

ФИЗИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ, БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 582.28 : 620.193.82 : 541.6

© В. Л. Мокеева, Л. Н. Чекунова, В. Л. Мышкина, Д. А. Николаева,
В. А. Герасин, Г. А. Бонарцева

БИОДЕСТРУКЦИЯ ПОЛИ- β -ГИДРОКСИБУТИРАТА МИКРОСКОПИЧЕСКИМИ ГРИБАМИ: ИСПЫТАНИЕ ГРИБОСТОЙКОСТИ И ФУНГИЦИДНЫХ СВОЙСТВ ПОЛИМЕРА

МОКЕЕВА В. Л., ЧЕКУНОВА Л. Н., МЫШКИНА В. Л., НИКОЛАЕВА Д. А.,
ГЕРАСИН В. А., БОНАРТСЕВА Г. А. POLY- β -HYDROXYBUTYRATE BIODESTRUCTION
BY MICROMYCETES: RESISTANCE AND FUNGICIDITY TESTS

Перспективность использования поли- β -гидроксибутирата (ПГБ) в народном хозяйстве обусловлена его нестойкостью в окружающей среде и возможностью разложения до углекислого газа и воды. Среди факторов, способствующих его разрушению в различных природных средах (гидролиз, механическое или термическое разложение, окисление, фотодеструкция), биодegradация под воздействием бактерий и грибов занимает центральное место. Грибы характеризуются гетеротрофным типом питания, их потребности в питательных субстратах чрезвычайно разнообразны и определяются ферментными системами, которыми они обладают. Многие виды грибов способны усваивать труднодоступные соединения, и это дает им определенные экологические преимущества в естественной среде обитания. Так как грибы составляют значительную часть микробиоты почвы (Мирчинк, 1976), нельзя недооценивать их роль в биодegradации биополимеров. Среди выделенных из почвы микроорганизмов, участвующих в биодegradации полимера полигидроксибутирата, примерно 1/3 составляют грибы (Maergaert et al., 1992; Matavulj, Molitoris, 1992; Oda et al., 1995).

Способность грибов разрушать ПГБ в природной окружающей среде показана в целом ряде работ. Как правило, грибы-деструкторы выявляли путем высева смывов с образцов биопластика на питательный агар (Matavulj, Molitoris, 1992; Lopez-Llorca et al., 1993; Savencova et al., 2000; Бонарцева и др., 2002). О способности отдельных видов грибов разрушать ПГБ судили по интенсивности их развития и зонам просветления при росте колоний на агаризованной среде с полимером (Oda et al., 1995; Козловский и др., 1999). Наиболее часто в литературе как деструкторы ПГБ упоминаются грибы следующих родов: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Verticillium*, *Cephalosporium*, *Trichoderma*.

Целью данной работы было впервые лабораторно испытать полимерную пленку из ПГБ, полученную нами из клеток *Azotobacter chroococcum* в Институте биохимии им. А. Н. Баха РАН, на грибостойкость и фунгицидность путем заражения ее чистыми культурами плесневых грибов (роды *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Chaetomium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Trichoderma*) в оптимальных для их развития условиях; проследить за изменениями молекулярной массы и механических свойств пленки в процессе биоразрушения.

Материалы и методы

В работе использовали образцы высокомолекулярного поли- β -гидроксиполутирата, 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, сахароза — 20, агар — 20. Для достижения сверхсинтеза ПГБ в клетках (выше 75 % от сухого веса клетки) культуру азотобактера выращивали на среде Берка в условиях избыточного содержания источника углерода (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 °С 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 °С. У полимера молекулярная масса (ММ) была 633 кДа, температура плавления — 176 °С, содержание основного вещества 99.2 %. Пленки толщиной 0.05 мм изготавливали методом налива в чашки Петри раствора чистого ПГБ в хлороформе.

ММ полимера определяли методом вискозиметрии и вычисляли по уравнению Марка—Хаувинка—Куна, используя следующие коэффициенты: $[\eta] = (7.7 \cdot 10^{-5})M^{0.82}$ (Akita et al., 1975). Измерения вязкости раствора ПГБ в хлороформе проводили при 30 °С.

Механические свойства полимера определяли на универсальном динамометре Инстрон 1121. Высекали образцы полимера в виде лопаток с длиной рабочей части 10 мм и толщиной 0.05 мм, скорость движения траверсы — 5 мм/мин. Испытания проводили при 20 °С.

Подготовку образцов к испытаниям их биостойкости и сами испытания проводили в соответствии с ГОСТом 9.048—89. Для заражения ПГБ использовали суспензию 9 видов грибов в соответствии с ГОСТами 9.048—89 и 9.049—91 для полимерных и технических материалов (табл. 1). По данным литературы (Мирчинк, 1976; Maergaert et al., 1992; Matavulj, Molitoris, 1992; Savencova et al., 2000; Козловский и др., 1999), представители этих же родов способны к биодеградации ПГБ в почве.

Для максимального приближения условий лабораторных испытаний к естественным было признано целесообразным оценивать биостойкость тремя методами.

С помощью первого метода устанавливается грибостойкость материалов при отсутствии минеральных и органических загрязнений и производится оценка, является ли материал источником питания для развития грибов. На материал наносили суспензию грибных спор в воде.

С помощью второго метода устанавливали грибостойкость материалов в условиях, имитирующих минеральные загрязнения. На материал наносили суспензию спор в жидкой минеральной среде (среде Чапека—Докса без сахарозы).

Третьим методом устанавливали наличие способности у материалов подавлять или тормозить рост грибов (фунгицидные и фунгистатические свойства). На материал наносили суспензию спор в полной (с сахарозой) среде Чапека—Докса.

Контролем служили кусочки пленки ПГБ без нанесения на них грибных спор. Как контрольные, так и опытные образцы полимера помещали в термостат с температурой 29.5 °С и относительной влажностью воздуха 90 %. Испытание длилось 4 нед.

Грибостойкость оценивали по интенсивности развития грибов на поверхности материалов в соответствии с ГОСТом 9.048—89 визуально по 6-балльной системе: 0 — под микроскопом прорастания спор и конидий не видно; 1 — под микроскопом видны проросшие споры и незначительно развившийся мицелий; 2 — под микроскопом виден развившийся мицелий, возможно спороношение; 3 — невооруженным глазом мицелий и спороношение едва заметны, но отчетливо видны под микроскопом; 4 — невооружен-

Виды грибов, применяемые для биоиспытаний

Порядковый номер	Виды грибов	Применяют для испытаний по ГОСТам	
		9,048—89	9,049—91
1	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	+	+
2	<i>A. terreus</i> Thom	+	+
3	<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) Arnaud	+	-
4	<i>Chaetomium globosum</i> Kunze	-	+
5	<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier	+	+
6	<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	-	+
7	<i>P. funiculosum</i> Thom	+	+
8	<i>P. verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i> Westling	-	+
9	<i>Trichoderma viride</i> Pers.: Fr.	+	+

ным глазом отчетливо видно развитие грибов, покрывающее менее 25 % поверхности; 5 — невооруженным глазом отчетливо видно развитие грибов, покрывающее более 25 % поверхности.

Обсуждение результатов

Результаты испытаний биостойкости образцов представлены в табл. 2. Внешний вид образцов (форма, размер, цвет, наличие блеска с нижней стороны) спустя 4 нед от начала испытаний почти не изменился. Мицелиальный налет на опытных образцах был хорошо заметен визуально уже через 2 нед.

Согласно данным, приведенным в табл. 2, грибостойкость полимерной пленки поли-β-гидроксипутирата можно обозначить как ПГ₃₅₅, где первая, вторая и третья цифры обозначают стойкость материала к плесневым грибам по методам 1, 2 и 3 соответственно.

Так как интенсивность развития грибов на поверхности ПГБ-пленок по первому методу оценивается баллом 3, этот материал может быть признан негрибостойким в условиях, складывающихся при отсутствии любых загрязнений, т. е. полимер является достаточно хорошим источником питания для плесневых грибов. У спор большинства тест-культур грибов появились мицелиальные ростковые трубки и гифы, а у *Chaetomium globosum* и *Paecilomyces variotii* сформировалось спороношение.

Еще менее грибостойким этот полимер оказался в условиях минерального загрязнения (5 баллов по второму методу). В условиях минерального загрязнения проросли все споры тест-грибов и появился хорошо развитый мицелий. У *P. variotii*, *Aspergillus terreus* и *Aureobasidium pullulans* сформировалось спороношение.

Фунгицидный эффект у полимера ПГБ при взаимодействии с плесневыми грибами отсутствует (5 баллов по третьему методу). Поверхность ПГБ-пленки при минеральном и органическом загрязнении еще более интенсивно (по сравнению с испытанием по методу 2) обрастает мицелием. Спороношение отмечено у тех же видов грибов.

Находясь в условиях, аналогичных для опытных образцов, контрольные образцы полимера ПГБ самопроизвольно инфицировались спорами грибов, которые, как правило, присутствуют в воздухе помещений, и степень их обрастания получила оценку 2 балла. При этом обнаружено спороношение *Penicillium* sp.

Данные ММ и механических свойств полимера при разных методах оценки биостойкости представлены в табл. 3. Средневязкостная ММ полимера за 4 нед снижалась примерно на 100 кДа по сравнению с ММ исходной пленки (633 кДа) и составляла от 505 до 527 кДа. Возможно, основной причиной снижения ММ следует считать не столько биodeградацию, сколько гидролиз полимерного материала под воздействием температуры и влажности, так как во всех вариантах опыта потери веса пленки при этом незна-

Оценка биостойкости пленки из ПГБ по интенсивности развития плесневых грибов на ней через 4 нед

Метод испытаний	Оценка интенсивности развития плесневых грибов, балл	Заключение
1	3	Материал содержит достаточное количество питательных веществ, благоприятствующих развитию используемых грибов
2	5	Материал не обладает сопротивлением к поражению плесневыми грибами и содержит питательные вещества, способствующие развитию грибов при наличии минеральных загрязнений
3	5	Фунгицидный эффект отсутствует
Контроль	2	Материал содержит питательные вещества, которые обеспечивают незначительное развитие спонтанной микрофлоры

Примечание. Приведен средний балл, полученный для трех из пяти максимальных значений.

чительны (не более 3 %). Что касается механических свойств, то наибольшие изменения по сравнению с исходной пленкой отмечены там, где проведено испытание по методу 2: напряжение при разрыве возросло с 22.4 до 27.5 мПа, удлинение при разрыве уменьшилось с 4.0 до 2.9 %, значение модуля упругости возросло с 1660 до 2340 мПа. Изменение механических свойств и особенно увеличение жесткости (повышение модуля упругости) при испытании по методам 2 и 3 говорит о нарушении внутренней структуры полимера. Возможно, это связано с уменьшением доли аморфной фазы, которая подвергается деструкции в первую очередь.

Таким образом показано, что пленка из полигидроксibuтирата не проявляет фунгицидных свойств, не обладает сопротивлением к поражению плесневыми грибами и является благоприятным субстратом для их развития (при заражении по методу 1, т. е. при отсутствии загрязнений, степень развития грибов уже через 2 нед составила 3 балла); наличие минеральных и органических загрязнений стимулирует развитие грибов на пленках ПГБ (при заражении по методам 2 и 3 степень развития грибов — 5 баллов). ММ полимера менялась незначительно: к концу биоиспытания она снижалась от 633 до 510 кДа. В процессе биоразрушения отмечены изменения механических свойств полимерной пленки. Так, модуль упругости повышался от 1660 до 2340 мПа, что говорит об увеличении жесткости и нарушении внутренней структуры полимера. Не последнюю роль в этом играют влажность и температура окружающей среды.

Таблица 3

Механические свойства пленки ПГБ при разных методах оценки биостойкости

Материал	Метод оценки биостойкости	Средневязкостная молекулярная масса, кДа	Напряжение при разрыве, мПа	Удлинение при разрыве, %	Модуль упругости, мПа
Исходная пленка до испытания	—	633	22.4	4.0	1660
Пленка после испытания по методам	1	515	23.4	3.9	1635
	2	527	27.5	2.9	2340
	3	510	22.1	4.0	1838
Контрольная пленка (находилась только при повышенной влажности)	—	505	20.8	3.9	1736

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бонарцева Г. А., Мышкина В. Л., Николаева Д. А., Ребров А. В., Герасин В. А., Махина Т. К. Биодegradация поли- β -оксибутирата в модельных условиях почвенного сообщества: влияние условий среды на скорость процесса и физико-механические характеристики полимера // *Микробиология*. 2002. В печати.

ГОСТ 9.048—49 ЕСЗКС. Изделия технические. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов.

ГОСТ 9.049—91 ЕСЗКС. Материалы полимерные и их компоненты. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов.

Козловский А. Г., Желифонова В. П., Винокурова Н. Г., Антипова Т. В., Иванушкина Н. Е. Изучение биодegradации полигидроксибутирата микроскопическими грибами // *Микробиология*. 1999. Т. 68, № 3. С. 340—346.

Мирчинк Т. Г. Почвенная микология. М.: Изд-во МГУ, 1976. 205 с.

Akita S., Einaga Y., Miyaki Y., Fujita H. Solution properties of poly(D- β -hydroxybutyrate) // *Macromolecules*. 1975. Vol. 9. P. 774—780.

Lopez-Llorca L. V., Colom M. F., Gascon A. F. A study of biodegradation of poly- β -hydroxyalkanoate (PHA) films in soil using scanning electron microscopy // *Micron*. 1993. Vol. 24, N 1. P. 23—29.

Maergaert J., Anderson C., Wouters A., Swings J., Kersters K. Biodegradation of polyhydroxyalkanoates // *FEMS Microbiol. Rev.* 1992. Vol. 103. P. 317—322.

Mataulj M., Molitoris H. P. Fungal degradation of polyhydroxyalkanoates and a semiquantitative assay for screening their degradation by terrestrial fungi // *FEMS Microbiol. Rev.* 1992. Vol. 103. P. 323—332.

Oda Y., Asari H., Urakami T., Tonomura K. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and polycaprolactone by filamentous fungi // *J. Ferment. Bioengineering*. 1995. Vol. 80, N 3. P. 265—269.

Savencova L., Gercberga Z., Nikolaeva V., Dzene A., Bibers J., Kalnin M. Mechanical properties and biodegradation characteristics of PHB-based film // *Proc. Biochem.* 2000. Vol. 35. P. 573—579.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН
Институт нефтехимического синтеза им. А. В. Топчиева РАН
Москва

Поступила 21 V 2002

SUMMARY

The samples of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) with molecular weight 633 kDa were tested for fungicidity and resistance to fungi by estimating the growth rate of test fungi from the genera *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Chaetomium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Trichoderma* under optimal growth conditions. PHB film did not exhibit neither fungicide properties, nor the resistance to fungal damage, and served as a good substrate for fungal growth. Changes in molecular weight and mechanical properties of PHB film during biodegradation were studied.

Рецензент — И. В. Максимова