

УДК 504.054

БІОДЕСТРУКЦІЯ ПОЛІМЕРІВ МІКРОМІЦЕТАМИ ТА ЇХ АСОЦІАЦІЯМИ

Зінченко О.Ю., Ротар Ю. В., Ковтало М. С., Проданець Н.М.

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова

Досліджено здатність мікроміцетів родів Trichoderma та Fusarium до деструкції пластикової харчової упаковки. Деструктивну дію грибів на зразки полімерних пакувальних матеріалів визначали за втратою останніми ваги при інкубації в рідкому середовищі Чапека-Докса протягом 10-180 днів. Установлено, що розкладання зразків асоціаціями мікроміцетів, що належать до різних родів, відбувається більш ефективно, ніж окремими видами або асоціаціями представників одного роду.

Ключові слова: мікроміцети, полімери, асоціація мікроміцетів, інкубація, деструктивна дія.

Вступ. Рациональне природокористування входить в ряд пріоритетних напрямків розвитку науки, технологій і техніки в Україні, тому проблема забруднення навколишнього середовища відходами перероблювального промислу сьогодні є актуальною.

Високі темпи росту виробництва пластмас, характерні для промисловості розвинених країн, обумовили виникнення відносно нової проблеми – знищення й утилізація пластмас.

В Європі об'єм виробництва полімерних матеріалів складає 47,5 млн.т на рік, з яких 10 % використовується вторинно. Середня витрата пластикових виробів складає 100 кг на людину в рік [1].

Полімерна упаковка виходить з обороту майже відразу після того, як товар потрапив в руки покупця. У сучасному виробництві упаковка з пластика застосовується всюди: для харчових продуктів, ліків, електроніки, небезпечних речовин тощо. Широке використання пластиків у харчовій галузі, науці і технологіях обумовлено тим, що вони забезпечують надійний захист упакованого продукту від забруднення, пошкодження, розкладання, а також універсальністю застосовуваних форм і кольорової гами, низькою собівартістю сировини, малою енергоємністю виробництва порівняно зі склом, металом, папером. Відходи полімерів, в тому числі, і пакувальний матеріал, підлягають або захороненню в землю, або утилізації, що здійснюється по одному з трьох напрямків: спалювання, піроліз, ресайклінг [4, 6, 8].

Радикальним рішенням проблеми утилізації полімерного сміття є створення полімерів, здатних за відповідних умов піддаватися біодеградації з

утворенням нешкідливих для природи речовин. До таких належать: целюлоза, мікробні поліефіри, полігідроалканоати, полівініловий спирт, полікапролактон, полілактозна кислота [10].

За визначенням Міжнародної організації зі стандартизації, біодеградованими пластиками-полімерами вважаються такі, розкладання яких відбувається під дією бактерій, грибів і водоростей. Наразі до біодеградованих полімерів відносять полілактид і полігідроксибутират, отримані мікробіологічним способом, та сополімери на їх основі, які інколи називають біополімерами [10].

У нашій країні промислове виробництво біополімерів біотехнологічним шляхом в даний момент відсутнє. В умовах швидкого зростання темпів виробництва синтетичних полімерів розробка шляхів їх утилізації стає вкрай необхідною.

Метою даної роботи було визначення здатності мікроміцетів до біодеградації харчової упаковки, виготовленої з полімерних матеріалів.

Матеріали та методи. Роботу виконано на базі Біотехнологічного науково-навчального центру ОНУ імені І. І. Мечникова. Вивчали здатність мікроміцетів до біодеградації харчової упаковки 4 видів: пакет мережі супермаркетів «Таврія В» (заявлений як такий, що піддається біодеградації на 100%) (зразок I); пакет мережі супермаркетів «Сільпо» (зразок II); харчова плівка «Фрекен Бок» (зразок III); екологічний пакет для харчових відходів «Mater-Bi» виробництва Італії (заявлений як такий, що піддається повній біодеградації) (зразок IV).

На першому етапі визначали активність наступних видів представників класу *Deuteromycetes*: *Fusarium oxysporum* БННЦ II, *Fusarium graminearum* БННЦ III, *Trichoderma koningii*.

Також визначали біодеструкцію полімерної упаковки асоціаціями мікроміцетів чотирьох представників пліснявих грибів класу *Deuteromycetes*: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma viride*. Між ними було створено 3 асоціації: *F. oxysporum* і *F. graminearum*; *T. koningii* і *T. viride*; *F. oxysporum*, *F. graminearum* і *T. koningii*, *T. viride*.

Визначення здатності грибів до деструкції зазначених зразків проводили в рідкому поживному середовищі Чапека-Докса з вмістом 1 % сахарози [6].

Для постановки досліду гриби культивували на скошеному картопляному агарі при температурі 25 °С 5-7 днів до появи масивного росту.

Біомасу змивали стерильним фізіологічним розчином, вимірювали оптичну густину суспензії, доводили її до 0,5 OD₆₀₀ як для монокультури, так і для асоціації та інокулювали середовище Чапека-Докса у флаконах. Об'єм інокуляту складав 1 мл, загальний об'єм культури – 20 мл. У середовище вносили зразки харчової упаковки розміром 2x2 см, попередньо зважені,

оброблені етиловим спиртом та ультрафіолетовим випромінюванням протягом 1 год.

Результат впливу монокультур на зразки визначали через 10, 20 та 30 днів. По закінченні кожного етапу зразки упаковки вилучали з флаконів, ретельно відмивали дистильованою водою від поживного середовища і мікроорганізмів, висушували при кімнатній температурі до постійної маси (в середньому 5 днів), яку визначали за допомогою електронних вагів (Pioneer, США). Про деструкцію зразків судили за зміною їх ваги.

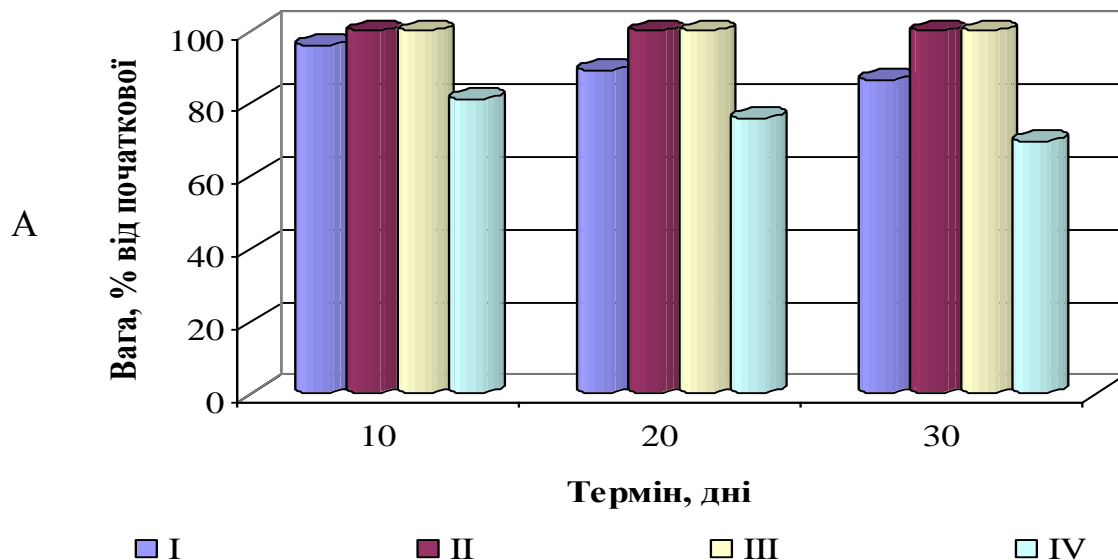
Деструктивну активність асоціацій мікроміцетів визначали протягом 60, 90, 120, 150 та 180 діб.

Двічі на місяць проводилася часткова (30% від об'єму) заміна поживного середовища. Для кожного варіанту досліджу використовували 5 зразків відповідної харчової упаковки.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційного та кореляційного аналізу. Розраховували середні значення показників (\bar{X}) та їх стандартну помилку ($S_{\bar{X}}$). Вірогідність відмінностей між середніми визначали за критерієм Стьюдента, оцінюючи вірогідність отриманих результатів на рівні значимості не менше 95 % ($p \leq 0,05$) [3].

Математичні розрахунки проводили за допомогою комп'ютерної програми Excel.

Результати дослідження та їх обговорення. При вивченні здатності *F. oxysporum* до деструкції харчової упаковки, було відзначено найсуттєвіше зменшення ваги у зразка IV. Через 10 днів досліджу середня втрата ваги зразків склала 18,6 %, через 20 днів – 23,9 % і за термін 30 днів – 30,5 % (рис. 1, А).



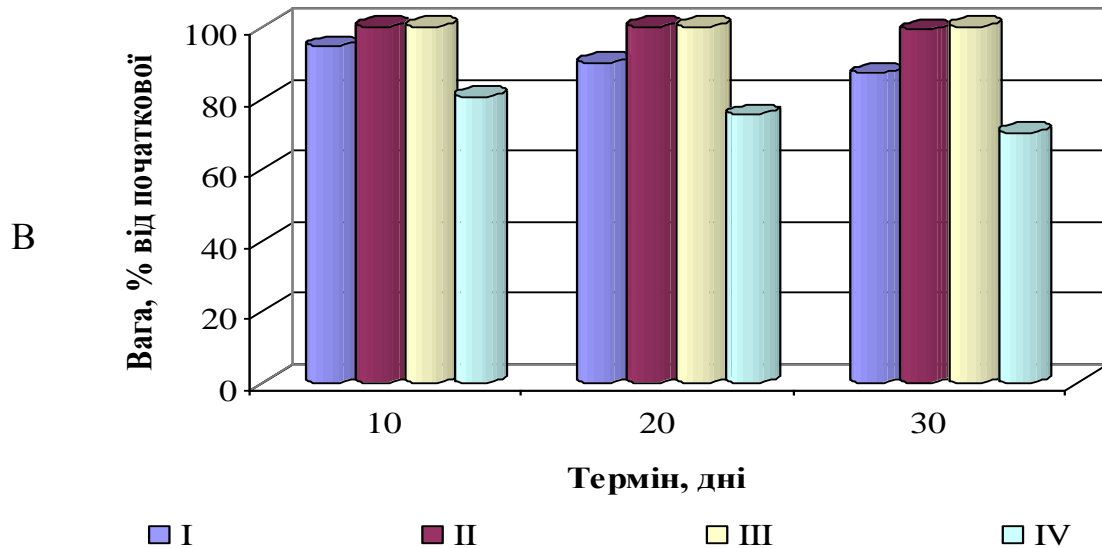


Рис. 1. Біодеструкція досліджуваних зразків за присутності *F. oxysporum* (А) та *F. graminearum* (В)

Менш значну зміну ваги було виявлено у зразка I. Так, за 10 днів дослідження маса зразків зменшилася на 3,9 % у порівнянні з контролем, за 20 і 30 днів – на 10,8 % та 13,4 % відповідно.

Руйнівної дії *F. oxysporum* щодо зразка II не зареєстровано. Жодних проявів деструкції не спостерігалось також у зразків харчової плівки.

Результати дослідження показали, що *F. graminearum* також викликає найбільш значну деструкцію зразка IV. Через 10 днів зареєстровано середню втрату ваги на 19,5 %, через 20 та 30 днів – на 24,7 % та 29,8 % відповідно. Досить активним цей гриб був також щодо зразка I, викликаючи втрату 5,5 % ваги за 10 днів, 9,9 % – за 20 днів і на 13,0 % за місяць. Вірогідної зміни ваги у зразків II та III не було зафіксовано (рис. 1, В).

Порівняно з мікроміцетами р. *Fusarium*, *T. koningii* проявляла значно меншу деструктивну активність щодо використаних видів полімерної упаковки (рис. 2).

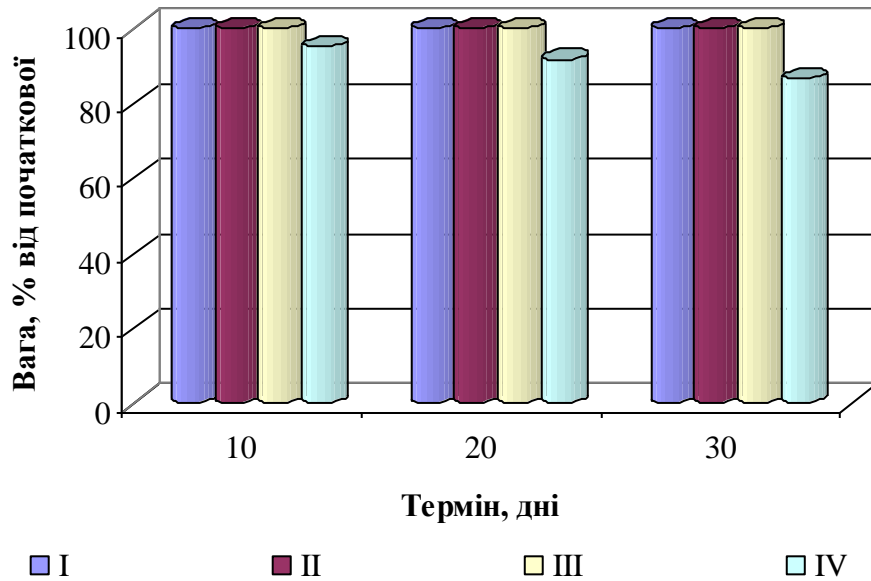
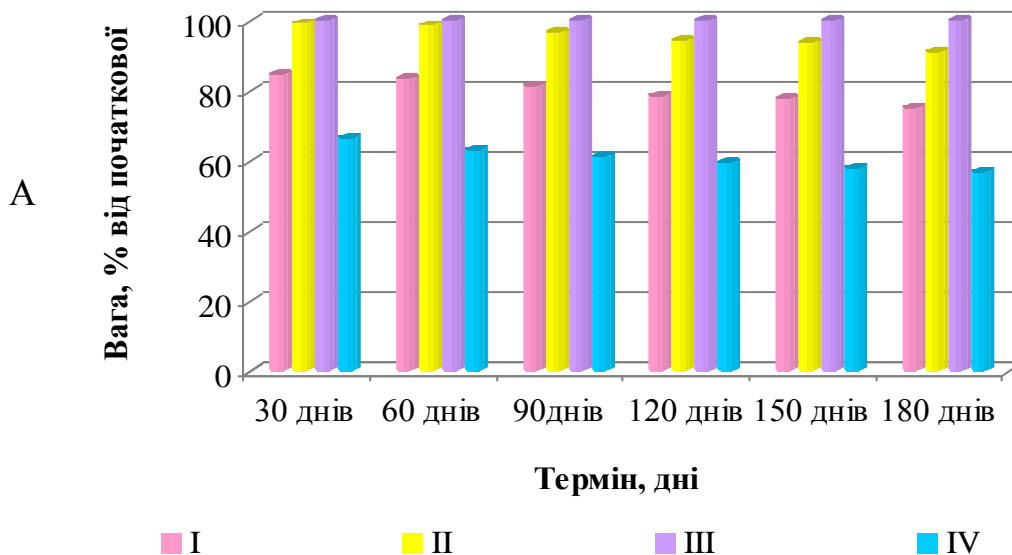


Рис. 2. Результати біодеструкції *T. koningii* досліджуваних зразків

Загалом руйнівна дія *T. koningii* виявлена лише щодо зразка IV, для якого втрата ваги складала 4,8 % за 10 днів, 9,4 % за 20 днів і 13,4 % за 30 днів дослідження (рис. 2).

При сумісному культивуванні *F. oxysporum* і *F. graminearum* – протягом 180 днів зафіксовано зменшення маси зразка II на 9%, зразка I – на 24,5%, зразка IV – на 43,4% (рис. 3). При цьому найбільш інтенсивно процес деструкції зразків I та IV проходив протягом першого місяця.



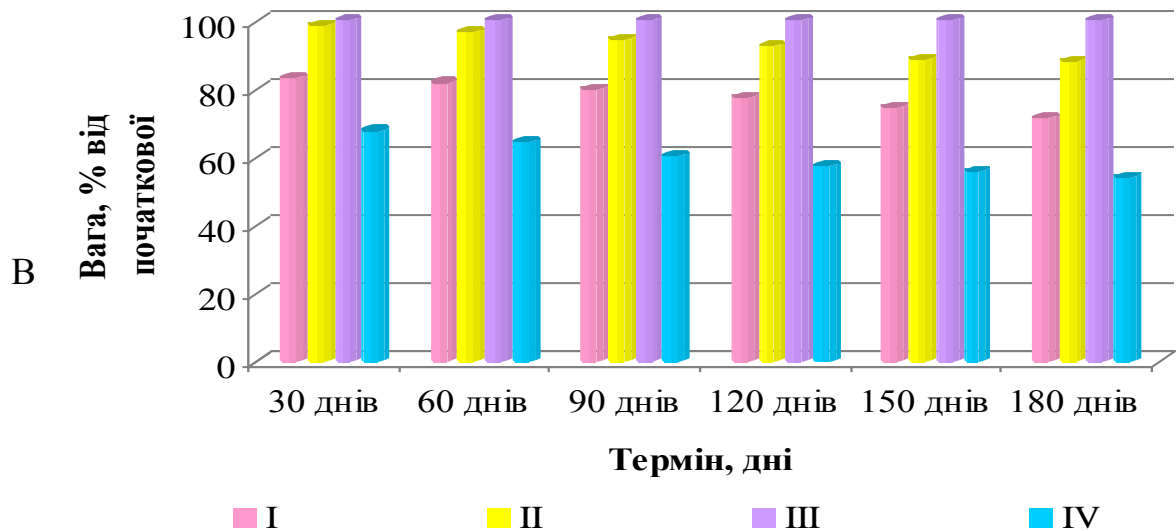


Рис. 3. Біодеструкція асоціаціями мікроміцетів р. *Fusarium* (А) та р. *Trichoderma* (В) досліджуваних зразків

Втрата ваги кожного виду зразків була найменшою протягом 5 місяця досліду. Це явище, вірогідно, пояснюється інтенсивним пошкодженням мікроміцетами верхнього шару полімеру біодеградованих пакетів протягом першого місяця культивування на бідному на джерела вуглецю середовищі Чапека-Докса. Уповільнення процесу при збільшенні терміну культивування, можливо, пов'язане з важкою доступністю більш глибоких шарів полімерного матеріалу або з накопиченням в середовищі продуктів його деструкції, що можуть пригнічувати ріст або ферментативну активність грибів. Крім того, можливе пригнічення різними видами фузаріїв один одного при конкуренції за важкодоступні джерела вуглецю. У зразка III за присутності асоціації *F. oxysporum* і *F. graminearum* протягом 180 днів не виявлено зміни маси (рис. 3, А).

Найменшу біодеструктивну активність щодо зразків полімерної упаковки нами виявлено при сумісному культивуванні *T. koningii* та *T. viride*. Так, за 180 днів середня втрата ваги зразками II, I та IV склала 7,8%, 13,6%, та 28,4% відповідно (рис. 3, В).

Асоціація чотирьох видів мікроміцетів показала найкращі результати руйнування усіх видів полімерної упаковки, окрім харчової плівки, маса якої не змінилася. За 180 днів досліду маса зразка II зменшилася на 12,1%, зразка I – на 28,8%, зразка IV – на 46,1% за період 180 днів (рис. 4).

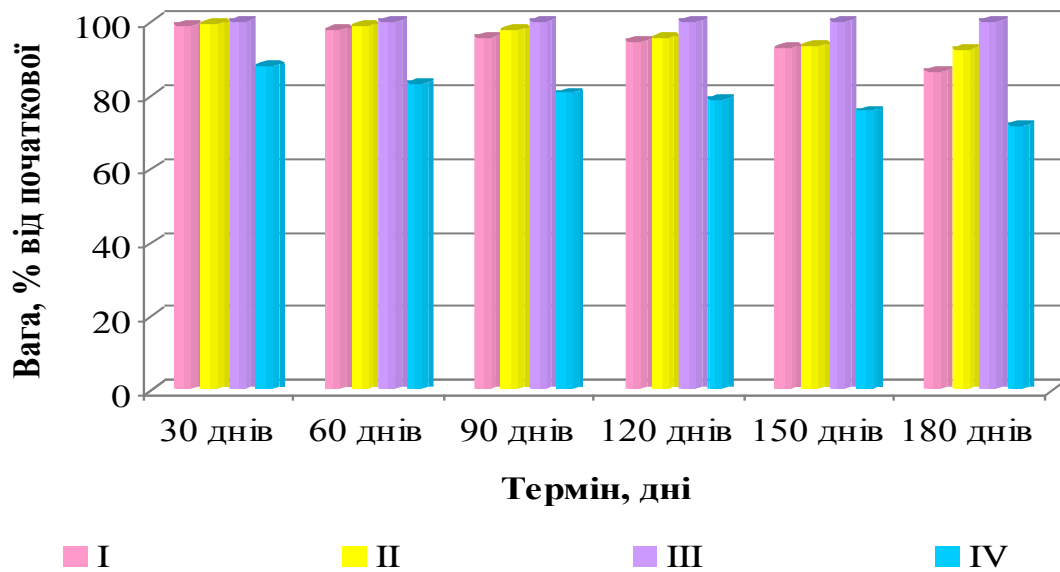


Рис. 4. Біодеструкція асоціацією мікроміцетів (*F. oxysporum*, *F. graminearum* і *T. koningii*, *T. viride*) досліджуваних зразків

У даному випадку найактивнішу деструкцію біодеградованих пакетів (зразки I та IV) також спостерігали протягом першого місяця досліду. У подальшому процес уповільнювався.

Таким чином, асоціація з чотирьох представників класу *Deuteromycetes* показала найкращі результати. *T. koningii* та *T. viride* в природі є антагоністами фітопатогенів р. *Fusarium*, які є більш активними колонізаторами поверхонь, ніж мікроміцети р. *Trichoderma*. У прямих експериментах продемонстровано, що інгібувальний вплив триходерми на проростання конідій представників роду *Fusarium* при високій щільності популяції останніх згладжується, і навпаки, проявляється кооперативний ефект між представниками двох родів мікроміцетів. Вірогідно, при сумісному культивуванні використані штами *Trichoderma* можуть виступати як стимулятори підвищеної продукції ферментів та органічних кислот [11, 12].

Пакети супермаркетів Таврія В, що відносяться до оксо-пакетів, мають в своєму складі добавку d2w (1% від маси пакета). Біорозщеплювана добавка працює як каталізатор, ініціюючи фрагментацію і окиснення молекул полімеру, причому через «запрограмований» рецептурою проміжок часу. Цей період можна скоротити під впливом органічних кислот грибів, а також світла і тепла. Після окиснення пакет стає доступним для змочування водою та для ферментів мікроорганізмів [2]. У наших дослідах показано, що 6 місяців є недостатнім терміном для значної деструкції пакетів, виготовлених з даного виду полімеру.

Найкраще біодеструкції піддавався органічний пакет для сміття виробництва Італії марки «Mater-Bi», який має в своєму складі біодеградований доповнював у вигляді кукурудзяного крохмалю і целюлози [5, 11]. Дана добавка легко піддається розщепленню амілазними і целюлазними ферментами грибів, про що свідчать результати досліду.

Зразки харчової плівки зовсім не піддавалися руйнуванню грибами. Це може означати те, що дана полімерна упаковка не має органічних добавок, які б піддавалися біодеградації мікроміцетами, а вміст поліетилену дорівнює 100%. Також причиною може стати спосіб виготовлення полімеру. Харчова плівка – це матеріал, який виготовляють з гранул поліетилену під впливом високого тиску, що впливає на зменшення кристалізації і товщини [4]. Можливо, через це зв'язки полімеру є недоступними для ферментативних систем грибів.

У цілому, асоціації мікроміцетів показали більш високу деструктивну активність, ніж монокультури, але вона відрізнялася незначно. Збільшення терміну культивування та розширення видового складу асоціації мікроміцетів призводили до часткової деструкції навіть упаковки (пакетів мережі супермаркетів «Сільпо»), не заявленої виробником як біодеградована.

Висновки

1. У представників р. *Fusarium* та *Trichoderma* встановлено здатність до біодеструкції окремих видів полімерних матеріалів, що використовуються у виробництві харчової упаковки.
2. *F. oxysporum* та *F. graminearum* в монокультурі проявляють більш високу активність при руйнуванні полімерних пакувальних матеріалів для харчових продуктів, ніж *T. koningii*.
3. Асоціації мікроміцетів проявляють більш значну деструктивну активність щодо полімерної упаковки, ніж монокультури. Найбільш значну втрату маси зразків усіх видів полімерів встановлено при їх культивуванні за присутності асоціації двох видів *Fusarium* та двох видів *Trichoderma*.

Отримані результати свідчать про доцільність подальшого дослідження здатності мікроміцетів до руйнування полімерних пакувальних матеріалів з метою оптимізації видового складу деструкторів і умов досліду.

ЛІТЕРАТУРА

1. Биоповреждение и биокоррозия в строительстве // Материалы Межд. научно-техн. конференции «Биоповреждения и биокоррозия в строительстве». – Саранск: Мордовский университет, 2004. – С. 230.
2. Власов С.В., Ольхов А.А. Биоразлагаемые полимерные материалы // Полимерные материалы. – 2006. – №9. – С. 28 – 37.

3. Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион, 2001. – 260 с.
4. Легонькова О. А., Сухарева Л. А. Тысяча и один полимер от биостойких до биоразлагаемых – М.: РадиоСофт, 2004. – 270 с.
5. Легонькова О.А., Пешехонова А.Л., Сдобникова О.А. Крахмалонаполненные полимерные биоразлагаемые материалы // Тара и упаковка. – 2003. – №5. – С. 56-60.
6. Лугаускас А. Ю., Левинскайте Л. И., Лукишите Д. И. Поражение полимерных материалов микромицетами // Пластмассы. – 1991. – № 15. – С. 28 – 36.
7. Руденко А. В., Коваль Э. З., Савельев Ю. В. Микодеструкция полимерных материалов в условиях Земли и космоса // Космічна наука та технологія. – 2003. – Т. 9, №2. – С. 20 – 23.
8. Савельев Ю. В., Робота Л. П., Руденко А. В., Коваль Э. З. Исследование стойкости полиуретанов, индуцируемой микроорганизмами // Доп. НАН України. – 2005. – № 1. – С. 141 – 146.
9. Семенов С.А., Гумаргалиева К.З., Заиков Г.Е. Биоповреждения материалов и изделий // Энциклопедия инженера-химика. – 2007. – № 4. – С. 2.
10. Фомин В.А. Биоразлагаемые полимеры, состояние и перспективы использования // Пластические массы. – 2001. – № 2. – С. 42 – 46.
11. Gu J.D., McCarty S.P., Smith G.P. et al. Degradability of cellulose acetate and cellophane in anaerobic bioreactors // Polymer Materials: Science and Engineering. – 1992. – V. 67. – P. 230 – 231.
12. Ji-Dong Gu. Microbiological deterioration of synthetic polymeric materials: recent research advances // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2003. – V. 52. – P. 69 – 91.

Аннотация

О.Ю. Зинченко, Ю. В. Ротарь, М. С. Ковтало, Н.М. Проданец **Биодеструкция полимеров микромицетами и их ассоциациями** Исследована способность микромицетов родов *Trichoderma* и *Fusarium* к деструкции пластиковой пищевой упаковки. Деструктивное действие грибов на образцы полимерных упаковочных материалов определяли по потере последними массы при инкубации в жидкой среде Чапека-Докса в течение 10-180 дней. Установлено, что разложение образцов ассоциациями микромицетов, принадлежащих к разным родам, происходит более эффективно, чем отдельными видами или ассоциациями представителей одного рода.

Ключевые слова: микромицеты, полимеры, ассоциация микромицетов, инкубация, деструктивное действие.

Summary

*O.Yu. Zinchenko, Yu. V. Rotar, M. S. Kovtalo, N.M. Prodanets. **Biodestruction Of Polymers By Micromycetes And Their Associations.** The ability of micromycetes of genera *Trichoderma* and *Fusarium* to the destruction of plastic food package has been studied. The destructive action of fungi on the polymer package material samples has been detected by their weight loss under the incubation in liquid Czapek-Dox medium during 10-180 days. It has been shown more effective destruction of samples by the micromycete associations of the representatives of different genera than by individual species or associations of the representatives of the same genus.*

Key words: micromycetes, polymer, micromycete associations, incubation, destruction