических пластмасс. В настоящее время во многих странах функционируют пилотные и малотоннажные производства ПГА, выпускающие полимер под марками Biopol™, Nodax™, DegraPol/btc®, Mirel® [1, 2]. В связи со снижением стоимости применение ПГА все более ориентируют на изготовление разрушаемой тары и упаковки, одноразовой посуды и бытовых изделий. С ростом объемов производства и расширением областей применения ПГА актуальность приобретает исследование закономерностей процесса их разрушения в различных природных условиях.

Важным природным резервуаром для деструкции ПГА является почва. Однако большинство работ, ориентированных на изучение почвенной деструкции ПГА, выполнено в лабораторных условиях [3–10], тогда как полевые исследования немногочисленны. В одном из первых исследований биодегградации ПГА в природных условиях

[11] отмечалось, что кольцо для гольфа, изготовленный из полимера, практически полностью разрушился и почве за четыре недели; к сожалению, в этой работе не были указаны ни точный состав ПГА, ни характеристики почвы. Известно, что тип почвы влияет на процесс разрушения ПГА. Так, в мангровой и лесной почвах скорость их дегградации различается в несколько раз [12–14]. Показано влияние численности почвенных микроорганизмов на течение процесса дегградации поли-3-гидроксипутирата в садовой почве [15]. Однако работы, раскрывающие закономерности разрушения ПГА в почвах разных типов, различающихся микробной составляющей, крайне мало.

Микроорганизмы, разрушающие полимер 3-гидроксимасляной кислоты (поли-3-гидроксипутират) — первый и наиболее изученный представитель семейства полимеров этого класса, были выделены более 40 лет назад [16]. Впоследствии были идентифицированы и охарактеризованы микроорганизмы, разрушающие полимеры с различной длиной углеродной цепи мономеров [4, 17–19]. Однако вопрос о том, какие ПГА разрушаются активнее и в каких условиях среды, дискутируется до настоящего времени.

Цель работы — выделение микроорганизмов-деструкторов ПГА и исследование дегградации по-

лимеров различной химической структуры почвенными микроорганизмами в прикорневой зоне хвойных и лиственных деревьев при изменении температурного режима среды.

### МЕТОДИКА

**Характеристика ПГА.** Исследованы образцы ПГА двух типов. Один из них – гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты (поли-3-гидроксibuтират, ПГБ) со степенью кристалличности (СК) 61%, средневесовой молекулярной массой ( $M_v$ )  $710 \pm 1.5\%$  кДа. Другой – сополимер 3-гидроксимасляной и 3-гидроксивалериановой кислот (поли-3-гидроксibuтират-3-гидроксивалерат, ПГБВ) с включением 3-гидроксивалерата 10 мол. %, СК – 50%;  $M_v$  –  $799 \pm 3.1\%$  (в эксперименте 2007 г.) и  $680 \pm 1.1\%$  кДа (2010 г.). Образцы полимеров синтезированы в культуре *Wautersia eutropha* B5786. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов [20–21].

Были взяты образцы ПГБ и ПГБВ в виде пленочных дисков, полученных поливом растворов ПГА в хлороформе на полированную поверхность с последующим испарением растворителя (диаметр 30 мм, толщина 0.1 мм, масса  $73 \pm 5$  мг). Химическую структуру ПГА анализировали после метанолиза проб полимера на хромато-масс-спектрометре 5975 Inert (“Agilent”, США).

**Биодеградация ПГА.** Изучение проводили на территории дендрария Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (г. Красноярск). Предварительно взвешенные стерильные образцы ПГА размещали в чехлах из мелкоячеистой синтетической ткани (мельничного газа) на глубине 5 см в прикорневой зоне лиственницы сибирской (*Larix sibirica* L.) и березы повислой (*Betula pendula* L.). Почва дендрария дерново-карбонатного типа состоит из гумусового горизонта мощностью от 10–15 до 30–40 см и подстилающей его карбонатной породы.

Исследования проведены в течение двух полевых сезонов, различающихся температурным режимом. Первый сезон охватывал период с 2 июля по 19 октября 2007 г.; второй – с 7 июня по 7 сентября 2010 г. Второму сезону предшествовала суровая зима, при средней зимней температуре воздуха  $-22.1^\circ\text{C}$  (для половины января и части февраля характерны температуры до  $-40^\circ\text{C}$ ), что на  $13.5^\circ\text{C}$  ниже средней температуры воздуха зимнего периода, предшествующего первому сезону ( $-8.6^\circ\text{C}$ ). Для второго сезона отмечено более позднее наступление весеннего потепления; снежный покров сохранялся до конца апреля.

В ходе эксперимента чехлы с полимерными образцами ( $n = 3$  каждого типа) изымали из почвы, образцы извлекали, очищали от остатков почвы с

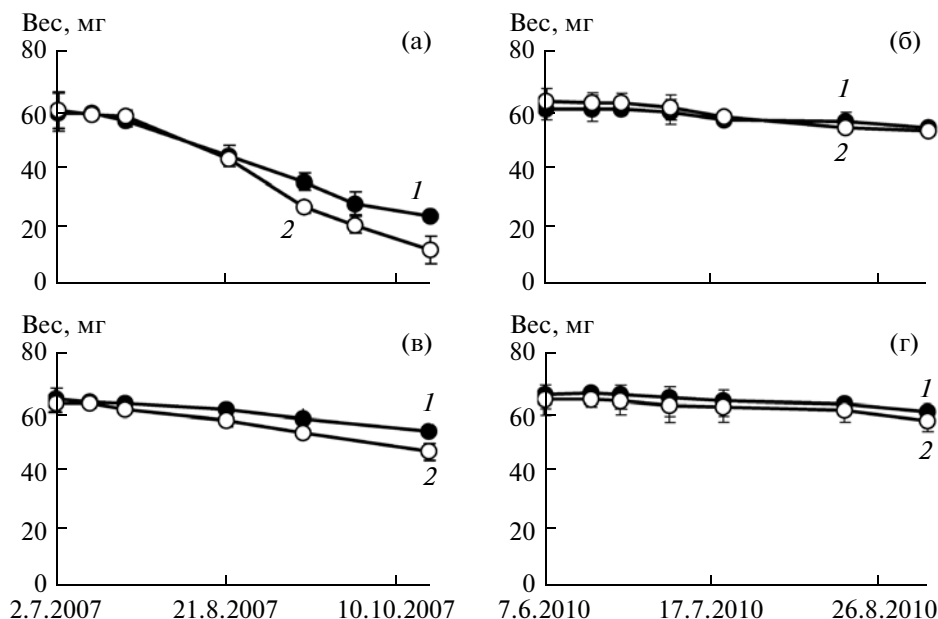
применением механических и ферментативных методов, промывали дистиллированной водой и высушивали при  $40^\circ\text{C}$  в течение 24 ч. Одновременно регистрировали температуру, pH и влажность почвы с использованием стандартных физико-химических методов [22]. Образцы взвешивали на аналитических весах IV класса точности (“Metler”, США). Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение ПГА исследовали с использованием хроматографа для гель-проникающей хроматографии Breeze System (“Waters”, США) относительно полистироловых стандартов (“Fluka”, Швейцария, Германия). Находили средневесовую ( $M_v$ ) и среднечисловую ( $M_n$ ) молекулярную массу, а также полидисперсность ( $ПД = M_v/M_n$ ). Степень кристалличности полимеров (СК, %) определяли на рентгеноспектрометре D8 ADVANCE (“Bruker”, Германия).

**Микробиологические исследования.** Микробиологический анализ почвы проводили в момент размещения образцов и через 3 мес, в последнем случае исследовали контрольные образцы почвы, взятые из прикорневой зоны березы и лиственницы в месте размещения образцов ПГА, и смывы с их поверхности. Ранее было показано, что качественный состав микрофлоры, выделенной с поверхности пленок ПГБ, не отличался от такового с поверхности пленок, изготовленных из сополимера ПГБВ [4, 23], поэтому пробы почвы с поверхности обоих типов ПГА не разделяли.

Для характеристики микробиоценозов почвы использовали общепринятые методы почвенной микробиологии [22]. Общую численность бактерий определяли на рыбопептонном агаре (РПА), численность прототрофов и олиготрофов – на крахмало-аммиачном агаре (КАА) и почвенном агаре (ПА) соответственно. Микромицеты выделяли на сусло-агаре (СА). Посев производили из почвенной суспензии (разведения  $10^4$ – $10^7$ ) в трехкратной повторности. Чашки инкубировали при  $30^\circ\text{C}$  в течение 3–7 сут для учета бактерий и при  $25^\circ\text{C}$  в течение 7–10 сут – для микромицетов. Выделение доминантных микроорганизмов и их идентификацию проводили на основании культуральных, морфологических признаков и стандартных биохимических тестов [24, 25]. За 2 полевых сезона было выделено и проанализировано 400 изолятов.

Почвенные микромицеты идентифицированы по морфологическим признакам (структура и цвет колоний, строение мицелия и органов спороношения), широко используемым для определения систематической принадлежности этих микроорганизмов [26–29].

Для выявления истинных деструкторов ПГА проводили посевы проб, взятых с поверхности полимерных образцов, на диагностическую среду, со-



**Рис. 1.** Динамика уменьшения массы (мг) образцов полимера в почве прикорневой зоне лиственницы (а, б) и березы (в, г): а, в – 2007 г.; б, г – 2010 г.; 1 – ПГБ; 2 – ПГБВ.

держашую в качестве единственного источника углерода 0.25% порошкообразного ПГБ [30]. Рост микроорганизмов, обладающих ПГА-деполимерной активностью, сопровождался образованием вокруг колоний характерных прозрачных зон. Бактериальные деструкторы, помимо общепринятых морфолого- и биохимических исследований, были отобраны для идентификации секвенированием последовательностей гена 16S рРНК.

**Анализ ДНК.** ДНК выделяли с использованием набора реактивов AquaPure Genomic DNA Isolation (“Bio-Rad”, США). Ген 16S рРНК был амплифицирован с использованием универсальных праймеров 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'), соответствующих позициям 8–27 и 1510–1492 гена *Escherichia coli*. ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе Mastercycler Gradient (“Eppendorf”, Германия), визуализацию и документирование – на трансиллюминаторе Doc Print (“Vilber Lourmat”, Франция). Образцы для определения нуклеотидной последовательности подвергали секвенированию методом Сенгера на генетическом анализаторе ABI PRISM 3100 (“Applied Biosystems”, США).

**Филогенетический анализ.** Определенные секвенированием нуклеотидные последовательности сравнивали с гомологичными последовательностями штаммов из баз данных GenBank, EMBL и DDBJ с помощью программы NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), выравнивая их с использованием программы ClustalX версии 2.08.

Филогенетический анализ выполнен по модели Джукеса и Кантора в пакете программ TREECON версии 1.3b [31].

Найденные нуклеотидные последовательности (16 микроорганизмов – деструкторов ПГА) депонированы в базе данных GenBank (№№ HQ689679 – HQ689694).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика изменения массы полимерных образцов представлена на рис. 1, свидетельствующем, что на процесс разрушения ПГА оказывали влияние химический состав полимера и место размещения образцов в почве.

Для первого полевого сезона отмечалось существенное повышение температуры почвы от 18°C до 28°C в начальный засушливый период (июль 2007 г.), с постепенным падением до 8–10°C к концу исследований (октябрь 2007 г.). Активная реакция почвы была нейтральной или слабо щелочной под лиственницей (рН 7.1–8.1, с кратковременным уменьшением до 6.7 в конце июля) и слабо кислой (рН 6.1–7.1, с аналогичным падением до 4.5) под березой. Влажность почвы с конца июля до конца сентября была выше под лиственницей (18–28%), чем под березой (11–23%). Для полевого сезона 2010 г. характерна температура почвы 14–18°C в первый месяц наблюдения, с постепенным подъемом до 26°C и последующим спадом до 13–18°C к концу наблюдений. Активная реакция поч-

**Таблица 1.** Общая численность бактерий в пробах почвы в прикорневой зоне лиственницы и березы

Образец почвы	Общее микробное число, КОЕ в 1 г почвы	
	2007 г.	2010 г.
<i>L. sibirica</i>		
Прикорневая зона в момент размещения ПГА	$(1.47 \pm 0.08) \times 10^9$	$(3.16 \pm 0.24) \times 10^6$
Прикорневая зона в конце сезона	$(5.11 \pm 0.42) \times 10^9$	$(5.28 \pm 1.76) \times 10^7$
Поверхности ПГА	$(1.60 \pm 0.04) \times 10^{11}$	$(1.35 \pm 0.11) \times 10^8$
<i>B. pendula</i>		
Прикорневая зона в момент размещения ПГА	$(1.33 \pm 0.47) \times 10^8$	$(2.67 \pm 0.16) \times 10^5$
Прикорневая зона в конце сезона	$(2.21 \pm 0.24) \times 10^9$	$(6.77 \pm 4.51) \times 10^7$
Поверхности ПГА	$(1.29 \pm 0.08) \times 10^9$	$(1.96 \pm 0.05) \times 10^8$

вы под березой (рН 6.5–7.2) и лиственницей (рН 7.2–8.0) не проявляла заметных колебаний в течение полевого сезона. Влажность почвы была в целом выше, чем в 2007 г., но также заметно ниже в почве под березой.

Исходный микробиоценоз почвы в местах произрастания деревьев двух исследованных видов имел существенные различия по общей численности (табл. 1) и по видовому составу. Общий титр аэробной микрофлоры в начале июня 2007 г. под лиственницей был выше, чем под березой, и составил  $(1.47 \pm 0.08) \times 10^9$  КОЕ/г почвы. Через 3 мес. общая численность бактерий в почве под лиственницей составила  $(5.11 \pm 0.42) \times 10^9$ ; под березой –  $(2.21 \pm 0.24) \times 10^9$  КОЕ/г почвы соответственно. Численность прототрофов и олиготрофов также была выше в образцах почвы, взятых под лиственницей, в которой коэффициент олиготрофности (ПА/РПА) составил 0.75, что свидетельствовало об активном усвоении и утилизации элементов питания из зоны рассеяния.

Бактериальная компонента микробиоценоза почвы в прикорневой зоне лиственницы была представлена доминантными бактериями *Alcaligenes* (25.0%), *Aureobacterium* (15.9%), *Pseudomonas* (4.5%), *Cellulomonas* (52.3%), *Acinetobacter* (2.3%). Микрофлора почвы под березой представлена более разнообразным микробным сообществом. В качестве доминирующих видов идентифицированы *Pimelobacter* (48.4%), *Actinomyces* (16.1%) и *Micrococcus* (9.7%); в небольшом количестве присутствовали *Flavimonas*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium* и *Arthrobacter*. Из микромицетов в почве под лиственницей идентифицированы *Acremonium* (1.8% от общего количества), *Mucor* (5.5%), *Verticillium* (18.2%) и доминирующий *Penicillium* (74.5%). Под березой, помимо характерных для почвы под

лиственницей представителей *Penicillium* и *Verticillium*, идентифицированы *Cladosporium* (1.7%), *Hyphoderma* (1.7%), *Pytium* (3.3%), *Cephalosporium* (8.3%), *Beltrania* (31.7%); в качестве доминирующих определены два вида – *Beltrania* и *Penicillium*. Общий титр грибов был близким под лиственницей и березой.

В более холодном 2010 г. качественная картина микробиоценозов в целом была аналогичной 2007 г., но общая численность микроорганизмов в исходной почве была ниже (табл. 1). Общий титр аэробной микрофлоры в начале июля 2010 г. под лиственницей и березой составил соответственно  $(3.16 \pm 0.24) \times 10^6$  и  $(2.67 \pm 0.16) \times 10^5$  КОЕ/г. В конце эксперимента общая численность бактерий, по сравнению с данными 2007 г., была ниже на 2 порядка: под лиственницей  $(5.28 \pm 1.76) \times 10^7$  и под березой  $(6.77 \pm 4.51) \times 10^7$  КОЕ/г почвы.

Отличие почвенных показателей в местах произрастания деревьев и характеристик микробиоценозов оказывали влияние на процесс деградации ПГА (рис. 1а). В 2007 г. в более влажной и более населенной микроорганизмами почве под лиственницей разрушение обоих типов ПГА происходило активнее, чем под березой. К концу наблюдения остаточная масса образцов ПГБ составила 45%, сополимера – 22% от исходной; период полураспада – соответственно 83 и 68.5 сут, при средней убыли массы за полевой сезон – 0.325 и 0.44 мг/сут. В почве прикорневой зоны березы, несмотря на большее разнообразие грибов, разрушение ПГА обоих типов было замедленным. За 109 сут остаточная масса ПГБ и ПГБВ составила соответственно 84 и 74% от исходной (рис. 1б) при средней убыли массы гомополимера и сополимера 0.097 и 0.15 мг/сут.

Сополимер разрушался более активно, чем высококристаллический ПГБ. Это согласуется с ре-

**Таблица 2.** Показатели степени кристалличности и молекулярной массы образцов ПГА в процессе биодegradации

Условия	2007 г.						2010 г.					
	СК, %, ПГБ	СК, %, ПГБВ	М <sub>в</sub> , кДа, ПГБ	ПД, ПГБ	М <sub>в</sub> , кДа, ПГБВ	ПД, ПГБВ	М <sub>в</sub> , кДа, ПГБ	ПД, ПГБ	М <sub>в</sub> , кДа, ПГБВ	ПД, ПГБВ		
Исходное значение	61	50	710 ± 1.5%	2.05 ± 2.1%	799 ± 3.1%	1.77 ± 4.4%	710 ± 1.5%	2.05 ± 2.1%	680 ± 1.1%	2.32 ± 0.3%		
90 сут экспонирования под березой	69	54	691 ± 3%	2.22 ± 6.5%	633 ± 5.4%	2.23 ± 8.6%	704 ± 2.3%	2.32 ± 3.2%	628 ± 5.0%	2.35 ± 2.5%		
90 сут экспонирования под лиственницей	65	68	577 ± 4.6%	2.39 ± 4.1%	660 ± 2.6%	2.41 ± 2.6%	692 ± 2.9%	2.25 ± 3.4%	660 ± 2.6%	2.41 ± 2.6%		

зультатами ряда работ, в том числе нашего коллектива, в которых было показано, что сополимерные образцы ПГА разрушаются в биологических средах быстрее гомополимерного ПГБ [4, 6, 19, 32], однако в другой работе [33] зафиксирована большая скорость биодegradации гомогенного ПГБ по сравнению с ПГБВ, что авторы объяснили особенностями структуры и свойствами поверхности образцов.

В 2010 г. разрушение ПГА было менее активным и к концу наблюдения остаточная масса образцов составила для ПГБ и ПГБВ, экспонированных под лиственницей, соответственно 89.9 и 74%, для образцов, размещенных под березой – 91.4 и 89%. Незначительное падение массы полимерных образцов, имевшее место в 2010 г., не позволило достоверно выявить различия в разрушаемости исследованных типов ПГА.

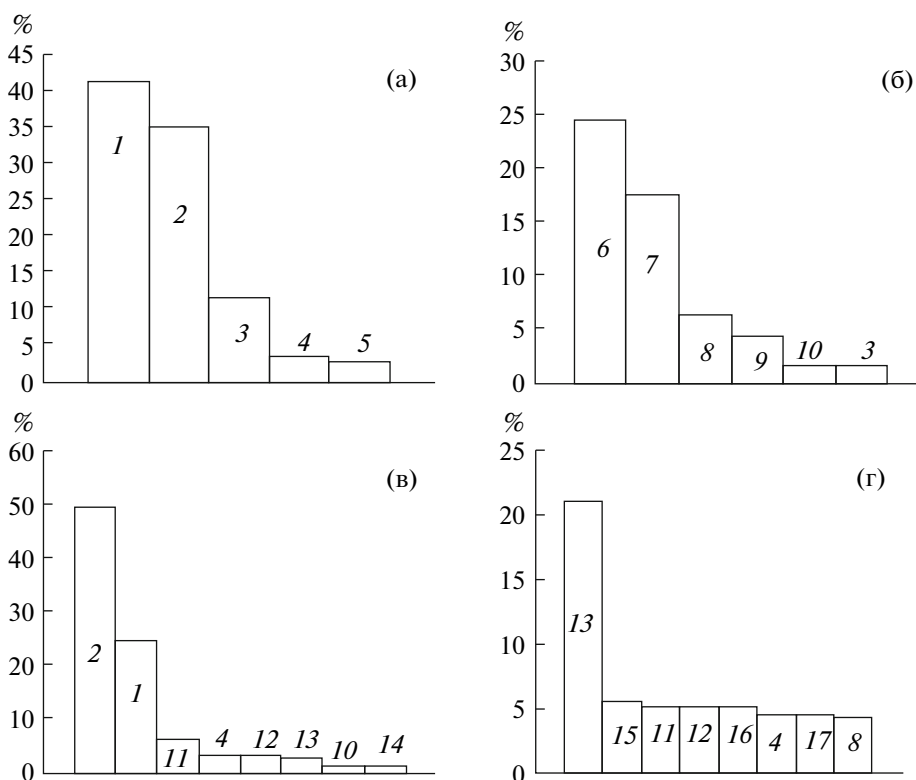
Факторами, влияющими на биоразрушаемость ПГА, помимо химического состава и температуры среды, являются стереоконфигурация, степень кристалличности полимера и молекулярная масса [10, 34, 35]. В работе исследованы образцы ПГА с различными значениями степени кристалличности (табл. 2). Рентгеноструктурным анализом образцов к концу наблюдения отмечено увеличение степени кристалличности полимеров обоих типов, что служит показателем предпочтительного разрушения (вымывания) аморфной фазы полимеров по сравнению с кристаллической в процессе биодegradации ПГА в почве в исследованных условиях. Это согласуется с рядом работ [13, 35], но отличается от результатов, полученных нами при исследовании разрушения ПГА в морской воде в условиях тропиков, где кристалличность полимерных образцов практически не изменилась [36].

В связи с тем, что свойства полимеров в значительной мере зависят от величины молекулярной

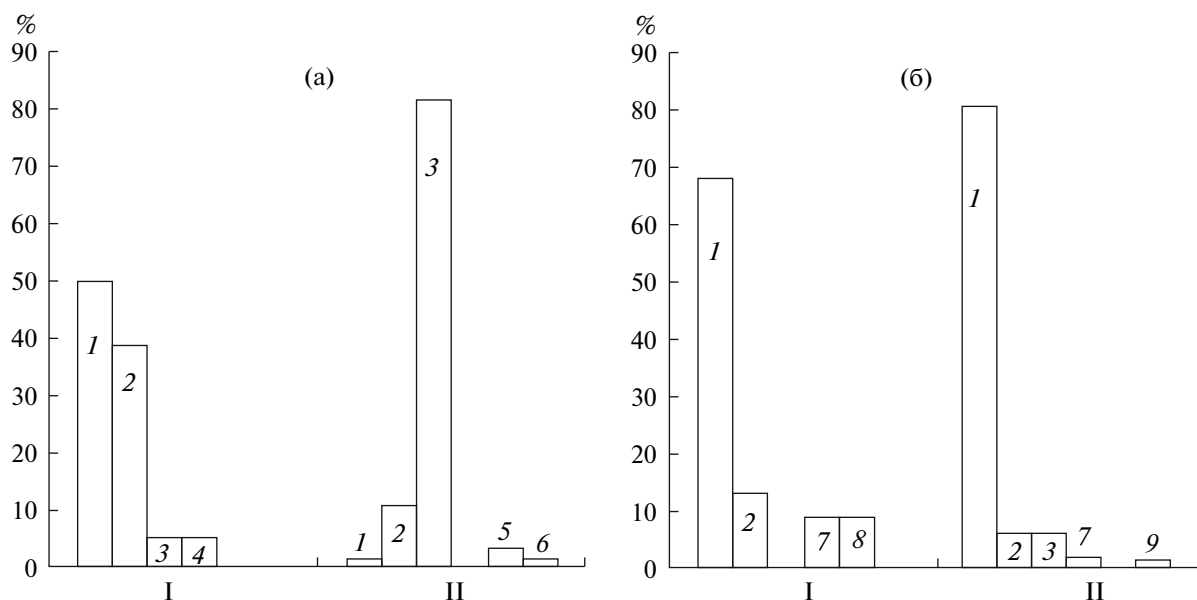
массы, исследованы ее изменения в процессе разрушения образцов ПГА в почве (табл. 2). Для образцов, исследованных в 2007 г. и подвергшихся наибольшей деструкции, отмечено незначительное, но достоверное снижение значения М<sub>в</sub>; в 2010 г. существенного изменения М<sub>в</sub> не зарегистрировано. Значение полидисперсности полимера возрастало во всех вариантах, что свидетельствовало о деструкции цепей ПГА и изменении соотношения в полимере фрагментов с различной степенью полимеризуемости. Это согласуется с данными, полученными нами при исследовании разрушения ПГА в морской воде в тропиках [36], а также другими работами, авторами которых установлено, что между величиной М<sub>в</sub> и разрушением ПГА существует прямая связь [3, 37].

ПГА, в отличие от других разрушаемых полимеров (полисахариды, полилактоиды), подвергаются истинной биологической дegradации клеточным и гуморальным путями под воздействием фагоцитирующих клеток и ПГА-деполимеризующих ферментов, экскретируемых микрофлорой [2].

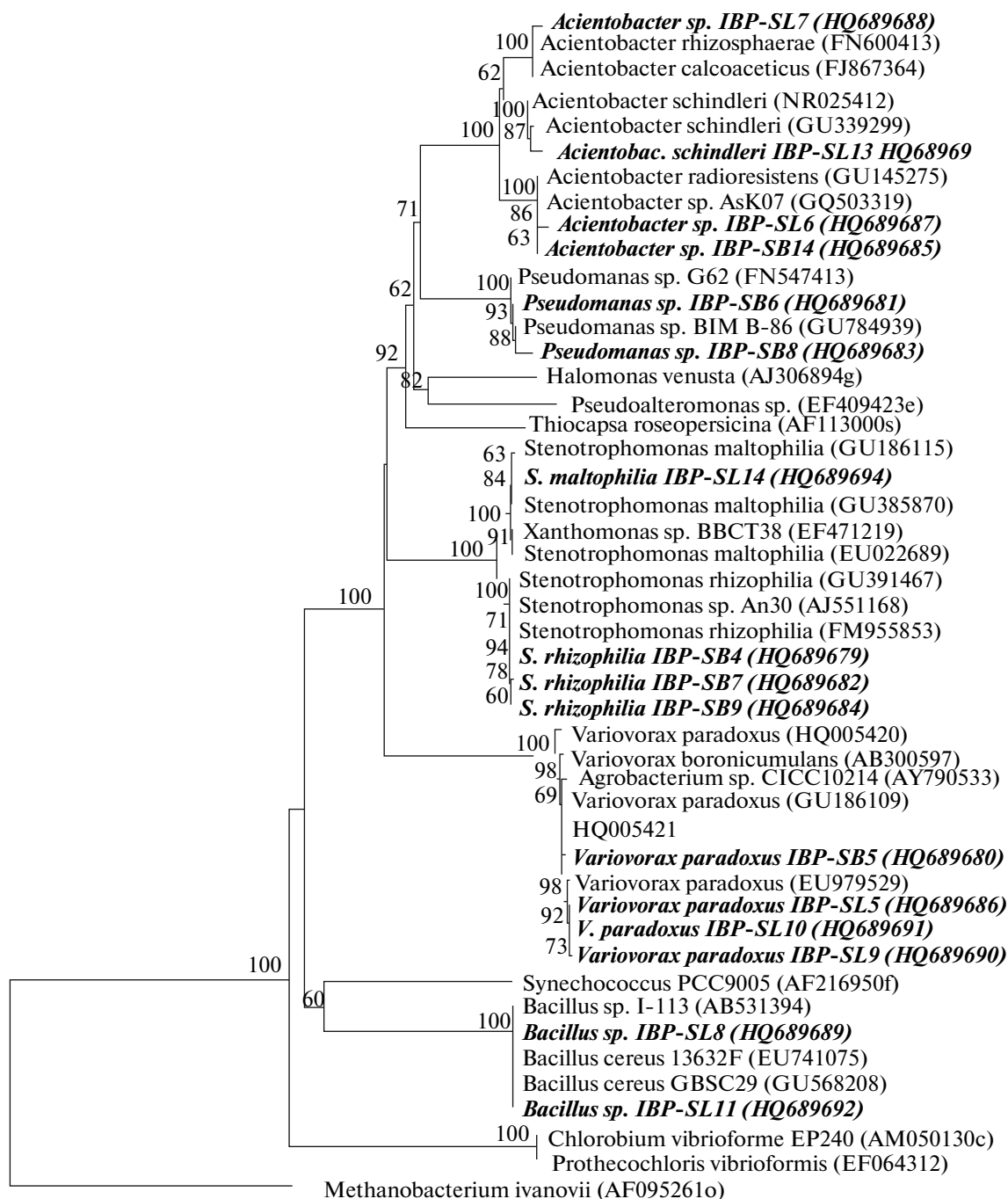
Сопоставление в конце периода наблюдений данных по общей численности и составу контрольных почвенных микробиоценов и проб, взятых с поверхности полимерных образцов, выявили существенные отличия. В почве под обоими видами деревьев отмечено увеличение численности прототрофов примерно в 3 раза по сравнению с исходной почвой. Возросшая до  $(3.81 \pm 0.71) \times 10^8$  КОЕ/г почвы численность олиготрофов под березой свидетельствует о большей активности этой группы микроорганизмов. Напротив, в почве под лиственницей отмечено снижение численности олиготрофов и коэффициента олиготрофности. Возможно, высокая численность гидролитиков (первичных деструкторов органических веществ), имеющая место в почве под лиственницей,



**Рис. 2.** Доминирующие представители бактерий, выделенные из почвы прикорневой зоны лиственницы (а) и с поверхности полимера (б); прикорневой зоны березы (в) и с поверхности полимера (г) 20.09.2007: 1 – *Micrococcus varians*, 2 – *Micrococcus roseus*, 3 – *Acinetobacter* sp., 4 – *Arthrobacter* sp., 5 – *Bacillus alvei*, 6 – *Agrobacterium* sp., 7 – *Cellulomonas* sp., 8 – *Alcaligenes* sp., 9 – *Aureobacterium* sp., 10 – *Pseudomonas* sp., 11 – *Actinomyces* sp., 12 – *Micrococcus luteus*, 13 – *Bacillus fastidiosus*, 14 – *Flavobacterium* sp., 15 – *Bacillus brevis*, 16 – *Pimelobacter*, 17 – *Nocardia* sp.



**Рис. 3.** Основные представители микромицетов, выделенные из почвы прикорневой зоны лиственницы (а) и березы (б): 1 – *Penicillium*\*, 2 – *Aureobasidium*; 3 – *Paecilomyces*\*; 4 – *Mycelia sterilia*; 5 – *Acremonium*\*; 6 – *Zygosporium*\*, 7 – *Verticillium*\*, 8 – *Trichoderma*, 9 – *Nigrospora* (звездочкой отмечены истинные деструкторы ПГА); I – контроль, II – на поверхности ПГА.



**Рис. 4.** Филогенетическое положение изученных в работе штаммов бактерий – деструкторов ПГА (выделены курсивом) на основе сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК методом ближайших соседей. Масштаб соответствует 1 нуклеотидной замене на каждые 10 последовательностей. Цифрами показаны значения индекса “bootstrap” 60% и более.

подавляла развитие олиготрофов (микробиоценоза).

Количественные показатели (табл. 1) и качественный состав микроорганизмов (рис. 2), выделенных непосредственно с поверхности ПГА, имели существенные отличия от контрольных образцов почвы. Общая численность микроорганизмов

на поверхности полимерных образцов была на 2 порядка выше в 2007 г. и на порядок в 2010 г. по сравнению с титром контрольной почвы. В контрольных образцах почвы под лиственницей в качестве доминантных определены представители рода *Micrococcus* (рис. 2а); также выделены спорообразующие палочки из рода *Bacillus* и артробакте-

рии. Среди представителей грамотрицательной микрофлоры выделены бактерии из родов *Acinetobacter*, *Flavobacterium* и *Pseudomonas*. В пробах, отобранных с поверхности полимерных образцов (рис. 2б), преобладали представители родов *Agrobacterium* и *Cellulomonas*. В небольшом количестве были представлены роды *Alcaligenes*, *Aureobacterium*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* и *Arthrobacter*. Аналогичный результат получен при анализе контрольных и экспериментальных проб почвы в прикорневой зоне березы (рис. 2в, 2г). В контрольной пробе доминировали бактерии рода *Micrococcus* (рис. 2в); на поверхности полимерных пленок преобладали бактерии рода *Bacillus*; также выделены *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Actinomyces*, *Pimelobacter* и *Alcaligenes* (рис. 2г).

К концу вегетационного периода в контрольных образцах из микромицетов присутствовали представители родов *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Aureobasidium*, *Verticillium* (рис. 3) с преобладанием грибов рода *Penicillium*. Это согласуется с данными о доминировании пенициллов среди микромицетов северных почв [26]. В пробах почвы с поверхности полимерных пленок было отмечено увеличение общего числа микромицетов в 36.5 раза в ризосфере лиственницы и в 4 раза в ризосфере березы по сравнению с контролем. Это свидетельствует об активном участии грибов в деградации ПГА, что находит подтверждение в литературе [4, 38, 39].

К настоящему моменту среди активных деструкторов ПГА описаны бактерии различных видов [5, 30, 34], а также грибы [28, 3, 7, 34]. Зачастую при выявлении деструкторов ПГА анализируют микроорганизмы, выделенные из пленок обрастания на поверхности полимеров, экспонировавшихся в почве (компост, вода, и т.д.). Однако среди микроорганизмов могут присутствовать сопутствующие виды, утилизирующие мономеры и другие продукты разрушения высокомолекулярных ПГА, которые появляются в среде благодаря жизнедеятельности истинных ПГА-деструкторов. Для выделения последних необходимо использовать метод прозрачных зон [4], предусматривающий высев проб на минеральный агар, содержащий ПГА в качестве единственного источника углерода.

Исследование выделенных грибов показало, что из 8 идентифицированных таксонов только 5 обладали ПГА-деполимеразной активностью. Образование прозрачных зон было отмечено вокруг колоний представителей родов *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Verticillium* и *Zygosporium*). Основными деструкторами ПГА в почве прикорневой зоны лиственницы были представители вида *Paecilomyces lilacinus*, численность которых составила 81.5%, что согласуется с работой других ав-

торов [38]. Среди грибов, локализованных на поверхности ПГА, в ризосфере березы доминировали *Penicillium* sp. БП-1 и БП-2, суммарная численность которых достигала 81%.

На основании сходных морфотипов отобраны 16 штаммов бактерий–деструкторов ПГА, которые были идентифицированы по совокупности морфологических, культуральных, биохимических и молекулярно-генетических признаков. Штаммы IBP-SB5, IBP-SL5, IBP-SL9 и IBP-SL10 отнесены к роду *Variovorax*; штаммы IBP-SB4, IBP-SB7, IBP-SB9 и IBP-SL14 – к роду *Stenotrophomonas*, штаммы IBP-SB14, IBP-SL6, IBP-SL7 и IBP-SL13 – к роду *Acinetobacter*, штаммы IBP-SB6 и IBP-SB8 – к роду *Pseudomonas*, и штаммы IBP-SL8 и IBP-SL11 – к роду *Bacillus* (рис. 4). Анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК выделенных штаммов показал высокую степень их гомологии с последовательностями ряда ранее определенных штаммов из базы данных GenBank. Штаммы формируют на дереве (рис. 4) 5 отдельных кластеров; один из них образован бета-протеобактериями рода *Variovorax* (штаммы, относящиеся к *Variovorax paradoxus*), 3 других – гамма-протеобактериями, принадлежащими к родам *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* и *Acinetobacter*. Еще один кластер соответствует грамположительным бактериям рода *Bacillus*.

Выполненные комплексные исследования процесса биоразрушения двух типов ПГА почвенными микробиоценозами различной структуры в течение двух полевых сезонов, различающихся погодными условиями, показали, что на этот процесс оказывали влияние как химический состав полимера, так и характеристика почвы – температура, влажность, микробная составляющая. В процессе разрушения ПГА зафиксировано падение молекулярной массы полимеров, а также повышение степени кристалличности, свидетельствующее о преимущественном разрушении аморфной фазы по сравнению с кристаллической. Установлено, что на поверхности полимерных образцов формируется микробиоценоз, качественно отличающийся от контрольных образцов почвы, в котором доминируют представители грибов рода *Penicillium* и бактерий рода *Micrococcus*. Обнаружено, что среди микроорганизмов, развивающихся непосредственно на поверхности полимерных образцов, наряду с истинными деструкторами, обладающими ПГА-деполимеразной активностью, за счет продуктов гидролиза ПГА активно развиваются сопутствующие бактерии. Среди истинных деструкторов ПГА идентифицировано 20 видов бактерий и 5 видов грибов. В качестве доминантных деструкторов ПГА в исследованных условиях выделены бактерии – представители родов *Variovorax*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*,



*Bacillus*. В популяции почвенных микромицетов, развивающихся на образцах полимера, доминируют виды – деструкторы ПГА *Penicillium* sp. БП-1, *Penicillium* sp. БП-2 и *Paecilomyces lilacinus*, численность которых достигала 80%.

Работа выполнена при поддержке проекта по постановлению Правительства РФ для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования (договор № 11.G34.31.0013), и Программы интеграционных исследований Президиума СО РАН (проект № 96).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chen G-Q.* // Chem. Soc. Rev. 2009. V. 38. № 8. P. 2434–2446.
2. *Kim D.Y., Kim H.W., Chung M.G., Rhee Y.H.* // J. Microbiol. 2007. V. 45. № 2. P. 87–97.
3. *Bonartseva G.A., Myshkina V.L., Nikolaeva D.A., Kevbrina M.V., Kallistova A.Y., Gerasin V.A., Iordanskii A.L., Nozhevnikova A.N.* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2003. V. 109. № 1–3. P. 285–301.
4. *Mergaert J., Webb A., Anderson C., Wouters A., Swings J.* // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. № 10. P. 3233–3238.
5. *Suyama T., Tokiwa Y., Ouichanpagdee P., Kanagawa T., Kamagata Y.* // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. № 12. P. 5008–5011.
6. *Woolnough C.A., Charlton T., Yee L.H., Sarris M., Foster J.R.* // Polym. Int. 2008. V. 57. № 9. P. 1042–1051.
7. *Мокеева В.Л., Чекунова Л.Н., Мышкина В.Л., Николаева Д.А., Герасин В.А., Бонарцева Г.А.* // Микология и фитопатология. 2002. Т. 36. № 5. С. 59–63.
8. *Bhatt R., Shah D., Patel K.C., Trivedi U.* // Biores. Technol. 2008. V. 99. № 11. P. 4615–4620.
9. *Colak A., Güner S.* // Int. Biodeterior. Biodegradation. 2004. V. 53. P. 103–109.
10. *Nishida H., Tokiwa Y.* // J. Environ. Polym. Degrad. 1993. V. 1. № 1. P. 65–80.
11. *Mukai K., Doi Y.* // RIKEN Review. 1993. №3. P. 21–22.
12. *Lim S.-P., Gan S.-N., Tan I.* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2005. V. 126. № 1. P. 23–32.
13. *Sridewi N., Bhubalan K., Sudesh K.* // Polym. Degrad. Stab. 2006. V. 91. № 12. P. 2931–2940.
14. *Lopez-Llorca L.V., Colom Valiente M.F., Gascon A.* // Micron. 1993. V. 24. № 1. P. 23–29.
15. *Yew S.-P., Tang H.-Y., Sudesh K.* // Polym. Degrad. Stab. 2006. V. 91. № 8. P. 1800–1807.
16. *Chowdhury A.A.* // Arch. Mikrobiol. 1963. V. 47. P. 167–200.
17. *Brandl H., Puchner P.* // Biodegradation. 1991. V. 2. № 4. P. 237–243.
18. *Briese B.-H., Jendrossek D., Schlegel H.G.* // FEMS Microbiol. Lett. 1994. V. 117. № 1. P. 107–112.
19. *Mergaert J., Anderson C., Wouters A., Swings J.* // J. Environ. Polym. Degrad. 1994. V. 2. № 3. P. 177–183.
20. *Патент РФ.* 1996. № 2053292.
21. *Volova T.G., Kalacheva G.S., Steinbüchel A.* // J. Sib. Fed. Univ. Biol. 2008. V. 1. № 1. P. 91–101.
22. *Звягинцев Д.Г.* Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: Изд-во МГУ, 1990. 303 с.
23. *Войнова О.Н., Калачева Г.С., Гродницкая И.Д., Волова Т.Г.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 4. С. 427–431.
24. *Определитель бактерий Берджи / Ред. Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит, Дж. Стейли, С. Уильямс.* М.: Мир, 1997.
25. *Вейант Р., Мосс У., Уивер Р., Холлис Д., Джордан Дж., Кук Э., Дейншвар М.* Определитель нетрициальных патогенных грамотрицательных бактерий. М.: Мир, 1999. 1784 с.
26. *Егорова Л.Н.* Почвенные грибы Дальнего Востока. Гифомицеты. Л.: Наука, 1986. 192 с.
27. *Саттон Д.* Определитель патогенных и условно патогенных грибов / Ред. Д. Саттон, А. Фотергилл, М. Ринальди. М.: Мир, 2001. 468 с.
28. *Кураков А.В., Новикова Н.Д., Озерская С.М., Дешевая Е.А., Геворкян С.А., Гогинян В.Б.* // Авиакосмическая и экологическая медицина, 2007. Т. 41. № 5. С. 49–56.
29. *Кондратюк Т.А.* // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2010. № 1. С. 65–66.
30. *Delafield F.P., Doudoroff M., Palleroni N.J., Lusty C.J.* // J. Bacteriol. 1965. V. 90. № 5. P. 1455–1466.
31. *Van de Peer Y., De Wachter R.* // Comput. Applic. Biosci. 1993. V. 9. № 2. P. 177–182.
32. *Волова Т.Г., Луковенко С.Г., Васильев А.Д.* // Биотехнология. 1992. № 1. С. 19–22.
33. *Rosa D.S., Filho R.P., Chui Q.S.H., Guedes C.G.F.* // Eur. Polym J. 2003. V. 39. № 2. P. 233–237.
34. *Jendrossek D., Handrick R.* // Annu. Rev. Microbiol. 2002. V. 56. P. 403–432.
35. *Abe H., Doi Y., Aoki H., Akehata T.* // Macromolecules. 1998. V. 31. № 7. P. 1791–1797.
36. *Volova T.G., Boyandin A.N., Vasiliev A.D., Karpov V.A., Prudnikova S.V., Mishukova O.V., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L., Rudnev V.P., Bui Bá Xuân, Vũ Viêt Dũng, Gitelson I.I.* // Polym. Degrad. Stab. 2010. V. 95. № 12. P. 2350–2359.
37. *Quinteros R., Goodwin S., Lenz R.W., Park W.H.* // Int. J. Biol. Macromol. 1999. V. 25. № 1–3. P. 135–143.
38. *Sang B.-I., Hori K., Tanji Y., Unno H.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 58. № 2. P. 241–247.
39. *Lee K.-M., Gimore D.F., Huss M.J.* // J. Polym. Environ. 2005. V. 13. № 3. P. 213–219.

# Biodegradation of Polyhydroxyalkanoates by Soil Microbiocoenoses of Different Structures and Detection of Microorganisms-Destructors

A. N. Boyandin<sup>a</sup>, S. V. Prudnikova<sup>b</sup>, M. L. Filipenko<sup>c</sup>, E. A. Khrapov<sup>c</sup>,  
A. D. Vasil'ev<sup>d</sup>, and T. G. Volova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biophysics, Siberian Branch Russian Academy of Sciences, building 50, Akademgorodok 50, Krasnoyarsk, 660036 Russia  
e-mail: ab@ibp.krasn.ru

<sup>b</sup> Siberian Federal University, pr. Svobodny 79, Krasnoyarsk, 660041 Russia

<sup>c</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>d</sup> Kirenskii Institute of Physics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, building 38, Akademgorodok 50, Krasnoyarsk, 660036 Russia

Received April 7, 2011

**Abstract**—Biodegradation of microbial linear polymers of hydroxyalkanoic acids (polyhydroxyalkanoates, PHAs) by soil microbiocoenoses of different structures has been studied during two field seasons in different weather conditions. This process was shown to be influenced by the polymer chemical composition, temperature, humidity, and the microbial soil component. The PHA degradation was accompanied by a decrease in the polymer molecular weight and an increase in the degree of crystallinity, indicating the preferential destruction of the amorphous phase compared to the crystalline one. The quantity of the true PHA destructors developing at the surface of the polymer samples was lower than the quantity of accompanying bacteria. The dominant PHA destructors under the test conditions were identified as bacteria of the genera *Variovorax*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, and *Xanthomonas* and as micromycetes from *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Verticillium*, and *Zygosporium*.