

15. Thompson C.J., Ward J.M., Hopwood D.A. Cloning of antibiotic resistance and nutritional genes in *Streptomyces* // J. Bacteriol. – 1982. – 15, N 2. – P. 668–677.
16. Tichy L.N., Moskalenko L.N., Smrckova I., Krumphanzl V. Isolation and characterization of a plasmid pSLG3, from *Streptomyces lavendulae-grasseri* // FEMS Microbiol Lett. – 1985. – 27, N 1. – P. 65–68.
17. Toyama H., Okanishi M., Umezawa H. Physical characterization of plasmids from *Streptomyces kasugaensis* MB273 // Plasmid. – 1981. – 11, N 5. – P. 306–312.

Отримано 01.06.2008

УДК 579. 69:620.193.8

**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: биоупленочной и планктонной. Показано, что синтез экзоферментов в биоупленке и планктоне отличается. В условиях биоупленочной формы роста усиливается удельная активность исследованных ферментов. Активность внеклеточных липазы и каталазы в биоупленке в 1,1–1,5 и 1,2–2,1 раза выше, чем в планктоне соответственно. С увеличением продолжительности опыта до 14 суток липолипидическая активность значительно уменьшается. Активность исследованных ферментов, продуцируемых бактериями-деструкторами, может быть использована для оценки биостойкости изоляционных покрытий, как показать их биодеградации в техногенных средах.*

*Ключевые слова:* бактерии-деструкторы покрытий, липаза, каталаза, биоупленка, 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 липолипидической 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 биоупленку 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 биоупленку 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<sup>-1</sup> · мл<sup>-1</sup> [1].

Активность внеклеточной каталазы бактерий определяли титрометрически. За единицу активности каталазы принимали количество фермента, катализирующее разложение 1 мкМ перекиси водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (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.

Т а б л и ц а 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 <sup>5</sup>	31,73	10 <sup>9</sup>	15,87
<i>Pseudomonas</i> sp. 109 ПЛ	10 <sup>9</sup>	28,5	10 <sup>7</sup>	14,63
<i>Pseudomonas</i> sp. 109 НК	10 <sup>10</sup>	38,61	10 <sup>7</sup>	9,0
<i>Pseudomonas</i> sp. Т/2 БП	10 <sup>4</sup>	29,6	10 <sup>4</sup>	12,8
<i>Pseudomonas</i> sp. Т/2 ПЛ	10 <sup>5</sup>	20,19	10 <sup>7</sup>	10,6
<i>Pseudomonas</i> sp. Т/2 НК	10 <sup>3</sup>	35,8	10 <sup>5</sup>	8,6
<i>Arthrobacter</i> sp. 102 БП	10 <sup>5</sup>	32,3	10 <sup>3</sup>	11,9
<i>Arthrobacter</i> sp. 102 ПЛ	10 <sup>5</sup>	25,17	10 <sup>5</sup>	9,2
<i>Arthrobacter</i> sp. 102 НК	10 <sup>9</sup>	13,1	10 <sup>5</sup>	8,9
<i>Bacillus</i> sp. 138 БП	10 <sup>7</sup>	28,5	-	-
<i>Bacillus</i> sp. 138 ПЛ	10 <sup>9</sup>	23,15	-	-
<i>Bacillus</i> sp. 138 НК	10 <sup>10</sup>	28,46	-	-
<i>Bacillus</i> sp. 140 БП	10 <sup>7</sup>	22,8	-	-
<i>Bacillus</i> sp. 140 ПЛ	10 <sup>9</sup>	18,72	-	-
<i>Bacillus</i> sp. 140 НК	10 <sup>9</sup>	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.

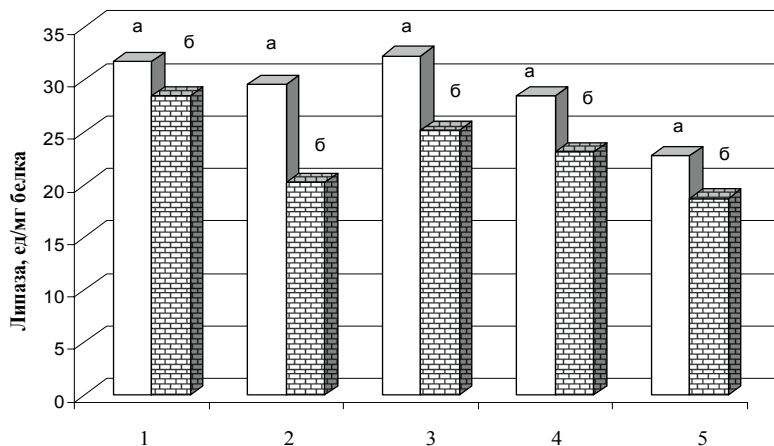


Рис. 1. Удельная липолитическая активность бактерий в биопленке (а) и планктоне (б):  
1 – *Pseudomonas* sp. 109, 2 – *Pseudomonas* sp. T/2, 3 – *Arthrobacter* sp. 102,  
4 – *Bacillus* sp. 138, 5 – *Bacillus* sp. 140

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 <sup>7</sup>	35,2
<i>Pseudomonas</i> sp. 109 ПЛ	10 <sup>10</sup>	30,8
<i>Pseudomonas</i> sp. 109 НК	10 <sup>10</sup>	33,3
<i>Pseudomonas</i> sp. Т/2 БП	10 <sup>6</sup>	24,8
<i>Pseudomonas</i> sp. Т/2 ПЛ	10 <sup>10</sup>	11,7
<i>Pseudomonas</i> sp. Т/2 НК	10 <sup>10</sup>	21,8
<i>Arthrobacter</i> sp. 102 БП	10 <sup>6</sup>	37,5
<i>Arthrobacter</i> sp. 102 ПЛ	10 <sup>10</sup>	23,04
<i>Arthrobacter</i> sp. 102 НК	10 <sup>10</sup>	14,25
<i>Bacillus</i> sp. 138 БП	10 <sup>7</sup>	15,98
<i>Bacillus</i> sp. 138 ПЛ	10 <sup>9</sup>	14,65
<i>Bacillus</i> sp. 138 НК	10 <sup>10</sup>	34,63
<i>Bacillus</i> sp. 140 БП	10 <sup>7</sup>	19,64
<i>Bacillus</i> sp. 140 ПЛ	10 <sup>9</sup>	12,65
<i>Bacillus</i> sp. 140 НК	10 <sup>9</sup>	37,29

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

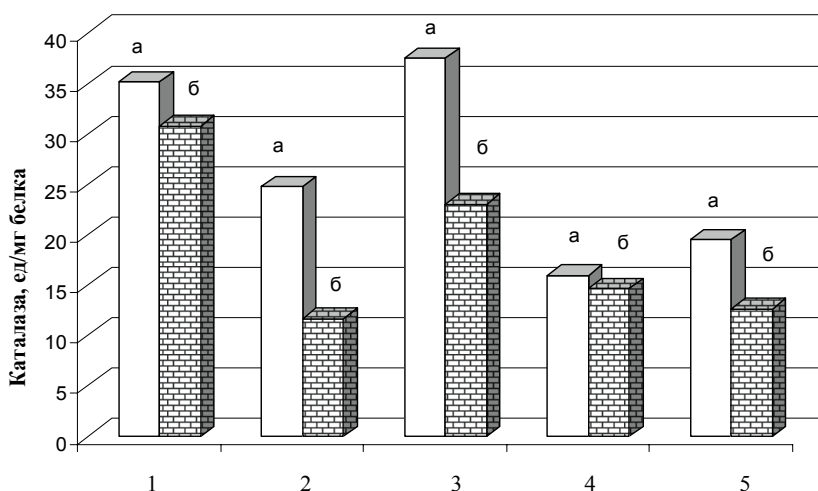


Рис. 2. Удельная каталазная активность бактерий в биопленке (а) и планктоне (б): 1 – *Pseudomonas* sp. 109, 2 – *Pseudomonas* sp. Т/2, 3 – *Arthrobacter* sp. 102, 4 – *Bacillus* sp. 138, 5 – *Bacillus* sp. 140

Возможно, активность экзолипазы и экзокаталазы у исследованных нами бактерий-деструкторов может быть использована для оценки биостойкости изоляционных покрытий как показатель их биодеградации 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-destructors 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-destructors, can be used for estimating bioreistance of isolating coatings as the index of their biodegradation in technogenic media.

The paper is presented in Ukrainian.

**Key words:** bacteria-destructors 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. Олішевська<sup>1</sup>, В.О. Захарченко<sup>1</sup>, Л.Т. Наконечна<sup>1</sup>,  
В.Й. Манічев<sup>2</sup>, І.В. Кураєва<sup>3</sup>**

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

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

<sup>3</sup>Інститут 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 *Raecilosporium lilacinus* і *R. tarquandii*, 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 запиленисть 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 м<sup>3</sup> 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