

УДК 621.798.4.004.82

Биоутилизация крупнотоннажного упаковочного материала в пищевой промышленности

О.А. Легонькова, канд. техн. наук, доцент, **М.С. Федотова**

Московский государственный университет прикладной биотехнологии

О.В. Селицкая

Российский государственный Аграрный Университет им. К.А. Тимирязева

А.В. Александрова

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

В настоящее время уделяется все больше и больше внимания экологическим вопросам, связанным с утилизацией упаковочных материалов. Исследование процессов физико-химических превращений синтетических и природных полимерных материалов (ПМ) в условиях воздействия окружающей среды – фундаментальная задача науки о материалах как при решении вопросов их биостойкости, так и получении

Ключевые слова: биоутилизация; крупнотоннажный упаковочный материал; полиэтилены высокого давления; микроорганизмы; мицелий.

Key words: biorecycling; a large-capacity packing material; high pressure polyethylene; microorganisms; a mycelium.

ческим характеристикам: температуре плавления (105...108 °С), стойкости к различным химическим средам (исключая окислители), низкой газопроницаемостью и хорошим изоляционным свойствам. ПЭВД – наиболее широко применяемые упаковочные полимеры, одну треть всех упаковочных пластику составляют именно эти материалы. Состав полимерных отходов на 38 % состоит из полиэтиленов (ПЭ) различных марок [2].

В предыдущих работах [3–6] показано, что мицелий микромицетов агрегируется на полимерных материалах неравномерно, хаотично. Адгезивно закрепившись на поверхности, грибы формируют вокруг себя микросреду, специфичную для каждой пары полимер – микроорганизм. Выявлена избирательность действия микромицетов на синтетические полимеры. Процесс биодест-

рукции высокомолекулярных материалов определяется поверхностным биоповреждением за счет деструкции как основной цепи и боковых групп, так и добавок, вводимых в полимер.

В связи с продолжением исследований в этом научно-практическом направлении в пределах данной работы были поставлены задачи: получить культуры микромицетов из основных зональных почв России; провести скрининг микроорганизмов – деструкторов ПЭВД различных марок; выявить процессы биоповреждений ПЭВД различных марок.

В качестве объектов исследования были выбраны марки ПЭ высокого давления, широко используемые при упаковке пищевых продуктов и изготовлении изделий различных назначений: ГОСТ 16337–77: 15303-003, 15803-020 (специальное назначение: изделия и детали медицинского назначения, в том числе изделий внутреннего протезирования); 10803-020 (специальное назначение: детские игрушки). Полиэтилены получены с применением катализаторов радикального типа без гомогенизации в расплаве. Отличаются такими параметрами, как показатель текучести расплава (ПТР), прочность, плотность (табл. 1).

Материалы на основе полиэтиленов высокого давления (ПЭВД) нашли широкое применение в различных сферах жизнедеятельности человека благодаря своим физико-химическим характеристикам.

биоразлагаемых изделий [1]. Знание механизма процессов биодеструкции или относительной биостойкости должно позволить прогнозировать изменение функциональных параметров, находить способы как продления «сроков жизни», так и ускорения процесса их распада.

Материалы на основе полиэтиленов высокого давления (ПЭВД) нашли широкое применение в различных сферах жизнедеятельности человека благодаря своим физико-хими-

Таблица 1

Физико-механические характеристики полиэтиленов, ГОСТ 16337–77

Марка ПЭВД	ПТР, г/10 мин	Прочность при разрыве, МПа	Деформация при разрыве, %	Плотность, г/см ³
ПЭВД 153 03-003	0,3	13,7	600	0,9205
ПЭВД 158 03-020	2,0	11,5	600	0,9270
ПЭВД 108 03-020	2,0	12,2	550	0,9185

Таблица 2

Балл	Характеристика балла
0	Под микроскопом прорастания спор и конидий не обнаружено
1	Под микроскопом видны проросшие споры и незначительно развитый мицелий
2	Под микроскопом виден развитый мицелий, возможно спороношение
3	Невооруженным глазом мицелий и (или) спороношение едва видны, но отчетливо видны под микроскопом
4	Невооруженным глазом отчетливо видно развитие грибов, покрывающих менее 25 % испытываемой поверхности
5	Невооруженным глазом отчетливо видно развитие грибов, покрывающих более 25 % испытываемой поверхности



Таблица 3

Грибостойкость ПЭВД (ГОСТ 9.048–89, ГОСТ 9.040–91)

Марка полимера	Вид микроорганизмов	Интенсивность развития мицелия, дней			
		7	14	21	28
ПЭВД 153 03-003	<i>Actinomucor elegans</i>	4	4	4	4
ПЭВД 158 03-020	<i>Actinomucor elegans</i>	4	4	5	5
ПЭВД 108 03-020	<i>Actinomucor elegans</i>	5	5	5	5
ПЭВД 153 03-003	<i>Aspergillus versicolor</i>	3	4	4	4
ПЭВД 158 03-020	<i>Aspergillus versicolor</i>	4	4	5	5
ПЭВД 108 03-020	<i>Aspergillus versicolor</i>	5	5	5	5
ПЭВД 153 03-003	<i>Aspergillus sydowii</i>	4	4	4	4
ПЭВД 158 03-020	<i>Aspergillus sydowii</i>	4	4	4	4
ПЭВД 108 03-020	<i>Aspergillus sydowii</i>	4	4	4	4
ПЭВД 153 03-003	<i>Aureobasidium pullulans</i>	3	4	4	4
ПЭВД 158 03-020	<i>Aureobasidium pullulans</i>	4	4	4	4
ПЭВД 108 03-020	<i>Aureobasidium pullulans</i>	4	5	5	5
ПЭВД 153 03-003	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	2	3	4	4
ПЭВД 158 03-020	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	2	2	3	3
ПЭВД 108 03-020	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	3	4	4	5
ПЭВД 153 03-003	<i>Trichoderma harzianum</i>	2	4	4	4
ПЭВД 158 03-020	<i>Trichoderma harzianum</i>	2	3	4	4
ПЭВД 108 03-020	<i>Trichoderma harzianum</i>	4	4	5	5

Образцы почв были взяты из различных регионов России: Краснодарский край (образец № 1), Самарская область (образец № 2), Тульская область (образец № 3), Московская область (образец № 4). Особое внимание обращали на исследование образцов почв Московской области, взятых со свалок (техноземы). В работе использовали образцы техноземов с нерегулируемой (образцы №№ 5 и 6) и регулируемой (образец № 7) свалок.

Получение и выделение чистых культур проводили путем создания селективных условий по общепринятой методике [6]. Микроскопические грибы идентифицировали по культурально-морфологическим признакам с использованием определителей почвенных грибов [7, 8].

Культивирование микроорганизмов на полимерах и ПКМ проводили на основании ГОСТ 9.048–89, ГОСТ 9.040–91. Оценивали грибостойкость каждого образца по интенсивности развития мицелия (табл. 2).

Продукты деструкции выявляли при помощи хроматографа марки Hewlett Packard модель HP – 6890 (США). Для идентификации хроматограмм использовали базу данных NIST 98 и WILEY275. Газохроматографическое разделение примесей осуществляли на капиллярной кварцевой колонке HP-5 MC с геометрическими размерами 30 м x 0,25 мм x 0,25 мкм. Образцы пленок до и после обработки растворителями сушили на фильтровальной бумаге при комнатной температуре и взвешивали на аналитических весах. Пленки помещали в бюксы, заливали 2 мл метанола, встряхивали вручную в течение 5 мин и ставили в УЗВ на 15 мин, после чего отбирали растворитель и концентрировали его

до объема 0,2 мл, обдувая поверхность жидкости потоком азота, затем 1 мкл «рабочего» образца вводили в испаритель хроматографа. Образцы пленок, не бывших в контакте с микроорганизмами, обрабатывали вышеприведенным способом и использовали как «контрольные» образцы. Сравнивали хроматограммы в случаях контакта полимера с микроорганизмами с хроматограммами контрольных образцов, исключая пики с одинаковыми временами удерживания (метод вычитания). Оставшиеся пики на хроматограммах идентифицировали.

В исследованных почвах были обнаружены следующие виды микроорганизмов:

в почве Краснодарского края (почва № 1) преобладают *Aspergillus ochraceus* G. Wilh., *A. sydowii* (Bainier et Sartory) Thom et Church, *A. versicolor* (Vuill.) Tirab., *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx, *P. chrysogenum* Thom, *P. citrinum* Thom;

в почве Самарской области (почва № 2) наиболее обильно были представлены *Acrostalagmus luteoalbus* (Link) Zare, *Aspergillus sydowii*, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Penicillium aurantiogriseum*, *P. citrinum* W. Gams et Schroers;

почва Тульской области (почва № 3) характеризовалась преобладанием следующих культур: *Aspergillus niger* Tiegh., *A. sydowii*, *A. versicolor*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*;

в почве Московской области (почва № 4) наиболее обильны были: *Aspergillus ochraceus*, *A. glaucus* (L.) Link, *A. sydowii*, *Penicillium chrysogenum*, *P. citrinum*;

Процесс биодеструкции высокомолекулярных материалов определяется поверхностным биоповреждением за счет деструкции как основной цепи и боковых групп, так и добавок, вводимых в полимер.

технозем № 1 (почва № 5) с нерегулируемой свалки (песок) отличается наличием таких микроорганизмов, как *Aspergillus sydowii*, *Mucor terreus* Thom; *Penicillium chrysogenum*;

технозем № 2 (почва № 6) – *Aspergillus glaucus*, *A. sydowii*, *A. ustus* (Bainier) Thom et Church, *Mucor circinelloides* Tiegh, *Penicillium canescens* Sopp, *Talaromyces helicus* (Raper et Fennell) C.R. Benj., *Trichoderma harzianum* Rifai;

технозем № 3 (почва № 7) с регулируемой свалки оказался более богатым видами технофильных грибов – *Acremonium kiliense* Grütz, *Acrostalagmus luteoalbus*, *Actinomucor elegans* (Eidam) C.R. Benj. et Hesselt., *Aspergillus glaucus*, *A. niger*, *A. sydowii*, *A. versicolor*, *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G.

Таблица 4

Идентифицированные органические соединения при контакте ПЭВД 15303-003 с почвенными микромицетами

Микроорганизмы	Обнаруженные органические соединения
<i>Aspergillus sydowii</i> (почва № 7)	Тетракозан
<i>Trichoderma harzianum</i> (почва № 7)	Метоксифенилоксим, 2,6-ди(т-бутил)-4-гидрокси-4-метил-2,5-циклогексадиен-1-он, 3-октадецен, метиловый эфир пентадекановой кислоты, 1,7,11-триметил-4-(1-метилэтил)циклотетрадекан, докозан
<i>Aureobasidium pullulans</i> (почва № 7)	1,2-докозадиен
<i>Gliomastix murorum</i> (почва № 7)	Докозан, бис (2-этилгексилловый) эфир гександиеновой кислоты, диизооктиладипат, 4-фенилморфолин
<i>Aspergillus versicolor</i> (почва № 7)	1-метил-2-пропил циклогексан, докозан, гексилциклогексан, 2-метил эйкозан, 1-октадецен, Н-гептадецил циклогексан, 2-метилтетракозан, пентакозан
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> (почва № 7)	1,2,4а,5,6,8а-гексагидро-4,7-диметил-1-изопропилнафтален, бензофенон, докозан, гексакозан

Таблица 5

Идентифицированные органические соединения при контакте ПЭВД 15803-020 с почвенными микромицетами

Микроорганизмы	Обнаруженные органические соединения
<i>Trichoderma harzianum</i> (почва № 7)	2-этил-1-гексанол
<i>Aspergillus sydowii</i> (почва № 7)	Метиловый эфир бутановой кислоты, 2-этил-1-гексанол
<i>Actinomucor elegans</i> (почва № 7)	Метиловый эфир бутановой кислоты
<i>Aureobasidium pullulans</i> (почва № 7)	Метиловый эфир бутановой кислоты, 2-этил-1-гексанол
<i>Penicillium citrinum</i> (почва № 1)	Метиловый эфир бутановой кислоты
<i>Aspergillus sydowii</i> (почва № 1)	Метиловый эфир бутановой кислоты, 2-этил-1-гексанол

Таблица 6

Идентифицированные органические соединения при контакте ПЭВД 10803-020 с почвенными микромицетами

Микроорганизмы	Обнаруженные органические соединения
<i>Aspergillus sydowii</i> (почва № 7)	Метиловый эфир бутановой кислоты, 2-метилдекан, 2,6-ди(т-бутил)-4-гидрокси-4-метил-2,5-циклогексадиен-1-он, метиловый эфир 9-гексадеценной кислоты, метиловый эфир 9,12-октадекадиеновой кислоты
<i>Actinomucor elegans</i> (почва № 7)	Гексакозан
<i>Trichoderma harzianum</i> (почва № 7)	2-этил-1-гексанол
<i>Aureobasidium pullulans</i> (почва № 7)	2-этил-1-гексанол, 2-метилдекан, 2,6,10-триметилпентадекан, метиловый эфир 9-гексадеценной кислоты, метиловый эфир цис-10-гептадеценной кислоты, бутилметиловый эфир-1,2-бензолдикарбоксильной кислоты, метиловый эфир 9,12-октадекадиеновой кислоты, трикозан, тетракозан разветвленный, гексакозан
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> (почва № 1)	2-этил-1-гексанол, 2-метилдекан, 2,6,10-триметилпентадекан, метиловый эфир 9,12-октадекадиеновой кислоты
<i>Aspergillus versicolor</i> (почва № 1)	2-метилдекан, 2,7,10-триметилдодекан, метиловый эфир 9,12-октадекадиеновой кислоты, трикозан

Arnaud, *Botryotrichum piluliferum* Sacc. et Marchal, *Cadophora fastigiata* Lagerb. et Melin, *Clonostachys solani* (Harling) Schroers et W.Gams, *Coniothyrium fuckelii* Sacc., *Fusarium oxysporum* Schltdl., *F. solani*, *Gliomastix murorum* (Corda) S. Hughes, *Lecanicillium psalliotae* (Treschow) Zare et W. Gams, *Paecilomyces inflatus* (Burnside) Carmichael, *Paraconiothyrium sporulosum* (W. Gams et Domsch) Verkley, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. canescens*, *P. funiculosum* Thom, *P. rubrum* Sopp, *P. variabile* Sopp, *Phoma*

herbarum Westend., *P. leveillei* Boerema et G.J. Bollen, *Pseudallescheria boydii* (Shear) McGinnis, A.A. Padhye et Ajello, *Scopulariopsis brumptii* Salv.-Duval, *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb.) S. Hughes, *Trichoderma harzianum* Rifai, *T. koningii* Oudem.

Всего из семи исследованных почв было выделено и идентифицировано около 100 штаммов микроорганизмов.

Для ответа на поставленные задачи и выявления наиболее «активных» микроорганизмов с точки зре-

ния их биоповреждающей способности по отношению к полиэтилену высокого давления образцы пластика были инокулированы всеми 100 идентифицированными штаммами из различных почв.

В табл. 3 представлены результаты, показывающие избирательность действия штаммов микроорганизмов по отношению к различным маркам полиэтилена. Интенсивность развития мицелия на поверхности полимера с низким показателем текучести (марка ПЭВД 153 03-003) ниже по сравнению с марками ПЭВД 108 03-020 и ПЭВД 158 03-020, имеющими более высокое значение ПТР. При одинаковом значении ПТР (марки ПЭВД 158 03-020 и ПЭВД 108 03-020) интенсивность развития мицелия зависит от плотности материала: чем ниже плотность полимера, тем выше степень его обрастания. Таким образом, определяющий фактор степени грибостойкости полимеров – их плотность.

Результаты по определению эффективности типов почв при твердофазном культивировании штаммов неоднозначны. Трудно оценить отличие активности штаммов, взятых из почв № 1–4, что подтверждается данными газохроматографического анализа: например, штамм *Aspergillus sydowii* на подложке ПЭВД 15803-020 продуцирует метиловый эфир бутановой кислоты и 2-этил-1-гексанол независимо от того, из какой почвы он выделен. Однако по интенсивности развития мицелия было очевидно, что наиболее «активными» (интенсивность развития мицелия от 4 баллов) были штаммы микроорганизмов образца почвы № 7.

«Активными» штаммами – биодеструкторами для исследуемых полиэтиленов являются:

в случае ПЭВД 153 03-003 – *Acrostalagmus luteoalbus*, *Aspergillus niger*, *A. sydowii*, *A. versicolor*, *A. ustus*, *Aureobasidium pullulans*, *Tichoderma harzianum*, *Gliomastix murorum*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium canescens*, *Mucor circinelloides*, *Lecanicillium psalliotae*, *Talaromyces helicus*, *Clonostachys solani*, *Fusarium solani*, *P. chrysogenum*, *Trichoderma harzianum*;

в случае ПЭВД 158 03-020 – *Talaromyces helicus*, *Fusarium oxysporum*, *Lecanicillium psalliotae*, *P. citrinum*, *P. chrysogenum*, *Acrostalagmus luteoalbus*, *A. sydowii*, *Actinomucor elegans*, *A. glaucus*, *Aureobasidium pullulans*, *P. aurantiogriseum*, *A. versicolor*;

в случае ПЭВД 108 03-020 – *Lecanicillium psalliotae*, *P. chrysogenum*, *Acrostalagmus luteoalbus*, *F. solani*, *A.*

sydowii, *Actinomyces elegans*, *A. glaucus*, *Aureobasidium pullulans*, *Trichoderma harzianum*, *P. aurantiogriseum*, *A. versicolor*.

В табл. 4–6 представлены результаты идентификации продуктов, образующихся при инокуляции почвенными микроорганизмами поверхности полиэтиленов.

Молекула полиэтилена не содержит атомов кислорода, азота и фрагментов ароматических и насыщенных углеводородов. Выявленные низкомолекулярные соединения, содержащие азот, кислород и насыщенные углеводороды, однозначно свидетельствуют о том, что это продукты метаболизма, образующиеся в процессе «расходования» полиэтилена микроорганизмами. Соединения, представленные в табл. 4–6, с большой долей вероятности можно отнести к продуктам взаимодействия полимеров и микроорганизмов, в том числе и вторичных метаболитов грибов, так как они отсутствуют в контрольных образцах.

Концентрация идентифицированных органических соединений находится на уровне $1,0 \cdot 10^{-3} - 5,0 \cdot 10^{-4} \%$. В работе [5] при рассмотрении механизмов биоповреждений акрилатов, термопластичных полиуретанов, поливиниловых спиртов показано, что концентрация органических соединений находится в тех же пределах. Можно предположить идентичность глубины процессов биоповреждений субстратов химического происхождения, основанных как на непосредственной метаболической активности микроорганизмов, так и на выделении ими продуктов жизнедеятельности.

Изменение убыли массы образцов в зависимости от марки ПЭВД представлено в табл. 7. Для ПЭВД 108 03-020 убыль массы составила $1,8 \pm 0,6 \%$ за 28 дней. В случае ПЭВД 15303-003 эта величина составила $1,3 \pm 0,4 \%$. На данном примере обнаружена зависимость глубины биоповреждений от плотности полимерного материала: чем ниже плотность, тем выше степень повреждения, вызванных почвенными микроорганизмами. Причем интенсивность развития мицелия не находится в прямой зависимости от изменения убыли массы образцов.

Данные по изменению массы образцов полиэтиленовых пленок, бывших в контакте с микроорганизмами, по сравнению с контрольными подтверждает результаты о том, что почвенные микромицеты вызывают деструктивные процессы ПЭВД. Отличия связаны как с природой ис-

Изменение массы образцов при инокулировании микроорганизмами, выделенными из почвы № 7, в зависимости от марки полимера

Таблица 7

Микроорганизмы	ПЭВД 108 03-020		ПЭВД 153 03-003	
	убыль массы, %	интенсивность развития мицелия	убыль массы, %	интенсивность развития мицелия
<i>Clonostachys solani</i>	0,26	3,0	1,1	3,4
<i>Asp. ustus</i>	1,0	3,0	0,75	3,0
<i>Talaromyces helicus</i>	0,98	3,0	0,3	3,0
<i>Asp. niger</i>	0,92	2,1	1,9	2,6
<i>Pen. canascens</i>	3,05	2,9	1,9	3,2
<i>Tr. harzianum</i>	3,9	0,7	0,58	3,1
<i>Mucor circinelloides</i>	1,0	2,4	0,01	3,75
<i>Fusarium oxysporum</i>	2,2	3,5	5,1	2,9
<i>Pen. cyclopium</i>	3,8	2,4	0,75	3,5
<i>Pen. variabile</i>	1,75	3,0	3,9	4,75
<i>Lecanicillium psalliotae</i>	2,3	3,75	2,8	3,75
<i>Pen. citrinum</i>	1,2	2,9	0,3	4,7
<i>Pen. chyrogenum</i>	2,6	4,4	3,3	4,8
<i>Acrostalagmus luterabus</i>	2,05	4,75	2,0	3,75
<i>Asp. sydowii</i>	2,6	3,4	1,25	4,25
<i>Asp. glaucus</i>	1,7	3,95	0,3	4,1
<i>Acremonium murorum</i>	1,8	3,1	0,3	3,6
<i>Tr. harzianum</i>	0,7	3,94	0,58	3,1
<i>Aureobasidium aoremonium</i>	1,5	4,75	1,7	3,8
<i>Pen. rubrum</i>	2,4	3,5	0,06	2,6

пользуемых микроорганизмов, так и марками полиэтилена, обладающими важным показателем для биоповреждений – плотностью материала.

Все изученные почвы содержали виды микромицетов, способные обрастать полиэтилены, наиболее разнообразие этих видов было найдено в технозомах. Самые активные штаммы были обнаружены в почве № 7. Это закономерный результат, так как данная почва – технозоем регулируемой свалки технических и бытовых отходов, где сформировано сообщество микроорганизмов, адаптированных к разнообразным полимерным субстратам химического происхождения.

Выделенные органические соединения при биодеструкции ПЭВД экологически безопасны при их утилизации инкубированием в почвах.

Обнаружена идентичность глубины процессов биоповреждений субстратов химического происхождения, основанных как на непосредственной метаболической активности микроорганизмов, так и на выделении ими продуктов жизнедеятельности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гумаргалиева, Г.З. Материаловедческие основы биодеструкции

полимерных материалов/Г.З. Гумаргалиева, И.Г. Калинина//Полимерные материалы. – 2010. – № 7–8. – С. 58–62.

2. Легонькова, О.А. Биодеструкция упаковочных материалов/О.А. Легонькова//ТБО. – 2010. – № 8. – С. 42–43.

3. Легонькова, О.А. Изменение почвенной микобиоты в контакте с полимерными композиционными материалами/О.А. Легонькова, О.В. Селицкая//Материаловедение. – 2007. – № 12. – С. 43–50.

4. Легонькова, О.А. Почвенные микроорганизмы как биодеструкторы полимерных композиционных материалов. Второй съезд микологов России: тез. конф./О.А. Легонькова, О.В. Селицкая. – М., 2008. – 373 с.

5. Легонькова, О.А. Биоповреждения синтетических полимеров под действием почвенных микроорганизмов/О.А. Легонькова//Материаловедение. – 2008. – № 6. – С. 49–55.

6. Теплер, Е.З. Практикум по микробиологии/Е.З. Теплер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева – М.: Колосс, 1979. – 215 с.

7. Domsch, K.H. Compendium of soil fungi. (Sec. ed.)/K.H. Domsch, W. Gams, T. Anderson. – Ehing: IHW-Verlag, 2007. – 672 p.

8. Arxvon, J.A. (1981a) The genera of fungi sporulation in pure culture. Vaduz./J.A. Arxvon//J. Cramer, 1981, a.