

Ж.П. Коптева, В.В. Занина, М.А. Борецкая, А.Е. Коптева, И.А. Козлова

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

ВЛИЯНИЕ ЛИПОЛИТИЧЕСКОЙ И КАТАЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ГЕТЕРОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ НА ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОКРЫТИЯ ПОЛИКЕН 980-25

*Изучены липолитическая и каталазная активности *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 109, *Rhodococcus erythropolis* 102, *Bacillus subtilis* 138 и их ассоциации при разных моделях роста: биопленочной и планктонной. Показано, что в условиях биопленки ферментативная активность исследуемых бактерий в 1,5 – 1,7 раза выше, чем в условиях планктона. Монокультуры бактерий проявляли значительно меньшую активность, чем ассоциативные.*

Исследованы изменения физико-механических свойств образцов защитного покрытия Поликен 980-25 в присутствии указанных бактерий. Под действием монокультур прочность к разрыву покрытия снижается на 5,9 – 11,8 %, под действием ассоциации – на 17,3 %. Адгезионная прочность как основной показатель биостойкости покрытий уменьшалась соответственно в моно- и ассоциативной культурах на 28,6 – 73,2 % относительно контроля. Повреждая клеящий слой изоляционного покрытия, бактерии нарушают адгезию к металлу, что способствует его коррозии.

Ключевые слова: гетеротрофные бактерии-деструкторы покрытий, липаза, каталаза, биопленка, планктон, прочностные характеристики покрытия.

Надежность металлических подземных сооружений зависит, прежде всего, от состояния антикоррозионной защиты. Изоляционные покрытия, которые применяются для защиты газопроводов и других конструкций от коррозии, постоянно подвергаются действию микроорганизмов, способных инициировать или стимулировать коррозионные процессы. Биопленка, формирующаяся на поверхности покрытий, является фактором их биоповреждения. Способность бактерий прикрепляться к твердым поверхностям – жизненно важное приспособление к существованию в разных эконившах и одна из стратегий выживания в окружающей среде [2, 7, 10, 13,17].

Почвенные микроорганизмы воздействуют на изоляционные материалы продуктами своего метаболизма, в частности, органическими, неорганическими кислотами и ферментами. Известно, что количество бактерий не всегда может быть показателем агрессивности среды, и поэтому более надежными и перспективными являются показатели ферментативной активности коррозионноопасных микроорганизмов. Именно ферменты как биологические катализаторы обуславливают обмен веществ микроорганизмов и интенсивность выделения в среду агрессивных продуктов их метаболизма [14].

Целью работы было изучение влияния липолитической и каталазной активностей моно- и ассоциативных культур гетеротрофных бактерий на основные физико-механические свойства покрытия Поликен 980-25.

Материалы и методы. Объектами исследования были монокультуры гетеротрофных бактерий-деструкторов покрытий: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 109, *Rhodococcus erythropolis* 102, *Bacillus subtilis* 138 и их искусственная ассоциация; защитное ленточное покрытие Поликен 980-25.

Бактерии культивировали на жидкой среде Таусона с глюкозой (20г/л) [12] с добавлением МПБ (20мл на 100мл среды) при температуре $28^{\circ} \pm 2$ °C. Образцы покрытия Поликен 980-25 размером 40x20x0,5 мм погружали в среду Таусона, инокулированную культурами указанных бактерий. Посевной материал вносили в среду в количестве 10^6 кл/мл. Продолжительность опыта составляла 5 суток. Повторность опыта трехкратная.

© Ж.П. Коптева, В.В. Занина, М.А. Борецкая, А.Е. Коптева, И.А. Козлова, 2013

По окончании эксперимента биопленку десорбировали с поверхности покрытия в 30 мл 0,1 н фосфатного буфера (рН 7) с помощью ультразвукового диспергатора УЗДН 2Т (частота 22 кГц) в течение 30 сек (два раза с интервалом 2 мин). Планктонные клетки бактерий центрифугировали при 18500 g в течение 20 мин для получения надосадочной жидкости (центрифуга «erpendorf» 5810R, Германия).

Титр бактерий (начальный и конечный) определяли методом десятикратных предельных разведений. Липолитическую и каталазную активности изучали при разных моделях роста бактерий: в биопленке и планктоне.

Липолитическую активность исследуемых бактерий определяли спектрофотометрическим методом по реакции с п-нитрофенилпальмитатом (пНФП) [1]. Сущность пНФП-метода заключается в воздействии липазы на хромогенный субстрат – фенольный эфир пальмитиновой кислоты (пара-нитрофенилпальмитат) с высвобождением в результате реакции высокоатомного спирта – п-нитрофенола (пНФ). В качестве эмульгатора использовали дезоксихолат натрия, защитного коллодия - гуммиарабик. Изменение оптической плотности реакционной среды регистрировали на спектрофотометре КФК-3-01, ОАО «ЗОМЗ», Россия. За единицу липолитической активности принимали такое количество фермента в 1 мл, которое катализирует освобождение 1 нмоля пНФ из эмульгированного субстрата (пНФП) за 1 мин при 37°C, т.е. 1 ед липолитической активности (ЛА) = 1 нмоль·мин⁻¹·мл⁻¹.

Величину липолитической активности рассчитывали по формуле:

$$ЛА = \frac{\Delta E \cdot V}{\text{мин} \cdot \varepsilon \cdot d \cdot V_n}$$

где ΔE – изменение величины экстинкции за минуту;

V – общий объем реакционной смеси, мл;

ε – коэффициент экстинкции пНФ – 1,5 · 10⁻³ нмоль;

d – длина светового пути (0,5 см)

V_п – объем пробы (0,1 мл)

В итоге формула принимает вид:

$$ЛА = \Delta E \cdot 222,2 \text{ нмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мл}^{-1},$$

где 222,2 – постоянная величина в условиях опыта.

Активность внеклеточной каталазы определяли спектрофотометрически. Принцип метода основан на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс [9].

Активность каталазы рассчитывали по формуле:

$$E = (A_1 - A_2) \cdot V \cdot t \cdot K \text{ (ед./л)}, \text{ где:}$$

A₁ – экстинкция контрольной пробы,

A₂ – экстинкция опытной пробы,

V – объем опытной пробы 0,1 мл,

t – время инкубации 600 секунд,

K – коэффициент миллимолярной экстинкции перекиси водорода

- 22,2 · 10³ мМ⁻¹·см⁻¹

Удельную активность исследуемых ферментов выражали в ед.·мг⁻¹ белка.

Белок в биопленке и планктоне определяли методом Лоури [11].

Для определения влияния бактерий на физико-механические свойства поликена использовали образцы покрытия размером 50x70 мм для учета прочности к разрыву и образцы диаметром 25 мм – для адгезионной прочности. Исследованные образцы покрытия погружали в среду Таусона, инокулированную культурами гетеротрофных бактерий *P. pseudoalcaligenes* 109, *R. erythropolis* 102, *B. subtilis* 138 и их ассоциацией. Контролем служил образец покрытия, погруженный в среду Таусона без бактерий. Продолжительность опыта составляла 30 сут.

Прочность образцов покрытия к разрыву определяли по ГОСТ 14236-81, адгезионную прочность – по ГОСТ 14760-69 [3, 4] в Институте химии высокомолекулярных соединений НАН Украины.

Результаты и их обсуждение. Результаты изучения липолитической и каталазной активностей исследуемых бактерий в условиях биопленки и планктона представлены на рисунках 1 и 2. Бактерии были выделены ранее из поврежденных покрытий газопроводов [2] и отличались активностью исследуемых ферментов. Более активно продуцировали названные экзоферменты бактерии биопленки. В частности, удельная липолитическая активность бактерий в биопленке в 1,5 раза выше, чем в условиях планктона, а каталазная активность – в 1,5–1,7 раза (рис. 1, 2). Из монокультур высокая активность выявлена у *R. erythropolis* 102. Они продуцировали липазу с активностью 38,8 ед·мг⁻¹ белка, а каталазу значительно выше – 51,8 ед·мг⁻¹ белка. Ассоциативные культуры бактерий, включающие *R. erythropolis* 102, *P. pseudoalcaligenes* 109 и *B. subtilis* 138, проявляли более высокую активность, чем монокультуры, что может свидетельствовать об усилении активности в условиях кооперации бактерий. Липолитическая активность бактерий в ассоциации составляла 54,8 ед·мг⁻¹ белка, каталазная активность – 77,3 ед·мг⁻¹ белка. Ранее было установлено, что между гетеротрофными бактериями в биопленке существуют разные виды взаимоотношений: нейтрализм, комменсализм и протокооперация. Межвидовое взаимодействие бактерий играет важную роль в функционировании биопленок еще в начале их формирования – на этапах прикрепления бактерий и колонизации ими поверхности покрытий [2].

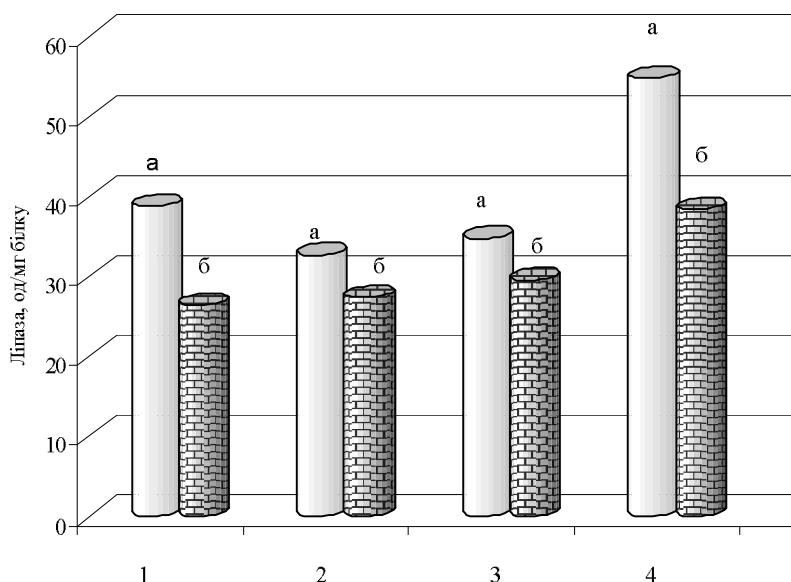


Рис. 1. Удельная липолитическая активность бактерий-деструкторов защитных покрытий в биопленке (а) и планктоне (б); 1 - *Rhodococcus erythropolis* 102, 2 - *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 109, 3 - *Bacillus subtilis* 138, 4 – ассоциация бактерий.

Целесообразным было определить изменения основных физико-механических характеристик покрытия Поликен 980-25 (прочность на разрыв и адгезионную прочность) в присутствии изученных бактерий, образующих полисахариды, жирные кислоты и ферменты. В процессе эксперимента, который продолжался 30 суток, численность бактерий в биопленке на поверхности покрытия возрастала на 2-3 порядка относительно начальной. Максимальное количество бактерий выявлено в вариантах опыта с участием ассоциации бактерий, оно составляло 10^7 – 10^8 клеток/мл среды.

Изменения физико-механических свойств образцов полимерного покрытия под действием бактерий приведены в таблице. В варианте опыта, где образцы покрытия служили единственным источником углерода, под влиянием гетеротрофных бактерий понижается прочность к разрыву и адгезионная прочность. Например,

прочность к разрыву образца в культуре *B. subtilis* 138 снижалась на 5,9 %, а под действием ассоциации – на 17,3 % относительно контроля.

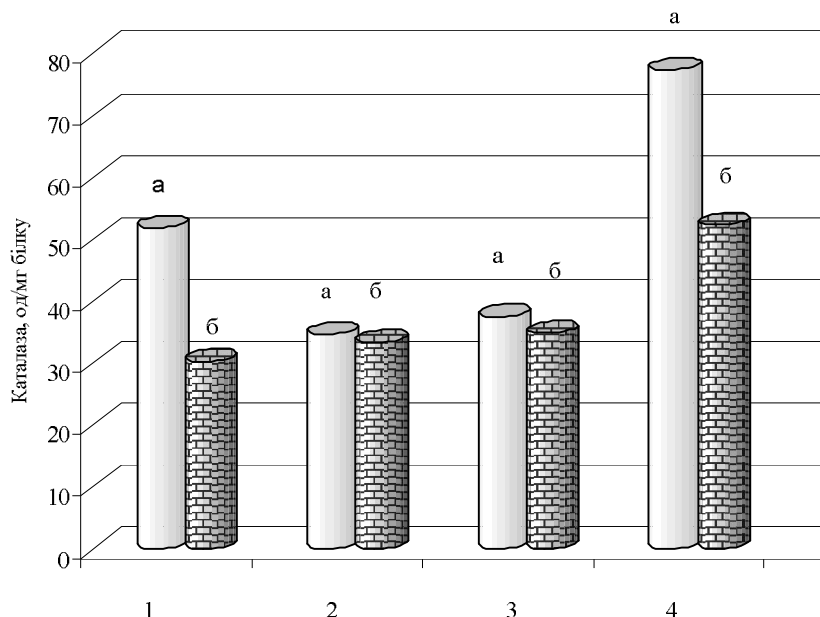


Рис. 2. Удельная каталазная активность бактерий-деструкторов защитных покрытий в биопленке (а) и планктоне (б);
 1 - *Rhodococcus erythropolis* 102, 2 - *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 109,
 3 - *Bacillus subtilis* 138, 4 –ассоциация бактерий.

Таблица

Влияние гетеротрофных бактерий на физико-механические свойства образцов защитного покрытия Поликен 980-25

Варианты опыта, среда без источника углерода	Снижение прочности к разрыву, %	Снижение адгезионной прочности, %
<i>Rhodococcus erythropolis</i> 102 + образец покрытия	11,8	28,6
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> 109 + образец покрытия	7,1	24,0
<i>Bacillus subtilis</i> 138 + образец покрытия	5,9	26,8
Ассоциация бактерий + образец покрытия	17,3	73,2

Адгезионная прочность как важный показатель биостойкости покрытий соответственно снижалась в культуре *P. pseudoalcaligenes* 109 и ассоциации на 24 % и 73,2 %. Наиболее существенные потери прочностных характеристик образцов поликена отмечены в варианте опыта с участием ассоциации бактерий, состоящей из *P. pseudoalcaligenes* 109, *R. erythropolis* 102 и *B. subtilis* 138. Повреждая клеящий слой покрытий, бактерии нарушают их адгезию к металлу, что, в свою очередь, приводит к полной потере эффективности пассивной защиты подземных сооружений.

Полученные данные о липолитической и каталазной активностей моно- и ассоциативных культур гетеротрофных бактерий, образующих биопленку на поверхности покрытия Поликен 980-25, являются новыми и оригинальными.

Имеющиеся единичные работы о роли окислительно-восстановительных и гидролитических ферментов в повреждении строительных материалов, фенопластов, резин, битумов и т.д. преимущественно выполнены на микромицетах. Разрушение

многих полимерных материалов происходит в результате комплексного действия ферментов [6], что было подтверждено в представленной работе.

Как видно из полученных результатов, липолитическая и каталазная активности ассоциативных культур в биопленке была в 1,4 – 2,2 раза выше, чем у монокультур. Примерно одинаковые показатели активностей отмечены у *P. pseudoalcaligenes* 109 и *B. subtilis* 138. Активность изученных ферментов *R. erythropolis* 102 выше в 1,2 – 1,5 раза, чем у других бактерий в условиях биопленочной модели роста.

Известно, что активность липаз усиливается в ответ на действие индуктора, внесимого в питательную среду [5]. Таким индуктором в условиях проведенных экспериментов является Поликен 980-25, содержащий бутилкаучуковый слой, который, как показали более ранние исследования, разрушается бактериями [2].

Углеводороды в виде битумов активизируют липолитическую активность нефтезагрязненных почв. С активацией липолиза увеличивается численность углеводородоокисляющих микроорганизмов и уменьшается количество нефтепродуктов [8]. Некоторые авторы предлагают использовать активность липазы в качестве одного из показателей биодеструкции нефти и нефтепродуктов [18].

Каталаза, которая относится к классу окислительно-восстановительных ферментов, ускоряет разложение перекиси водорода до молекулярного кислорода. Ее роль состоит в защите микроорганизма от ядовитого действия H_2O_2 , образующейся при биологическом окислении. Имеются данные о том, что коррозионная опасность грунтов может контролироваться активностью каталазы. Снижение ее активности достоверно характеризует высокую степень разрушения металла [16].

Взятые в опыт моно- и ассоциативные культуры бактерий изменяют прочностные характеристики поликена, синтезируя липазу и каталазу ускоряют деструкцию защитного покрытия.

Проведенные ранее исследования по изучению биостойкости нефтебитумных покрытий показали, что в агрессивных грунтах разрушаются C=O и S=O связи, что может привести к обрыву олигомерных цепей и, как следствие, к уменьшению прочности покрытия. Разрушение этих связей происходит в результате функционирования многовидовой биопленки на поверхности покрытия, состоящей из бактерий окисляющих углеводороды и восстанавливающих нитраты и сульфататы, а также продуцирующих каталазу и липазу [2].

Предложен гипотетический механизм биодegradации бутилкаучукового слоя покрытия Поликен 980-25 моно и бинарной биопленкой, состоящей из *P. pseudoalcaligenes* 109 и *Arthrobacter flavescens* 102. Под их действием происходит разрыв двойных связей (CH=CH) между группами линейной цепи и образование карбонильных групп (C=O), что является результатом окислительной деструкции, которая приводит к нарушению целостности химической структуры бутилкаучука [15].

Таким образом, на поверхности покрытия Поликен 980-25 формируется гетерогенная биопленка, состоящая из бактерий разных таксономических групп. В процессе функционирования биопленки гетеротрофные бактерии образуют белки, углеводы, липиды, органические кислоты, ферменты и др.

Установлено, что 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 коррозионно активными бактериями гидролаз и оксидоредуктаз, которые разрушают сложные эфирные связи, переносят атомы водорода от CH_2-CH_2 с образованием C=C групп, т.е. происходит дегидрирование углеродных цепей и преобразование насыщенных соединений в ненасыщенные, которые могут быть агрессивными по отношению к покрытиям.

Ж.П. Коптєва, В.В. Заніна, М.О. Борецька, Г.Є. Коптєва, І.П. Козлова

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

**ВПЛИВ ЛІПОЛІТИЧНОЇ І КАТАЛАЗНОЇ АКТИВНОСТІ
ГЕТЕРОТРОФНИХ БАКТЕРІЙ НА ФІЗИКО-МЕХАНІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ
ПОКРИТТЯ ПОЛІКЕН 980-25**

Резюме

Вивчено ліполітичну і каталазну активності *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 109, *Rhodococcus erythropolis* 102, *Bacillus subtilis* 138 та їхньої асоціації за різними моделями росту: біоплівкової і планктонної. Показано, що в умовах біоплівки ферментативна активність досліджуваних бактерій в 1,5 – 1,7 рази була вищою, ніж за умов планктону. Монокультури бактерій проявляли значно меншу активність, ніж асоціативні.

Досліджено зміни фізико-механічних властивостей зразків захисного покриття Полікен 980-25 за участю вказаних бактерій. Під дією монокультур міцність до розриву покриття знижується на 5,9 – 11,8 %, під дією асоціації – на 17,3%. Адгезійна міцність як основний показник біостійкості покриттів зменшувалась відповідно в моно- і асоційованих культурах на 28,6 – 73,2% відносно контролю. Пошкоджуючи клеючий шар ізоляційного покриття, бактерії, порушують адгезію до металу, що сприяє його корозії.

Ключові слова: гетеротрофні бактерії-деструктори покриттів, ліпаза, каталаза, біоплівка, планктон, міцнісні характеристики покриття.

Zh.P.Kopteva, V.V.Zanina, M.O. Boretska, G. Ye. Kopteva, I.P. Kozlova

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

**EFFECT OF LIPOLYTIC AND CATALASE ACTIVITY ON PHYSICO-
MECHANICAL PROPERTIES OF COATING POLYKEN 980-25**

S u m m a r y

Lipolytic and catalase activity of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 109, *Rhodococcus erythropolis* 102, *Bacillus subtilis* 138 and their association with different growth models: biofilm and plankton ones. It is shown that under biofilm conditions the fermentative activity of bacteria under study was 1.5-1.7 times higher than under plankton conditions. Monocultures of bacteria displayed much lower activity than associative ones.

Changes of physico-chemical properties of the specimens of protective coating Polyken 980-25 with participation of the above bacteria have been studied. The coating breaking strength decreases by 5.9-11.8 % under the effect of monocultures, and by 17.3% under the effect of association. The adhesive strength as the basic index of coating biologic resistance decreased respectively in mono- and associated cultures by 28.6-73.2% in respect of the control. Damaging the sticking layer of isolation coating, bacteria damage the adhesion to metal which favors its corrosion.

The paper is presented in Russian.

Key words: heterotrophic bacteria-destroyers of coatings, lipase, catalase, biofilm, plankton, strength characteristics of coating.

The authors address: Kopteva Zh.P., 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., Катичон 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., Коптєва Ж.П., Піляшенко-Новохатний А.І., Заніна В.В., Пуріш Л.М. Мікробна корозія підземних споруд. – К.: Наук. думка, 2005. – 258с.
3. ГОСТ 14236-81. Пленки полимерные. Метод испытания на растяжение. – М. – Введ. 01.01.82. – 8с.

4. ГОСТ 14760- 69. Клеи. Метод определения прочности при отрыве. – М. Введ. 01.01.70. – 5с.
5. Давранов К. Микробные липазы в биотехнологии// Прикладная биохимия и микробиология . – 1994 . – **30**, №4-5 . – С.527–534.
6. Защита от коррозии, старения и биоповреждений машин, оборудования и сооружений: Справочник/ под ред. А.А. Герасименко. – Т.1. – М.: Машиностроение, 1987. – 688с.
7. Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Биопленки бактерий как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития // Генетика. – 2004. – **40**, №11. –С. 1145–1156.
8. 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.
9. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майоров И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело . – 1988. – №1. – С. 16–18.
10. Николаев Ю.А., Проссер Дж. И. Внеклеточные факторы, влияющие на адгезию *Pseudomonas fluorescens* на стекле// Микробиология . – 2000 . – **69**, №2 . – С.237–242.
11. Практикум по биохимии / Под ред. С.Е. Северина, Т.А. Соловьевой. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1989. – 509с.
12. Романенко В.И., Кузнецов С.И. Экология микроорганизмов пресных водоемов. – Ленинград: Наука, 1974. – 193с.
13. Романова Ю.М., Смирнова Т.А., Андреев А.Л., Ильина Т.С., Диденко Л.В., Гинцбург А.Л. Образование биопленок – пример «социального» поведения бактерий// Микробиология. – 2006. – **75**, №4. – С. 556–561.
14. 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.
15. Юмина Ю.М., Коптцева Ж.П., Ласковенко Н.Н., Бубнова А.С., Остапюк С.М. Биодеградація захисного покриття «Полікен 980-25»// Полімерн. журн. – 2009. – **31**, №4 . –С. 349–352.
16. Ямольская Т.Д. Природа и условия развития биокоррозии биоповреждений в северных регионах (на примере г. Сургута) : Автореф. дис. канд. биол. Наук. – Санкт-Петербург; Цушкин, 2005. –20 с.
17. Fletcher M. Bacterial attachments in aquatic environments: a diversity of surface and adhesion strategies// Bacterial adhesion (Molecular and ecological diversity). – New York: Willey-Liss, 1996. – P. 1–24.
18. Margesin R., Zimmerbauer A., Schinner F. Soil lipase – a useful indicator of oil bioremediation // Biotechnology Techniques. – 1999. – **13**. – P. 859– 863.

Отримано 13.10.2012