

УДК 579.222.4+57.083.18+579.69

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АНАЭРОБНОГО МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА, ВОЗНИКАЮЩИЕ ПРИ КОНТАКТЕ С ОТХОДАМИ ИЗ ПЕНОПОЛИСТИРОЛА¹

© 2024 г. Л. И. Ширинкина^{а, *}, Ю. В. Тактарова^а, М. А. Гладченко^а,
А. Ю. Меркель^б, И. Б. Котова^а

^аМосковский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, 119234, Россия

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

*e-mail: pro100tilka@gmail.com

Поступила в редакцию 02.04.2024 г.

После доработки 12.04.2024 г.

Принята к публикации 19.04.2024 г.

Растущее загрязнение пластиками представляет собой серьезную экологическую проблему, поскольку широкое производство и неадекватная утилизация пластиковых материалов приводят к неблагоприятному воздействию на экосистемы. В работе исследованы структурно-функциональные особенности анаэробного микробного сообщества при контакте с отходами из пенополистирола (ВПС) в метаногенных (МГ), нитрат- (НР) и сульфатредуцирующих (СР) условиях. Показано, что присутствие ВПС в микробном сообществе не оказывает негативного влияния на процессы образования биогаза, а наоборот, приводит к увеличению выхода метана и летучих жирных кислот и изменению их соотношения. В культуральной жидкости вариантов с ВПС обнаружены микрочастицы разного размера: в НР условиях – 2.4×10^6 /мл, в СР условиях – 1.2×10^6 /мл и в МГ условиях – 0.4×10^6 /мл, тогда как в контрольных вариантах без клеток микрочастицы обнаружены не были. Методом сканирующей электронной микроскопии выявлено, что во всех опытных вариантах поверхность полимера стала более рыхлой, рельефной, появились неровности, трещины и отверстия. Рост разнообразия в микробном сообществе, связанный с увеличением числа микробных морфотипов, коррелирует с результатами высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК. При внесении ВПС в анаэробное сообщество, инкубируемое в разных донорно-акцепторных условиях, повысилось число входящих в него групп микроорганизмов и увеличилась доля представителей гидролитических и ацидогенных бактерий (*Sedimentibacter*, *Lentimicrobium*), ацетогенных синтрофов (*Syntrophomonas*, *Desulfovibrio*, *Geobacter*) и метаногенных архей (*Methanosarcina*, *Methanobacterium*). Наше исследование показывает, что отходы из ВПС не являются инертными для микробного сообщества, и контакт с ними приводит к существенным перестройкам в его структуре и функционировании. Обнаруженные изменения поверхности образца, появление микрочастиц и различия в составе промежуточных и конечных продуктов метаболизма сообщества могут свидетельствовать о медленной частичной деструкции путем фрагментации этого вида отходов. Однако поскольку для опытов был взят бытовой ВПС, содержащий кроме основного полимера различные наполнители, то есть вероятность, что наряду с полистиролом деградации подвергаются и входящие в его состав дополнительные вещества (пластификаторы, красители и т.д.). Способность микроорганизмов к деструкции самого полимера требует дальнейших исследований.

Ключевые слова: вспененный полистирол, анаэробное микробное сообщество, метаногенез, нитратредукция, сульфатредукция

DOI: 10.31857/S0026365624050068

Со времен промышленной революции антропогенная нагрузка на окружающую среду неуклонно растет. Среди важных факторов следует выделить

загрязнение отходами и отдельный его вид – загрязнение полимерными ксенобиотиками. В течение 2019–2020 гг. в мире было произведено в среднем

¹Дополнительные материалы к статье размещены по ссылке DOI: 10.31857/S0026365624050068

от 368 до 415 млн. тонн пластика (с ожидаемым приростом 4% в ближайшие годы), что привело к возрастающим масштабам поступления пластиковых отходов в окружающую среду (Billard, Boucher, 2019; Plastics Europe, 2021). Создатели пластиков исходили из того, что изделия будут инертны для окружающей среды. Однако оказалось, что под воздействием абиотических факторов — ультрафиолета, колебаний температуры и влажности, ветровой эрозии — пластик разрушается на свалках и распадается на микропластик, который мигрирует со сточными и грунтовыми водами, загрязняя почву, водные ресурсы и заканчивая свой путь в океане. Показано, что микропластик отрицательно влияет на структуру почвы, ухудшая ее водоудерживающую способность и аэрацию, а также оказывает негативное влияние на круговорот органического углерода и азота в почве, микробную активность почвы и перенос питательных веществ (Cao et al., 2017; Liu et al., 2017; Rillig, 2018; Ruimin et al., 2020).

Микропластик попадает в пищевые цепи, обнаруживается в крови и легких человека, проникает через плацентарный барьер, приводит к риску воспаления сосудов (Ragusa et al., 2021; Vethaak, Legler, 2021; Vlacil et al., 2021; Field et al., 2022).

Значительная доля объемов мирового производства пластика приходится на полистирол (ПС), так как это легкий, дешевый, термостойкий материал, широко используемый в строительстве, упаковке, изделиях бытового назначения, электротехнике, лабораторном оборудовании. ПС получают полимеризацией стирола. Молекула содержит фенильную группу (рис. 1).

В производстве изделий из ПС используются красители, пластификаторы, стабилизаторы (Бакирова, Зенитова, 2009). Для переработки ПС во вспененный полистирол (ВПС) широко применяют метод экструзии, заключающийся в продавливании насыщенного газом расплава полимера через формующую головку (Ярцев и соавт., 2010). Производство также включает стадию отстаивания для удаления вспенивающего агента и замещения его воздухом. Таким образом достигается объемное

соотношение газовой и полимерной фаз от 30 : 1 до 1 : 10. Для утилизации полистирола используют сжигание, термодеструкцию и термоокислительную деструкцию, однако минусом данных методов является образование токсичных продуктов (паров стирола, бензола, этилбензола, толуола, оксида углерода). Перспективной альтернативой является вторичная переработка, однако легкость и дешевизна материала делают сбор отходов из полистирола экономически нецелесообразным, и зачастую компании отдают приоритет переработке других видов пластиков (Клинков и соавт., 2010). Поэтому отходы из вспененного ПС постоянно присутствуют на свалках, в компостируемых массах и в природных местообитаниях.

Биодеградация ПС может быть перспективным решением, однако она осложняется следующими структурными особенностями материала, такими как: молекулярная масса, достигающая 100000–400000 г/моль; гидрофобность; случайное расположение фенильных групп по обеим сторонам полимерной цепи, что обуславливает аморфность полимера; сложность деполимеризации, связанная с тем, что вновь образованная σ -связь “углерод—углерод” прочнее, чем π -связь винильной группы.

В литературе приводятся различные и противоречивые данные о микробной деградации ПС (Котова и соавт., 2021). Большинство исследователей отмечают крайне медленную скорость этого процесса (Плакунов и соавт., 2020). Так, известный деструктор органических соединений *Rhodococcus ruber* в аэробных условиях показал снижение массы ПС 0.8% за 8 нед. культивирования, штаммы *Exiguobacterium sibiricum* и *E. undae* достигли убыли 0.4% массы ПС за 30 сут (Mor, Sivan, 2008; Chauhan et al., 2018).

Процесс микробного разложения ПС природными сообществами проходил быстрее: в образцах с мусорной свалки Саримукти в Индонезии убыль массы ВПС за 7 нед. инкубации в присутствии кислорода составила 18.23% (Hidayat et al., 2020).

В литературе имеется значительно меньше данных об изменениях в составе и функционировании микробных сообществ при контакте с ПС, хотя именно они могут свидетельствовать о существенных экологических сдвигах в отдельных местообитаниях и в биосфере в целом. Например, в опыте Zhang et al. (2020) показана сукцессия сообщества активного ила в анаэробных условиях в присутствии микропластика ПС размером 80 нм и 5 мкм в количестве 0.25 г/л с сопутствующим снижением продукции метана на 19.3–17.9% соответственно. Wei et al. (2020) продемонстрировали, что наночастицы полистирола в количестве 20 и 50 мкг/л также угнетают процесс анаэробного сбраживания сточных вод и снижают выработку метана на 19.0–28.6% в анаэробном реакторе с восходящим потоком. Изучение воздействия частиц

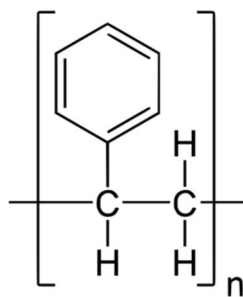


Рис. 1. Структурная формула ПС (Малкин и соавт., 1975).

ПС различного размера на микробное сообщество в образцах почвы показало значительное снижение микробной биомассы, уменьшение скорости нитрификации и рост относительной численности микроорганизмов филума *Proteobacteria* (Ko et al., 2023).

Физико-химические свойства материала во многом определяют методы анализа, применимые для обнаружения признаков деструкции материала в процессе биodeградации. ВПС отличается хрупкостью, пористостью, низкой устойчивостью к растворителям и высоким температурам, по объему содержит до 98% газа, что значительно сужает спектр применимых методик для анализа его состояния.

Целью нашего исследования является изучение изменений состава и функциональных характеристик анаэробного микробного сообщества в присутствии отходов ВПС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биологический материал. В работе использовали метаногенное сообщество ЕРа, выделенное из ила очистных сооружений (EGSB-реактора) стоков пивоваренного завода “Efes Pilsener” (Москва) и адаптированное к полной минерализации 2-аминобензойной кислоты (2-АБК) (Линькова и соавт., 2011).

Образец вспененного полистирола. В экспериментах применяли бытовой ВПС темно-серого цвета, используемый для изготовления подложек для овощей и кондитерских изделий (лоток подложка, 175 × 85 × 20 мм; артикул 1363). Подложку нарезали на пластинки размером 1.5 × 4 см (масса 71.7 ± 7.0 мг), взвешивали, стерилизовали в течение 1 ч в 70% этиловом спирте и сушили в чашках Петри в течение 24 ч.

Среды и условия культивирования. Инкубацию осуществляли в герметичных стеклянных флаконах объемом 100 мл с резиновыми пробками, зажатými алюминиевыми колпачками, и аргонном в качестве газовой фазы с 50 мл минеральной среды (мг/л): NH_4Cl – 280, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 10, K_2HPO_4 – 250, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 100, ЭДТА – 1, NaHCO_3 – 5000, H_3BO_3 – 0.05, $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 2, ZnCl_2 – 0.05, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.05, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.03, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 2, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.05, $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; дрожжевой экстракт – 100; начальный pH 7.0 (Sklyar, 2000). Инкубацию проводили при температуре 30°C в статичных условиях в темноте.

В качестве дополнительных акцепторов электронов в среду вносили растворы солей натрия до конечной концентрации 10 мМ: для создания нитратредуцирующих (НР) условий – NaNO_3 , для создания сульфатредуцирующих (СР) условий – Na_2SO_4 . Для метаногенных (МГ) условий

внешние акцепторы не добавляли. Вносили следующие источники углерода и энергии: 2-АБК 1 мМ (в МГ условиях), пируват 1 г/л (в МГ и НР условиях) и лактат натрия 2 г/л (в СР условиях). Субстраты и другие добавки хранили в виде концентрированных анаэробных растворов и вносили во флаконы стерильным шприцем до нужной концентрации. В качестве инокулята использовали суспензию клеток микробного сообщества (ОП₆₀₀ 1.0), предварительно выращенного на минеральной среде с 2-АБК и пируватом в течение 9 сут. Посевной материал составлял 10% от объема среды. В качестве контролей использовали минеральную среду без и с дополнительными акцепторами электронов, в которую был помещен ВПС, без микробных клеток (химический контроль), и минеральную среду без ВПС, содержащую микробное сообщество (биологический контроль, контроль роста клеток).

Методы анализа. В культуральной жидкости отслеживали изменения pH, содержания общего белка и летучих жирных кислот (ЛЖК), а в газовой фазе следили за соотношением основных газов. Для регистрации возможной деструкции ВПС отслеживали визуальные изменения поверхности и целостности пластика, определяли присутствие микропластика в культуральной жидкости и фиксировали убыль массы образцов ВПС. Морфологические особенности микроорганизмов исследовали микроскопически, а изменения в составе микробного сообщества – с помощью высокопроизводительного секвенирования участков гена 16S рРНК.

Измерение pH культуральной жидкости проводили с помощью тест-полосок (“Johnson”, Великобритания).

Определение белка. Измерение общего белка в культуральной жидкости проводили по Бредфорд (Bradford, 1976). Культуральную жидкость освобождали от клеток центрифугированием при 15000 об./мин в течение 10 мин. Супернатант в объеме 50 мкл помещали в микропробирки, смешивали с 950 мкл красителя Кумасси, избегая образования пены. Измеряли оптические плотности испытуемого раствора и растворов сравнения с известным содержанием белка на спектрофотометре Shimadzu UV-1202 (“Shimadzu”, Япония) при длине волны 595 нм, с использованием в качестве контрольного раствора смеси 50 мкл дистиллированной воды и 950 мкл красителя Кумасси.

Определение содержания летучих жирных кислот. Содержание ЛЖК в культуральной жидкости определяли с помощью газо-жидкостной хроматографии на хроматографе Кристалл 5000М (“Хроматэк”, Россия), используя капиллярную колонку 50 м × 0.32 мм, НР-FFAP, 0.5 мкм, пламенно-ионизационный детектор. Пробу предварительно осаждали центрифугированием при 15000 об./мин в течение 10 мин. Супернатант объемом 1 мкл вводили

в прибор. Определение концентрации компонентов смеси осуществляли на основе вычисления отношения площадей пиков компонентов к соответствующим площадям пиков веществ в стандартных растворах.

Определение содержания газов. Каждые 30–40 сут шприцем отбирали 1 мл пробы газовой фазы флакона и определяли содержание метана, углекислого газа и сопутствующих газов на газовом хроматографе ЛХМ 8 МД — модель 3 с катарометром (“Хроматограф”, Россия), газ-носитель — аргон, скорость газа-носителя — 20 мл/мин. Колонки длиной 2 м были заполнены порпаком QS. Количественное определение компонентов проводили на основе вычисления площади под хроматографическим пиком. Избыточное давление во флаконах измеряли с помощью манометра 332.30 (“Wika”, Германия) и учитывали эти данные при расчете конечных концентраций газовых метаболитов. Для преобразования численного значения объемной концентрации газа, выраженной в процентах, в молярную концентрацию (мМ) применяли следующую формулу:

$$Y = \frac{(P_1 \times P_{\text{общ.}} \times T_0 \times V_{\text{г.ф.}})}{(P_0 \times 22.4 \times T_1 \times V_{\text{ж.ф.}})} \times 1000,$$

где P_1 — парциальное давление газа, (%/100); $V_{\text{ж.ф.}}$ — объем жидкой фазы во флаконе, мл; $V_{\text{г.ф.}}$ — объем газовой фазы во флаконе, мл; T_0 — температура при нормальных условиях, 273°K; T_1 — рабочая температура, °K; P_0 — давление при нормальных условиях, 1 атм.; $P_{\text{общ.}}$ — общее давление во флаконе, атм.; 22.4 — объем 1 моль газа при 273°K, л·моль⁻¹. При этом делали допущение, что весь газ, образовавшийся в культуральной жидкости, выходит в газовую фазу флакона.

Гравиметрия. Образцы пластика извлекали из флаконов, трижды промывали дистиллированной водой, помещали в 2% раствор додецилсульфата натрия на 1 ч на ротационный шейкер со 160 об./мин при 30°С, после чего снова трижды промывали водой и сушили 24 ч в открытых чашках Петри в термостате при температуре 55°С. Отмытые и высушенные образцы взвешивали на электронных весах ER-60A (“A&D”, Япония).

Световая микроскопия. Морфологию микроорганизмов исследовали путем приготовления препаратов живых и фиксированных окрашенных фуксином клеток (ФОП) и их просмотра в световом микроскопе Биолам 2 (“ЛОМО”, Россия). Количество частиц микропластика определяли подсчетом в камере Горяева—Тома при просмотре в том же световом микроскопе при увеличении $\times 40$ с последующим пересчетом на объем культуральной жидкости.

Сканирующая электронная микроскопия. Препараты клеток для сканирующей электронной микроскопии подвергали фиксации 2.5% глутаровым альдегидом на фосфатном буфере в течение 30 мин, затем дегидрировали в этиловом спирте с постепенным увеличением концентрации (30, 50, 70, 80 и 99.5%) и последующим погружением в смеси абсолютного спирта и ацетона в пропорциях 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3. Препараты выдерживали в абсолютном ацетоне на протяжении 12 ч, затем высушивали в критической точке с использованием оборудования HCP-2 Critical Point Dryer (“Hitachi”, Япония) и покрывали смесью Au—Pd в ионно-распылительной установке Eiko IB-3 Ion Coater (“Hitachi”, Япония).

Образцы ВПС подвергали напылению смесью Au—Pd без процедуры сушки, в связи с неустойчивостью материала к используемым в методике растворителям. Анализ образцов проводили с использованием сканирующего электронного микроскопа JSM-6380LA (“Jeol”, Япония) в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 20 кВ в режиме регистрации вторичных электронов.

Определение состава микробного сообщества. Состав микробного сообщества анализировали с помощью высокопроизводительного секвенирования участков гена 16S рРНК. Следуя инструкциям производителя, выделяли из проб тотальную ДНК (набор FastDNA Spin Kit for Soil; “MP Biomedicals”, США) и оценивали концентрацию и чистоту препаратов ДНК спектрофотометрически на приборе NanoDrop 2000C (“Thermo Fisher Scientific”, США) при λ 260 и 280 нм. Амплификацию фрагментов генов 16S рРНК проводили с помощью ПЦР, используя “универсальные” праймеры для участка V4 по методике Fadrosch et al. (2014). Применяли систему праймеров 515F (5'-GTGBCAGCMGCCGCGGTAA-3') (Hugert et al., 2014) и Pro-mod-805R (5'-GACTACNVGGGTMTCTAATCC-3') (Merkel et al., 2019). Полученные ПЦР-фрагменты секвенировали на платформе MiSeq (“Illumina”, США) с использованием набора реактивов для считывания 150 нуклеотидов с каждого конца. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили при помощи программного пакета QIIME2 (Bolyen et al., 2019). Относительное количество прочтений, входящих в ту или иную ОТЕ, соответствует относительной представленности данного таксона микроорганизмов в исследуемом микробном сообществе. Статистические подсчеты осуществляли с помощью Microsoft Excel. Тепловые карты для сравнительного анализа филогенетического состава микробных сообществ генерировали с помощью платформы ClustVis — <https://biit.cs.ut.ee/clustvis/> (Metsalu, Vilo, 2015).

Статистическая обработка результатов. Эксперименты проводили в трехкратной повторности.

Для каждой точки вычисляли среднее значение, которое сравнивали по показателям стандартного отклонения и доверительного интервала при $P \leq 0.005$. На графиках представлены значения в виде “среднее $\pm$ среднее отклонение”. Вычисления проводили в программе Microsoft Excel 2007 (“Microsoft”, США) и STATISTICA (StarSoft Россия, 2015).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех донорно-акцепторных условиях в вариантах с ВПС наблюдали помутнение среды (доп. материалы, рис. S1), тогда как в контрольных вариантах без пластика среда оставалась прозрачной.

В МГ условиях во флаконах с ВПС формировался мелкий рыхлый черный осадок, в то время как без ВПС образовавшийся осадок в виде плотных агрегатов клеток имел светло-бежевый цвет.

В НР условиях в присутствии ВПС наблюдали образование мелкого плотного бежевого осадка и его последующее превращение в черный рыхлый осадок, в то время как в контрольном варианте без пластика осадок в виде плотных агрегатов сначала имел яркий рыжий цвет, а затем стал бежевым.

В СР условиях в присутствии ВПС образование мелкого черного рыхлого осадка происходило в большем количестве, чем в контрольном варианте без пластика.

В вариантах микробного сообщества, инкубируемых без пластика, значение pH составляло 7.7–8.2 и существенно не изменялось на протяжении всего времени эксперимента. В вариантах с добавлением ВПС во всех донорно-акцепторных условиях на 99-е сут происходило некоторое снижение pH (до 6.3–7.0), вероятно, связанное с образованием ЛЖК. Схожее снижение pH с 7.0 до 6.8 было показано Naz et al. (2013) при культивировании активного ила очистных сооружений с фрагментами упаковочного материала на основе ПС в стеклянных флаконах объемом 2892 мл в анаэробных условиях в течение 9 нед., что авторы также связывают с накоплением кислых продуктов.

Содержание белка в вариантах с ВПС на протяжении эксперимента немного превышало содержание в вариантах без ВПС, к 267 сут в вариантах с СР и МГ условиями разница резко увеличилась, в случае НР условий разница увеличилась к 307 сут эксперимента (рис. 2).

Сходный характер кривой содержания белка получен в исследовании процесса формирования биопленки аэробным штаммом *Bacillus megaterium* на поверхности ПС. К третьему дню культивирования в опыте содержание белка достигло пика в 91.1 мкг/мл, но к десятому дню резко снизилось до минимального значения в 46.4 мкг/мл. Последующее культивирование в течение 40 сут показало устойчивый медленный рост содержания белка до 64.7 мкг/мл. Авторы связывают

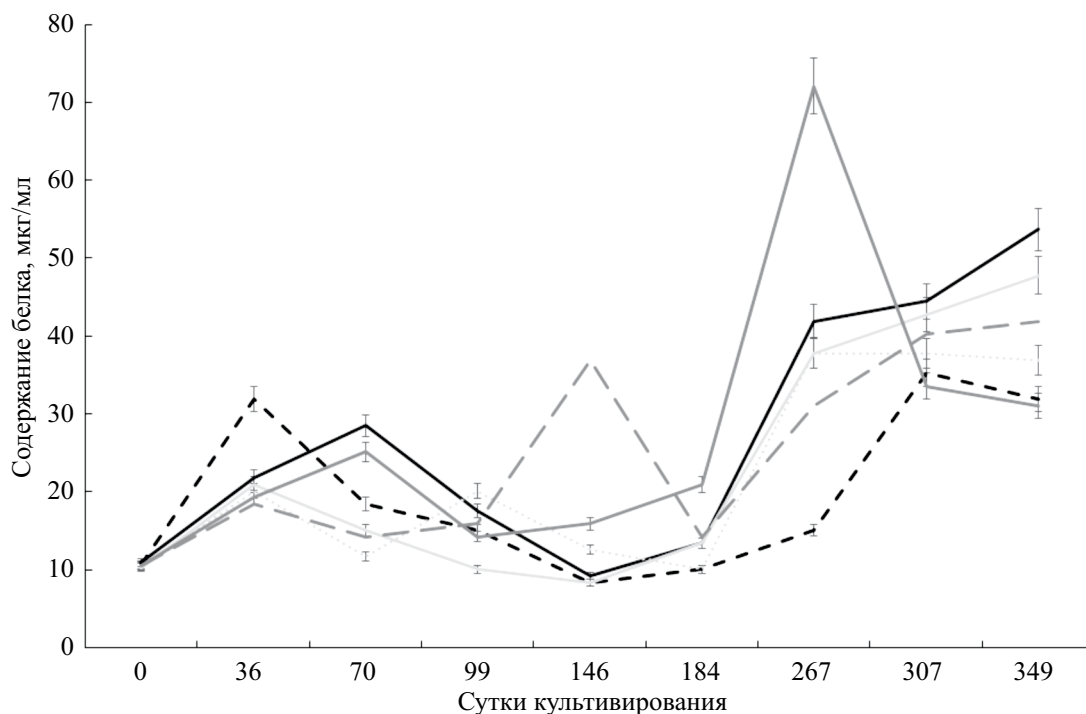


Рис. 2. Содержание белка в сообществе ЕР в МГ (черный цвет), НР (светло-серый цвет) и СР условиях (темно-серый цвет); сплошная линия — опыт в присутствии ВПС; пунктирная линия — биологический контроль.

колебания в содержании белка с быстрой пролиферацией клеток при прикреплении к поверхности пластика, гибелью клеток в процессе адаптации к ПС в качестве единственного источника углерода и медленным ростом адаптированных клеток (Tan et al., 2021).

Определение промежуточных летучих продуктов в анаэробных микробных сообществах, контактирующих с ВПС, показало, что в МГ условиях с ВПС образуется на 120.3% больше формиата по сравнению с аналогичным микробным сообществом без добавления пластика. В НР и СР условиях с ВПС разница в образовании формиата составила до 39.8 и 13.8% соответственно (доп. материалы, рис. S2). Образование ацетата в присутствии ВПС превышало показатели по сравнению с аналогичным микробным сообществом без добавления пластика в МГ условиях на 18.7%, в НР — до 23.5%, в СР — до 21.6% (доп. материалы, рис. S3). Продукция пропионата в контакте с ВПС отличалась на 10.2% в МГ условиях, до 8.1% в НР и до 61.3% в СР условиях (доп. материалы, рис. S4). Разница в образовании валерата в присутствии ВПС по сравнению с аналогичным микробным сообществом без добавления пластика составляла до 113.6% в МГ, до 49.4% в НР и до 43.2% в СР условиях (доп. материалы, рис. S5).

Также во всех донорно-акцепторных условиях сообщества, контактировавшие с ВПС, в отличие от контрольных образцов показали наличие следов изобутирата и бутирата.

Можно отметить, что присутствие ВПС вызывает значимые отклонения в содержании и соотношении ЛЖК по сравнению с контрольными образцами без пластика. На 340 сут в опытных образцах наблюдали большее количество формиата, ацетата, пропионата и валерата. Это соответствует результатам измерения pH, показывающим закисление среды. Сходная тенденция показана в работе Zhang et al. (2021b) по изучению влияния пластмасс на производительность реактора и микробные сообщества при ацидогенной ферментации пищевых отходов. В опыте длительностью 25 сут добавление полиэтилена высокого давления и ВПС увеличили общий выход ЛЖК на 28 и 47% соответственно, в то время как добавление полипропилена и полиэтилентерефталата снижало общую продукцию ЛЖК на 6 и 2%. Наибольший выход в присутствии ВПС авторы связывают с высокопористой структурой материала, обеспечивающей эффект иммобилизации клеток микроорганизмов. Также существуют работы, демонстрирующие индуцирующее влияние наночастиц ПС на продукцию ЛЖК

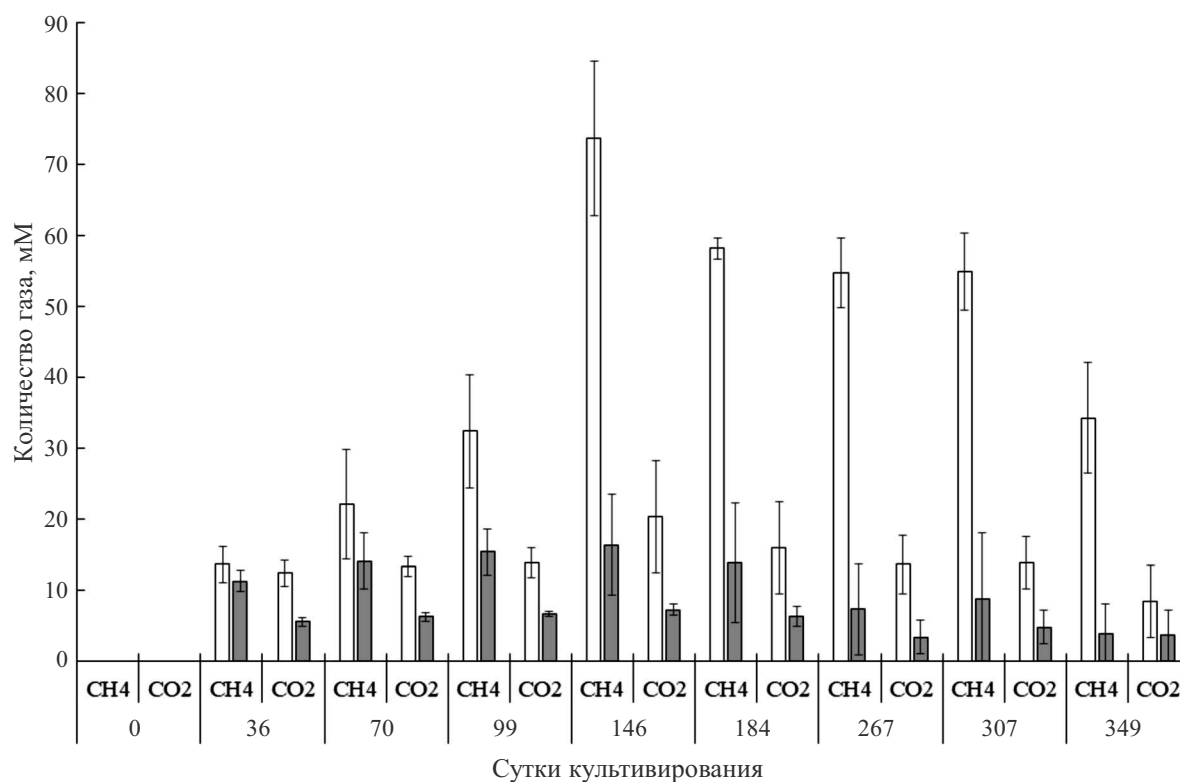


Рис. 3. Динамика образования газов во флаконах с сообществом ЕРa в МГ условиях: белые столбики — опыт в присутствии ВПС, серые — биологический контроль.

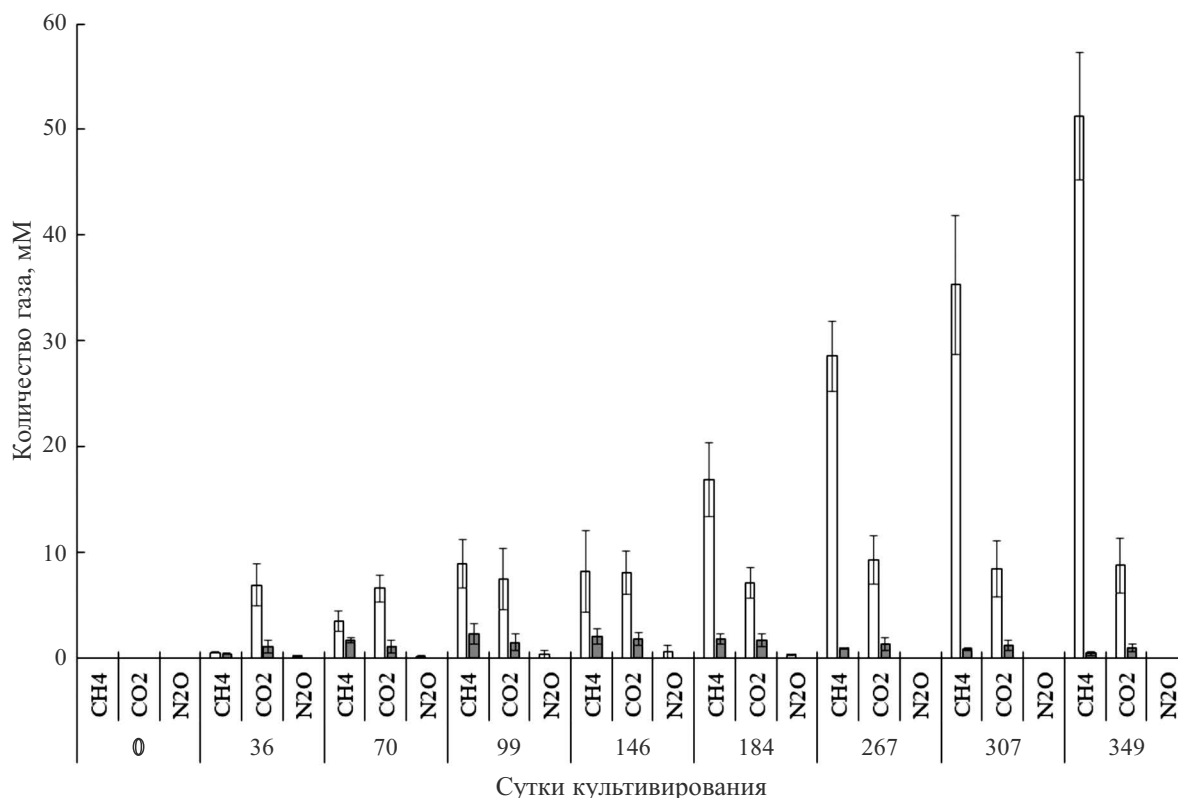


Рис. 4. Динамика образования газов во флаконах с сообществом ЕР в НР условиях: белые столбики — опыт в присутствии ВПС, серые — биологический контроль.

в анаэробных реакторах на величины порядка 22.6% с сопутствующим падением выхода биогаза на 67.1% (Wei et al., 2020). В работе Wang et al. (2022) показаны обратные результаты, согласно которым присутствие микро- и наночастиц ПС в реакторе приводит к снижению суммарной продукции ЛЖК до 38.3% и снижению уровня метана на 67.1%.

Обнаружено, что в присутствии ВПС у анаэробного микробного сообщества изменяется количество образованных конечных газообразных продуктов. Показано, что микробное сообщество в МГ условиях в контакте с пластиком продуцирует в 9 раз больше CH_4 и в 2.3 раза — CO_2 , чем в контрольных флаконах. Наибольшую разницу наблюдали на 146 сут культивирования, однако впоследствии она сократилась (рис. 3).

В НР условиях разница в продукции CH_4 для сообщества с ВПС составила до 100 раз, а CO_2 — до 8.8 раза. Наибольшая разница в содержании метана возникла на 349 сут культивирования и составила 50 мМ этого газа. Также в вариантах с пластиком был обнаружен предположительно N_2O в количестве до 0.6 мМ. Содержание N_2O росло до 146-х сут, затем стало падать, и с 267 сут этот газ перестал определяться в пробах из-за истощения нитрата в среде (рис. 4).

В СР условиях в первые 2 мес. количество CH_4 во флаконах с ВПС было в 1.6 раза меньше по сравнению с его количеством в контрольных флаконах, однако в конце опыта наблюдали образование CH_4 на 70% выше, чем в контроле (рис. 5).

Наибольшая разница возникла на 349-е сут культивирования и составила 22.9 мМ метана. Продукция CO_2 в СР условиях с ВПС превышала данные показатели для вариантов без пластика на 10% и это соотношение сохранялось на протяжении всего опыта. Сероводород появился в пробах только после 70 сут культивирования, и его количество во флаконах с ВПС продолжало расти за время опыта. В среднем содержание сероводорода в образцах с пластиком было в 2.5–3 раза выше, чем в контрольных вариантах.

Выход биогаза используется в качестве аналитического параметра для определения конечной биоразлагаемости полимеров в международных стандартах. На количественный выход биогаза влияет множество факторов, таких как время культивирования, закисление среды вследствие накопления ЛЖК, избыточное содержание белка, приводящее к ингибированию метаногенов аммонием (Ножевникова и соавт., 2016). Воздействие ПС и ВПС на продукцию биогаза изучено недостаточно.

Большее внимание уделяется влиянию микро- и нанопластиков, однако существующие литературные данные противоречивы. Воздействие микрочастиц ПС размером 80 нм и 5 мкм в концентрации 0.2 г/л и менее не влияло на кумулятивную продукцию CH_4 , но концентрации выше 0.25 г/л снижали выход метана на 19.3 и 17.9% соответственно (Zhang et al., 2020). При этом анализ влияния наночастиц ПС показал подавление ацидогенеза в микробном сообществе путем ингибирования активности ацетаткиназы с последующим уменьшением выработки CH_4 (Wang et al., 2022). Выдвигаются предположения о дозозависимом эффекте ПС, например, добавление 20–40 микрочастиц ПС на 1 г веса сухого анаэробного ила увеличило выход метана на 3.38–8.22%, но в дозе 80–160 микрочастиц привело к снижению продукции метана на 4.78–11.04% (Zhao et al., 2023).

В нашей работе показано, что присутствие ВПС в микробном сообществе не оказывает негативного влияния на процесс метанообразования. Напротив, наблюдающееся увеличение количества газов, как конечных продуктов в вариантах с добавлением пластика по сравнению с вариантами без него, в разных донорно-акцепторных условиях может свидетельствовать о частичной деструкции ВПС и возможности его минерализации до CH_4 и CO_2 .

Также это говорит о функциональных изменениях анаэробного микробного сообщества при контакте с данными пластиковыми отходами.

По результатам гравиметрии убыль массы образца ВПС составила 2.3% в НР условиях на 349 сут эксперимента. Для вариантов в СР и МГ условиях показатели были нестабильными, в связи с чем невозможно достоверно подтвердить убыль массы данных образцов. Это вызвано такой особенностью гравиметрического метода, как низкая чувствительность при маленьких значениях измерений. Исследователи также отмечают сложность достижения необходимой степени очистки образца, особенно для таких пористых материалов, как ВПС (Muller, 2005). Также потеря массы может быть связана с исчезновением летучих и растворимых примесей (Lucas et al., 2008). Следует отметить, что гравиметрия затрагивает только ранние стадии процесса биоразложения, но не дает информации о степени минерализации (Zee, 2005). По литературным данным для ПС характерна малая скорость разложения. Syranidou et al. (2017) показали убыль массы ПС на 0.19–4.7% спустя 12 мес. инкубации с различными морскими микробными сообществами и пленками ПС в качестве единственного источника углерода и энергии. В реакторе с анаэробным микробным

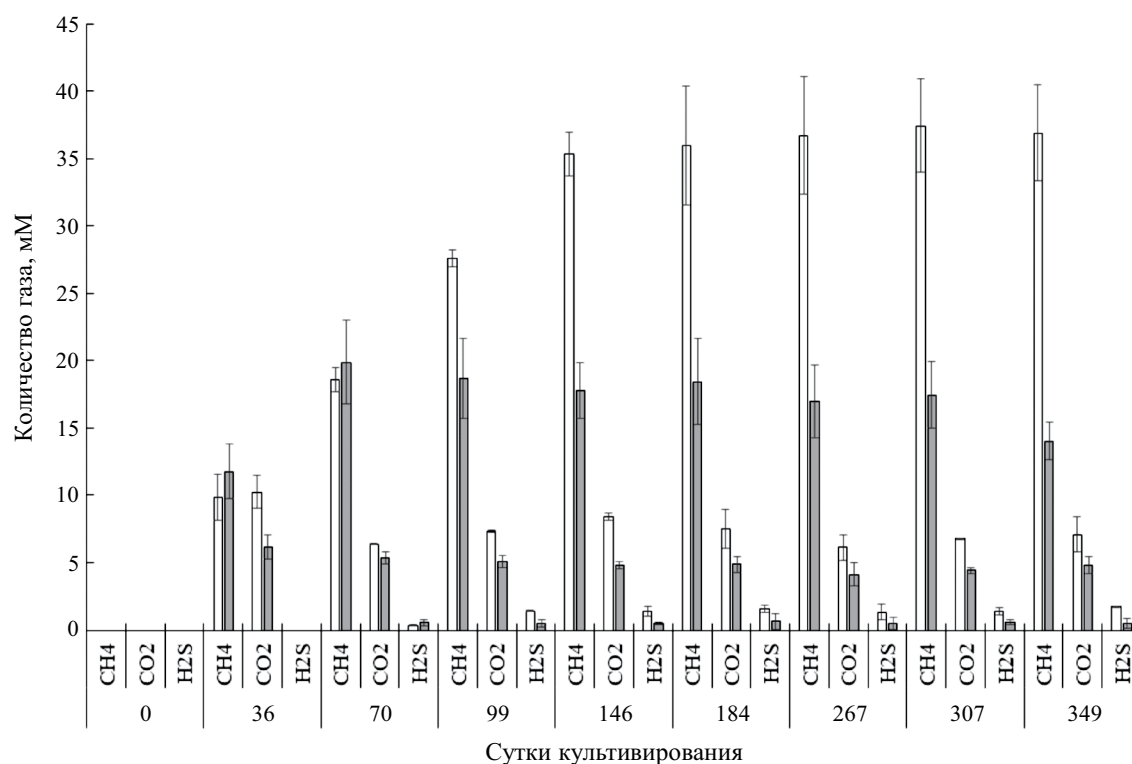


Рис. 5. Динамика образования газов во флаконах с сообществом ЕР в СР условиях: белые столбики — опыт в присутствии ВПС, серые — биологический контроль.

сообществом удалось достичь биодеструкции ВПС до 6.3% за 25 сут (Zhang et al., 2021b).

Для первоначальной оценки биоразложения также используют визуальное наблюдение за структурой поверхности полимера (появление шероховатости, образование отверстий и трещин, изменение цвета) и методы микроскопии — сканирующей электронной, атомно-силовой, поляризационной (Ва Но, 2018). В эксперименте с микробным сообществом ЕРа показано, что поверхность пластика во всех опытных вариантах стала более рыхлой, рельефной, появились неровности, трещины и отверстия (рис. 6).

Различия на поверхности полимеров также обнаружены при сравнении необработанных и обработанных микроорганизмами морского сообщества пленок ПС (Syranidou et al., 2017). Образцы, выветренные естественным путем, имели более гладкую поверхность без трещин и отверстий, в то время как инкубация с морскими консорциумами привела к увеличению шероховатости и появлению

множества трещин. Naz et al. (2013) показали образование биопленки сообществом активного ила на поверхности ПС спустя 9 нед. инкубации как в аэробных, так и в анаэробных условиях, сопровождаемое структурными изменениями поверхности материала. Отмечено, что на частицах ПС образуется более толстая микробная биопленка, чем на других пластиках, таких как полиэтилен и полипропилен. Авторы связывают это с пористостью материала и большим количеством складок (Shi et al., 2022).

В культуральной жидкости вариантов с ВПС присутствовало довольно большое количество микрочастиц черного цвета и разного размера (рис. 7): в НР условиях — 2.4×10^6 /мл, в СР условиях — 1.2×10^6 /мл и в МГ условиях — 0.4×10^6 /мл. В большинстве случаев они обнаруживались в составе скоплений клеток, но иногда встречались и в свободном состоянии. В контрольных вариантах (без клеток) микрочастицы обнаружены не были.

Известно, что микро- и наночастицы пластика образуются в результате фрагментации

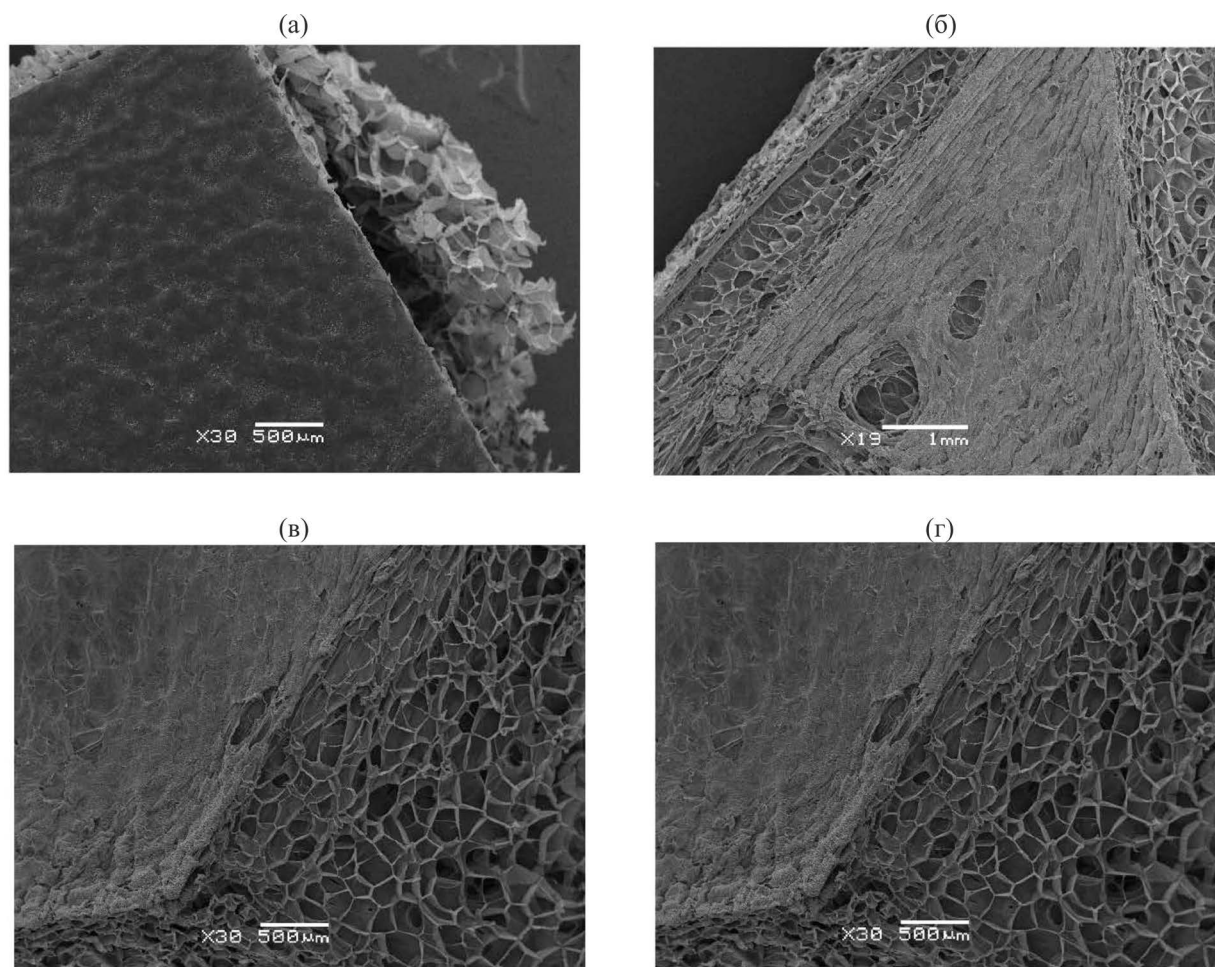


Рис. 6. Сканирующая электронная микроскопия поверхности ВПС: а — химический контроль (среда без клеток); б — МГ условия; в — НР условия; г — СР условия. Увеличение $\times 30$.

пластикового мусора, происходящей под действием абиотических и биотических факторов (Zhang et al., 2021a). Однако свидетельства образования микропластика в процессе микробной биodeградации недостаточно представлены в литературе. Мы полагаем, что под действием анаэробного микробного сообщества происходит медленная частичная деструкция пластинки ВПС путем фрагментации с образованием микрочастиц данных отходов, что еще раз показывает экологическую опасность пластикового загрязнения. Поскольку на начальных стадиях процесса производства вспененного полистирола образуется гомогенная масса, состоящая из стирола и различных красителей и добавок, которая затем подвергается полимеризации и отверждению, то обнаруженные твердые микрочастицы могут содержать все эти вещества и/или интермедиаты их деструкции. Для определения химического состава микрочастиц требуются дальнейшие исследования, однако,

так как в химическом контроле (варианте без клеток) микрочастиц не обнаружено, то их наличие в опытных вариантах свидетельствует, что такая фрагментация пластинки ВПС — это результат деятельности микроорганизмов.

В процессе культивирования микробного сообщества в контакте с ВПС наблюдали его морфологические изменения. Так, по данным световой и сканирующей электронной микроскопии исходное сообщество было представлено различными типами палочек и кокков, объединенных в агрегаты темного цвета, с преобладанием крупных прямых палочек с обрубленными концами в виде коротких цепочек и коккобацилл, лежащих попарно (доп. материалы, рис. S6). В МГ условиях в присутствии пластика отмечено исчезновение крупных прямых палочек с обрубленными концами в виде коротких цепочек, появление значительно количества крупных кокков в скоплениях и по

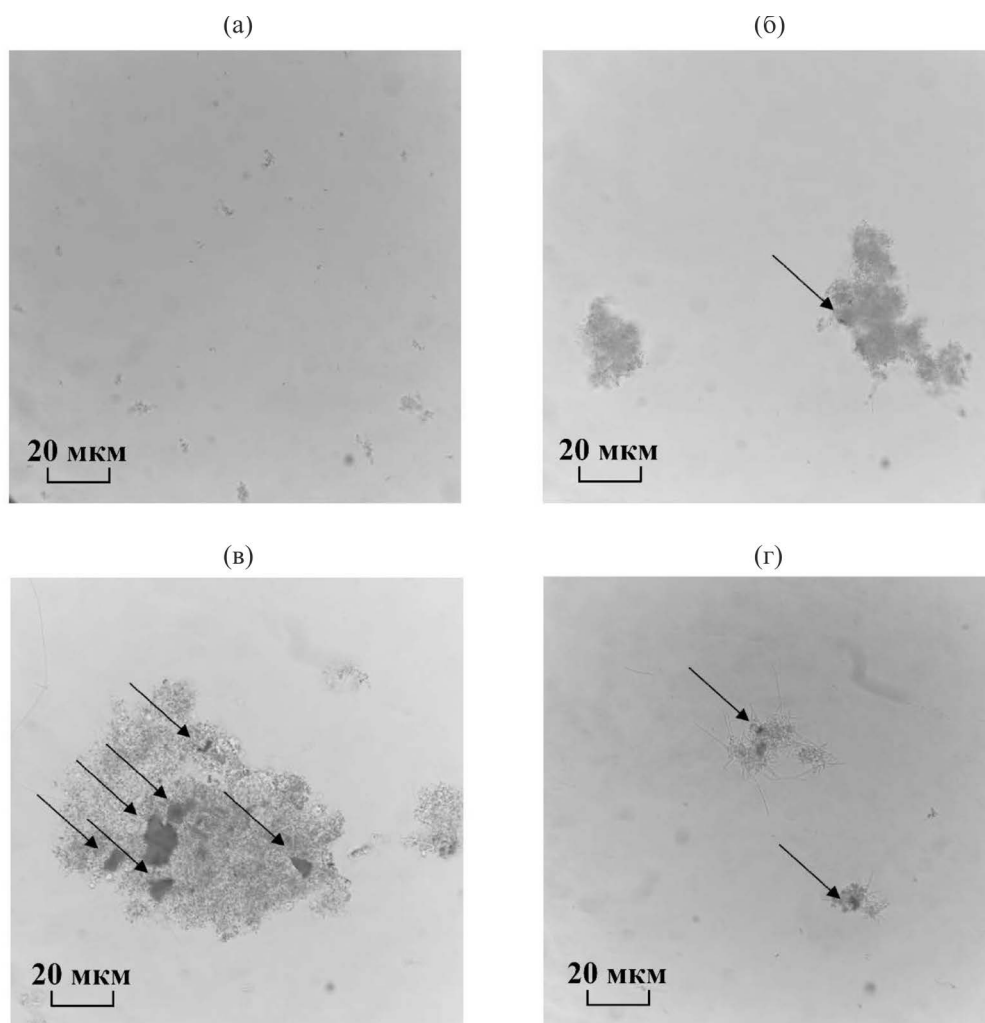


Рис. 7. Световая микроскопия культуральной жидкости микробного сообщества в присутствии ВПС: а — химический контроль; б — МГ условия; в — НР условия; г — СР условия. Увеличение $\times 400$.

отдельности, а также крупных, среднего размера и коротких палочек (доп. материалы, рис. S7). В НР условиях с ВПС в микробном сообществе также отмечено исчезновение крупных прямых палочек с обрубленными концами в виде коротких цепочек. Обнаружено большое количество изогнутых палочек, кокки среднего и маленького размера, отдельные короткие палочки (доп. материалы, рис. S8). В варианте, инкубировавшемся в СР условиях с пластиком, было отмечено наличие изогнутых клеток, а также крупных палочек, крупных и мелких кокков, расположенных отдельно и в скоплениях (доп. материалы, рис. S9). Рост разнообразия в микробном сообществе, представленный увеличением числа микробных морфотипов, коррелирует с результатами профилирования по гену 16S рНК.

Анализ филогенетического разнообразия микробных сообществ до и после контакта с ВПС, проведенный с помощью высокопроизводительного секвенирования, показал, что в исходном

метаногенном сообществе, адаптированном к 2-АБК, значительно преобладают представители родов *Lysinibacillus* (48.0%), *Brevibacillus* (19.9%), *Clostridium* (5.6%), и *Sedimentibacter* (5.2%) (рис. 8).

Домен *Bacteria* при пороге отсека 1% представлен 20-ю таксономическими группами. Представители домена *Archaea* совокупно составляют 0.025%. При внесении ВПС во всех вариантах (НР, МГ, СР) повысилась степень разнообразия сообщества, при этом доля домена *Archaea* выросла до 1.7–6.0%, а бактерий родов *Lysinibacillus* и *Brevibacillus* — упала до 0.1–0.3%. В сообществе в МГ, НР и СР условиях выявлено 29, 35 и 35 групп соответственно. В МГ условиях преобладающими стали *Sedimentibacter* (15.6%), в НР — *Lentimicrobium* (19.3%), в СР — новая группа *Desulfovibrio* (36.1%). Кроме того, зафиксировано появление новых групп: рода *Syntrophomonas* (10.2%) и сем. *Spirochaetaceae* (8.0%) в МГ условиях, рода *Desulfotobacterium* (6.9%), сем. *Spirochaetaceae* (5.8%), *Geobacteraceae* (7.5%) и *Rikenellaceae*

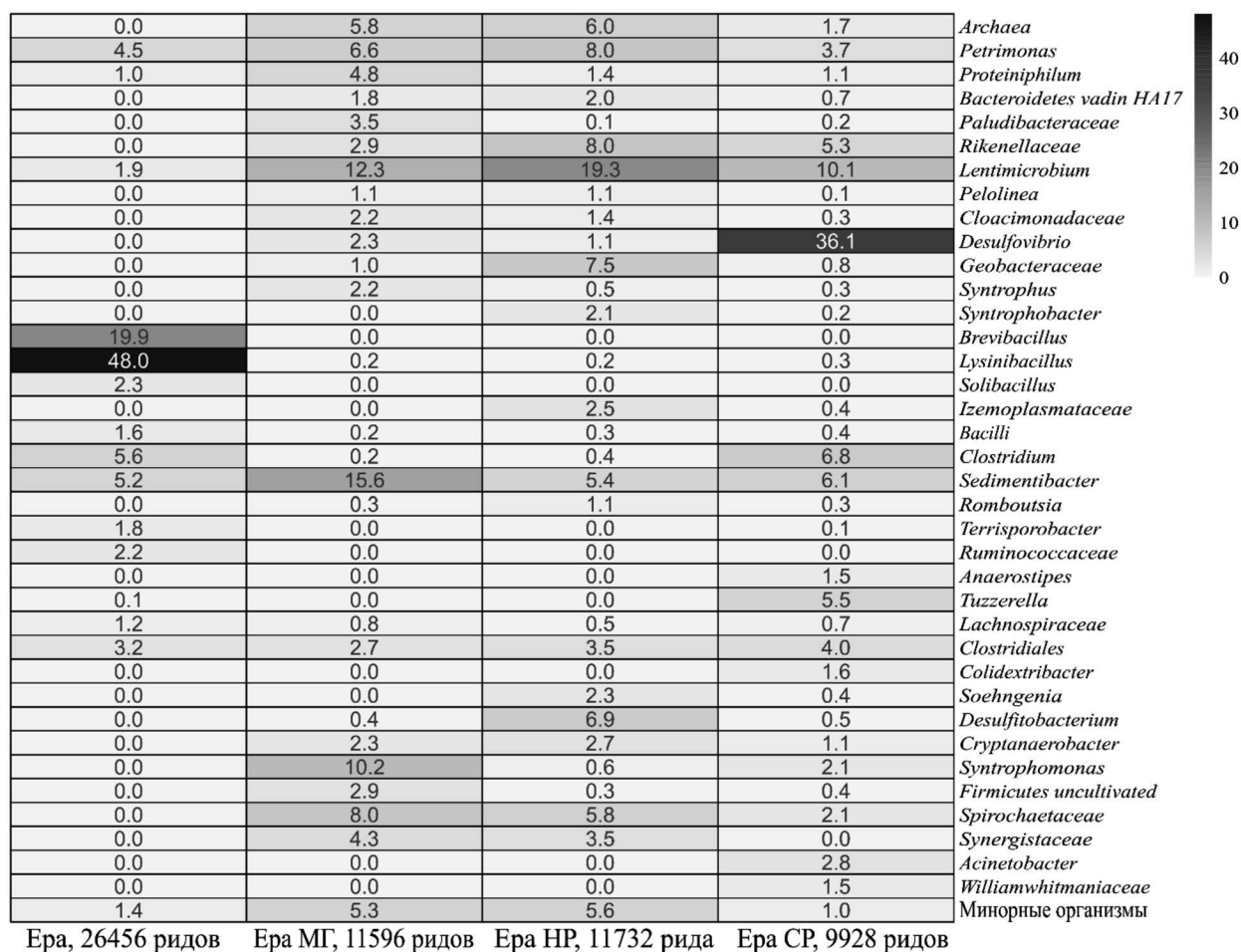


Рис. 8. Тепловая карта распределения 38 доминантных таксономических единиц бактерий и архей по 4 библиотекам, представляющим микробные сообщества до и после контакта с ВПС. Представленность родов рассчитана как отношение количества ридов, принадлежащих представителям данного рода, к общему количеству ридов в соответствующей библиотеке.

(8.0%) в НР условиях и сем. *Rikenellaceae* (5.3%) в СР условиях.

В архейном компоненте сообщества в возрастании доли метаногенов до 2–6% ключевую роль сыграли представители родов *Methanobacterium* и *Methanosarcina* (рис. 9).

Представители преобладающих таксонов известны как деструкторы ряда сложных органических веществ и ксенобиотиков. Например, *Sedimentibacter* является деструктором хлорорганических и полициклических соединений (Berdugo-Clavijo et al., 2012; Gomes et al., 2014), *Syntrophomonas* известен способностью к деградации бутирата (Crabbe et al., 2016; Wang et al., 2023), для *Lentimicrobium* показана микробная биodeградация битума, а также антибиотиков сульфаметоксазола и триметоприма (Liang et al., 2019; Pannekens et al., 2021; Song et al., 2021). Хорошо изученным является род сульфатредуцирующих бактерий *Desulfovibrio*, способный к биоразложению фенантрена и пирена, нитроцеллюлозы, различных фракций сырой нефти (Kim et al., 1995; Giacometti et al., 2012; Dhar et al., 2023).

Кроме того, известно, что по сравнению с отдельными штаммами микробные сообщества, благодаря синтрофным взаимодействиям, способны более эффективно усваивать сложные субстраты, в том числе химически стабильные и инертные вещества. В процессе анаэробного разложения выделяют следующие стадии: гидролиз, ацидогенез, ацетогенез и метаногенез (Logan et al., 2019; Литти и соавт., 2022). Среди доминирующих в исследуемом сообществе групп гидролитическими и ацидогенными являются представители родов *Lentimicrobium* и *Sedimentibacter*. К представителям синтрофных микроорганизмов, осуществляющих ацетогенную стадию разложения продуктов брожения до ацетата, относятся синтрофные бактерии родов *Syntrophomonas*, *Desulfovibrio* и *Geobacter*. Накопленные ацетат, молекулярный водород и углекислоту метаболизируют в метан археи родов *Methanobacterium* и *Methanosarcina*.

Ряд работ также регистрирует значительные сдвиги в составе микробных сообществ анаэробного ила, морской воды, почвы, полигона твердых бытовых отходов в присутствии ВПС, ПС или микрочастиц ПС, выражающиеся в смене доминирующих видов и росте таксономического разнообразия (Naz et al., 2013; Syranidou et al., 2017; Tourova et al., 2020; Choi et al., 2021; Vaksmaa et al., 2021; Zhang et al., 2021b). Аналогичные изменения в микробном компоненте экосистем вызывают и другие синтетические полимерные материалы (Журина и соавт., 2022). Таким образом, наши исследования показывают, что отходы ВПС не являются инертными для микробного сообщества, и контакт с ними приводит к существенным перестройкам его структуры.

Микробные сообщества, благодаря лабильному метаболизму, представляют собой ключевой элемент механизма эффективного самоочищения окружающей среды от ксенобиотиков, представленных сложными органическими веществами. Деструкция может выражаться в трансформации, фрагментации и полной минерализации загрязнителя. Внесение полимерных загрязнителей-ксенобиотиков и попадание интермедиатов их деструкции в окружающую среду может приводить к сдвигам в составе и функционировании микробных сообществ, что отразится на экосистеме в целом. Показано, что присутствие отходов ВПС не является безразличным для анаэробного микробного сообщества. В разных донорно-акцепторных условиях наличие отходов из этого пластика приводит к увеличению выделения газов, образования белка и летучих жирных кислот, снижению pH среды и сукцессии сообщества со сменой доминирующих групп и увеличением доли метаногенных архей. Обнаруженные изменения поверхности образца ВПС, появление микрочастиц и различия в составе промежуточных и конечных продуктов метаболизма сообщества могут свидетельствовать о медленной частичной деструкции этого вида отходов. Однако поскольку для опытов были взяты отходы бытового

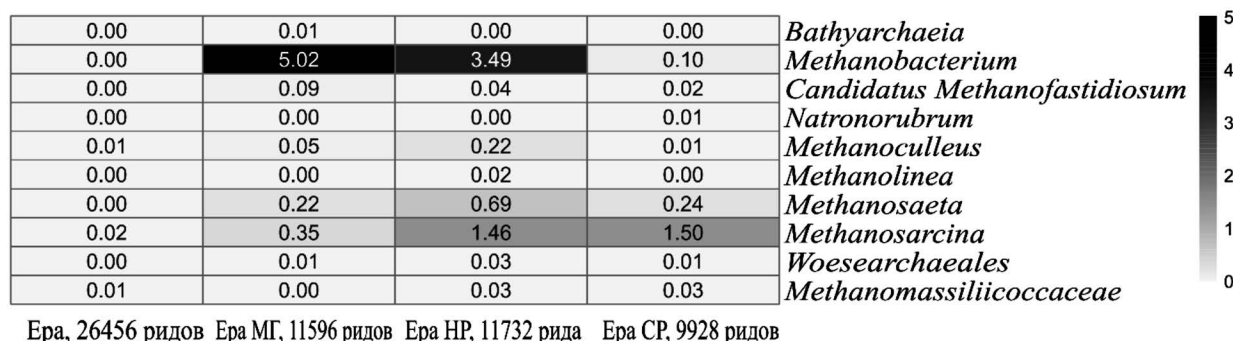


Рис. 9. Тепловая карта распределения 10 доминантных таксономических единиц архей по 4 библиотекам, представляющим архейный компонент микробных сообществ до и после контакта с ВПС. Представленность родов рассчитана как отношение количества ридов, принадлежащих представителям данного рода, к общему количеству ридов в соответствующей библиотеке.

ВПС, то есть вероятность, что наряду с полимером полистирола деградации подвергаются и входящие в его состав наполнители (пластификаторы, красители и т.д.). Способность микроорганизмов к деградации самого полистирола требует дальнейшего изучения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования методом СЭМ были проведены с использованием оборудования ЦКП “Электронная микроскопия в науках о жизни” МГУ им. М.В. Ломоносова (УНУ “Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия”).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032300094-7.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бакирова И.Н., Зенитова Л.А. Газонаполненные полимеры: Учебное пособие. Казань: Изд-во Казан. гос. технол. ун-та, 2009. 105 с.
- Биотехнология и микробиология анаэробной переработки органических коммунальных отходов: коллективная монография / Общая ред. и составл. А.Н. Ножевникова, А.Ю. Каллистова, Ю.В. Литти, М.В. Кевбрина. М.: Университетская книга, 2016. 320 с.
- Журина М.В., Богданов К.И., Ганнесен А.В., Мартыанов С.В., Плакунов В.К. Микропластики — новая экологическая ниша в пластисфере для мультиспециевых микробных биопленок // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 131–149.
- Zhurina M.V., Bogdanov K.I., Gannesen A.V., Mart'yanov S.V., Plakunov V.K. Microplastics as a new ecological niche for multispecies microbial biofilms within the plastisphere // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 107–123.
- Клинков А.С., Беляев П.С., Скуратов В.К., Соколов М.В., Однолько В.Г. Утилизация и вторичная переработка тары и упаковки из полимерных материалов: учебное пособие. Тамбов: Изд-во Тамбовского гос. техн. ун-та, 2010. 100 с.
- Котова И.Б., Тактарова Ю.В., Цавкелова Е.А., Егорова М.А., Бубнов И.А., Малахова Д.В., Ширинкина Л.И., Соколова Т.Г., Бонч-Осмоловская Е.А. Микробная деградация пластика и пути ее интенсификации // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 627–659.
- Kotova I.B., Taktarova Y.V., Tsavkelova E.A., Egorova M.A., Bubnov I.A., Malakhova D.V., Shirinkina L.I., Bonch-Osmolovskaya E.A., Sokolova T.G. Microbial degradation of plastics and approaches to make it more efficient // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 671–701.
- Линькова Ю.В., Дьяконова А.Т., Гладченко М.А., Калюжный С.В., Котова И.Б., Стамс А., Нетрусов А.И. Метаногенная деструкция (амино)ароматических веществ анаэробными микробными сообществами // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. С. 558–565.
- Lin'kova Y.V., Dyakonova A.T., Kotova I.B., Netrusov A.I., Gladchenko M.A., Kalyuzhnyi S.V., Stams A. Methanogenic degradation of (amino)aromatic compounds by anaerobic microbial communities // Appl. Biochem. Microbiol. 2011. V. 47. P. 507–514.
- Литти Ю.В., Русскова Ю.И., Журавлева Е.А., Паршина С.Н., Ковалев А.А., Ковалев Д.А., Ножевникова А.Н. Электрометаногенез — перспективная биотехнология анаэробной переработки органических отходов (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. № 1. С. 23–43.
- Litti Y.V., Russkova Y.I., Zhuravleva E.A., Parshina S.N., Nozhevnikova A.N., Kovalev A.A., Kovalev D.A. Electromethanogenesis: a promising biotechnology for the anaerobic treatment of organic waste // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. P. 19–36.
- Малкин А.Я., Вольфсон С.А., Кулезнев В.Н., Файдель Г.И. Полистирол. Физико-химические основы получения и переработки. М: Химия, 1975. 288 с.
- Плакунов В.К., Ганнесен А.В., Мартыанов С.В., Журина М.В. Биокоррозия синтетических пластмасс: механизмы деградации и способы защиты // Микробиология. 2020. Т. 89. №6. С. 631–645.
- Plakunov V.K., Gannesen A.V., Mart'yanov S.V., Zhurina M.V. Biocorrosion of synthetic plastics: degradation mechanisms and methods of protection // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 647–659.
- Ярцев В.П., Андрианов К.А., Иванов Д.В. Физико-механические и технологические основы применения пенополистирола при дополнительном утеплении зданий и сооружений: учебное пособие. Тамбов: Изд-во ГОУ ВПО ТГТУ, 2010. 120 с.
- Ba Ho T., Roberts T.K., Lucas S. An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach // Crit. Rev. Biotechnol. 2018. V. 38. P. 308–320.
- Berdugo-Clavijo C., Dong X., Soh J., Sensen C.W., Gieg L.M. Methanogenic biodegradation

- of two-ringed polycyclic aromatic hydrocarbons // FEMS Microbiol. Ecol. 2012. V. 81. P. 124–133.
- Billard J., Boucher G. The challenges of measuring plastic pollution // Field Actions Sci. Rep. 2019. V. 19. P. 68–75.
- Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., Bokulich N.A., Abnet C.C., Al-Ghalith G.A., Alexander H., Alm E.J., Arumugam M., Asnicar F., Bai Y., Bisanz J.E., Bittinger K., Brejnrod A., Brislawn C.J., Brown C.T., Callahan B.J., Caraballo-Rodríguez A.M., Chase J., Caporaso J.G. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME2 // Nat. Biotechnol. 2019. V. 37. P. 852–857.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 7. P. 248–254.
- Cao D., Wang X., Luo X., Liu G., Zheng H. Effects of polystyrene microplastics on the fitness of earthworms in an agricultural soil. 3rd Int. conf. on Energy Materials and Environment Engineering. Thailand, Bangkok, 2017. Conf. Ser. P. 61.
- Chauhan D., Agrawal G., Deshmukh S., Roy S.S., Priyadarshini R. Biofilm formation by *Exiguobacterium* sp. DR11 and DR14 alter polystyrene surface properties and initiate biodegradation // RSC Adv. 2018. V. 8. P. 37590–37599.
- Choi H.J., Ju W.J., An J.J. Impact of the virgin and aged polystyrene and polypropylene microfibers on the soil enzyme activity and the microbial community structure // Water Air Soil Pollut. 2021. V. 232. Art. 322.
- Crable B.R., Sieber J.R., Mao X., Alvarez-Cohen L., Gunsalus R., Ogorzalek L.R.R., Nguyen H., McInerney M.J. Membrane complexes of *Syntrophomonas wolfei* involved in syntrophic butyrate degradation and hydrogen formation // Front. Microbiol. 2016. V. 7. Art. 1795.
- Dhar K., Sudharsanam A., Tanmoy S., Kadiyala V., Malavarapu M. Anaerobic biodegradation of phenanthrene and pyrene by sulfate-reducing cultures enriched from contaminated freshwater lake sediments // Environ. Res. 2023. V. 235. Art. 116616.
- Fadrosh D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalai N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // Microbiome. 2014. V. 2. P. 1–7.
- Field D.T., Green J.L., Bennett R., Jenner L.C., Sadofsky L.R., Chapman E., Loubani M., Rotchell J.M. Microplastics in the surgical environment // Environ. Int. 2022. V. 170. Art. 107630.
- Giacomucci L., Toja F., Sanmartín P., Toniolo L., Prieto B., Villa F., Cappitelli F. Degradation of nitrocellulose-based paint by *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC13541 // Biodegradation. 2012. V. 23. P. 705–716.
- Gomes B.C., Adorno M.A., Okada D.Y., Delforno T.P., Lima Gomes P.C., Sakamoto I.K., Varesche M.B. Analysis of a microbial community associated with polychlorinated biphenyl degradation in anaerobic batch reactors // Biodegradation. 2014. V. 25. P. 797–810.
- Hidayat T.R., Indrawati I., Herlina T. Biodegradation styrofoam by soil bacteria from Sarimukti Cipatat Bandung final disposal site // AL-Kaunivah Jurnal Biologi. 2020. V. 13. P. 218–227. <http://dx.doi.org/10.15408/kaunivah.v13i2.14529>
- Hugert L.W., Wefer H.A., Lundin S., Jakobsson H.E., Lindberg M., Rodin S., Engstrand L., Andersson A.F. DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies // Appl. Environ. Microbiol. 2014. V. 80. P. 5116–5123.
- Kim B.H., Kim H.Y., Kim T.S., Park D.H. Selectivity of desulfurization activity of *Desulfovibrio desulfuricans* M6 on different petroleum products // Fuel Process. Technol. 1995. V. 43. P. 87–94.
- Ko K., Chung H., Kim W., Kim M.-J. Effects of different sizes of polystyrene micro(nano)plastics on soil microbial communities // NanoImpact. 2023. V. 30. Art. 100460.
- Liang B., Kong D., Qi M., Yun H., Li Z., Shi K., Chen E., Vangai A.S., Wang A. Anaerobic biodegradation of trimethoprim with sulfate as an electron acceptor // Front. Environ. Sci. Engin. 2019. V. 13. Art. 84.
- Liu H., Yang X., Liu G., Liang C., Xue S., Chen H., Ritsema C.J., Geissen V. Response of soil dissolved organic matter to microplastic addition in Chinese loess soil // Chemosphere. 2017. V. 185. P. 907–917.
- Logan B.E., Rossi R., Ragab A., Saikaly P.E. Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems // Nat. Rev. Microbiol. 2019. V. 17. P. 307–319.
- Lucas N., Bienaime C., Belloy C., Queneudec M., Silvestre F., Nava-Saucedo J.E. Polymer biodegradation: mechanisms and estimation techniques: a review // Chemosphere. 2008. V. 73. P. 429–442.
- Merkel A.Y., Tarnovetskii I.Y., Podosokorskaya O.A., Toshchakov S.V. Analysis of 16S rRNA primer systems for profiling of thermophilic microbial communities // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 671–680.
- Metsalu T., Vilo J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap // Nucl. Acids Res. 2015. V. 43. P. 566–570.
- Mor R., Sivan A. Biofilm formation and partial biodegradation of polystyrene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*: biodegradation of polystyrene // Biodegradation. 2008. V. 19. P. 851–858.
- Muller R.-J. Biodegradability of polymers: regulations and methods for testing // Biopolymers Online. 2005. V. 12. P. 365–388.
- Naz I., Batool S., Ali N., Khatoon N., Atiq N., Hameed A., Ahmed S. Monitoring of growth and physiological activities of biofilm during succession on polystyrene from activated sludge under aerobic and anaerobic conditions // Environ. Monit. Assess. 2013. V. 185. P. 6881–6892.
- Pannekens M., Voskuhl L., Mohammadian S., Köster D., Meier A., Köhne J.M., Kulbatzki M., Akbari A., Haque S., Meckenstock R.U. Microbial degradation

- rates of natural bitumen // *Environ. Sci. Technol.* 2021. V. 55. P. 8700–8708.
- Plastics Europe <https://www.plasticseurope.org/en/newsroom/events/2021>
- Ragusa A., Svelato A., Santacroce C., Catalano P., Notarstefano V., Carnevali O., Papa F., Rongioletti M.C.A., Baiocco F., Draghi S., D'Amore E., Rinaldo D., Matta M., Giorgini E. Plasticenta: first evidence of microplastics in human placenta // *Environ. Int.* 2021. V. 146. Art. 106274.
- Rillig M.C. Microplastic disguising as soil carbon storage // *Environ. Sci. Technol.* 2018. V. 52. P. 6079–6080.
- Ruimin Q., Jones D.L., Li Z., Liu Q., Yan C. Behavior of microplastics and plastic film residues in the soil environment: A critical review? // *Sci. Total Environ.* 2020. V. 703. Art. 134722.
- Shi Y., Wang S., Wang H., Li Z., Cai J., Han Q., Zhao M. Diversity and succession of microbial communities on typical microplastics in Xincun Bay, a long-term mariculture tropical lagoon // *Int. J. Oceanogr. Hydrobiol.* 2022. V. 51. P. 10–22.
- Sklyar V., Kalyuzhnyi S., Mosolova T., Kucherenko I., Russkova J., Degtyarova N. Methanogenic biodegradation of aromatic amines // *Water Sci. Technol.* 2000. V. 42. P. 363–370.
- Song J., Hao G., Liu L., Zhang H., Zhao D., Li X., Yang Z., Xu J., Ruan Z., Mu Y. Biodegradation and metabolic pathway of sulfamethoxazole by *Sphingobacterium mizutaii* // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. Art. 23130.
- Syranidou E., Karkanorachaki K., Amorotti F., Franchini M., Repouskou E., Kaliva M., Vamvakaki M., Kolvenbach B., Fava F., Corvini P., Kalogerakis N. Biodegradation of weathered polystyrene films in seawater microcosms // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. Art. 17991.
- Tan K.M., Agzaz S.K., Noor A.B. *Bacillus megaterium*: a potential and an efficient bio-degrader of polystyrene // *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2021. V. 64. Art. 1190321.
- Tourova T., Sokolova D., Nazina T., Grouzdev D., Kurshiev E., Laptev A. Biodiversity of microorganisms colonizing the surface of polystyrene samples exposed to different aqueous environments // *Sustainability.* 2020. V. 12. Art. 3624.
- Vaksmas A., Knittel K., Asbun A.A., Goudriaan M., Ellrott A., Witte H.J., Vollmer I., Meirer F., Lott C., Weber M., Engelmann J.C., Niemann H. Microbial communities on plastic polymers in the Mediterranean Sea // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. Art. 673553.
- Vethaak A.D., Legler J. Microplastics and human health // *Science.* 2021. V. 371. P. 672–674.
- Vlácil A.-K., Banfer S., Jacob R., Trippel N., Kuzu I., Schieffer B., Grote K. Polystyrene microplastic particles induce endothelial activation // *PLoS One.* 2021. V. 16. Art. 260181.
- Wang C., Wei W., Zhang Y., Dai X., Ni B. Different sizes of polystyrene microplastics induced distinct microbial responses of anaerobic granular sludge // *Water Res.* 2022. V. 220. Art. 118607.
- Wang J., Ma D., Feng K., Lou Y., Zhou H., Liu B., Xie G., Ren N., Xing D. Polystyrene nanoplastics shape microbiome and functional metabolism in anaerobic digestion // *Water Res.* 2022. V. 219. Art. 118606.
- Wang T., Kuang B., Ni Z., Guo B., Li Y., Zhu G. Stimulating anaerobic degradation of butyrate via *Syntrophomonas wolfei* and *Geobacter sulfurreducens*: characteristics and mechanism // *Microb. Ecol.* 2023. V. 85. P. 535–543.
- Wei W., Qiang H., Zhijie C., Teng B., Bing-Jie N. Polystyrene nanoplastics reshape the anaerobic granular sludge for recovering methane from wastewater // *Water Res.* 2020. V. 182. Art. 116041.
- Zee M. Biodegradability of polymers: mechanisms and evaluation methods. Ch. 1. // *Handbook of biodegradable polymers.* Sawbury (UK): Rapra Technology Limited, 2005. 534 p.
- Zhang J., Zhao M., Chao L., Miao H., Huang Z., Dai X., Ruan W. Evaluation the impact of polystyrene micro and nanoplastics on the methane generation by anaerobic digestion // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2020. V. 205. Art. 110095.
- Zhang K., Hamidian A.H., Tubić A., Zhang Y., J.K.H., Wu C., Lam P.K.S. Understanding plastic degradation and microplastic formation in the environment: a review // *Environ. Pollut.* 2021a. V. 274. Art. 116554.
- Zhang L., Tsui T.-H., Loh K.-C., Dai Y., Tong Y.W. Effects of plastics on reactor performance and microbial communities during acidogenic fermentation of food waste for production of volatile fatty acids // *Biore-sour. Technol.* 2021b. V. 337. Art. 125481.
- Zhao W., Hu T., Ma H., He S., Zhao Q., Jiang J., Wei L. Deciphering the role of polystyrene microplastics in waste activated sludge anaerobic digestion: changes of organics transformation, microbial community and metabolic pathway // *Sci. Total Environ.* 2023. V. 901. Art. 166551.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Structural and Functional Characteristics of the Microbial Community Emerging upon Its Contact with Extruded Polystyrene Waste

L. I. Shirinkina^{1, *}, Y. V. Taktarova¹, M. A. Gladchenko¹, A. Y. Merkel², I. B. Kotova¹

¹ *Moscow State University, Moscow, 119234, Russia*

² *Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071, Russia*

**e-mail: pro100tilka@gmail.com*

Abstract. Increasing plastic pollution is a serious environmental problem as widespread production and inadequate disposal of plastic materials lead to adverse impacts on ecosystems. The research investigated the structural and functional features of the anaerobic microbial community in contact with waste from extruded polystyrene (XPS) under methanogenic (MG), nitrate-(NR) and sulfate-reducing (SR) conditions. It has been shown that the presence of XPS in the microbial community does not have a negative effect on the processes of biogas formation, but, on the contrary, leads to an increase in the yield of methane and volatile fatty acids and a change in their ratio. Microparticles of different sizes were found in the culture fluid of variants with XPS: in NR conditions – $2.4 \times 10^6/\text{ml}$, in SR conditions – $1.2 \times 10^6/\text{ml}$ and in MG conditions – $0.4 \times 10^6/\text{ml}$, while in control variants microparticles was not found. Using scanning electron microscopy, it was revealed that in all experimental variants the surface of the polymer became looser, more textured, and irregularities, cracks and holes appeared. Increased diversity in the microbial community, associated with an increase in the number of microbial morphotypes, correlates with the results of high-throughput sequencing of the 16S rRNA gene. When XPS was introduced into an anaerobic community incubated in different donor-acceptor conditions, the number of groups of microorganisms included in it increased and the proportion of representatives of hydrolytic and acidogenic bacteria (*Sedimentibacter*, *Lentimicrobium*), acetogenic syntrophs (*Syntrophomonas*, *Desulfovibrio*, *Geobacter*) and methanogenic archaea (*Methanosarcina*, *Methanobacterium*) increased. Our study shows that waste from XPS is not inert for the microbial community and contact with it leads to significant changes in its structure and functioning. However, since the experiments were carried out using household XPS containing various fillers in addition to the main polymer, there is a possibility that, along with polystyrene, additional substances included in its composition (plasticizers, dyes, etc.) are also subject to degradation. The ability of microorganisms to destroy the polymer itself requires further research.

Keywords: extruded polystyrene, anaerobic microbial community, methanogenesis, nitrate reduction, sulfate reduction