

УДК 631.46:579.8.[083.13+044]

БИОДЕГРАДАЦИЯ ПОЛИ- β -ГИДРОКСИБУТИРАТА В МОДЕЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ ПОЧВЕННОГО СООБЩЕСТВА: ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ СРЕДЫ НА СКОРОСТЬ ПРОЦЕССА И ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОЛИМЕРА

© 2002 г. Г. А. Бонарцева*, В. Л. Мышкина*, Д. А. Николаева*, А. В. Ребров**,
В. А. Герасин**, Т. К. Махина**

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

**Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН, Москва

Поступила в редакцию 28.05.01 г.

Исследована биодеградация пленок из поли- β -гидроксибутирата молекулярной массы 1500 кДа (выделенного из клеток *Azotobacter chroococcum* в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН) в модельных условиях почвенного сообщества при дополнительном внесении нитратов и разных концентрациях кислорода в газовой фазе. Прослежены изменения молекулярной массы, степени кристалличности и некоторых механических свойств полимера в процессе его биодеградации.

Ключевые слова: *Azotobacter chroococcum*, биодеградация, поли- β -гидроксибутират, молекулярная масса, кристалличность.

Поли- β -гидроксибутират (ПГБ) – резервный полимер, образующийся в клетках некоторых микроорганизмов в условиях несбалансированного питания. Биодеградируемость ПГБ в различных природных средах является одним из его наиболее привлекательных коммерческих свойств. Дegradация полимеров в окружающей среде может быть обусловлена разными факторами; это может быть гидролиз, механическое или термическое разложение, окисление, фотодеструкция и, наконец, биодеградация. О биодеградируемости полимера судят на основании полевых и лабораторных тестов. Существует необходимость в системе стандартов на методы определения степени биодеградируемости полимеров. В частности, Американским обществом тестирования материалов (ASTM) предложен набор стандартных тестов на аэробную и анаэробную деградацию полимера (ПГБ) в различных средах. Система тестов включает измерение изменений физико-механических характеристик полимера и анализ изменений химического состава и продуктов разложения [1]. В зависимости от назначения полимера требования к его биодеградируемости могут быть разными. С экологической точки зрения наиболее важным свойством ПГБ является возможность его полной микробной деградации до CO_2 и воды. Известны работы по деградации ПГБ в естественных экосистемах, таких как почва, компост и водоемы [2–4], а также композитов ПГБ с другими материалами [5, 6]. Более 300 микроорганизмов, способных к деградации ПГБ *in vitro* было

выделено из почвы [2]. Известно, что в состав микроорганизмов, способных к деградации ПГБ входят денитрификаторы [2]; кроме того, наличие денитрификаторов среди микроорганизмов, способных к деградации ПГБ, представляет практический интерес, так как ПГБ может быть использован в качестве биоразлагаемой матрицы для иммобилизации денитрифицирующих бактерий при очистке питьевой воды от нитратов [7]. В этой связи сам процесс восстановления нитратов сообществом денитрификаторов при использовании поли- β -гидроксибутирата в качестве источника углерода представляет несомненный интерес.

Целью данной работы было изучить биодеградируемость полученного в нашей лаборатории ПГБ (молекулярная масса M_w 1100 кДа, молекулярно-массовое распределение $M_w/M_n = 2.7$) в модельных условиях почвенного сообщества с дополнительным внесением нитратов и при разных концентрациях кислорода в газовой фазе; проследить изменения молекулярной массы, некоторых механических характеристик и степени кристалличности полимера в процессе его биодеградации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали образцы высокомолекулярного поли- β -гидроксибутирата, синтезированного азотфиксирующей бактерией *Azotobacter*

chroococcum 32 В. Штамм выделен из ризосферы пшеницы (дерново-подзолистая почва). Коллекционный штамм *Azotobacter* поддерживали на среде Эшби (г/л: $K_2HPO_4 - 0.2$; $MgSO_4 - 0.2$; $NaCl - 0.2$; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O - 0.006$; $CaCO_3 - 5.0$; сахара - 20; агар - 20). Для достижения сверхсинтеза поли-β-оксибутирата в клетках (до 80% от массы сухих клеток) культуру азотобактера выращивали на среде Берка в условиях избыточного содержания источника углерода в среде (г/л): $MgSO_4 \cdot 7H_2O - 0.4$; $FeSO_4 \cdot 7H_2O - 0.01$; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O - 0.006$; цитрат Na - 0.5; $CaCl_2 - 0.1$; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O - 1.05$; $KH_2PO_4 - 0.2$; глюкоза - 40.

Процесс выделения и очистки полимера из биомассы *Azotobacter chroococcum* включал следующие стадии: растворение ПГБ в хлороформе путем встряхивания на качалке при 37°C в течение 12 ч; отделение раствора ПГБ от клеточных остатков фильтрованием; выделение ПГБ из раствора хлороформа осаждением изопропиловым спиртом; последующее трехкратное растворение в хлороформе и осаждение изопропанолом; высушивание при 60°C. Пленки толщиной 0.03–0.04 мм изготавливали методом разлива в чашки Петри раствора чистого ПГБ в хлороформе.

Молекулярную массу полимера определяли методом вискозиметрии. Измерения вязкости раствора ПГБ в хлороформе проводили при 30°C. Молекулярную массу вычисляли по уравнению Марка-Хаувинка-Куна, используя следующие коэффициенты $[\eta] = 7.7 \times 10^{-5} M^{0.82}$ [8].

Механические свойства полимера определяли на универсальном динамометре Инстрон 1121. Высекали образцы полимера в виде лопаток с длиной рабочей части 10 мм и толщиной 0.03–0.04 мм, скорость движения траверсы 5 мм/мин. Испытания проводили при 20°C.

Содержание летучих жирных кислот в жидкой фазе почвенной суспензии определяли на хроматографе Chrom-5 с пламенно-ионизационным детектором, в качестве сорбента использовали Chromosorb-101. Пробу объемом 2 мкл вводили в стеклянную колонку длиной 1.2 м и диаметром 3 мм, температура колонки 170°C, газ-носитель аргон.

N_2O в газовой фазе определяли на газовом хроматографе Chrom-5 с детектором по теплопроводности (температура детектора 20°C), на колонке с сорбентом Porapak Q (длина колонки - 1.2 м, диаметр - 3 мм), газ-носитель аргон.

Степень кристалличности определяли методом рентгеноструктурного анализа на установке Bruker AXS (2-координатный детектор) с использованием вращающегося медного анода.

Образцы пленки весом около 40 мг и толщиной 0.03–0.04 мм помещали во флаконы емкостью 50 мл с почвенной суспензией (20 мл). Почвенную суспензию готовили на основе 0.1 М калий-фосфатного буфера (соотношение почва-буфер 1 : 10). Нитраты (KNO_3) добавляли в концентрации 5 г/л. Для

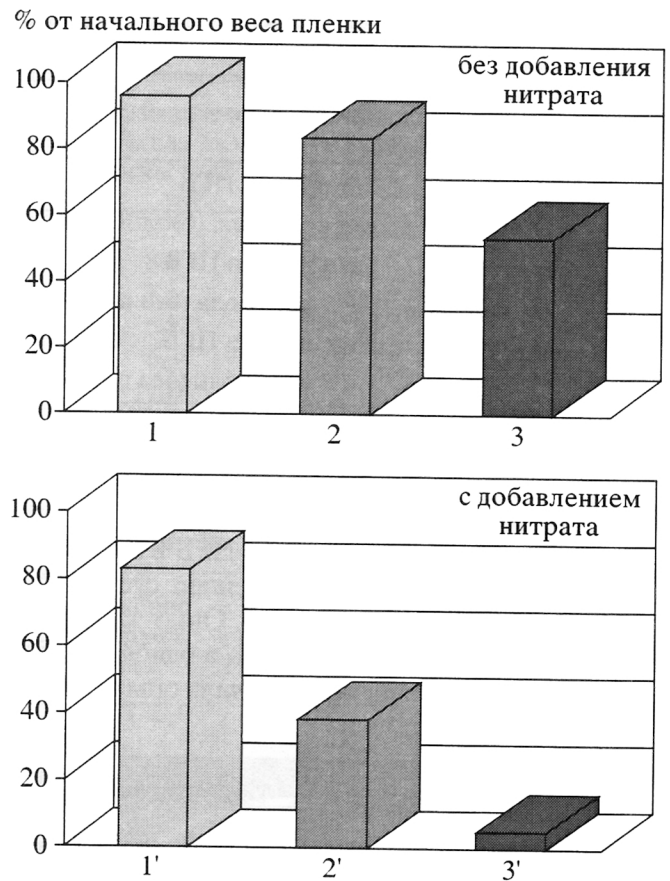


Рис. 1. Степень биодegradации пленок ПГБ в зависимости от содержания нитратов в среде и концентрации кислорода в газовой фазе (продолжительность эксперимента - 2 мес.): 1 - анаэробные условия, 2 - микроаэрофильные условия, 3 - аэробные условия.

создания анаэробных условий флаконы закрывали резиновыми пробками и эвакуировали воздух с помощью масляного насоса. Затем флаконы заполняли аргоном и добавляли 5% ацетилена (ингибитор N_2O -редуктазы).

В вариантах с микроаэрофильными условиями эвакуации воздуха не проводили, в закрытые резиновыми пробками флаконы добавляли 5% ацетилена. В аэробных вариантах флаконы закрывали ватными пробками. Инкубацию проводили при 28°C. Для определения потери веса образца, пленки извлекали из почвенной суспензии, тщательно промывали 0.1 М фосфатным буфером, высушивали 2 ч при 60°C и взвешивали.

Для определения общей численности бактерий по окончании опыта оставшиеся кусочки пленки (весом около 10 мг) помещали в стерильную воду, встряхивали на качалке 1 ч, делали разведения (10^1-10^6) и высев на питательные среды: МПА, Чапека. Численность денитрификаторов определяли методом титра на среде Гильтая.

Повторность в каждом из вариантов опыта - трехкратная. В таблицах приведены средние данные.

Таблица 1. Динамика восстановления NO_3^- и N_2O в процессе биоразложения ПГБ

Вариант опыта	Условия биodeградации	Содержание N_2O в газовой фазе мкмоль/флакон		
		20 сут	30 сут	60 сут
1'	O_2 0%, NO_3^- , 5 г/л пленка ПГБ	82.3	114.4	128.5
	O_2 0%, NO_3^- , 5 г/л контроль (без пленки)	28.1	40.2	56.2
2'	O_2 10%, NO_3^- , 5 г/л пленка ПГБ	178.7	271.0	259.0
	O_2 10%, NO_3^- , 5 г/л контроль (без пленки)	8.0	16.1	12.0
3'	O_2 20%, NO_3^- , 5 г/л пленка ПГБ	Не определяется	Не определяется	Не определяется
	O_2 20%, NO_3^- , 5 г/л контроль (без пленки)	Не определяется	Не определяется	Не определяется

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 приведены результаты эксперимента по изучению степени деградации ПГБ в зависимости от наличия нитратов в почвенной суспензии и уровня кислорода в газовой фазе. Опыт заканчивали, когда пленка была разрушена в одном из вариантов. Через два месяца после начала опыта пленка

в варианте с аэробными условиями и добавлением нитрата (вариант 3') была разрушена практически полностью. По окончании опыта извлекали неразрушившиеся остатки пленок из всех вариантов и по убыли веса судили о степени биодеструкции.

При сравнении влияния условий аэрации на биodeградацию полимера видно, что наибольшая скорость разложения пленок наблюдается в аэ-

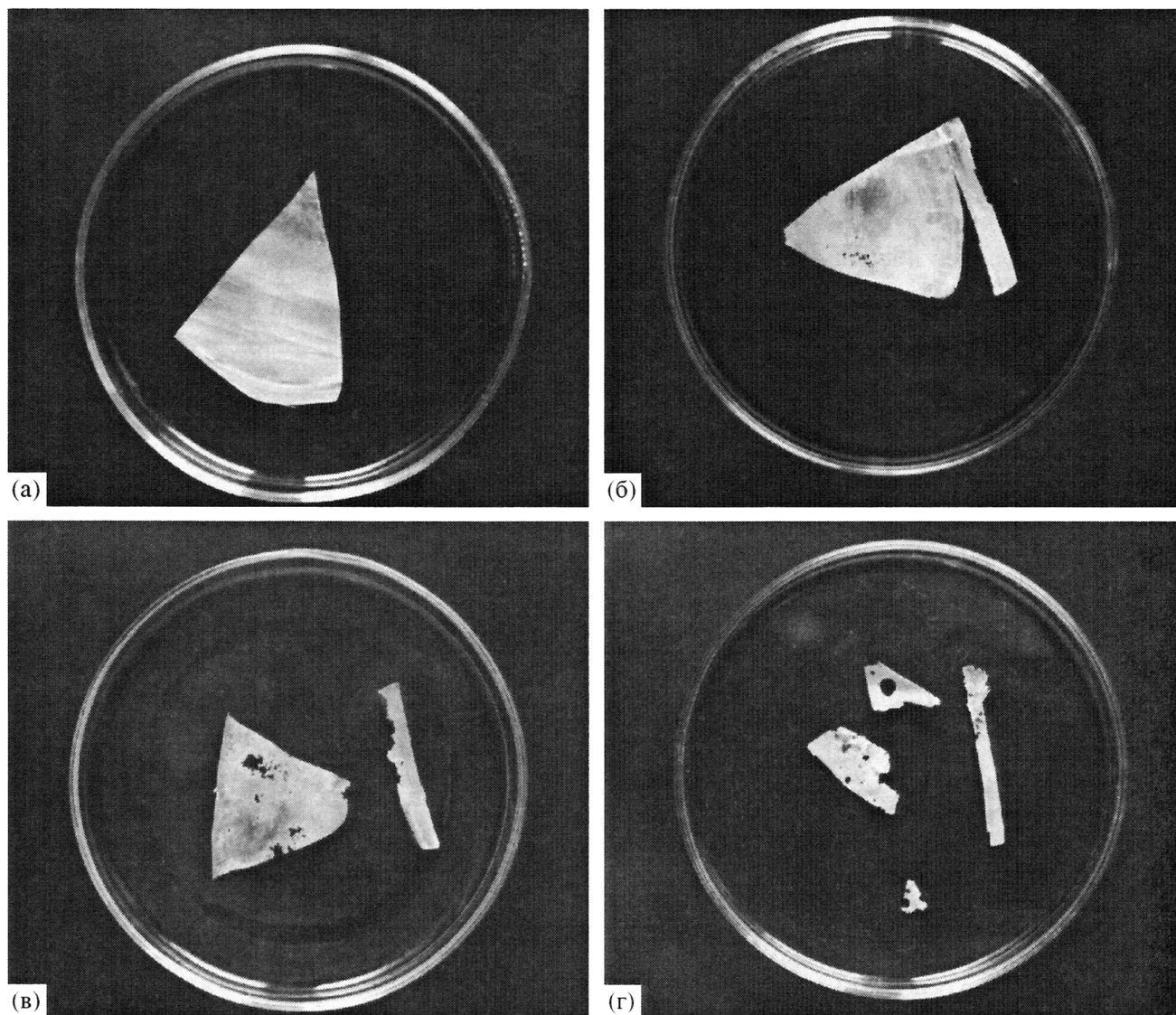


Рис. 2. Пленки ПГБ разной степени биodeградации: а – исходная пленка, б – вариант 1, в – вариант 2, г – вариант 2'.

Таблица 2. Изменения молекулярной массы и степени кристалличности полигидроксibuтирата в процессе биодеградации

Вариант опыта	Условия биодеградации	Степень биодеструкции (% от начального веса пленки)	Характеристическая вязкость, дл/г	Средневязкостная молекулярная масса, кДа	Степень кристалличности, %
1	Контроль (исходная пленка)	100	8.9	1490	72.9
1'	Без кислорода	96	8.0	1310	73.9
2	Без кислорода + NO ₃	83	8.1	1330	74.1
2'	O ₂ 10%	83	6.8	1080	74.2
3	O ₂ 10% + NO ₃	38	6.3	980	75.2
3'	O ₂ 20%	53	7.0	1110	73.9
	O ₂ 20% + NO ₃	5	5.2	780	76.3

Примечание. Здесь и в табл. 3 продолжительность эксперимента 60 сут.

Таблица 3. Изменение механических характеристик пленки ПГБ в процессе биодеградации

Вариант опыта	Условия биодеградации	Степень биодеструкции (% от начального веса пленки)	Напряжение при разрыве, мПа	Удлинение при разрыве, %	Модуль упругости, мПа
1	Контроль (исходная пленка)	100	31.3	4.0	1660
1'	O ₂ 0%	96	36.6	3.2	2010
2	O ₂ 0% + NO ₃	83	31.2	3.4	1965
2'	O ₂ 10%	83	26.0	3.7	1695
3	O ₂ 10% + NO ₃	38	12.1	3.0	840
3'	O ₂ 20%	53	13.2	3.8	825
	O ₂ 20% + NO ₃	5	Не определяется*	Не определяется*	Не определяется*

* Пленка разрушена практически полностью.

робных условиях как в присутствии, так и в отсутствие нитратов в почвенной суспензии.

Сравнивая серии вариантов с одинаковыми концентрациями кислорода, следует отметить, что добавление нитрата в почвенную суспензию заметно повышает степень биодеградации пленки при всех заданных уровнях кислорода в газовой фазе. Очевидно, нитрат как альтернативный кислороду акцептор электронов, дополнительно внесенный в среду, стимулирует развитие микроаэрофильной и анаэробной денитрифицирующей микрофлоры. Интересно отметить, что в условиях высокой аэрации, но без добавления нитрата (вариант 3) и в микроаэрофильных условиях с добавлением нитрата (вариант 2') скорость разложения пленки примерно одинакова, причем в варианте 2' степень разложения даже несколько выше.

Из приведенных в табл. 1 результатов измерений газообразного продукта денитрификации N₂O в ходе опыта видно, что уже на 20-е сут в варианте 2' (микроаэрофильных условиях + NO₃⁻) содержание N₂O в газовой фазе составляло 178.7 мкмоль/флакон, тогда как в контрольном варианте без пленки (почва + NO₃⁻) содержание N₂O близко к нулю (8.0 мкмоль/флакон). Из таблицы видно, что микроаэрофильные условия более благоприятны для биодеградации ПГБ и развития денитрификаторов,

чем анаэробные (количество N₂O в анаэробном варианте снижено вдвое по сравнению с вариантом, где содержание кислорода составляло 10%). На протяжении опыта денитрифицирующая активность сохраняется. По всей видимости, дополнительное внесение нитрата стимулирует развитие денитрифицирующих бактерий, которые в свою очередь играют важную роль в биодеградации ПГБ.

На рис. 2 представлены пленки разной степени биодеградации из трех вариантов опыта.

На 60-е сут биодеградации ПГБ методом газовой хроматографии проводилось определение содержания летучих жирных кислот в почвенной суспензии. В анаэробных условиях содержание уксусной кислоты составляло 596 мкмоль/флакон и масляной кислоты 325 мкмоль/флакон, в микроаэрофильных условиях – 158 мкмоль/флакон уксусной и 53 мкмоль/флакон масляной кислоты. В аэробных условиях летучих жирных кислот в почвенной суспензии не обнаружено. Очевидно, в аэробных условиях окисление полимера проходит полностью, до CO₂ и воды.

Общая численность грибов, локализованных на поверхности пленки в среднем по вариантам (за исключением анаэробного варианта, где роста не было), составляла 4 × 10⁴–5 × 10⁶, бактерий – 1 × 10⁵–2 × 10⁷. При качественном анализе можно от-

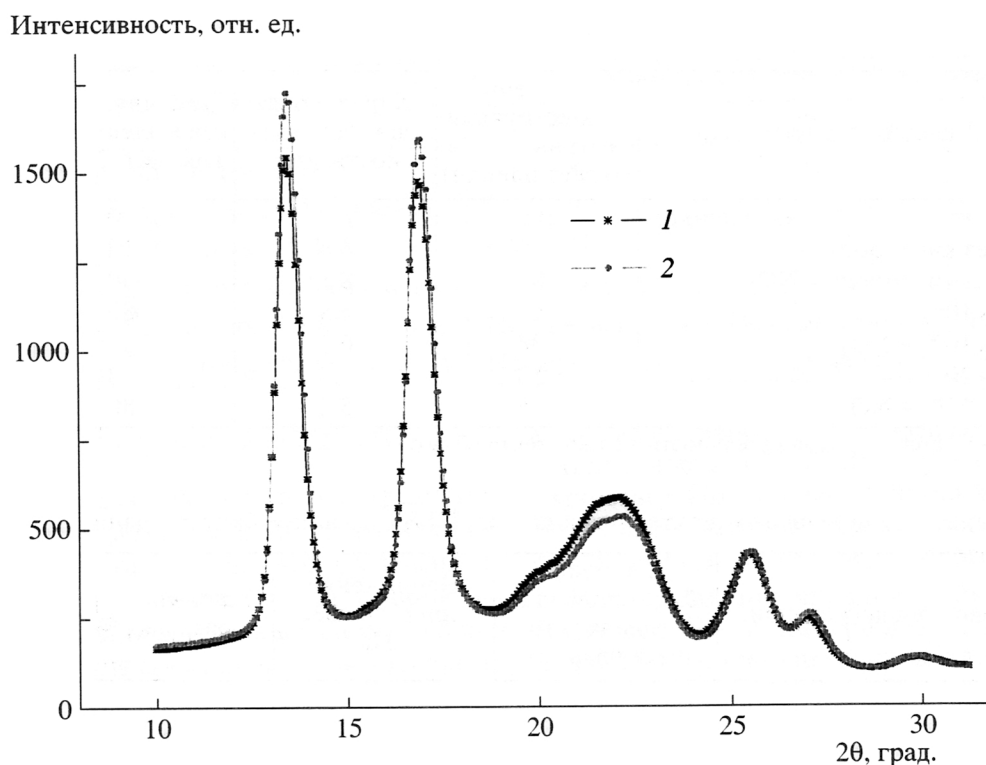


Рис. 3. Сравнительные дифрактограммы исходной пленки ПГБ (1), не подвергавшейся биodeградации, и пленки из варианта 3' (2).

метить преобладание бактерий родов *Pseudomonas* sp. (как флуоресцирующих, так и нефлуоресцирующих форм), *Bacillus* sp., *Azospirillum* sp., *Mycobacterium* и *Streptomyces*; среди грибов – *Penicillium*. Численность денитрификаторов во всех вариантах опыта, за исключением варианта 2', была 1×10^2 клеток на исходный вес пленки (40 мг); в микроаэрофильных условиях с дополнительным внесением азота в почвенную суспензию (вариант 2') численность денитрификаторов составляла 1×10^3 клеток.

Определение молекулярной массы полимера по вариантам показало ее изменение в процессе биodeградации (табл. 2). Из таблицы следует, что молекулярная масса ПГБ снижается во всех вариантах по сравнению с начальной пленкой, не подвергавшейся биodeградации (характеристическая вязкость 8.9 дл/г, M_v 1490 кДа). В варианте 3' (аэробные условия + NO_3), где визуальная степень биodeградации была наибольшей, значение средневязкостной молекулярной массы полимера на 60-е сут после начала опыта составляло 780 кДа, что почти вдвое меньше, чем молекулярная масса полимера, не подвергавшегося биodeградации. В отличие от наших данных Mergaert с соавт. [2], изучавшие биodeградацию объемных кусочков (не пленки) поли- β -гидроксипропионата и поли- β -гидроксипропионата-гидроксивалерата в почве и компосте, подобного эффекта не наблюдали. В почве при потере веса образцов ПГБ на 20% не отмечено изменения молекулярной массы. Также и при инкубации в компосте сложного сополиме-

ра, содержащего ПГБ с 20% ОВ (оксивалерата), его молекулярная масса не менялась, несмотря на потерю веса образцов на 60% за 150 сут [2].

Можно отметить прямую корреляцию между степенью биodeградации пленки и снижением молекулярной массы полимера (рис. 1 и табл. 2). Так, при одинаковом уровне содержания кислорода в газовой фазе в вариантах с добавлением нитрата пленка не только быстрее теряет в весе, но и молекулярная масса полимера снижается быстрее по сравнению с вариантами без внесения нитрата (варианты 2 и 2', 3 и 3'). Интересно отметить, что низким значением молекулярной массы полимера в вариантах 2' и 3' соответствуют наиболее высокие значения степени кристалличности (75.2 и 76.3%). На рис. 3 приведены сравнительные дифрактограммы исходной пленки, не подвергавшейся биodeградации, и пленки из варианта 3' (аэробные условия + NO_3). Рассчитанные на основе полученных дифрактограмм значения степени кристалличности составляли 72.9 и 76.3% для исходной пленки и варианта 3' соответственно. Так как структура полимера предполагает наличие аморфных и кристаллических областей, а аморфные области подвергаются гидролизу и микробной деградации в первую очередь [9], очевидно, что при последовательном разрушении аморфных областей снижается молекулярная масса полимера и повышается степень кристалличности. Степень кристалличности оказывает существенное влияние на разрушаемость биополимеров. По данным многих авторов, в частности Воловой и

соавт., пленки из гетерополимеров (полигидроксибутират-гидроксиалерат) с повышенной по сравнению с полигидроксибутиратом долей аморфной фазы разрушаются быстрее [10].

В табл. 3 представлены результаты механических испытаний образцов полимера, подвергшихся биодegradации в различных условиях. Как видно из таблицы, значения модуля упругости возрастают в вариантах 1, 1' и 2, а для вариантов 2', 3 и 3' значения модуля упругости ниже чем у исходной пленки. Возможным объяснением этого может быть следующее. Аморфные области, в которых осуществляется деформация, подвергаются гидролизу и микробной деградации в первую очередь, что повышает жесткость полимера. Напротив, уменьшение модуля упругости в условиях, благоприятствующих микробной деградации, можно объяснить тем, что при дальнейшем разрушении аморфных областей, структура полимера становится более рыхлой.

Таким образом, показано, что полученный нами высокомолекулярный поли-β-гидроксибутират легко подвергается биодegradации, особенно в аэробных и микроаэрофильных условиях с дополнительным внесением нитратов. Процесс восстановления нитратов и одновременное разложение ПГБ денитрифицирующими бактериями представляет как теоретический, так и практический интерес. Показаны изменения молекулярной массы, кристалличности и механических свойств ПГБ в процессе биодegradации, что дает представление о скорости и механизме биодеструкции пленки в почве.

Работа выполнена при поддержке гранта по федеральной целевой Программе “Биотехнология России” Министерства промышленности, науки и технологий РФ № 4 “Разработка и создание опытно-промышленного производства поли-β-оксибутирата – экологически чистого биоразлагаемого пластика” (договор № 97/24 от 10.03.97) и гранта РФФИ №00-03-33094А “Нетрадиционный подход к получению ориентированного состояния в полиоксиалканоатах и первое наблюдение “хардэластических” свойств в этих полимерах”.

Выражаем благодарность М.В. Кевбриной за помощь при газохроматографических измерениях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Swift G. Biodegradability of polymers in the environment: complexities and significance of definitions and measurements // FEMS Microbiol. Rev. 1992. V. 103. P. 339–346.
2. Maergaert J., Anderson C., Wouters A., Swings J., Kersters K. Biodegradation of polyhydroxyalkanoates // FEMS Microbiol. Rev. 1992. V. 103. P. 317–322.
3. Savenkova L., Gercberga Z., Nikolaeva V., Dzene A., Bibers J., Kalnin M. Mechanical properties and biodegradation characteristics of PHB-based films // Process Biochem. 2000. V. 35. P. 573–579.
4. Brandle H., Bachofen R., Mayer J., Wintermantel E. Degradation and application of polyhydroxyalkanoates // Can. J. Microbiol. 1995. V. 41. P. 143–153.
5. Scandola M. Polymers blends based on bacterial poly(3-hydroxybutyrate) // Can. J. Microbiol. 1995. V. 41. P. 310–315.
6. Koyama N., Doi Y. Morphology and biodegradability of a binary blend of poly((R)-3-hydroxybutyric acid) and poly((R, S)-lactic acid) // Can. J. Microbiol. 1995. V. 41. P. 316–322.
7. Biedermann J., Owen A.J., Schloe K.T., Gassner F., Susmuth R. Interaction between poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate and a denitrifying *Pseudomonas* strain // Can. J. Microbiol. 1997. V. 43. P. 561–569.
8. Akita S., Einaga Y., Miyaki Y., Fujita H. Solution properties of poly(D-β-hydroxybutyrate) // Macromolecules. 1975. V. 9. P. 774–780.
9. Spyros A., Kimmich R., Briese B.H., Jendrossek D. H-1-NMR imaging study of enzymatic degradation in poly-3-hydroxybutyrate and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate – evidence for preferential degradation of the amorphous phase by PHBdepolymerase from *Pseudomonas lemoignei* // Macromolecules. 1997. V. 30. P. 8218–8225.
10. Волова Т.Г., Беляева О.Г., Плотников В.Ф., Пузырь А.П. Исследование биодegradации микробных полиоксиалканоатов // Докл. АН. 1996. Т. 350. С. 707–711.

The Biodegradation of Poly-β-Hydroxybutyrate (PHB) by a Model Soil Community: The Effect of Cultivation Conditions on the Degradation Rate and the Physicochemical Characteristics of PHB

G. A. Bonartseva*, V. L. Myshkina*, D. A. Nikolaeva*, A. V. Rebrov**, V. A. Gerasin**, and T. K. Makhina**

*Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 33, Moscow, 117071 Russia

**Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 29, Moscow, 117912 Russia

Abstract—The biodegradation of films made of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) with a molecular mass of 1500 kDa was studied using a model soil community in the presence and absence of nitrate and at different concentrations of oxygen in the gas phase. The biodegradation of PHB was investigated with respect to changes in its molecular mass, crystallinity, and some mechanical properties.

Key words: *Azotobacter chroococcum*, biodegradation, poly-β-hydroxybutyrate, molecular mass, crystallinity.