

Введение Ежегодный прирост уровня потребления полимеров в мире за последние 60 лет составляет в среднем 10 %. В результате огромное количество пластиковых бутылок, полиэтиленовых пакетов и другого пластмассового мусора оказывается на свалках, причем доля его неуклонно возрастает [1]. Одним из основных областей применения синтетических полимерных материалов на основе полиэтилена является производство упаковки, после использования которой требуется ее утилизация. Наиболее распространенным способом утилизации короткоживущей упаковки является ее захоронение на полигонах с общей массой бытовых отходов. Полимеры проявляют высокую устойчивость к биodeградации, что обуславливает проведение научных изысканий по созданию специальных полимерных материалов, обладающих большей доступностью для биodeградации. Наиболее простым и дешевым способом получения биоразрушаемых полимерных композиций является создание смесей пластмасс с различными добавками, инициирующими их биodeградацию [2]. Одним из способов интенсификации процесса разложения полимерных материалов на полигонах их депонирования является проведение предварительной обработки полимеров [1].

1. Объекты и методы Исследуемые образцы представляли собой композиционные полимерные пленки толщиной 1 мм различного состава на основе полиэтилена высокого давления (ПЭВД) с добавками полиамида-6 (ПА-6) и малеинового ангидрида (МА). Состав полимерных плёнок приведен в таблице 1. Из данных, представленных в таблице видно, что ПА-6 входил в состав шести из десяти исследованных образцов. Все полимерные пленки готовили из механических смесей. При этом все пленки содержали в своем составе спайки ПЭВД и МА в различных соотношениях. Такие спайки необходимы, в том числе для обеспечения требуемых функциональных качеств полимерных материалов. Таблица 1 - Состав исследованных полимерных образцов № образца Содержа-ние ПЭВД в исследу-емых образцах, % мас Содержа-ние ПА-6 в исследу-емых образцах, % мас Содержа-ние спаек ПЭВД-п-МА в исследу-емых образцах, % мас

№ образца	ПЭВД, % мас	ПА-6, % мас	спайки ПЭВД-п-МА, % мас
1	93	7	2
2	95	5	3
3	97	3	4
4	99	1	5
5	95	4	1
6	91	8	1
7	87	12	1
8	87	10	3
9	84	11	5
10	93	4	3

Кроме того, в данной работе производилась оценка грибостойкости с использованием штаммов микромицетов из коллекции кафедры промышленной биотехнологии Казанского национального исследовательского технологического университета, выделенных с поверхности зерен ячменя. До помещения на плотные питательные среды образцы полимерных плёнок нарезались размером 5×7 см. Перед взвешиванием до и по окончании проведения эксперимента исследуемые полимерные образцы промывались в спирте и дистиллированной воде для того, чтобы отмыть посторонние вещества и биопленку с поверхности полимеров. Для проведения теста на грибостойкость использовалась среда Чапека. Для приготовления среды Чапека в 1 дм³ дистиллированной воды растворялись следующие компоненты: 20 г сахарозы, 2 г NaNO₃, 1 г KH₂PO₄, 0,5 г MgSO₄ (или

1 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), 0,01 г FeSO_4 (или 0,018 г $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$). Затем добавлялось 20 г агара и среда стерилизовалась 30 мин при 0,5 ати [3]. Полимерные образцы помещались в чашки Петри на поверхность агаризованных питательных сред, после чего производился посев микромицетов с использованием бактериологической петли на поверхность образцов. Чашки Петри с готовыми образцами помещались в термостат при температуре 28°C на 28 суток. Перед проведением эксперимента в жидкой питательной среде образцы полимерных пленок, содержащие в своем составе ПЭВД, ПА-6 и МА, помещали в контейнер с почвой. В данной работе использовалась серая лесная почва как одна из самых распространенных типов почв в Поволжском регионе. Почву в контейнере увлажняли водопроводной водой в течение 20 суток для активации почвенной микрофлоры. По истечении периода активации почвенной микрофлоры полимерные образцы изымались из контейнера, и производился смыв биопленки с поверхности полимеров. Полученная таким образом накопительная культура почвенной ассоциации микроорганизмов использовалась далее в экспериментальной работе. В качестве жидкой питательной среды использовался мясо-пептонный бульон (МПБ); инокулятом являлось сообщество почвенных культур микроорганизмов. В состав препарата для приготовления МПБ входит пептон сухой ферментативный для бактериологических целей, гидролизат казеина ферментативный неглубокой степени расщепления, дрожжевой экстракт, соли: NaCl , Na_2HPO_4 . Для приготовления МПБ 27,5 г порошкообразного готового препарата размешивалось в 1 дм³ дистиллированной воды и стерилизовалось 30 мин при 0,5 ати. Полимерные образцы нарезались в форме прямоугольников размером 3×7,5 см и помещались в качалочные колбы (по три прямоугольника каждого образца в колбу) вместимостью 250 см³. Затем колбы размещались на лабораторном перемешивающем устройстве типа ПУ-6410м производства компании «ЭКРОС» при $T=28^\circ\text{C}$ и скорости вращения $N=97$ об/мин на 10 суток в условиях периодического культивирования.

2. Обсуждение результатов

На 15 и 28 сутки эксперимента проводилась визуальная оценка образцов на стойкость к биообрастанию их поверхности по пятибалльной шкале. Результаты приведены в таблице 2. При концентрации ПЭВД в композициях выше 91 % оптимальное содержание спаек с МА составляет 3 %. Увеличение этого показателя до 5 % приводит к снижению биообрастания полимерных материалов. Увеличение концентрации спаек до 7 % связано со снижением концентрации ПЭВД в полимерной композиции до 93%, что также благоприятно сказывается на степени биообрастания полимеров. При снижении содержания полиэтиленовой матрицы ниже 91 % оптимум содержания спаек снижается до 1 % (образец № 7), однако, по-прежнему, с увеличением содержания ПА-6 в композиции ее грибостойкость уменьшается. Вероятно, это связано с тем, что дальнейшее снижение содержания полиэтиленовой матрицы приводит к увеличению

концентрации МА, находящегося в спайке с ПЭВД, в объеме полимерной композиции. Таблица 2 - Результаты визуальной оценки биологического обрастания поверхности исследуемых полимерных образцов № образца 15 сутки 28 сутки 1 2 3 2 1 1 3 2 3 4 1 2 5 1 2 6 2 4 7 2 3 8 1 1 9 1 2 10 2 3 После оценки грибостойкости полимерных образцов целесообразным представлялось проанализировать их доступность к биodeградации в жидкой питательной среде в условиях активного контакта суспендированных клеток с поверхностью полимеров. На данном этапе эксперимента проводилась оценка ферментативной (дегидрогеназной и протеазной) активности микроорганизмов, растущих на поверхности полимерных образцов. Рис. 1 - Дегидрогеназная активность микроорганизмов На 5-е сутки культивирования в присутствии образцов № 4 и № 7 отмечено значительное уменьшение ДА микроорганизмов с последующим увеличением значений ДА на 9-е сутки культивирования. Это может быть объяснено тем, что в среде с полимерными образцами № 4, содержащими наибольшее количество ПЭВД по массе (99%), происходит истощение легкодоступного субстрата из жидкой среды по истечении пяти суток культивирования. Далее, вследствие отмирания части микробной биомассы и последующего ее гидролиза, в данной среде появляется дополнительный усвояемый субстрат – компоненты клеток микроорганизмов. Образец №7 содержит наибольшее количество ПА-6 (12%), что может вызывать бóльший прирост микробной биомассы, которая затем, тем не менее, по вышеописанным причинам отмирает. Таким образом, высвобождение примесей из состава полимерных материалов может поддерживать жизнедеятельность биомассы, однако высокие концентрации примесей в полимерных образцах могут приводить к быстрому росту микроорганизмов и, вследствие чего, ускоренному истощению доступного субстрата в среде. Амидная связь в структуре ПА-6 представляет собой аналог природных пептидных связей, встречающихся в структуре белков. Разрушение амидных связей могут катализировать гидролитические экзоферменты – протеазы или протеолитические гидролазы, экскретируемые различными группами микроорганизмов в среду. Результаты анализа протеолитической активности микроорганизмов представлены на рисунке 2. Рис. 2 - Протеолитическая активность микроорганизмов На основании результатов анализа протеолитической активности микроорганизмов можно сделать вывод о протекании ферментативного гидролиза амидных связей ПА-6 в полимерных композициях. Сравнительный анализ активности дегидрогеназ и протеаз микроорганизмов показывает, что наличие в составе полимерных композиций ПА-6 повышает уровень микробной активности. Значения pH сред в процессе культивирования находились в диапазоне 7,5 - 9,0 и имели тенденцию к возрастанию. Увеличение pH среды в первые 4 суток, связанное с развитием биопленки на поверхности, может быть вызвано ферментативным гидролизом пептидных связей белка в составе культуральной жидкости, а также

аналогичных связей в составе полимерных композиций, что сопровождается выделением в среду аммонийных солей. Дальнейшее защелачивание среды на 7-10 сутки, вероятно, связано с дезаминированием микробных белков в процессе отмирания биопленки. В работе проводилось измерение массы исследуемых полимерных образцов до и после их биообработки. Полученные данные свидетельствуют об изменении массы в полимерных композициях, в составе которых присутствует ПА-6 в результате проведения экспериментальной работы. Наибольшее уменьшение характерно для образцов № 6-9, т.е. для образцов с максимальным содержанием ПА-6 (8-12 %). По результатам сравнения изображений поверхности полимерных образцов, полученных методом растровой электронной микроскопии для образца, содержащего в своем составе ПА-6, выявлено увеличение шероховатости поверхности, вызванное ростом мицелия микромицетов (рис. 3). Рис. 3 - Изображения поверхности образца № 6 до (слева) и после (справа) биodeградации на плотных питательных средах, полученные с помощью растрового электронного микроскопа

Расчет содержания функциональных групп, основанный на законе Бугера-Ламберта-Бера, показывает, что содержание функциональных групп амида в составе полимерных композиций после биodeградации уменьшается. Это позволяет сделать вывод о том, что с увеличением концентрации ПА-6 в составе полимерных композиций отмечено снижение доступности к биоразрушению, о чем свидетельствует уменьшение содержания СО- и NH-групп. Аналогичная тенденция проявляется при культивировании смешанного сообщества почвенных микроорганизмов в жидкой среде – с увеличением концентрации спаек ПЭВД и МА в составе полимерных композиций уменьшается доля разрушенных СО- и NH-групп. Данный факт можно объяснить тем, что, хотя на поверхности полимерных образцов интенсивно протекает процесс биodeградации, он не затрагивает соединения внутри полимерной матрицы. Методом дифференциального термического анализа (ДТА) показано, что пик плавления модифицированного полиэтилена после протекания процесса биodeградации характеризуется наличием эндотермических эффектов в более низкой температурной области, чем пик плавления исходного полимерного образца (рис. 4). Рис. 4 – Результаты дифференциального термического анализа полимерного образца, содержащего ПЭВД и ПА-6, до (слева) и после биodeградации (справа). Наличие эндотермического пика плавления на кривой ДТА косвенно свидетельствует об уменьшении молекулярной массы полимерной композиции в результате биodeградации.

3. Выводы

Показано, что культивирование микромицетов и бактериальной суспензии на поверхности полимерных образцов вызывает их биodeградацию в разной степени. Это обусловлено как различной активностью разных групп микроорганизмов, так и составом полимерных композиций. Так, например, в работе отмечено, что почвенные микроорганизмы, в основной массе бактерии, в жидкой среде в

большей степени атакуют спайки ПЭВД и МА, тогда как микромицеты, по всей видимости, активно гидролизуют полиамидные соединения. Умеренное (до 8 %) содержание ПА-6 в составе полимерных композиций способствует сбалансированному росту микроорганизмов на поверхности полимеров, сопровождающемуся, по всей видимости, перманентным высвобождением примесей в среду. Биodeградация исследуемых полимерных композиций сопровождается уменьшением молекулярной массы высокомолекулярного соединения. Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации соглашение №14.В37.21.0838 «Создание перспективных наноструктурированных гетероцепных полимеров с бидеградируемыми свойствами»).