

УДК 577.11

DOI 10.30679/2587-9847-2020-29-21-25

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM* НА РЕОЛОГИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО- МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОПОЛИМЕРА

Булгакова В.П., бакалавр 4 курса обучения
ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет
им. Н.В. Парахина», г. Орел, Российская Федерация

Аннотация. Проведены исследования по разработке биоразлагаемого композиционного материала на основе *Azotobacter chroococcum*. Оптимизирована питательная среда для культивирования *Azotobacter chroococcum*. Получены биокомпозиционные материалы на основе полисахарида леван. Изучены структуры полученных биокомпозиционных материалов. Исследованы физико-механические показатели и технические характеристики биокомпозиционного материала из соломы, жома сахарной свеклы и полисахарида леван.

Ключевые слова: биополимер, *Azotobacter chroococcum*, леван, биосвязующие, солома, свекловичный жом, меласса, послеспиртовая барда, молочная сыворотка, биоразлагаемый пластик.

Summary. Research has been conducted on the development of a biodegradable composite material based on *Azotobacter chroococcum*. The nutrient medium for *Azotobacter chroococcum* cultivation has been optimized. The obtained biocomposite materials based on polysaccharide Levan. The structures of the obtained composite materials are studied. The physico-mechanical characteristics and technical characteristics of the biocomposite material made of straw, pulp of sugar beet and the polysaccharide Levan.

Key words: biopolymer, *Azotobacter chroococcum*, Levan, bio-binders, straw, beet pulp, molasses, post-alcohol Barda, whey, biodegradable plastic.

Введение: В последние годы в связи с ростом цен на нефть и интенсивном загрязнении окружающей среды на смену традиционным синтетическим полимерам на основе пластмасс приходят так называемые компостируемые пластики (биоразлагаемые пластмассы), дающие возможность полимерным материалам разлагаться в природных условиях под действием вне и внутриклеточных ферментов микроорганизмов до практически безвредных соединений без ущерба для окружающей природной среды.

В качестве сырьевой основы для производства современных биополимеров могут служить воспроизводимые природные полимеры, компоненты сельскохозяйственных или дикорастущих растений (крахмал, целлюлоза, лигнин), продукты нефтехимии, или комбинированные технологии [2].

Значимость полимеров в современном обществе трудно недооценивать. Основные направления мировой экономики тесно связаны с производством и потреблением полимеров. Последние годы наблюдается положительная динамика развития данной области, как следствие остро встает проблема утилизации отходов после истечения эксплуатационного срока самих материалов и произведенных из них изделий. Выпускаемые полимеры высоко ценятся благодаря высокой устойчивости к воздействию на них микроорганизмов. Одновременно это и становится проблемой, т.к. синтетические полимеры в окружающей среде невосприимчивы ко внешним факторам, не разлагаются в естественных условиях. В этой связи в мире все большее внимание исследователей привлекает задача придания биоразлагаемости синтетическим полимерным системам, которые сохраняли бы свои потребительские свойства в течение срока эксплуатации, а по его истечении подвергались бы при определенных условиях физико-химическим и

биохимическим превращениям, ускоренно разрушаясь и разлагаясь на безвредные для природы компоненты. Пластмассы, полимерные материалы, производимые из нефти, очень широко используются во всем мире. С увеличением потребностей, утилизация отходов пластмасс стала серьезной глобальной проблемой. В связи с этим, разработка новых пластмасс, полимерных материалов, которые могут разлагаться микроорганизмами в почве и морской воде имеет очень широкое развитие [3].

Объекты и методы исследований: Объектом исследования выступает биополимер на основе *Azotobacter chroococcum*. Штамм микроорганизма *Azotobacter chroococcum* (B-5787) D-08 получен из фонда Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИГенетика. *Azotobacter chroococcum*-это граммотрицательная бактерия, открытая в 1901 году Мартинусом Бейеринком, известным в области вирусологии. Бейеринк выделил из почвы аэробную неспорообразующую бактерию, фиксирующую молекулярный азот, и назвал ее *Azotobacter chroococcum* (в родовом названии отражена способность бактерии фиксировать азот, в видовом - способность синтезировать коричневый пигмент - *chroo* и образовывать кокковидные клетки - *coccum*). Для фиксации азота *Azotobacter chroococcum* производит три фермента (каталаза, пероксидаза и супероксиддисмутаза) для "нейтрализации" активных форм кислорода. Азотобактер - типичный представитель свободноживущих микроорганизмов. Свободноживущие — это все те микроорганизмы, которые живут в почве независимо от того, развивается вблизи растение или нет.

Биоразлагаемые полимерные материалы сохраняют свои свойства практически неизменными в течение срока эксплуатации, по окончании которого претерпевают ускоренные физико-химические и биологические превращения в природной среде, легко включаясь в метаболизм полисистем. Для утилизации полимерных материалов не требуется выделять дополнительную площадь для свалки, продукты распада не способны оказывать негативное влияние на окружающую среду. Современная промышленность активно внедряет биополимеры в качестве доступного и биоразлагаемого упаковочного материала. На данном этапе исследования биополимеров важной задачей становится разработка необходимых нормативных норм, регулирующих методологию испытания и количественные параметры биоразложения утилизированных остатков.

Исследование паропроницаемости лабораторных образцов проводили по ГОСТ 21472 «Материалы листовые. Гравиметрический метод определения паропроницаемости».

Сначала проводится отбор материала в соответствии с требованиями. Использовались только плоские, чистые, без механических повреждений. Образцы для испытаний вырезаются в форме диска по шаблону, диаметром 5 сантиметров. Затем условно обозначили цифрами. Образцы материала перед испытанием помещают на 4 часа в лабораторные условия.

Подготовленный и закрытый крышкой прибор для определения паропроницаемости ставят на 15 мин в комнату для выравнивания температуры, затем взвешивают. Щипцами прибор переносят в камеру и снимают крышку. Через 24 ч прибор закрывают крышкой и щипцами выносят из камеры, охлаждают до комнатной температуры и взвешивают с погрешностью не более 0,0001 г. Результаты испытания наносили на график зависимости изменения массы от времени.

Исследование лабораторных образцов на прочность при разрыве проводили в соответствии с ГОСТ 14236-81 «Пленки полимерные. Метод испытания на растяжение». Для испытания брали образцы с ровными, гладкими краями, без зазубрин. Прямоугольной формы шириной 20мм, длиной 150мм. Образцы закрепляют в зажимы испытательной машины. Их равномерно затягивают, чтобы не происходило скольжения образца при испытании, но при этом не разрушался образец в месте закрепления. Затем образцы кондиционируют 16 часов при температуре 23°C, относительной влажности 50%. Перед испытанием на центральную часть образца наносят метки, ограничивающие расчетную длину. Толщину и ширину образцов измеряют в трех местах, в середине образца и на расстоянии 5 мм от краев меток.

Исследование лабораторных образцов на поглощение воды проводили по стандартам ГОСТ 4650-2014 (ISO 62:2008) «Пластмассы. Методы определения водопоглощения». Испытуемые образцы погружают в дистиллированную воду при температуре 23°C или кипящую дистиллированную воду или выдерживают в атмосфере относительной влажностью 50% при заданной температуре в течение установленного периода времени. Массу воды, поглощенную каждым испытуемым образцом, определяют или вычисляют по разности между массой образца до и после испытания, выраженной в процентах по отношению к начальной массе. При необходимости можно определить массу воды, потерянной испытуемым образцом после просушивания. Перед испытанием отобрали образцы прямоугольной формы. Толщиной 1 мм, длиной 100 мм. Затем образцы необходимо тщательно просушить. При температуре 50°C.

Исследование плотности лабораторных образцов проводили в соответствии с ГОСТ 15139-69 (ISO 1183) «Методы определения плотности». Образцы должны быть гладкими, без пустот и трещин для уменьшения возможности захвата или включения воздушных пузырьков. Объем материала 1 см³ и масса 180г. Кондиционирование образцов перед испытанием и испытания проводят по ГОСТ 12423-66 при контрольной стандартной атмосфере. Объем образца определяют следующим образом: правильной формы - вычисляют по результатам линейных замеров, неправильной или трудно измеряемой формы - по объему вытесненной жидкости. Для этого прибор, находящийся в вертикальном положении узким горлышком вверх, наполняют жидкостью до нижнего деления шкалы или немного выше, закрывают пробкой и переворачивают на 360°, после этого отсчитывают уровень жидкости. Затем прибор переворачивают так, чтобы большая пробка находилась сверху, после этого взвешенный образец объемом 5 см³ вводят в прибор, плотно закрывают пробкой и, переворачивая, приводят в первоначальное положение. Новый уровень жидкости отсчитывают, следя за тем, чтобы не было прилипших к образцу воздушных пузырьков. Объем образца определяют по разности между уровнями жидкости.

Исследование биодеструкции с лабораторных образцов проводили в соответствии с ГОСТ 9.060-75 «Единая система защиты от коррозии и старения (ЕСЗКС) ткани. Метод лабораторных испытаний на устойчивость к микробиологическому разрушению». От каждого отобранного куска отбирают точечную пробу размером 25×300мм. Для испытаний приготавливают смесь (в дальнейшем почва) из песка, конского навоза и садовой земли, взятых в равных количествах по массе. Почва, приготовленная перед испытаниями, должна быть выдержана не менее двух месяцев при (20±5) °С. Перед началом испытаний почву просеивают через сито и добавляют воду до образования однородной кашицы. Соотношение земли и воды по массе 2:1. Пробную полоску помещают на ровную стеклянную поверхность. В центре пробной полоски накладывают трафарет таким образом, чтобы отверстие в трафарете совпадало с краями полоски.

Подготовленную почву, шпателем наносят по всей площади отверстия трафарета. После нанесения почвы концы пробной полоски соединяют в виде петли таким образом, чтобы почва находилась на наружной поверхности. Концы образовавшейся петли закрепляют прищепкой на стеклянной палочке, помещенной между двумя штативами. Внутри петли вкладывают влажную асбестовую пробку, которая служит для поддержания заданной влажности пробной полоски ткани и тем самым удерживает почву на наружной поверхности петли. Затем стеклянные палочки с пробными полосками помещают в сосуд, в который предварительно наливают воду высотой 25 мм. Сосуд закрывают крышкой и помещают в термостат. Испытания в термостате проводят при 28°C. Продолжительность испытаний - 10 суток. После испытаний пробные полоски осторожно очищают от почвы, промывают водой до полного ее удаления, обрабатывают водным раствором формалина при концентрации 1-2 г/дм³ (40%-ного) 15 мин и высушивают на воздухе. Высушенные испытуемые пробные полоски и исходные пробные полоски выдерживают в атмосферных условиях.

Устойчивость исходных пленок в воде определялась в соответствии с ГОСТ 12020-72.

Сущность метода заключается в определении изменения массы образцов после выдержки в течение 24 часов в модельной среде (вода дистиллированная).

Для испытания образцы вырезают в форме диска диаметром 50 мм. Перед испытанием образцы кондиционируют в течение 88 ч при 23°C и относительной влажности 50% при отсутствии влияния света. Затем каждый образец взвешивают в стеклянном закрытом сосуде (бюксе) и измеряют его линейные размеры. Толщину образца измеряют не менее чем в четырех точках. Образцы помещают в сосуд с химическим реагентом, нагретым до температуры испытания. Образцы помещают в сосуд так, чтобы они полностью были погружены в химический реагент (образцы не должны соприкасаться друг с другом и со стенками сосудов) и выдерживают при температуре 20°C [1, 5].

Обсуждение результатов. В ходе наших исследований было получено биосвязующее на основе экзополисахарида *Azotobacter chroococcum* штамм (B-5787) D-08 культуру выращивали в течение 72 часов при 28° С.

С целью получения инокулята выращивание *Azotobacter chroococcum* штамм (B-5787) D-08 проводили на жидкой сахаросодержащей среде следующего состава: г/л: K_2HPO_4 – 0,8; KH_2PO_4 – 0,2; $CaSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; Na_2MnO_4 – 0,05; $FeCl_3$ – 0,05; дрожжевой экстракт – 0,5; сахароза – 20,0.

Культивирование *Azotobacter chroococcum* осуществляли в термостатируемом шейкере 72 часа при 250 об/мин и температуре 28° С. Полученным инокулятом засеивали питательные среды, в состав которых вошли отходы пищевых производств – меласса, послеспиртовая барда и молочная сыворотка (в соотношении 1:1:1) с добавлением лигноцеллюлозных наполнителей в соотношении 1:3, 1:6 к питательной среде. Дальнейшее культивирование проводили в течение 72 часов (3 суток) при 250 об/мин и температуре 28° С.

Известно, что для роста бактерий *Azotobacter* необходимы такие компоненты, как углеводы, спирты, органические кислоты, минералы в виде фосфорных и кальциевых солей. Используемые нами отходы пищевых производств содержат вещества, необходимые для роста микроорганизма, так и для образования и накопления полисахарида левана.

Нами было отмечено, что вид лигноцеллюлозного наполнителя в среде культивирования не оказывал отрицательного влияния на рост и развитие бактерии *Azotobacter chroococcum* штамм (B-5787) D-08.

На третьи сутки полученная нами культуральная жидкость обладала густой и вязкой консистенцией.

Наиболее это было выражено в среде с содержанием смеси свекловичного жома и соломы в соотношении наполнителя 1:3 по отношению к питательной среде.

На стадии получения биополимера проводили внесение наполнителей в суспензию, контроль за изменением реологических и физико-механических свойств.

В работе использовали вискозиметр ВПЖ-1, предназначенный для определения кинематической вязкости жидких сред. Вискозиметры данного типа позволяют измерять вязкость жидкостей при положительных и отрицательных температурах. Данный вискозиметр изготавливается из химико-лабораторного стекла в соответствии с требованиями стандарта ГОСТ 21400-75.

При исследовании физико-механических свойств лабораторного образца биокomпозиционного материала из соломы, жома сахарной свеклы и полисахарида леван были установлены пределы прочности. Плотность составляет 1,17 г/см³, прочность при растяжении в продольном направлении 22 МПа, прочность в поперечном направлении – 19 МПа и относительное удлинение при разрыве составляет 6%. Материал не подходит для вакуумных упаковок: паропроницаемость составила 150 г/м²сут., поглощение воды комнатной температуры -23%.

Биоразлагаемое вещество на основе природных полимеров, имеет короткие сроки биоразложения до 45 суток, экологически безопасно и не требует больших затрат для

производства. Продукт полностью соответствует требованиям ГОСТ, предъявляемым к биоразлагаемым материалам для использования в промышленности [4,6].

Выводы. Проведя комплексное изучение литературы и на основе собственных исследований и экспериментов, по данной работе можно сделать следующие выводы:

Опытами установлено, что использование свекловичного жома, соломы и левансодержащего биосвязующего позволяет получить материал, в котором появляются условия для создания большего числа клеевых слоев за счет адгезивных свойств левана и веществ, входящих в состав свекловичного жома. Это вызвано присутствием в свекловичном жоме пектиновых веществ и связующих гликанов (растительной целлюлозы). Такая плотная структура материала может служить предпосылкой для высоких физико-механических свойств. Разработан оптимальный компонентный состав биоразлагаемого материала имеющий соотношение в композиции с соломой и свекловичным жомом (отношение лигноцеллюлозного наполнителя к питательной среде 1/3), а так же подобраны технологические параметры культивирования: 72 часов (3 суток) при 250 об/мин и температуре 28° С, а также, параметры упаривания и высушивания в сушильном шкафу при температуре 50° С. Высушенную массу загружали в пресс-форму и подвергали горячему прессованию при температуре 140° С и давлении 19,6 МПа (15 т) в течение 5 минут. Изучены физико-механические и технические свойства биоразлагаемого материала. Плотность составляет 1,17 г/см³, прочность при растяжении – от 22 МПа, относительное удлинение при разрыве от 9%, паропроницаемость 150 г /м²сут., поглощение воды комнатной температуры - 23%, выдерживают температуру окружающей среды до 70°С, лажность 75%, при эксплуатации изделий не допустим контакт со щелочами, кислотами.

Таким образом, можно утверждать, что применение биополимеров на основе *Azotobacter chroococcum* продуцирующего полисахарид леван более целесообразно и экономически выгодно в сравнении с синтетическими полимерами, представленными на рынке. Полученный биокомпозиционный полимерный материал рекомендуется использовать в качестве материала для упаковки сухих, сыпучих и твердых продуктов в качестве пленок.

Литература

1. Авраменко А. А. Полевые и лабораторные методы исследований. Биоэкологический практикум. / А. А. Авраменко – М., 2018. – 120 с.
2. Алексанян К. В. Биоразлагаемые смеси хитина и хитозана с синтетическими полимерами / К. В. Алексанян, Э. В. Прут // Энциклопедия инженера-химика. – 2011. – №6. – С. 32–38.
3. Андреев Н.Р. Производство крахмала и крахмалопродуктов для импортозамещения // Пищевая промышленность. 2014. № 12. 34-36 с.
4. Антипов Е. М. Высокоориентированные волокна биodeградируемых полигидроксиалканоев / Е. М. Антипов, А.Е. Антипов, С.А. Гордеев, Ю.П. Некрасов, А.В. Ребров // Экология и промышленность России. – 2010. – №5. – С. 30–36.
5. Баймурзаев А.С. Биоразлагаемые высоконаполненные композиции на основе полиэтилена / А.С. Баймурзаев, Л.Н. Студеникина, Н.А. Балакирева // Экология и промышленность России 2012. - № 3 - С. 9-11.
6. Белов Д.А. Биоразлагаемый полимер полилактид / Д.А. Белов // Наука и инновации. – 2013. – №9. – С. 21–23.