

Ж.П. Коптева, В.В. Занина, А.Е. Коптева, В.Л. Айзенберг, А.В. Борисенко

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина

ЛИПОЛИТИЧЕСКАЯ И КАТАЛАЗНАЯ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ – ДЕСТРУКТОРОВ ЗАЩИТНЫХ ПОКРЫТИЙ

Изучены липолипидическая и каталазная активности бактерий – деструкторов защитных покрытий – при разных моделях роста: биоплёночной и планктонной. Показано, что синтез экзоферментов в биоплёнке и планктоне отличается. В условиях биоплёночной формы роста усиливается удельная активность исследованных ферментов. Активность внеклеточных липазы и каталазы в биоплёнке в 1,1–1,5 и 1,2–2,1 раза выше, чем в планктоне соответственно. С увеличением продолжительности опыта до 14 суток липолитическая активность значительно уменьшается. Активность исследованных ферментов, продуцируемых бактериями-деструкторами, может быть использована для оценки биостойкости изоляционных покрытий, как показать их биодegradации в техногенных средах.

К л ю ч е в ы е с л о в а : бактерии-деструкторы покрытий, липаза, каталаза, биопленка, планктон.

Почвенные микроорганизмы воздействуют на изоляционные материалы продуктами своего метаболизма, в первую очередь органическими и неорганическими кислотами, а также ферментами.

В процессе окисления, восстановления, гидролиза и других реакций микроорганизмы с помощью ферментов разрушают молекулы пластификаторов и стабилизаторов, ациклические и ароматические углеводороды, низкомолекулярные фракции покрытий, а также другие компоненты, входящие в их состав [2].

В доступной нам литературе встречаются единичные сведения о ферментативной активности бактерий – деструкторов защитных покрытий [12]. Приводятся данные, в основном, об активности окислительно-восстановительных и гидролитических ферментов у микромицетов, которые повреждают строительные материалы, фенопласты, резину и др. [4].

Целью нашей работы было изучение липолитической и каталазной активностей бактерий – деструкторов защитных покрытий.

Материалы и методы. Объектами исследований были бактерии *Pseudomonas* sp. штаммы 109 и Т/2, *Arthrobacter* sp. шт. 102 и *Bacillus* sp. штаммы 138 и 140, которые образовывали биопленку на поверхности поврежденных защитных покрытий газопроводов [2].

Бактерии культивировали на жидкой среде Таусона с глюкозой (20 г/л) [8] с добавлением МПБ (20 мл на 100 мл среды) при температуре $28 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Образцы пленочного покрытия Поликен 980-25 размером $40 \times 20 \times 0,5$ мм погружали в среду Таусона, инокулированную монокультурами исследованных бактерий. Посевной материал вносили в среду в количестве 10^6 кл/мл. Продолжительность опыта составляла 5 и 14 суток. Повторность опыта трехкратная.

После снятия эксперимента биопленку десорбировали с поверхности покрытия в фиксированный объем 0,1 н фосфатного буфера (рН 7) с помощью ультразвукового диспергатора УЗДН 2Т (частота 22 кГц) в течение 30 с (два раза с интервалом 2 мин). Планктонные клетки бактерий центрифугировали при 5000 об/мин в течение 40 мин для получения надосадочной жидкости.

Титр бактерий – начальный и конечный – определяли методом десятикратных предельных разведений [3].

© Ж.П. Коптева, В.В. Занина, А.Е. Коптева, В.Л. Айзенберг, А.В. Борисенко, 2009

Липолитическую и каталазную активности изучали при разных моделях роста бактерий: в биопленке и планктоне. Кроме того, определяли ферментативную активность бактерий, которые выращивали в среде без внесения образцов покрытий. В дальнейшем изложении результатов эксперимента они обозначены как нативные культуры (НК).

Экзолипазу определяли спектрофотометрическим методом по реакции с паранитрофенилпальметатом (пНФП). За единицу активности принимали такое количество фермента в 1 мл, которое катализирует освобождение 1 нмоля п-нитрофенола (пНФ) из эмульгированного субстрата (пНФП) за 1 мин при температуре 37 °С, т.е. 1 ед. липолитической активности (ЛА) = 1 нмоль · мин⁻¹ · мл⁻¹ [1].

Активность внеклеточной каталазы бактерий определяли титрометрически. За единицу активности каталазы принимали количество фермента, катализирующее разложение 1 мкМ перекиси водорода (H₂O₂) (0,034 мг) за 1 мин [6].

Удельную активность изученных ферментов выражали в ед/мг белка.

Белок определяли в биопленке, планктоне и нативных культурах методом Лоури [7].

Результаты и их обсуждение. Как известно, микроорганизмы синтезируют большое количество ферментов, основная функция которых состоит в ускорении и регуляции всех химических реакций, необходимых для их жизнедеятельности.

Отобранные для проведения эксперимента культуры бактерий – деструкторов защитных покрытий при разных моделях роста отличались уровнем синтеза липазы и каталазы. Более активно продуцировали изученные экзоферменты бактерии в состоянии биопленочной формы роста. В частности, удельная липолитическая активность бактерий в биопленке в 1,1–1,5 раза больше, чем в условиях планктона (рис. 1). С увеличением продолжительности опыта от 5 до 14 суток ферментативная активность бактерий понижается (табл. 1). Более высокая активность липазы отмечена на 5 сутки эксперимента. Например, в биопленке, образованной за 5 суток она в 2–2,7 раза выше, чем в биопленке полученной за 14 суток эксперимента. Такая же закономерность наблюдается и для планктонной модели роста.

Пятисуточные нативные культуры бактерий в варианте опыта в среде без образцов покрытия проявляли высокую липолитическую активность (табл. 1). Так, *Pseudomonas* sp. 109 и Т/2 продуцировали липазу в количестве 38,6 и 35,8 ед/мг белка соответственно. Выявлено усиление активности липазы в присутствии покрытия Поликен 980-25 у *Arthrobacter* sp. 102 и *Bacillus* sp. 140.

Таблица 1

Активность экзолипазы бактерий – деструкторов защитных покрытий при разных моделях роста

Варианты опыта	Экспозиция 5 суток		Экспозиция 14 суток	
	Титр бактерий, клетки/мл	Удельная липолитическая активность, ед/мг белка	Титр бактерий, клетки/мл	Удельная липолитическая активность, ед/мг белка
<i>Pseudomonas</i> sp. 109 БП	10 ⁵	31,73	10 ⁹	15,87
<i>Pseudomonas</i> sp. 109 ПЛ	10 ⁹	28,5	10 ⁷	14,63
<i>Pseudomonas</i> sp. 109 НК	10 ¹⁰	38,61	10 ⁷	9,0
<i>Pseudomonas</i> sp. Т/2 БП	10 ⁴	29,6	10 ⁴	12,8
<i>Pseudomonas</i> sp. Т/2 ПЛ	10 ⁵	20,19	10 ⁷	10,6
<i>Pseudomonas</i> sp. Т/2 НК	10 ³	35,8	10 ⁵	8,6
<i>Arthrobacter</i> sp. 102 БП	10 ⁵	32,3	10 ³	11,9
<i>Arthrobacter</i> sp. 102 ПЛ	10 ⁵	25,17	10 ⁵	9,2
<i>Arthrobacter</i> sp. 102 НК	10 ⁹	13,1	10 ⁵	8,9
<i>Bacillus</i> sp. 138 БП	10 ⁷	28,5	-	-
<i>Bacillus</i> sp. 138 ПЛ	10 ⁹	23,15	-	-
<i>Bacillus</i> sp. 138 НК	10 ¹⁰	28,46	-	-
<i>Bacillus</i> sp. 140 БП	10 ⁷	22,8	-	-
<i>Bacillus</i> sp. 140 ПЛ	10 ⁹	18,72	-	-
<i>Bacillus</i> sp. 140 НК	10 ⁹	18,62	-	-

Примечание: БП – биопленка; ПЛ – планктон; НК – нативная культура; «-» – не определяли.

Численность бактерий на протяжении опыта возрастает на 2–4 порядка относительно начального титра, но не всегда коррелирует с активностью фермента. Следует отметить, что взятые в опыт культуры бактерий являются полиредуктантами. Они восстанавливают Fe(III), нитраты, сульфаты и окисляют углеводороды [2], что указывает на высокую метаболическую активность исследованных культур.

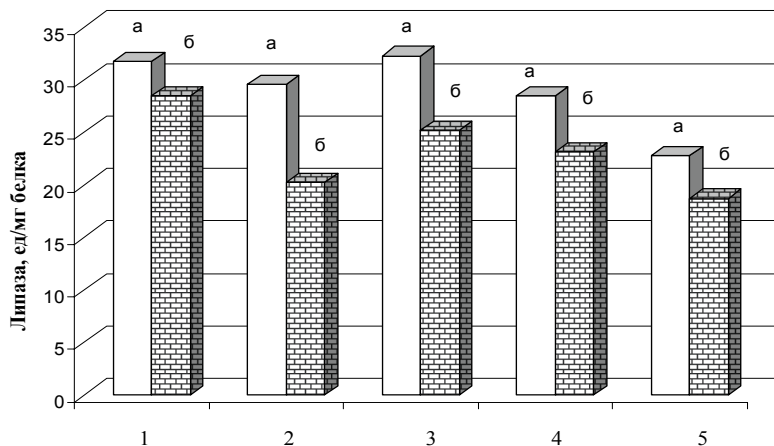


Рис. 1. Удельная липолитическая активность бактерий в биопленке (а) и планктоне (б):
1 – *Pseudomonas* sp. 109, 2 – *Pseudomonas* sp. T/2, 3 – *Arthrobacter* sp. 102,
4 – *Bacillus* sp. 138, 5 – *Bacillus* sp. 140

Известно, что количество бактерий не всегда может быть показателем агрессивности среды, и поэтому более надежными и перспективными являются методы, основанные на оценке ферментативной активности коррозионноопасных микроорганизмов. Именно ферменты как биологические катализаторы обуславливают обмен веществ микроорганизмов и интенсивность выделения в среду агрессивных продуктов их метаболизма [9].

Ранее при изучении биостойкости нефтебитумных покрытий в агрессивных грунтах нами был использован метод инфракрасной спектроскопии. Согласно спектральным данным под действием бактерий происходит разрушение связей C=O и S=O, которое может привести к обрыву олигомерных цепей и, как следствие, к уменьшению прочности покрытий [2]. Можно полагать, что такие изменения в химическом составе покрытий являются результатом действия гидролитических ферментов бактерий, в частности липазы, которая может разрушать сложные эфирные связи углеводородов, входящих в состав изоляционных материалов.

Н.А. Киреева и соавторы [5] изучали влияние различных доз нефти и нефтепродуктов на активность липазы серой лесной почвы. Они установили, что углеводороды активизируют липолитическую активность почвы. Параллельно с активацией липолиза наблюдалось увеличение численности углеводородокисляющих бактерий. В нефтезагрязненных почвах присутствует значительное количество битумов, которые являются одним из стимуляторов активности липаз в почве. Некоторые авторы [11] предлагают использовать активность липазы в качестве одного из показателей биодеструкции нефти и нефтепродуктов.

При изучении каталазной активности нами наблюдалась такая же закономерность, как и при определении липолитической активности бактерий – деструкторов покрытий. Активность каталазы у исследованных бактерий была выше в 1,2–2,1 раза в условиях биопленочной формы роста по сравнению с таковой в условиях планктонного роста (табл. 2, рис. 2). Титр бактерий в биопленке был на 2–4 порядка ниже, чем в планктоне. Следует отметить, что нативные культуры бактерии *Bacillus* sp. (шт. 148 и шт. 140) более активно продуцировали каталазу по сравнению с другими взятыми в опыт культурами бактерий. В присутствии покрытия Поликен 980-25 наблюдается усиление уровня каталазной активности у *Arthrobacter* sp. 102.

Известно, что оксидоредуктазы ускоряют окислительно-восстановительные процессы, которые протекают в клетках бактерий. В частности, в присутствии каталазы происходит реакция распада перекиси водорода на воду и кислород. Встречаются данные о том, что коррозионная активность трубопроводных систем в условиях грунта может контролироваться с помощью биохимического теста по активности каталазы [10].

Таблица 2

Активность внеклеточной каталазы бактерий – деструкторов защитных покрытий при разных моделях роста

Варианты опыта	Экспозиция 5 суток	
	Титр бактерий, клетки/мл	Удельная каталазная активность, ед/мг белка
<i>Pseudomonas</i> sp. 109 БП	10 ⁷	35,2
<i>Pseudomonas</i> sp. 109 ПЛ	10 ¹⁰	30,8
<i>Pseudomonas</i> sp. 109 НК	10 ¹⁰	33,3
<i>Pseudomonas</i> sp. Т/2 БП	10 ⁶	24,8
<i>Pseudomonas</i> sp. Т/2 ПЛ	10 ¹⁰	11,7
<i>Pseudomonas</i> sp. Т/2 НК	10 ¹⁰	21,8
<i>Arthrobacter</i> sp. 102 БП	10 ⁶	37,5
<i>Arthrobacter</i> sp. 102 ПЛ	10 ¹⁰	23,04
<i>Arthrobacter</i> sp. 102 НК	10 ¹⁰	14,25
<i>Bacillus</i> sp. 138 БП	10 ⁷	15,98
<i>Bacillus</i> sp. 138 ПЛ	10 ⁹	14,65
<i>Bacillus</i> sp. 138 НК	10 ¹⁰	34,63
<i>Bacillus</i> sp. 140 БП	10 ⁷	19,64
<i>Bacillus</i> sp. 140 ПЛ	10 ⁹	12,65
<i>Bacillus</i> sp. 140 НК	10 ⁹	37,29

Примечание. БП – биопленка; ПЛ – планктон; НК – нативная культура.

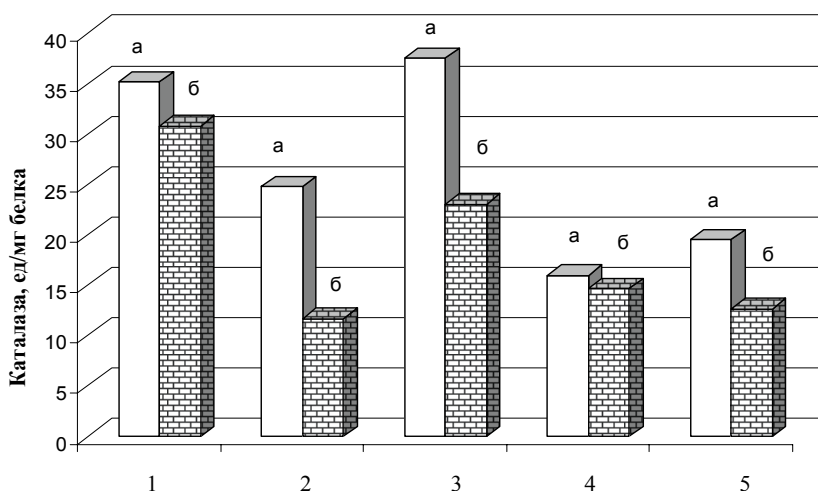


Рис. 2. Удельная каталазная активность бактерий в биопленке (а) и планктоне (б): 1 – *Pseudomonas* sp. 109, 2 – *Pseudomonas* sp. Т/2, 3 – *Arthrobacter* sp. 102, 4 – *Bacillus* sp. 138, 5 – *Bacillus* sp. 140

Возможно, активность экзолипазы и экзокаталазы у исследованных нами бактерий-деструкторов может быть использована для оценки биостойкости изоляционных покрытий как показатель их биодegradации в техногенных средах.

Таким образом, бактерии – деструкторы защитных покрытий обладают способностью синтезировать внеклеточные гидролитические и окислительно-восстановительные ферменты при разных моделях роста. В условиях биопленочной формы роста наблюдается усиление удельной ферментативной активности бактерий. Следует полагать,

что одним из механизмов биоповреждения защитных материалов является синтез коррозионноактивными бактериями гидролаз и оксидоредуктаз, которые разрушают сложные эфирные связи, переносят атомы водорода от $\text{CH}_2 - \text{CH}_2$ групп с образованием $\text{C}=\text{C}$ групп, т.е. происходит дегидрирование углеродных цепей и преобразование насыщенных соединений в ненасыщенные, которые могут быть агрессивными по отношению к покрытиям.

Экзоферменты в составе биопленки, образованной бактериями-деструкторами, являются постоянным фактором повреждения защитных материалов.

Ж.П. Коптева, В.В. Занина, Г.С. Коптева, В.Л. Айзенберг, Г.В. Борисенко

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна

ЛІПОЛІТИЧНА І КАТАЛАЗНА АКТИВНОСТІ БАКТЕРІЙ- ДЕСТРУКТОРІВ ЗАХИСНИХ ПОКРИТТІВ

Резюме

Вивчено ліполітичну і каталазну активності бактерій-деструкторів захисних покриттів за різними моделями росту: біоплівкової та планктонної. Показано, що синтез екзоферментів у біоплівці і планктоні відрізняються. За умовами біоплівкової форми росту підсилюється питома активність досліджених ферментів. Активність ліпази та каталази у біоплівці в 1,1–1,5 і 1,2–2,1 рази вища, ніж у планктоні відповідно. Зі збільшенням тривалості досліду до 14 діб ліполітична активність бактерій значно зменшується. Активність досліджених ферментів, що продукуються бактеріями-деструкторами, може бути використана для оцінки біостійкості ізоляційних покриттів як показник їх деградації у техногенних середовищах.

Ключові слова: бактерії-деструктори покриттів, ліпаза, каталаза, біоплівка, планктон.

Zh. P. Kopteva, V.V. Zanina, A.E. Kopteva, V.L. Aisenberg, A.V. Borisenko

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

LIPOLYTIC AND CATALASE ACTIVITY OF BACTERIA- DESTRUCTORS OF PROTECTIVE COATINGS

S u m m a r y

Lipolytic and catalase activity of bacteria-destroyers of protective coatings at different growth models: biofilm and plankton have been studied. It was shown that the synthesis of exoenzymes in the biofilm is different. Activity of extracellular lipase and catalase in the biofilm is 1.1-1.5 and 1.2-2.1 times higher, respectively, than in plankton. The experiment duration being increased to 14 days, the lipolytic activity considerably decreases. Activity of studied enzymes, produced by bacteria-destroyers, can be used for estimating bioresistance of isolating coatings as the index of their biodegradation in technogenic media.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: bacteria-destroyers of coatings, lipase, catalase, biofilm, plankton.

The authors' address: Zh.P. Kopteva, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Айзенберг В.Л., Карпель В.И., Сырчин С.А. Седина С.А., Капичон А.П. Апробация количественного метода определения липолитической активности с использованием хромогенного субстрата // Микробиол. журн. – 1995. – 57, № 5. – С. 84–89.
2. Андreyuk К.І., Козлова І.П., Коптева Ж.П., Піляшенко-Новохатний А.І., Занина В.В., Пуріш Л.М. Мікробна корозія підземних споруд. – Київ: Наук. думка, 2005. – 258 с.
3. *Большой практикум по микробиологии* // Под ред. Г.Л. Селибера. – Москва: Высш. шк., 1962. – 497 с.
4. *Защита от коррозии, старения и биоповреждений машин, оборудования и сооружений: Справочник* // Под ред. А.А. Герасименко. – Т. 1. – Москва: Машиностроение, 1987. – 688 с.

5. Киреева Н.А., Тарасенко Е.М., Шамаева А.А., Новоселова Е.Н. Влияние нефти и нефтепродуктов на активность липазы серой лесной почвы // Почвоведение. – 2006, № 8. – 1005–1011.
6. Методы экспериментальной микологии: Справочник // Отв. редактор В.И. Билай. – Киев: Наук. думка, 1982. – 550 с.
7. Практикум по биохимии // Под ред. С.Е. Северина, Т.А. Соловьевой. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1989. – 509 с.
8. Романенко В.И., Кузнецов С.И. Экология микроорганизмов пресных водоемов. – Ленинград: Наука, 1974. – 193 с.
9. Савеня С.Н., Савеня А.А., Ушаков А.П. Методы диагностики стресс-коррозионных повреждений трубной стали // Интернет-вестник ВолгГАСУ. Политематическая серия. – 2007. – Вып. 2(3). – С. 1–7.
10. Ямпольская Т.Д. Природа и условия развития биокоррозии биоповреждений в северных регионах (на примере г. Сургута): Автореф. дис. канд. биол. наук. – Санкт-Петербург – Пушкин, 2005. – 20 с.
11. Margesin R., Zimmerbauer A., Schinner F. Soil lipase – a useful indicator of oil bioremediation // Biotechnology Techniques. – 1999. – V. 13. – P. 859–863.
12. Teeraphatpormchai T., Nakajima-Kambe T., Shigeno-Akutsu Y., Nakayama M., Nomura N., Nakahara T., Uchiyama N. Isolation and characterization of a bacterium that degrades various polyester-based biodegradable plastics // Biotechnol Lett. – 2003. – 25, N 1. – P. 23–28.

Отримано 11.12.2007

УДК 669.018.674+582.28+628.516+477.63

**С.В. Олішевська¹, В.О. Захарченко¹, Л.Т. Наконечна¹,
В.Й. Манічев², І.В. Кураєва³**

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна

²Інститут геохімії навколишнього середовища НАН і МНС України,
пр-т Палладіна, 34 а, Київ, 03142, Україна

³Інститут геохімії, мінералогії і рудоутворення ім. М.П. Семененка НАН України, пр-т Палладіна,
34, Київ, 3403142, Україна

ВПЛИВ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА МІКОБІОТУ ҐРУНТУ КРИВОРІЗЬКОГО РЕГІОНУ

*Із забруднених іонами важких металів ґрунтів м. Кривий Ріг та його околиць виділено та ідентифіковано 45 видів 28 родів (127 штамів) мікроскопічних грибів, серед яких новим для мікобіоти України є *Murothecium leucotrichum*, рідкісними — *Absidia cylindrospora* і *Gongronella butleri*. У ґрунтах поблизу заводів “Криворіжсталь” і Південного гірничо-збагачувального комбінату домінували *Raeciloscyces lilacinus* і *P. taqandii*, часто траплявся стерильний міцелій, кількість темнозбарвлених видів грибів сягала до 30 %, внаслідок чого екологічна ситуація у м. Кривому Розі оцінена як несприятлива.*

Ключові слова: іони важких металів, ґрунт, мікроскопічні гриби.

Грандіозні об’єми видобутку і переробки гірських порід у Криворізькому залізорудному басейні (м. Кривий Ріг Дніпропетровської обл.) невідворотно викликають запиленість і загазованість повітряного басейну і потрапляння у довкілля іонів важких металів у кількостях, які набагато перевищують гранично допустимі концентрації (ГДК). Щорічно підприємствами міста скидається понад 200 млн м³ недостатньо очищених стічних вод, у яких частка підприємств гірничорудної промисловості складає 85,3 % від загального обсягу забруднених стоків. Найбільший внесок у забруднення атмосфери дають Південний гірничо-збагачувальний комбінат (ПГЗК) – 30,12 % і Криворізький металургійний завод “Криворіжсталь” – 29,49 %, з викидами яких до ґрунту в середньому потрапляє 500–700 мг/кг свинцю (10 ГДК), 1500 мг/кг цинку (15 ГДК) та інших металів [2].

Накопичуючись у ґрунті, іони важких металів негативно впливають на мікроорганізми, в тому числі і мікроскопічні гриби, сільськогосподарські рослини та тварини, а також становлять загрозу здоров’ю людини [1, 4, 6]. Наприклад, у дітей, які проживають поблизу підприємств чорної та кольорової металургії, виявлено високий вміст іонів свинцю у волоссі,

© С.В. Олішевська, В.О. Захарченко, Л.Т. Наконечна, В.Й. Манічев, І.В. Кураєва, 2009