

УДК 579.69: 620.193.8

**В.В. Занина, Ж.П. Коптева, Ю.М. Юмына, А.Н. Остапчук**

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, ДО3680, Украина

## **МОНОСАХАРИДНЫЙ СОСТАВ ЭКЗОПОЛИМЕРНОГО КОМПЛЕКСА БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ ЗАЩИТНЫХ ПОКРЫТИЙ**

*Изучен моносахаридный состав экзополимерного комплекса (ЭПК) бактерий-деструкторов защитных покрытий *Pseudomonas* sp. T/2, *Pseudomonas* sp. 109, *Arthrobacter* sp. 102. Установлено, что моносахаридный состав экзополимерного комплекса бактерий различен и зависит от модели роста бактерий. Он представлен в основном пентозами и гексозами. Доминирующими моносахаридами*

© В.В. Занина, Ж.П. Коптева, Ю.М. Юмына, А.Н. Остапчук, 2009

являются глюкоза, галактоза, арабиноза, которые определены в ЭПК биопленки и планктона всех исследуемых бактерий. Содержание глюкозы составляет в биопленке от 22,6 % до 39 %; галактозы – от 17,4 % до 26,4 %; арабинозы от 6,4 % до 31,6 %. Манноза также синтезируется исследуемыми бактериями, но в меньшем количестве, чем другие моносахариды. Рибоза обнаружена в ЭПК *Pseudomonas* sp. шт. 109, ксилоза – в биопленке ЭПК всех исследованных бактерий.

**Ключевые слова:** бактерии-деструкторы, покрытие Поликен 980-25, экзополимерный комплекс, биопленка, моносахариды.

Биоповреждение защитных покрытий подземных металлических сооружений происходит в процессе жизнедеятельности почвенных гетеротрофных бактерий, формирующих на их поверхности биопленки, которые инициируют и стимулируют коррозионные процессы. Бактерии биопленки обладают высокой биологической активностью, образуя экзополимерный комплекс (ЭПК), состоящий, как правило, из экзополисахаридов, экзолипополисахаридов, белков, нуклеиновых кислот и др. [1,4].

Физиологическое значение экзополимеров бактерий состоит в создании и поддержании благоприятных условий для их существования [2,4]. Важным фактором прикрепления бактерий к твердым поверхностям и формированию биопленки являются экзополисахариды и экзолипополисахариды [8,10,11].

В литературе практически отсутствуют сведения о составе экзополимеров бактерий – деструкторов, вызывающих биоповреждения защитных материалов. В этой связи целью данной работы было аналитическое исследование моносахаридного состава экзополимерного комплекса гетеротрофных бактерий – деструкторов защитных покрытий.

**Материалы и методы.** Объектами исследований служили культуры гетеротрофных бактерий, выделенные нами ранее из поврежденных покрытий и продуктов коррозии газопроводов: *Pseudomonas* sp. 109 и T/2 и *Arthrobacter* sp. 102. Бактерии культивировали на жидкой среде Таусона с глюкозой (20 г/л) при температуре 28 °С [7]. В среду погружали образцы защитного покрытия Поликен 980-25 размером 20×40×5 мм. Контролем служила среда Таусона с бактериями без образцов покрытия. Экспозиция эксперимента – 5 суток.

Сформированную биопленку с поверхности исследуемых покрытий снимали при помощи ультразвука в 30 мл стерильной водопроводной воды на диспергаторе УЗДН-2 Т (частота 22 кГц) дважды по 30 с с перерывом 2 мин. Полученную суспензию центрифугировали, затем проводили диализ в течении 3 суток и лиофилизировали.

Для выделения ЭПК бактерий планктонной формы роста культуральную жидкость центрифугировали при 5000 об/мин, надосадочную жидкость концентрировали, затем проводили диализ и лиофилизировали.

В экзополимерном комплексе, полученном из бактерий биопленки и планктона, определяли белок по методу Лоури [5], общее количество углеводов – фенолсерным методом [3]. Для изучения моносахаридного состава исследуемого ЭПК проводим гидролиз препаратов 2N HCl в течении 5 часов при температуре 100 °С, затем анализировали методом газожидкостной хроматографии на хроматографе “Chrom-5” (“LP Praga,” Чехия). Детектор ионизации в пламени, газ-носитель – гелий, скорость газа-носителя 20мл/мин. Температура испарителя – 160 °С; термостата – 140–210 °С, 3/мин. Колонка d- 4 мм, l=2 м, заполненная 3 % SP 2340 Superlcoport.

**Результаты и их обсуждение.** При поверхностной модели роста микроорганизмы проявляют более высокую физиологическую активность. Объем биопленки образуется, в основном, за счет, клеточных полимерных соединений. Сравнительное изучение синтеза экзополимерного комплекса клетками гетеротрофных бактерий-деструкторов при различных формах роста, выявило различия в продукции ЭПК бактериями биопленки и планктона. Полученные данные свидетельствуют о том, что удельная продуктивность ЭПК в биопленке, сформированной бактериями рода *Pseudomonas* в 2,14–2,46 раз выше, чем в планктоне. У *Arthrobacter* sp. 102 величина удельной продуктивности ЭПК в биопленке в 10 раз больше, чем в планктонной форме роста (таблица).

Продукция экзополимерного комплекса бактериями-деструкторами покрытий

Бактерии	Форма роста	Титр бактерий, кл/мл	Удельная продуктивность ЭПК, мг/мл	Количество, % от сухого веса вещества	
				углеводов	белка
<i>Pseudomonas</i> sp. 109	Биопленка	$10^8$	$6 \cdot 10^{-8}$	24,6	2,5
	Планктон	$10^{10}$	$2,8 \cdot 10^{-8}$	35,8	4,5
<i>Pseudomonas</i> sp. T/2	Биопленка	$10^8$	$3,7 \cdot 10^{-8}$	15,8	3,2
	Планктон	$10^{10}$	$1,5 \cdot 10^{-8}$	30,2	6,1
<i>Arthrobacter</i> sp. 102	Биопленка	$10^6$	$3 \cdot 10^{-6}$	17,3	2,7
	Планктон	$10^9$	$2,2 \cdot 10^{-7}$	31,5	4,7

Установлено, что общее количество углеводов в ЭПК биопленки исследуемых бактерий составляет от 15,8 % до 24,6 %, количество белка – от 2,5 % до 3,2 % (от сухого веса ЭПК). Общее количество углеводов в ЭПК планктона составляет от 30,2 % до 35,8 %, количество белка – от 4,5 % до 6,1 % (от сухого веса ЭПК).

Ранее нами показано, что пленочные и нефтебитумные защитные покрытия являются мощным фактором, стимулирующим формирование и функционирование биопленки. Увеличение количества углеводов и белка в ЭПК планктона свидетельствует об активной жизнедеятельности бактерий, за счет использования ими бутилкаучукового слоя защитного полиэтиленового покрытия Поликен 980-25 как дополнительного источника углерода [1].

Определение моносахаридного состава ЭПК бактерий биопленки и планктона выявило некоторые закономерности при различных моделях роста. Доминирующими моносахаридами у всех исследуемых культур являются глюкоза, галактоза и арабиноза, которые обнаружены в значительных количествах. Манноза также синтезируется данными бактериями при различных формах роста. Однако, количество ее гораздо меньше, чем других моносахаридов, описанных выше, и составляет от 4,9 % до 19,9 %.

Необходимо отметить, что ксилоза была обнаружена в биопленке ЭПК исследуемых культур *Pseudomonas* sp. 109 – 4,1 %; T/2 – 1,8 %, *Arthrobacter* sp. 102 – 4,1 %. (рис. 1, 2, 3).

Кроме того отмечены различия в образовании экзоглюканов изученных культур бактерий. Показано, что в ЭПК биопленки *Pseudomonas* sp. 109 глюкозы на 28 % больше, чем в планктонной форме роста, а рибозы – на 1,5 %. Следует отметить, что рибоза определена только у этого штамма (рис. 1).

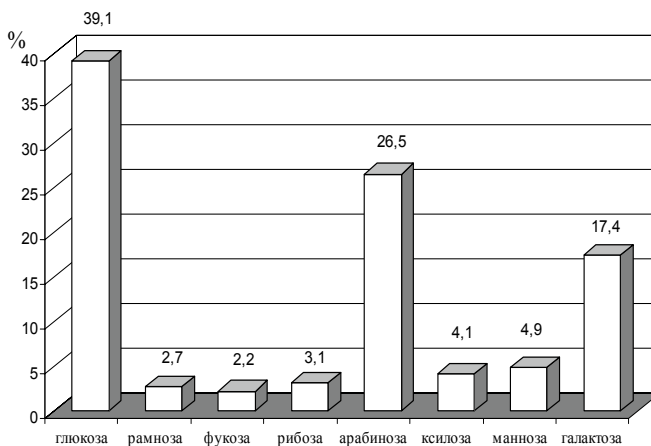
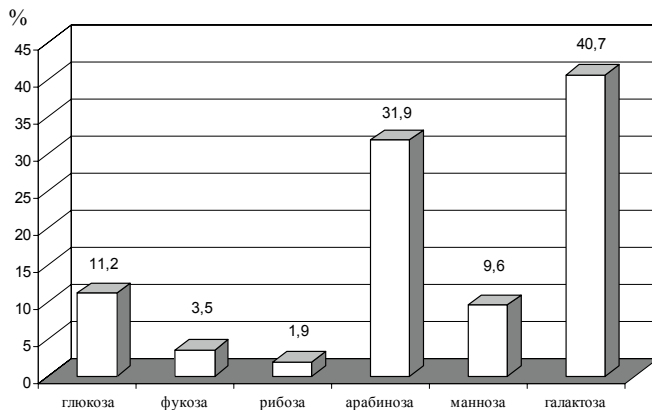
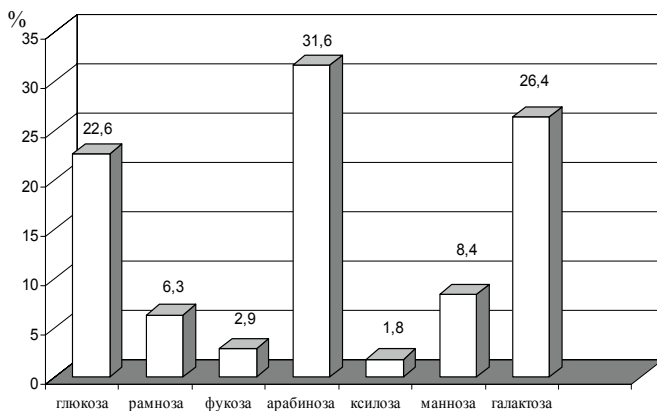


Рис. 1-а. Моносахаридный состав экзополимерного комплекса *Pseudomonas* sp. 109 (биопленка)

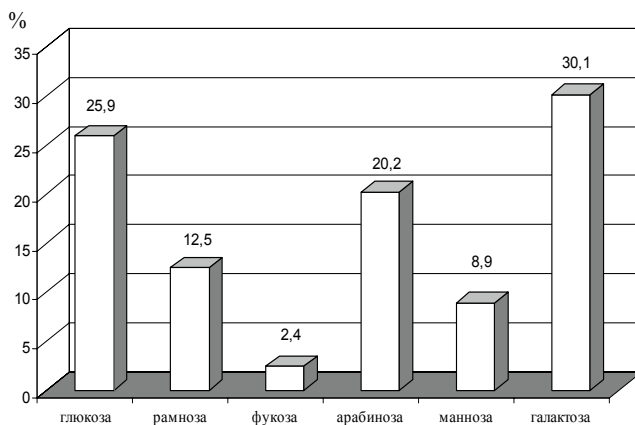


**Рис. 1-б. Моносахаридный состав экзополимерного комплекса *Pseudomonas* sp. 109 (планктон)**

Процентное содержание глюкозы, галактозы, маннозы и фруктозы в ЭПК биопленки и планктона *Pseudomonas* sp. Т/2 одинаково. В биопленке в большем количестве выявлена арабиноза – 31,6 % (рис. 2).



**Рис. 2-а. Моносахаридный состав экзополимерного комплекса *Pseudomonas* sp. Т/2 (биопленка)**



**Рис. 2-б. Моносахаридный состав экзополимерного комплекса *Pseudomonas* sp. Т/2 (планктон)**

В моносахаридный состав ЭПК биопленки *Arthrobacter* sp. 102 входят: глюкоза, галактоза, манноза, арабиноза, ксилоза и два не идентифицированных глюкозана обозначенные

нами как  $X_1$  и  $X_2$  (рис. 3). Аналогичные данные получены при изучении моносахаридного состава экзополимерного комплекса биопленки сульфатовосстанавливающих бактерий и планктона [6].

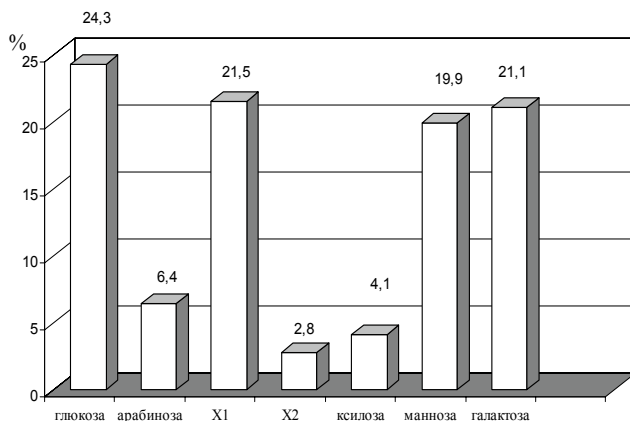


Рис. 3-а. Моносахаридный состав экзополимерного комплекса *Arthrobacter* sp. 102 (биопленка)

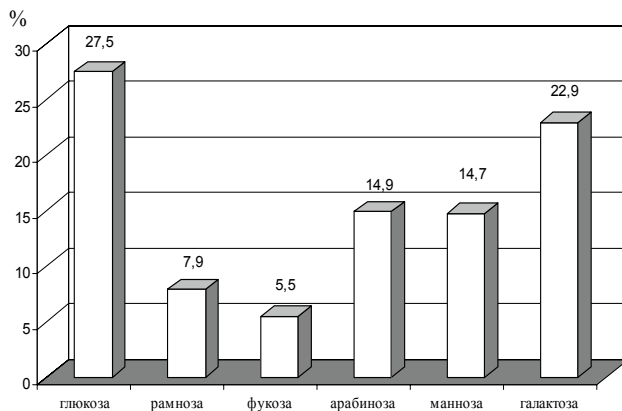


Рис. 3-б. Моносахаридный состав экзополимерного комплекса *Arthrobacter* sp. 102 (планктон)

Итак, экзополисахариды бактерий состоят из альдоз, что обеспечивает их высокую реактивную способность как фактора адгезии. Возможно, прикрепление бактерий к поверхности материалов и дальнейшее формирование биопленки осуществляется не только за счет реологических характеристик биополимеров, а также вследствие химического взаимодействия альдегидных групп экзополисахаридов с активными группами на поверхности покрытий.

Известно, что экзополисахариды обуславливают не только прикрепление клеток к субстрату, но и функционирование сообществ биопленки, создавая стабильную архитектуру. Сложная архитектура биопленок обеспечивает возможность метаболической кооперации клеток и создает условия, способствующие симбиотическим взаимоотношениям между бактериями разных видов [11, 12].

Ранее нами было выявлено, что в микробном сообществе биопленки на поверхности защитных покрытий доминируют слизеобразующие бактерии. Известно, что слизи в большинстве случаев являются полисахаридами, содержащими уроневые кислоты. Карбоксильные группы в их составе могут способствовать деструкции изоляционных покрытий [4].

Кроме того, экзополимеры могут принимать участие в создании прочной структуры биопленки. Такие исследования проведены лишь для немногих микроорганизмов, в частности изучали роль колановой кислоты (ЭПС) *Escherichia coli* K – 12 в образовании биопленки. Показано, что продукция колановой кислоты не требуется для прикрепле-

ния клеток к поверхностям. Тем не менее она является существенным фактором для образования комплексной трехмерной структуры и глубины биопленки *E. coli* [9].

Таким образом, установлено, что моносахаридный состав экзополимерного комплекса бактерий – деструкторов защитных покрытий представлен в основном пентозами и гексозами. В биопленке он более разнообразен, чем в планктоне, что возможно способствует прикреплению бактерий к поверхности покрытий.

*В.В. Заніна, Ж.П. Коптева, Ю.М. Юмина, А.Н. Остапчук*

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

### **МОНОСАХАРИДНИЙ СКЛАД ЕКЗОПОЛІМЕРНОГО КОМПЛЕКСУ БАКТЕРІЙ-ДЕСТРУКТОРІВ ЗАХИСНИХ ПОКРИТТІВ**

#### **Резюме**

Вивчено моносахаридний склад екзополімерного комплексу (ЕПК) бактерій-деструкторів захисних покриттів *Pseudomonas sp.* T/2, *Pseudomonas sp.* 109, *Arthrobacter sp.* 102. Встановлено, що моносахаридний склад (ЕПК) бактерій різноманітний і залежить від моделі росту. Він поданий в основному пентозами і гексозами. Домінуючими моносахаридами є глюкоза, галактоза, арабіноза, які визначені в біоплівці і в планктоні усіх досліджених бактерій. Вміст глюкози в біоплівці складає від 22,6 % до 39 %; галактози від 17,4 % до 26,4 %; арабінози від 14,9 % до 31,9 %. Манноза також синтезується бактеріями, але в меншій кількості ніж інші моносахариди. Рибоза визначена в ЕПК *Pseudomonas sp.* 109, ксиліза – в ЕПК біоплівці всіх досліджених бактерій.

**Ключові слова:** бактерії-деструктори, покриття Полікен 980-25, екзополімерний комплекс, біоплівка, моносахариди.

*V.V. Zanina, Zh.P. Kopteva, Yu. M. Yumina, A. N. Ostapchuk*

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

### **MONOSACCHARIDE COMPOSITION OF EXOPOLYMER COMPLEX OF BACTERIA-DESTRUCTORS OF PROTECTIVE COATINGS**

Monosaccharide composition of exopolymer complex (EPC) of bacteria-destroyers of protective coatings *Pseudomonas sp.* T/, *Pseudomonas sp.* 109, *Arthrobacter sp.* 102 has been studied. It is established that monosaccharide composition of exopolymer complex of bacteria is different and depends on the bacteria growth model. It is mainly represented by pentoses and hexoses. Glucose, galactose, arabinose, which are determined in EPC of biofilm and plankton of all studied bacteria, are dominating monosaccharides. Glucose content in the biofilm is from 22.6% to 39%; galactose – from 17% to 26.4%; arabinose – from 0.4 to 31.6%. Mannose is also synthesized by the studied bacteria, but in a less quantity than other monosaccharides. Ribose is found in EPC of *Pseudomonas sp.* st. 109, xylose – EPC biofilm of all studied bacteria.

The paper is presented in Russian.

**К е у в о р д с:** bacteria-destroyers, Poliken 980-25 coat, exopolymer complex, biofilm, monosaccharides.

**The authors address:** *V.V. Zanina*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Андреев К.И., Козлова И.П., Коптева Ж.П., Плященко-Новохатний А.И., Заніна В.В., Пуриш Л.М. Микробная коррозия подземных споруд. – Київ: Наук. думка, 2005. – 258 с.
2. Ботвинко И.В. Экзополисахариды бактерий // Успехи микробиологии. – Москва: Наука, 1985. – 20. – С. 46–49.
3. Захарова И.А., Косенко Л.В. Методы изучения микробных полисахаридов. – Киев: Наук. думка, 1982. – 182 с.
4. Коптева Ж.П., Заніна В.В. Микробні біоплівки на захисних покриттях підземних металевих споруд // Мікробіол. журн. – 2008. – 70, № 1. – С. 71–85.
5. Практикум по биохимии // Под ред. С.Е. Северина, Т.А. Соловьевой. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1989. – 509 с.
6. Пуриш Л.М., Асаулєнко Л.Г., Козлова І.П. Вплив інгібітору корозії на продукування екзополімерного комплексу сульфатвідновлювальними бактеріями // Мікробіол. журн. – 2007. – 69, № 3. – С. 43–50.

7. Романенко В.И., Кузнецов С.И. Экология микроорганизмов пресных водоемов. – Ленинград: Наука, 1974. – 196 с.
8. Beveridge T.J., Makin S.A., Kadurugamuwa J.L., Zusheng L.I. Interactions between biofilms and the environment // FEMS Microbiology Reviews. – 1977. – 20, N 3–4. – P. 2291–2304.
9. Danese P.N., Pratt L.A., Colter R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture // J. Bacteriol. – 2000. – 182, N 12. – P. 3593–3596.
10. Fletcher M. The attachment of bacteria to surfaces in aquatic environments // Adhesion of microorganisms surface. – London: Acad. Press, 1979. – P. 87–108.
11. Novak J.S., Tanenbaum S.W., Nakas J.P. Heteropolysaccharides formation by *Arthrobacter viscosus* grown on xylose and xylose oligosaccharides // Appl. And Environ. Microbiol. – 1992. – 58, N 11. – P. 3501–3507.
12. Sutherland I.W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework // J. Microbiol. – 2001. – 147. – P. 3–9.

Отримано 20.12.2008

УДК 616.24-002.5:576.8.093

**Г.В. Яворська<sup>1</sup>, Р.І. Сибірна<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Львівський національний університет ім. Івана Франка,  
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна

<sup>2</sup>Львівський державний університет внутрішніх справ,  
вул. Городоцька, 26, Львів, 79000, Україна

## **МОРФОЛОГО-КУЛЬТУРАЛЬНІ І ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ АТИПОВИХ МІКОБАКТЕРІЙ**

*Досліджено морфолого-культуральні і фізіолого-біохімічні властивості культур атипичних мікобактерій, виділених від хворих на мікобактеріози. Показано можливість використання вказаних властивостей для своєчасної діагностики захворювання.*

*Ключові слова: атипичні мікобактерії, мікобактеріози, бактеріовиділення.*

Маючи туберкульозоподібну клінічну картину, мікобактеріози важко піддаються діагностуванню і часто йдуть як міксти поряд із туберкульозом [2, 4, 6, 12]. Атипичні мікобактерії можуть виділятися не тільки хворими на туберкульоз, а й при неспецифічних захворюваннях легенів чи пухлинах. Відомо велике число представників цієї групи мікроорганізмів, які морфологічно подібні до типових мікобактерій туберкульозу і мають здатність зумовлювати бактеріоносійство, інфікування або ж бути причиною виникнення того чи іншого захворювання.

У даний час збільшується роль атипичних мікобактерій у патології людини, що, у першу чергу, пов'язане з неправильним застосуванням антибіотиків. Атипичні мікобактерії характеризуються широким спектром стійкості та потенційною патогенністю для людини і тварин [1, 3, 10, 11]. При виділенні з патологічного матеріалу атипичних мікобактерій важливо встановити значення їх у патології. В останні роки мікробіологічне вивчення основних характеристик мікобактерій залишається поза увагою дослідників [6, 10, 11]. Значно погіршує ситуацію ще й зниження опірності імунної системи людського організму, яке спостерігається в Україні внаслідок надмірного забруднення довкілля радіоактивними елементами та шкідливими хімічними речовинами. У зв'язку з цим актуальною залишається і проблема пошуку та вдосконалення діагностичних тестів для виявлення мікобактеріозів [5, 7, 8, 9, 12].

Ріст захворюваності на туберкульоз і послаблення уваги щодо вивчення атипичних мікобактерій зумовлюють необхідність комплексного підходу до питань, які стосуються профілактики та діагностики захворювань, спричинених мікобактеріями. Для ідентифікації атипичних мікобактерій запропоновано багато тестів, що базуються на імунологічних та генетичних методах дослідження. Однак у практичних лабораторіях їхнє використання значно утруднене, на відміну від мікробіологічних. Крім того, бактеріологічні методи займають основне місце, оскільки є необхідними не тільки для діагностики, але й для контролю ефективності терапії.

© Г.В. Яворська, Р.І. Сибірна, 2009