

ВЫДЕЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ, СПОСОБНЫХ К БИОДЕГРАДАЦИИ ПОЛИЛАКТИДОВ, И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА

Повсеместное использование синтетических полимеров вызвало экологическую проблему мирового масштаба, решением которой стали биоразлагаемые полимеры, подвергающиеся быстрой деструкции под влиянием факторов окружающей среды и микроорганизмов. Примером подобных материалов являются высокомолекулярные полимеры молочной кислоты – полилактиды (PLA).

Целью настоящего исследования являлось выделение микроорганизмов, способных к биоразложению полилактидов, и их характеристика. Планируется использовать данные микроорганизмы в качестве модельных систем при дизайне модифицированных полилактидов с управляемым сроком биodeградации.

Для выделения микроорганизмов, способных к использованию полилактидов в качестве субстратов – источников углерода и энергии, в ходе которого и происходит наиболее интенсивная деградация полимеров, использовали несколько подходов, в основу которых положены следующие принципы: способные к деградации полимеров микроорганизмы всегда прочно прикрепляются к поверхности субстрата, что упрощает их выделение; основным селективным фактором для выделения PLA-деградирующих микроорганизмов является применение синтетической среды, в которой PLA служат единственными источниками углерода и энергии; необходимо в среду вводить индукторы протеаз, поскольку они являются основными ферментами, обуславливающими разложение PLA; полилактид-деградирующие микроорганизмы образуют зоны на среде с эмульсией PLA [1, 2].

В соответствии с названными принципами, при выделении PLA-деградирующих микроорганизмов использовали 3 основных подхода:

- 1) метод биообрастания PLA-пленок в почве в лабораторных условиях и в плодородной почве в естественных местообитаниях;
- 2) суспензионный приливно-отливной метод в инокулированной пробой почвы синтетической среде с PLA-пленками;
- 3) метод высева культуральной жидкости (КЖ) на синтетическую среду с эмульсией PLA;

В методе биообрастания PLA-пленок в лабораторных условиях пробы почвы вносили в стерильные чашки Петри, фрагменты PLA-пленок углубляли в почву и оставляли для биообрастания на 7 суток.

Одновременно другие фрагменты PLA-пленок помещали в почву в нескольких населенных пунктах Минского района и выдерживали в течение 1 месяца. По истечению этих сроков пленки помещали на разные по составу агаризованные среды, получали реплики потомков прочно удерживающихся на поверхности пленок клеток. В результате в виде чистых культур удалось получить 41 штамм бактерий, из которых 15 отобраны с помощью метода биообрастания в лабораторных условиях и 26 – с помощью аналогичного метода в естественных местообитаниях. Среди изолятов преобладали грамположительные палочковидные бактерии, способные к спорообразованию.

Суспензионный приливно-отливной метод позволил культивировать суспензии при разной температуре (30°C и 50°C). Это особенно важно, так как среди встречающихся в природе полилактид-деградирующих микроорганизмов присутствуют термофилы. Также этот метод дал возможность использовать желатин в качестве индуктора протеаз. На рисунке 1 представлена схема проведения суспензионного приливно-отливного метода.

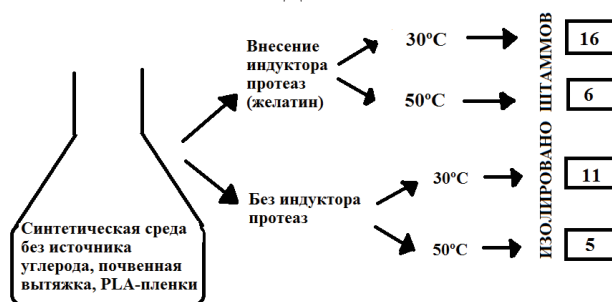


Рисунок 1 - Схема проведения приливно-отливного метода

Как и в предыдущем исследовании среди изолятов преобладали палочковидные бактерии, способные к спорообразованию.

Метод высева КЖ на синтетическую среду с эмульсией PLA особенен тем, что полилактид-деградирующие микроорганизмы образуют прозрачные зоны на мутной среде [1]. Причем PLA-эмульсия является единственным источником углерода и энергии для микроорганизмов. В отличие от предыдущих исследований при использовании этого метода можно точно утверждать способен ли тот или иной изолят деградировать полилактиды. При этом преследовались две цели:

1. Выделить полилактид-деградирующие микроорганизмы;
2. Подтвердить или опровергнуть способность выделенных ранее изолятов утилизировать полилактиды.

Почвенную суспензию высевали на синтетическую среду с эмульсией PLA, которая стала доступной для опытов лишь в самом конце исследований. Удалось выделить 5 штаммов, клетки которых

образуют гало на синтетической среде с PLA-эмульсией. На рисунке 2 приведены фотографии колоний бактерий трех выделенных штаммов:

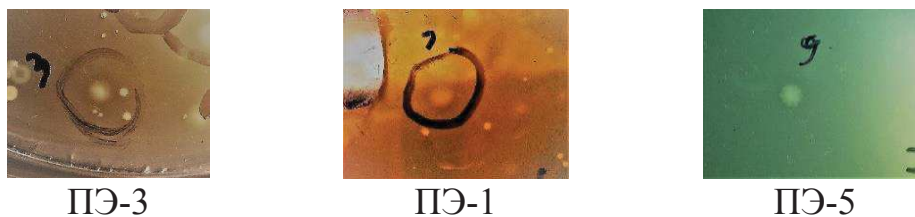


Рисунок 2 – Штаммы, клетки которых образуют гало на синтетической среде с эмульсией PLA

Обнаружено, что из 79 штаммов бактерий, выделенных в результате реализации первых двух методов, только 1 изолят обладал способностью образовывать гало на среде с эмульсией PLA.

Все 6 штаммов охарактеризованы с морфологической точки зрения. На рисунке 3 приведены микрофотографии клеток изолятов:

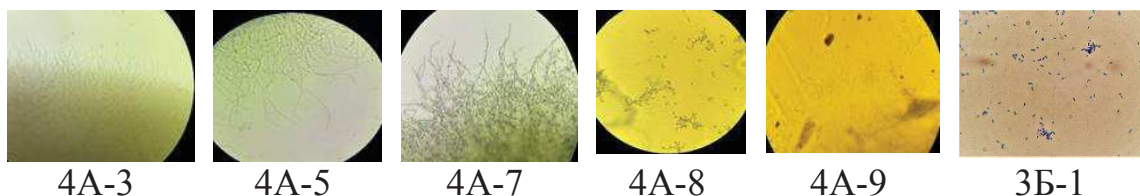


Рисунок 3 – Морфология клеток полилактид-деградирующих бактерий

Из шести отобранных изолятов 5 штаммов обладают способностью формировать субстратный, воздушный мицелий и спораносцы, что позволило отнести их к актиномицетам. Штамм 3B-1 представлен одиночными грамтрицательными палочковидными бактериями.

Установлено, что один из изолятов проявляет повышенную активность на синтетической среде с PLA-эмульсией, образуя гало через 12 дней культивирования, что делает его более перспективным при оценке скорости разложения полилактидов.

Выделенные бактерии будут использованы при разработке метода определения скорости разложения полилактидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pranamuda H, Tokiwa Yu. Polylactide Degradation by an Amycolatopsis sp. / Pranamuda H, Tokiwa Yu, Tanaka H. // Applied And Environmental Microbiology – 1997. - P. 1637–1640.

2. Pranamuda H, Tokiwa Yu. Microbial Degradation of an Aliphatic Polyester with a High Melting Point, Poly(Tetramethylene Succinate). / Pranamuda H, Tokiwa Yu, Tanaka H. // Applied And Environmental Microbiology – 1995. - P. 1828–1832.