

**БИОРАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ
ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ В ПОЧВАХ
РАЗЛИЧНЫХ КЛИМАТИЧЕСКИХ ЗОН**

Киселева О.П.

научный руководитель д-р биол. наук Прудникова С. В.

Сибирский федеральный университет

Одним из путей решения экологической проблемы утилизации и переработки полимерных отходов является получение экологически чистых биоразлагаемых материалов. Конструирование биополимеров за последние десять лет превратилось в одно из основных междисциплинарных исследований. В качестве полимеров такого типа широкое применение находят полигидроксиалканоаты (ПГА) – полиэфиры микробиологического происхождения, синтезируемые бактериями эндогенно в качестве запасаемого источника углерода и энергии. Биологическая деградация ПГА осуществляется под воздействием деполимеризующих ферментов, продуцируемых микроорганизмами, которые используют продукты расщепления полимеров в качестве субстрата для роста. Среди эффективных деструкторов ПГА из различных местообитаний выделяются как бактерии, так и микроскопические грибы, относящиеся к широко распространенным почвенным и водным представителям. С ростом перспектив применения ПГА все большую актуальность приобретает исследование закономерностей разрушаемости ПГА в естественных природных условиях.

Целью настоящей работы являлось выделение почвенных бактерий-деструкторов ПГА, их общий количественный учет, а также идентификация.

Бактерии были выявлены из почв различных климатических зон: в условиях умеренно континентального климата (дендрарий Института леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения РАН, г. Красноярск), а также в условиях резко континентального климата (Эвенкийский стационар Института леса имени В.Н. Сукачева Сибирского отделения РАН, п. Тура).

Использованные в работе полимеры были получены путем культивирования штамма водородных бактерий *Wautersia eutropha* ВКПМ-5786 по технологии Института биофизики СО РАН. Образцы ПГА экспонировали в течение полевого сезона 2012 года в период с 23 мая по 4 ноября на территории дендрария Института леса СО РАН им В.Н. Сукачева г. Красноярска. После экспозиции с поверхности полимеров выделяли микроорганизмы-деструкторы, высевая на питательную среду, содержащую ПГА в качестве источника углерода. Для идентификации бактерий-деструкторов исследовали культуральные, морфологические и физиолого-биохимические свойства стандартными методами. Определяли морфологию вегетативных клеток, спорообразование, подвижность, окраску по Граму, каталазную, оксидазную, амилазную, липазную, лецитиназную и протеазную активность. Способность к усвоению углеводов, образование кислоты и газа определяли на средах Гисса с глюкозой, лактозой, сахарозой, мальтозой и маннитом.

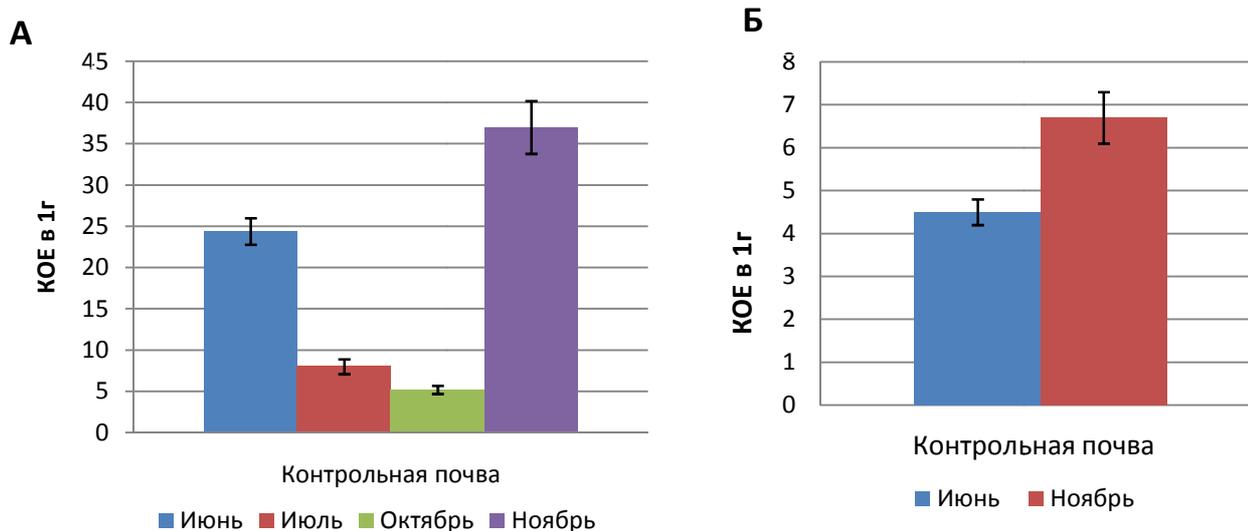


Рисунок 1 - А - Общее количество почвенных бактерий (РПА); Б - общее количество бактерий-деструкторов в начальной и конечной точке экспозиции (среда с полимером).

Микробиологический анализ показал (рис.1 – А), что в контрольной почве максимальная численность была зафиксирована в ноябре - 37×10^8 КОЕ, а в октябре – минимальная $5,2 \times 10^8$ КОЕ, что объясняется погодными условиями: осень была аномально теплой и влажной. Общее количество (рис.1 – Б) бактерий-деструкторов в конечной точке эксперимента, по сравнению с начальной, значительно не увеличилось и составило $6,7 \times 10^8$ КОЕ.

В работе было проанализировано 13 штаммов бактерий и 3 штамма актиномицетов, проявляющих способность к деструкции ПГА. Из них 3 штамма формировали субстратный и разветвленный вегетативный мицелий и гифы, распадающиеся на фрагменты. Эти микроорганизмы были отнесены к роду *Nocardioides*. Первое место по численности (7 штаммов) заняли аэробные грамположительные палочки, образующие эндоспores. Они характеризовались каталазной и оксидазной активностью, и были определены как представители рода *Bacillus* (рис.2).

Также были обнаружены грамотрицательные палочки (3 штамма), которые по совокупности культуральных, морфологических и физиолого-биохимических свойств были идентифицированы как *Pseudomonas sp.*, *Rhizobium sp.* и *Acinetobacter sp.*

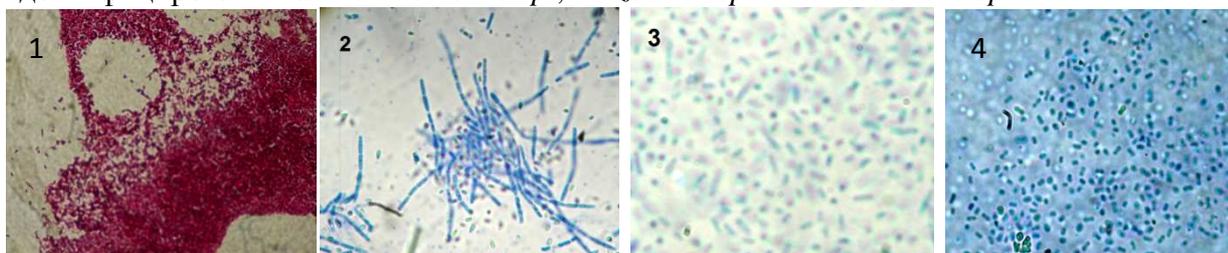


Рисунок 2 – Морфология бактерий-деструкторов ПГА;
1 – *Nocardioides sp.*, 2 – *Bacillus sp.*, 3 – *Pseudomonas sp.*, 4 – *Acinetobacter sp.*

На территории Эвенкийского стационара Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (п. Тура) исследовали образцы криогенных почв верхнего горизонта (0-10 см) лиственничников Центральной Сибири. Выделение штаммов-деструкторов ПГА осуществляли путем посева на среду с полимером. При идентификации бактериальных изолятов деструкторов проводили сравнительный анализ их морфологических, культуральных, биохимических свойств.

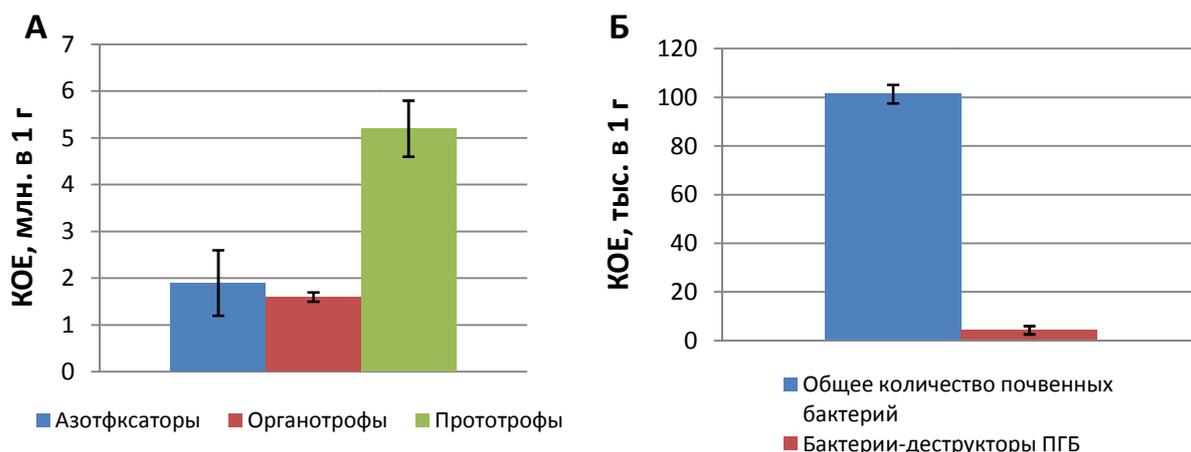


Рисунок 3 – А - Общее количество почвенных бактерий Эвенкийского стационара; Б – Соотношение численности почвенных бактерий Эвенкийского стационара (среда с полимером).

Среди выделенных бактерий (рис.3 – А) преобладали представители группы прототрофов - $5,2 \times 10^6$ КОЕ, а самой малочисленной группой оказались органотрофы – $1,6 \times 10^6$ КОЕ. Коэффициент минерализации составил 3,25, что свидетельствует о сложившемся почвенном микробиоценозе и зрелости почвенного покрова. Было показано (рис.3 – Б), что доля истинных деструкторов, обладающих ферментами ПГБ-деполимеразами, составляет 4,3 % от общей численности бактерий на среде с полимером.

В чистую культуру были выделены 13 изолятов бактерий и 2 изолята актиномицетов, обладающих гидролитической активностью по отношению к полимеру. Из них предположительно 11 штаммов относятся к роду *Bacillus* и 1 штамм к роду *Corynebacterium*. Также были выделены грамотрицательные палочки.

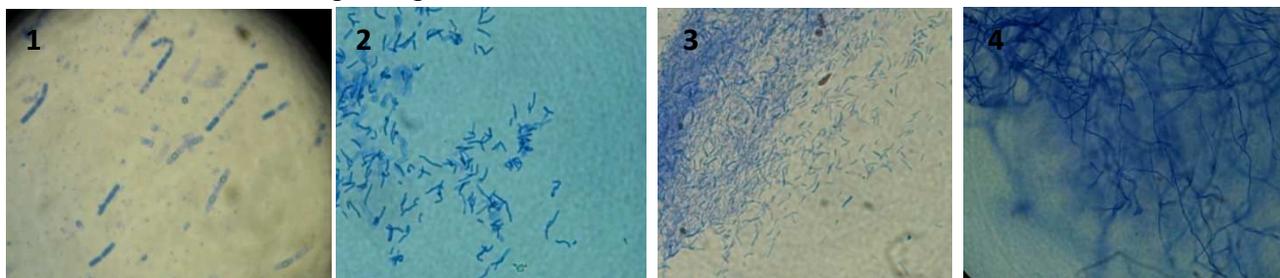


Рисунок 4 – Морфология штаммов-деструкторов ПГБ Эвенкийской почвы; 1 – *Bacillus* sp; 2 – *Corynebacterium*; 3 – Грамотрицательные палочки, 4 – Актинобактерии.

В ходе эксперимента было установлено, что наиболее высоким видовым разнообразием, а также численностью бактерий характеризуются почвы умеренно-континентального климата г. Красноярска. В них были обнаружены представители таких родов как *Nocardioides*, *Bacillus*, *Pseudomona*, *Rhizobium* и *Acinetobacter*. Наиболее распространенными деструкторами являются бактерии рода *Bacillus*, они были выявлены из почв обоих климатических регионов.