

КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

ОСОБЕННОСТИ ДЕСТРУКЦИИ ПОЛИЛАКТИДА В ПРИСУТСТВИИ
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *BACILLUS*

© 2023 г. В. В. Миронов^а, *, Е. С. Трофимчук^б, В. В. Острикова^а, А. В. Плуталова^б,
М. А. Москвина^б, А. А. Щелушкина^а, Е. В. Черникова^б, Д. Ш. Соколова^а

^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

^бХимический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: 7390530@gmail.com

Поступила в редакцию 25.04.2023 г.

После доработки 10.05.2023 г.

Принята к публикации 11.05.2023 г.

В работе показано, что микроорганизмы рода *Bacillus* по-разному воздействуют на деструкцию упаковочного материала из полилактида. Деструкцию проводили на агаризованной среде при температуре 55°C и pH 5.9 в течение 14 сут. Впервые обнаружено, что при инкубации с культурой *B. licheniformis* S8 абиотический гидролиз значительно замедляется и проходит параллельно с основным – ферментативным с последовательным отщеплением мономерных звеньев от конца макромолекулы и образованием низкомолекулярных продуктов, используемых микроорганизмами в качестве субстрата, что способствует уменьшению массы полилактида на 5.1% при сохранении его молекулярной массы и снижении дисперсности молекулярных масс. В присутствии бактерий *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii* и *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* масса полимера не снижалась, однако значительно уменьшалась молекулярная масса, как при абиотическом гидролизе.

Ключевые слова: полилактид, биодеструкция, масса образца, молекулярная масса, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*

DOI: 10.31857/S0026365623600207, EDN: QOBSIK

Одним из решений глобальной угрозы загрязнения окружающей среды отходами с содержанием пластиков является замена трудноразлагаемых пластиков на биоразлагаемые из возобновляемых ресурсов (Ivleva et al., 2021). Среди таких полимеров особое внимание привлекает полилактид (ПЛ), который способен разлагаться как в окружающей среде, так и в условиях промышленного компостирования (Kale et al., 2007; Hosni et al., 2019; Миронов и соавт., 2022). Однако механизмы разложения ПЛ и роль микроорганизмов в его деградации при компостировании остаются малоизученными (Karamanlioglu et al., 2017). Считается, что микроорганизмы способны активно подключаться к разложению ПЛ только после его предварительной частичной деструкции в результате химического (абиотического) гидролиза или окисления до молекулярной массы примерно 10 кДа и ниже, т.е. когда полимер становится водорастворимым (Husárová et al., 2014). Однако в некоторых работах описано, что экзоферменты, которые выделяют микроорганизмы, могут влиять на разложение высокомолекулярного ПЛ, что сопровождается потерей массы полимера (Lee et al., 2016; Stepczyńska et al., 2018; Richert et al., 2021).

Опубликован ряд работ, посвященных микроорганизмам, вызывающим ферментативную деструкцию ПЛ. Способность разлагать ПЛ выявлена у некоторых представителей рода *Bacillus* (Yuan et al., 2020). Ранее нами было показано, что семейство *Bacillaceae*, включая бактерии рода *Bacillus*, является одним из основных в прокариотическом сообществе микроорганизмов компостируемых органических отходов в термофильной стадии, составляя 16–44% (Mironov et al., 2021a, 2021b). Ферменты, участвующие в деструкции ПЛ, принадлежат к классу гидролаз. К ним относятся, например, протеаза (*B. amyloliquefaciens*), эстераза и алкалаза (*B. licheniformis*) (Prema et al., 2014, 2015; Lee et al., 2016). Значительное влияние на биоразложение оказывают температура и pH среды (Jong et al., 2001; Mitchell et al., 2015). Скорость деструкции ПЛ значительно возрастает при достижении температуры стеклования этого полимера (~60°C) и pH ~ 12. Однако вопрос, связанный с определением роли ферментативного гидролиза при участии активных микроорганизмов в разложении ПЛ при повышенной температуре, остается дискуссионным.

Цель работы заключается в определении роли биоразложения на начальных стадиях гидролитической деструкции ПЛ в присутствии четырех чистых культур рода *Bacillus*, выделяющих экзоферменты класса гидролаз, которые могут проявлять каталитическую активность в гидролизе ПЛ.

Для исследования были выбраны микроорганизмы *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*, выделенные нами ранее из компостируемых органических отходов, и штамм *B. licheniformis* S8, выделенный сотрудниками лаборатории нефтяной микробиологии из рассолов соленого озера Эльтон (Волгоградская обл.) (Соколова, 2013). Посев культур бактерий производили на плотной агаризованной среде в чашках Петри (триптон — 1 г л^{-1} , дрожжевой экстракт — 2.5 г л^{-1} , глюкоза — 1 г л^{-1} , агар — 1.5%; pH 5.9). На каждую чашку помещали по три пленки ПЛ. Предварительно пленки взвешивали и обеззараживали спиртом. В качестве контрольных были использованы варианты с добавлением в чашки Петри стерильной дистиллированной воды. Пленки инкубировали при 55°C в течение 14 сут. В работе использовали образцы аморфных пленок ПЛ (средняя молекулярная масса M_n 76 кДа, дисперсия молекулярных масс D_M 2.2; температуры: стеклования $T_{\text{ст}}$ 63°C , кристаллизации $T_{\text{крист}}$ 119°C , плавления $T_{\text{пл}}$ 149°C ; концентрация воды в объеме ПЛ 1.2 мас. %) размером 5×5 (± 1) мм и толщиной 200 (± 5) мкм, вырезанные из промышленного изделия (прозрачный лоток, производитель — компания “NatureWorks”, США). Средние молекулярные массы полимеров определяли методом гелъпроникающей хроматографии (ГПХ) на хроматографе 1260 Infinity II GPC/SEC Multidetector System (“Agilent”, США), оснащенном рефрактометрическим и вискозиметрическим детекторами, а также детектором светорассеяния и двумя колонками PLgel 5 μm MIXED B. В качестве растворителя использовали тетрагидрофуран. Молекулярные массы определяли по калибровочной кривой с использованием узкодисперсных стандартов ПММА ($M = 5 \times 10^2$ – 1×10^7). Оценку потери массы образцов ПЛ проводили гравиметрически с помощью аналитических весов Pioneer PX224 (“OHAUS”, Китай). Морфологию ПЛ изучали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на микроскопе Jeol JSM-IT200 (“JEOL”, Япония) в ЦКП “Коллекция UNIQEM” ФИЦ Биотехнологии РАН при ускоряющем напряжении 15 кВ. Предварительно образцы напыляли слоем золота толщиной 25 нм на установке IB-3 (“Eiko”, Япония). Данные обрабатывали методом дисперсионного анализа при уровне значимости $p < 0.05$ с использованием пакета Microsoft Excel 2010 (“Microsoft”, США). Коэффициенты Стьюдента были

определены для доверительной вероятности $\alpha = 0.95$.

В наших опытах после инкубации с культурой *B. licheniformis* S8 наблюдалось уменьшение дисперсности молекулярных масс ПЛ от 2.2 до 1.85, что указывает на некоторое уменьшение разброса макромолекул по молекулярным массам, при этом M_n практически не изменялась — на 8% при ошибке метода ГПХ 5%. Однако в случае использования культур *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* происходило существенное уменьшение молекулярной массы ПЛ: M_n менялась от 76 до 35 кДа, а дисперсность по молекулярным массам сохранялась на том же уровне. Очевидно, что механизм разложения ПЛ в присутствии различных представителей рода *Bacillus* различался. Гравиметрический анализ показал, что под действием культуры *B. licheniformis* S8 масса пленок полимера уменьшилась на $5.07 \pm 0.04\%$, а под действием остальных культур изменение массы образцов не обнаружено. Воздействие микроорганизмов на пленки исследовали методом СЭМ. Во всех вариантах инкубации с культурами поры на поверхностях образцов были немногочисленны, но на них присутствовали микроорганизмы и продукты их жизнедеятельности (рис. 1, в1–е1), особенно заметные в случае культур *B. amyloliquefaciens* (рис. 1, г1), *B. subtilis* subsp. *spizizenii* (рис. 1, д1) и *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* (рис. 1, е1). Вероятнее всего, бактерии прикреплялись на поверхность пленки, а их гидролитически активные ферменты проникали через поры в объем полимера вместе с водой, ускоряя процессы разложения. Микроскопия сколов образцов показывает, что в объеме ПЛ после инкубации с культурами наблюдалось большое количество пор $(1.8\text{--}7.4) \times 10^4 \text{ мм}^{-2}$ с размерами 0.15–1.6 мкм (рис. 1, в2–е2; табл. 1). Распределения образовавшихся пор по размерам для каждого случая представлены на рис. 1 (в3–е3).

В качестве контрольного эксперимента пленку ПЛ помещали в стерильную дистиллированную воду при 55°C на 14 сут. В этом случае масса пленки не изменялась, но в то же время M_n снижалась с 76 до 29 кДа. На микрофотографиях видно, что и в этих условиях образовывались поры субмикронного уровня на поверхности (рис. 1, б1) и в объеме (рис. 1, б2) полимера, концентрация которых составляла $1.1 \times 10^5 \text{ мм}^{-2}$ (табл. 1). Эти результаты свидетельствуют о протекании достаточно активного химического (абиотического) гидролиза ПЛ со статистическим разрывом цепей и понижением температуры стеклования полимера. При этом снижение молекулярной массы ПЛ, а также концентрация образовавшихся в объеме пор в контроле с водой значительно, чем с культурами *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*

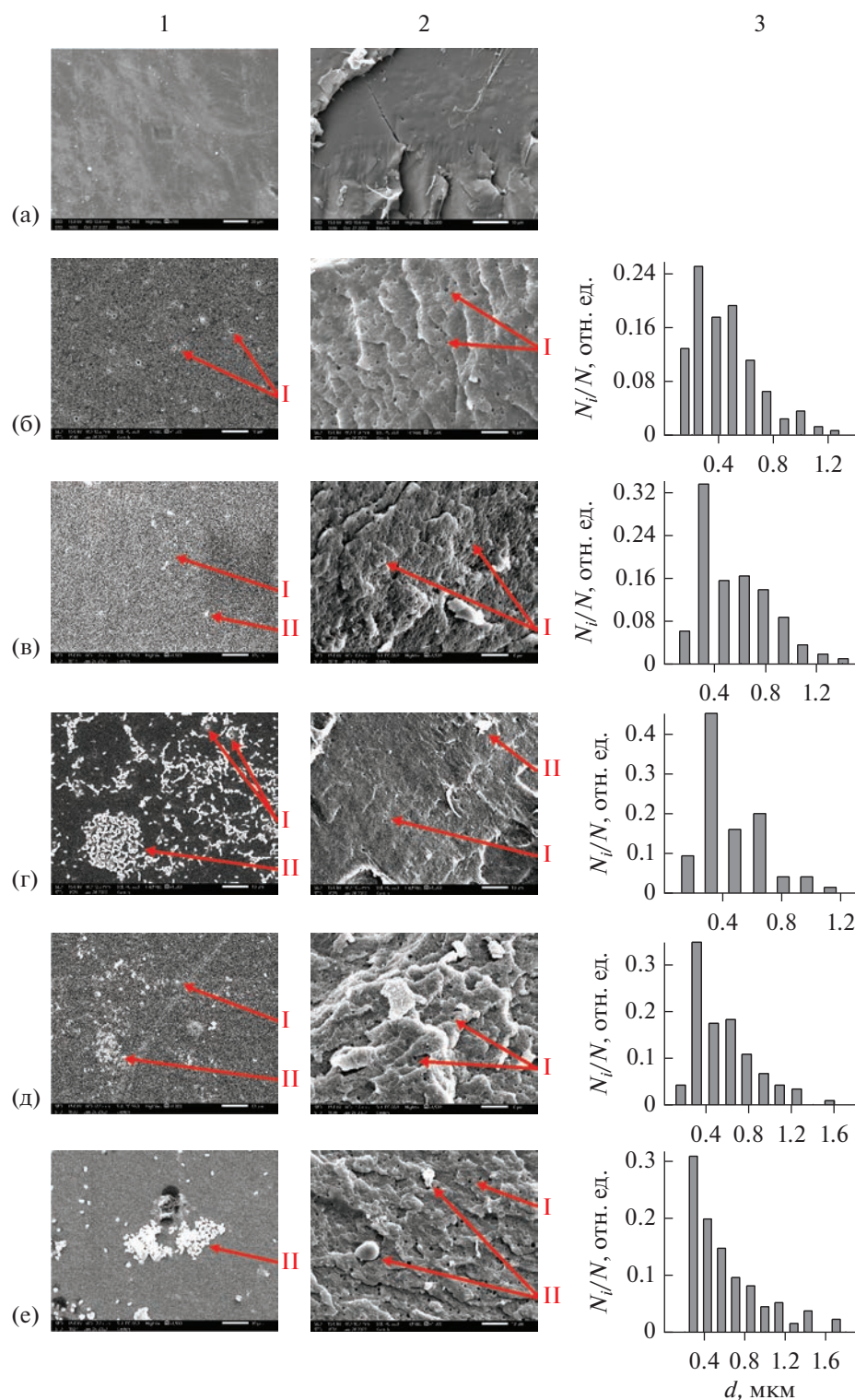


Рис. 1. СЭМ микрофотографии поверхности (1), скола (2) образцов ПЛ и распределение пор по размерам в объеме (3): исходный (а), контроль с водой (б) и после инкубации с *B. licheniformis* S8 (в), *B. amyloliquefaciens* (г), *B. subtilis* subsp. *spizizenii* (д) и *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* (е). I – поры; II – клетки микроорганизмов и продукты их жизнедеятельности; d – диаметр пор, мкм; N_i/N – отношение количества пор i -го диаметра к общему количеству пор.

Таблица 1. Характеристики образцов ПЛ после их выдерживания при 55°C в течение 14 сут в присутствии различных микроорганизмов

Условия	Потеря массы, %	Молекулярно-массовые характеристики		Параметры пористой структуры	
		M_n , кДа	$\bar{D}_M$	d_{cp} , мкм	количество пор на 1 мм ²
Образец без обработки	—	76	2.2	—	—
H ₂ O, стерильная	0	29	1.94	0.44	1.1×10^5
Агар, <i>B. licheniformis</i> S8	5.1	67	1.86	0.55	4.8×10^4
Агар, <i>B. amyloliquefaciens</i>	0	35	2.07	0.45	1.8×10^4
Агар, <i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	0	38	1.94	0.56	5.2×10^4
Агар, <i>B. subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	0	Нд	Нд	0.61	7.4×10^4

subsp. *inaquosorum* и *B. subtilis* subsp. *spizizenii*. Ранее в работе Pantani et al. (2016) было доказано, что вода диффундировала в объем образца и, действуя как пластификатор, понижала температуру стеклования полимера. Подвижность сегментов макромолекул возрастала, что приводило к кристаллизации ПЛ, увеличению концентрации воды в его аморфных областях и ускорению абиотического гидролиза.

В работах Zaaba et al. (2020) и Jong et al. (2001) показано, что деструкция ПЛ с разрывом сложноэфирной связи основной цепи может проходить по двух механизмам: (i) быстро, с последовательным отщеплением мономерных звеньев от конца макромолекулы или (ii) медленно, случайным образом со статистическим разрывом цепей ПЛ. В первом случае средняя молекулярная масса практически не изменяется, а во втором — она снижается в ходе эксперимента. Известно (Belbella et al., 1996), что в случае абиотического гидролиза деполимеризация с отщеплением концевых групп, как правило, протекает в щелочных (при pH 9 и выше) или в очень кислых средах (pH ниже 2); в этих условиях происходит значимое уменьшение массы полимерного образца при мало изменяющейся молекулярной массе. Такие процессы по механизму (i) обычно протекают достаточно быстро (по крайней мере, быстрее, чем статистический разрыв). В других условиях (в нейтральной и слабокислой средах) масса образца обычно долго остается постоянной, а его молекулярная масса начинает достаточно быстро уменьшаться, что соответствует механизму (ii). Важно отметить, что при реализации механизма (ii) скорость деструкции в объеме может увеличиваться в результате накопления кислых продуктов реакции и автокатализа, чего не происходит в щелочных средах. Поэтому для механизма (i) скорость гидролитиче-

ской деструкции на поверхности гораздо выше, чем в объеме (условия для поверхностной эрозии), а для механизма (ii), напротив, скорость в объеме, как правило, выше.

Среда, использованная в данном эксперименте, имеет pH 5.9, что, по данным Schliecker et al. (2003), не оказывает существенного влияния на скорость разложения ПЛ по сравнению с нейтральной средой (контроль в воде). Однако в присутствии *B. licheniformis* S8 реализуется механизм (i), что, вероятно, указывает на биоразложение высокомолекулярного ПЛ уже на начальном этапе деструкции. Важным остается вопрос, почему не происходит деструкции полимера по механизмам (i) и (ii) одновременно. Вероятно, скорости этих реакций различаются по крайней мере на порядок, поэтому при начале деструкции по механизму (i) протеканием второй реакции можно пренебречь. Также нужно учитывать небольшую концентрацию воды (1.2 мас. %), которая содержится в объеме гидрофобного ПЛ. Поскольку одна молекула воды разрывает одну сложноэфирную связь, то есть выбор — оторвать концевую группу (деполимеризация) или в центре макромолекулы (статистический разрыв). Если есть условия для быстрой деполимеризации, например, с участием эстеразы *B. licheniformis* (Prema et al., 2015), тогда молекулы воды в основном будут тратиться на этот механизм, а на статистический разрыв полимера молекул воды будет расходоваться небольшое количество. В то же время, процесс деполимеризации макромолекул с образованием низкомолекулярных продуктов на поверхности, где воды достаточно, протекает быстро, что приводит к поверхностной эрозии и уменьшению массы образца за счет использования микроорганизмами низкомолекулярных продуктов в качестве субстрата. Таким образом,

установлено, что при инкубации с культурой *B. licheniformis* S8 вероятность протекания абиотического гидролиза значительно снижается и проходит параллельно с основным — ферментативным по механизму (i) с последовательным отщеплением мономерных звеньев от конца макромолекулы и образованием низкомолекулярных продуктов, используемых микроорганизмами в качестве субстрата.

Инкубация ПЛ с культурами *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* не сопровождалась потерей массы пленок, однако молекулярная масса полимера заметно падала, а также изменялась морфология поверхности и сколов пленок. Можно предположить, что в этом случае деструкция проходила по механизму (ii) со случайным разрывом цепей ПЛ по всему объему полимерной пленки. Данные результаты свидетельствуют о протекании абиотического гидролиза, как и в экспериментах с водой. Причина снижения скорости биоразложения заключается в постепенном уменьшении массовой доли воды в среде за счет испарения. Вероятно, биоразложение в данном случае начинается после значительного уменьшения молекулярной массы ПЛ.

Таким образом, в работе впервые установлено наличие микробной деструкции ПЛ на начальных стадиях деструкции без стадии предварительного уменьшения молекулярной массы полимера (*B. licheniformis* S8). Показано, что мезофильные микроорганизмы *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii* и *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* не способны разлагать ПЛ при повышенной температуре на начальных стадиях процесса. Полученные результаты способствуют лучшему пониманию механизмов микробной деструкции и целенаправленному выбору штаммов микроорганизмов-деструкторов ПЛ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00237, <https://rscf.ru/project/23-24-00237/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Миронов В.В., Трофимчук Е.С., Загустина Н.А., Иванова О.А., Вантеева А.В., Бочкова Е.А., Острикова В.В., Чжан Ш. Твердофазная биодegradация полилактида (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. С. 537–550.
- Mironov V.V., Trofimchuk E.S., Zagustina N.A., Ivanova O.A., Vanteeva A.V., Bochkova E.A., Ostrikova V.V., Zhang S. Solid-phase biodegradation of polylactide (review) // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. P. 537–550.
- Соколова Д.Ш. Образование биоэмульгаторов и поверхностно-активных веществ галотолерантными и термотолерантными штаммами *Bacillus licheniformis* S10 и S8 // Материалы Седьмого московского межд. конгресса “Биотехнология: состояние и перспективы развития”. Москва. 19–22.03.2013. Ч. 2. С. 206.
- Belbella A., Vauthier Ch., Fessi H., Devissaguet J.-Ph., Pui-sieux F. In vitro degradation of nanospheres from poly(D,L-lactides) of different molecular weights and polydispersities // Int. J. Pharmaceut. 1996. V. 129. P. 95–102.
- Mironov V., Vanteeva A., Sokolova D., Merkel A., Nikolaev Y. Microbiota dynamics of mechanically separated organic fraction of municipal solid waste during composting // Microorganisms. 2021a. V. 9. Art. 1877.
- Mironov V., Vanteeva A., Merkel A. Microbiological activity during co-composting of food and agricultural waste for soil amendment // Agronomy. 2021b. V. 11. Art. 928.
- De Jong S., Arias E., Rijkers D., van Nostrum C., Bosch J.K.-V.D., Hennink W. New insights into the hydrolytic degradation of poly(lactic acid): Participation of the alcohol terminus // Polymer. 2001. V. 42. P. 2795–2802.
- Hosni A.S., Pittman J.K., Robson G.D. Microbial degradation of four biodegradable polymers in soil and compost demonstrating polycaprolactone as an ideal compostable plastic // Waste Manag. 2019. V. 97. P. 105–114.
- Husárová L., Pekárová S., Stloukal P., Kucharczyk P., Verney V., Commereuc S., Ramone A., Koutny M. Identification of important abiotic and biotic factors in the biodegradation of poly(l-lactic acid) // Int. J. Biol. Macromol. 2014. V. 71. P. 155–162.
- Ivleva N.P. Chemical analysis of microplastics and nanoplastics: challenges, advanced methods, and perspectives // Chem. Rev. 2021. V. 121. P. 11886–11936.
- Kale G., Auras R., Singh S.P. Comparison of the degradability of poly(lactide) packages in composting and ambient exposure conditions // Packag. Technol. Sci. 2007. V. 20. P. 49–70.
- Karamanlioglu M., Preziosi R., Robson G.D. Abiotic and biotic environmental degradation of the bioplastic polymer poly(lactic acid): a review // Polym. Degrad. Stab. 2017. V. 137. P. 122–130.
- Lee S.H., Yeo S.Y. Improvement of hydrophilicity of polylactic acid (PLA) fabrics by means of a proteolytic enzyme from *Bacillus licheniformis* // Fibers and Polymers. 2016. V. 17. P. 1154–1161.

- Mitchell M.K., Hirt D.E. Degradation of PLA fibers at elevated temperature and humidity // Polym. Eng. Sci. 2015. V. 55. P. 1652–1660.
- Prema S., Uma Maheswari Devi Palempalli. Degradation of polylactide film by depolymerase from *Bacillus amyloliquefaciens* // Int. J. Sci. Engin. Res. 2014. V. 5. P. 520–525.
- Prema S., Uma Maheswari Devi Palempalli. Degradation of polylactide plastic by PLA depolymerase isolated from thermophilic *Bacillus* // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2015. V. 4. P. 645–654.
- Pantani R., De Santis F., Auriemma F., De Rosa C., Di Girolamo R. Effects of water sorption on poly(lactic acid) // Polymer. 2016. V. 99. P. 130–139.
- Richert A., Dąbrowska G.B. Enzymatic degradation and bio-film formation during biodegradation of polylactide and polycaprolactone polymers in various environments // Int. J. Biol. Macromol. 2021. V. 176. P. 226–232.
- Schliecker G., Schmidt C., Fuchs S., Kissel T. Characterization of a homologous series of d,l-lactic acid oligomers; a mechanistic study on the degradation kinetics *in vitro* // Biomaterials. 2003. V. 24. P. 3835–3844.
- Stepczyńska M., Rytlewski P. Enzymatic degradation of flax-fibers reinforced polylactide // Int. Biodeterior. Biodegr. 2016. V. 126. P. 160–166.
- Yuan J., Ma J., Sun Y., Zhou T., Zhao Y., Yu F. Microbial degradation and other environmental aspects of microplastics/plastics // Sci. Total Environ. 2020. V. 715. Art. 136968.
- Zaaba N.F., Jaafar M. A review on degradation mechanisms of polylactic acid: hydrolytic, photodegradative, microbial, and enzymatic degradation // Polym. Eng. Sci. 2020. V. 60. P. 2061–2075.

Poly lactide Degradation in the Presence of Members of the Genus *Bacillus*

V. V. Mironov^{1, *}, E. S. Trofimchuk², V. V. Ostrikova¹, A. V. Plutalova², M. A. Moskvina²,
A. A. Shchelushkina¹, E. V. Chernikova², and D. S. Sokolova¹

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Department of Chemistry, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: 7390530@gmail.com

Received April 25, 2023; revised May 10, 2023; accepted May 11, 2023

Abstract—Microorganisms of the genus *Bacillus* were shown to have different effects on the degradation of polylactide packaging material. The degradation experiment was carried out on an agar medium at a temperature of 55°C and pH 5.9 for 14 days. This is the first report on the abiotic hydrolysis significantly slowing down during incubation with *B. licheniformis* S8 and occurring in parallel with the main process, enzymatic hydrolysis. The latter involved sequential cleavage of monomer units from the end of the macromolecule and the formation of low molecular weight products used by microorganisms as a substrate; it contributed to a decrease in the mass of polylactide by 5.1%, while maintaining its molecular weight and decreasing the dispersion of molecular weights. In the presence of bacteria *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, and *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*, the polymer weight did not decrease, but the molecular weight decreased significantly, similar to abiotic hydrolysis.

Keywords: polylactide, biodegradation, sample weight, molecular weight, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*