

Дарина АБДУЛІНА, Жанна КОПТЕВА, Ганна КОПТЕВА

БІОСТІЙКІСТЬ ПОЛІМЕРНИХ І ГУМОТЕХНІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ ДО ВУГЛЕВОДНЕОКИСНЮВАЛЬНИХ ТА СУЛЬФАТВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. акад. Заболотного, 154, м. Київ. E-mail: zhanna.kopteva38@gmail.com*

Daryna ABDULINA, Zhanna KOPTEVA, Ganna KOPTEVA

BIOPERSISTENCE OF THE POLYMERIC AND RUBBER MATERIALS TO HYDROCARBON-OXIDIZING AND SULFATE – REDUCING BACTERIA

*D.K. Zabolotny Institute of microbiology and virology of the NAS of Ukraine,
154, Acad. Zabolotno Str., Kyiv, Ukraine. E-mail: zhanna.kopteva38@gmail.com*

ABSTRACT

It was examined the biopersistence of foamed polyethylene (FPE), ethylene vinyl acetate (EVA) and rubber, which differ for compounds and ability to degradation. The objects of study were hydrocarbon-oxidizing (HOB) and sulfate-reducing bacteria (SRB), isolated from disrupted protective coatings and corrosion products. Bacterial cultures in the presence of the materials were shown various enzymatic activities. In control variant (without materials) were highest then in the presence of materials. For hydrocarbon-oxidizing and sulfate-reducing bacteria specific enzymatic activity were in 2-3 times higher than catalase activity. Enzymatic activity is species-specific feature for sulfate-reducing bacteria and it's more significant for estimating biopersistence of polymeric materials. Rubber and FPE were degraded due to *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 642, *D. Vulgaris* DSM 644 and EVA – due to *Desulfovibrio* sp. 10. Among the HOB the most high specific activity of catalase and lipase were appeared in *Rhodococcus erythropolis* 102 strain. Thus, as result, tested materials were not persistent to hydrocarbon-oxidizing and sulfate-reducing bacteria and could be a nutrient source for bacteria.

KEY WORDS: *biopersistence, hydrocarbon-oxidizing bacteria, sulfate-reducing bacteria, foamed-polyethylene, ethylene vinyl acetate, rubber, catalase, lipase.*

ВСТУП

Біопшкодження матеріалів і виробів, які застосовують для захисту від мікробної корозії, є наслідком взаємодії бактерій-деструкторів і матеріалу, який руйнується. Попередні дослідження показали, що різні за хімічним складом захисні матеріали стимулюють життєдіяльність мікроорганізмів – збудників корозії. Відомо, що ґрунтові мікроорганізми (сульфатвідновлювальні, денітрифікувальні та вуглеводнеокиснювальні) діють на ізоляційні матеріали продуктами свого метаболізму, зокрема органічними і неорганічними кислотами, а також ферментами. Саме ферменти, як біологічні каталізатори, зумовлюють активність мікроорганізмів та інтенсивність виділення у середовище агресивних продуктів їхнього метаболізму. У результаті дії ферментів відбувається мікробна деструкція матеріалів, зменшується їх міцність, еластичність і адгезія до металів. Тому введення показника їх якості, а саме біостійкості, допоможе цілеспрямовано вибирати засобів для протикорозійного захисту підземних і наземних споруд [1–3].

Метою даної роботи була оцінка біостійкості пінополіетилену (ППЕ), етиленвінілацетату (ЕВА) і гуми - матеріалів, які різняться за компонентним складом. Ці матеріали використовують у різних галузях промисловості, особливо в будівництві, завдяки високим тепло- і звукоізоляційним якостям, міцнісним властивостям і відносно невисокій вартості.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктами дослідження були вуглеводнеокиснювальні бактерії *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 109, *Bacillus subtilis* 138, *Rhodococcus erythropolis* 102, які раніше були виділені з пошкоджених захисних покриттів газопроводів, сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfovibrio* sp. УКМ В-11503 (10) та *Desulfovibrio desulfuricans* УКМ В-11501 (DSM642) та *Desulfovibrio vulgaris* УКМ В-11502 (DSM644) із Української Колекції Мікроорганізмів.

Вуглеводнеокислювальні бактерії вирощували у рідкому середовищі Таусона з додаванням МПБ як джерело Карбону (20 ml на 100 ml середовища), сульфат відновлювальні бактерії - у рідкому середовищі Постгейта «В» з лактатом (4,5 g/l) [4, 5]. Зразки матеріалів розміром 20x20x2 mm (або 20x50x2 mm) занурювали у відповідні стерильні середовища і додавали суспензію бактерій у кількості 10^6 cells/ml. Досліди виконували у двох варіантах: 1 – із додаванням у середовище джерела Карбону, 2 – без Карбону. Тривалість досліду – 8...14 days, температура культивування - $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

Після закінчення експерименту бактерії центрифугували при 8000 rot/min протягом 20 min на центрифугі Eppendorf із ротором 5810R (Німеччина). У над осадовій рідині вимірювали каталазу, ліполітичну активності та білок за методом Лоурі [7–9]. Початкову і кінцеву кількість бактерій визначали методом десятикратних граничних розведень [6].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Мікроорганізми за термін експерименту добре росли і розвивалися, про що свідчить збільшення їхньої кількості. Чисельність бактерій протягом досліду підвищувалась на 2–4 порядки відносно початкового титру. Необхідно відмітити, що культура *P. pseudoalcaligenes* 109 не росла на середовищі з дослідженими матеріалами без внесення МПБ як додаткового джерела вуглецю. Кінцева кількість бактерій *B. subtilis* 138 у контролі складала 10^8 cells/ml, а в присутності матеріалів більша на 2 порядки (1010 cells/ml). Кількість бактерій *R. erythropolis* 102 у контролі дорівнювала 10^8 cells/ml, а в досліді 10^6 ... 10^9 cells/ml середовища залежно від варіанту. На повноцінному середовищі вона була високою 10^8 10^9 cells/ml, а на середовищі з матеріалами як єдиним джерелом Карбону, чисельність бактерій складала 10^6 cells/ml, за винятком спороутворювальних бактерій, де кількість бактерій і в досліді, і контролі була однаковою. Аналогічно до ВОБ і чисельність сульфатвідновлювальних бактерій протягом досліду підвищувалась на 2–4 порядки відносно початкового титру. Слід наголосити, що взяті у дослід культури ВОБ є поліредуктантами, вони відновлюють Fe(III), нітрати і окиснюють вуглеводні, що свідчить про їх високу метаболічну активність [10].

За даними досліджень культури відрізнялись рівнем синтезу ліпази і каталази: питома активність ферментів у контрольному варіанті (середовище Таусона та Постгейта «В» без внесення матеріалів) була вищою, ніж за присутності досліджених матеріалів. Культури ВОБ *P. pseudoalcaligenes* 109, *R. erythropolis* 102 та *Bacillus subtilis* 138 за присутності досліджуваних матеріалів проявляли різну ферментативну активність залежно від виду матеріалу (рис. 1).

У контролі (без внесення матеріалів) ферментна активність була вищою, ніж за присутності випробуваних матеріалів. Серед ВОБ найвища питома активність ліпази і каталази виявлена у штаму *Rhodococcus erythropolis* 102, вона складала 37,03 і 16,72 un/mg білка відповідно. Ферментативна активність *R. erythropolis* 102 у присутності гуми, ППЕ та ЕВА зменшувалась в 1,4–2,0 рази відносно контролю. Питома каталазна активність *P. pseudoalkaligenes* 109 за присутності досліджених матеріалів не змінювалась, а ліполітична активність знижувалась у 2,3 рази від контролю. Для культури *Bacillus subtilis* 138 внесення у середовище ППЕ, ЕВА та гуми, як єдиного джерела Карбону, сприяло підвищенню каталазної активності в 1,6–2,7 рази відносно контролю. Ліполітична активність взятих у дослід бактерій на середовищі з ППЕ була значно меншою (2,9–7,4 un/mg білка) порівняно з іншими матеріалами. Внесення у поживне середовище ЕВА та гуми сприяло підвищенню активності бактерій. Активність ліпази за цих умов складала 5,0...31,0 і 4,5...26,12 un/mg білка відповідно.

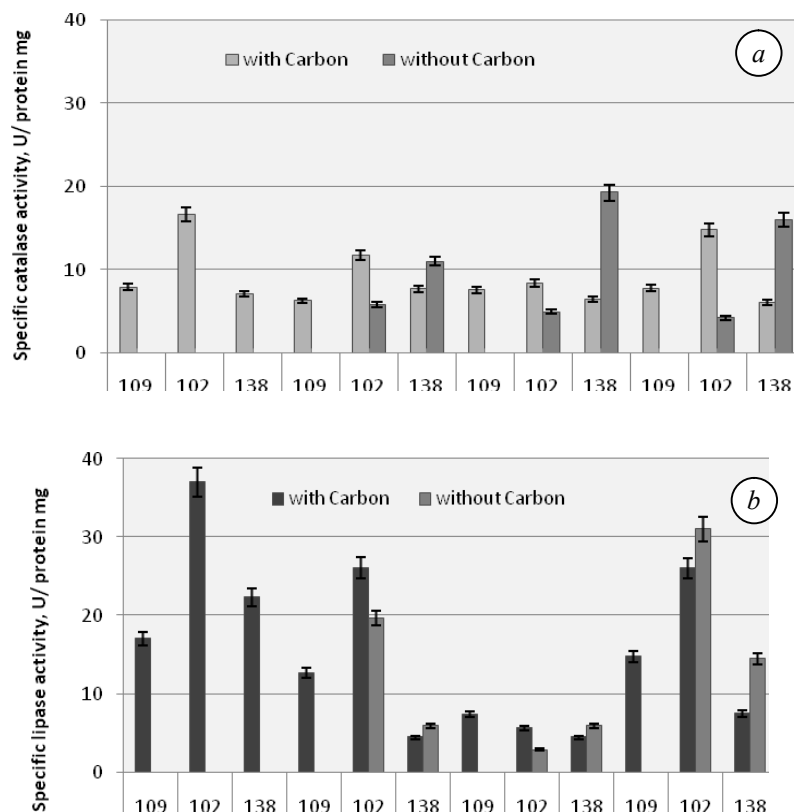


Рис. 1. Ферментативна активність вуглеводнеокислювальних бактерій за присутності полімерних і гумотехнічних матеріалів. Примітка: *a* – каталазна активність; *b* – ліпазна активність; 102 – *Rhodococcus erythropolis* 102; 109 – *P. pseudoalcaligenes* 109; 138 – *Bacillus subtilis* 138.
 Fig. 1. Enzyme activity of the hydrogen-oxidizing bacteria under the presence of polymeric and rubber materials.
 Notes: *a* – catalase activity; *b* – lipase activity; 102 – *Rhodococcus erythropolis* 102; 109 – *P. Pseudoalcaligenes* 109; 138 – *Bacillus subtilis* 138.

Слід відмітити, що на середовищі Таусона, де єдиним джерелом Карбону слугували досліджені матеріали, активність ферменту була нижчою в 2,8 і 3,9 рази щодо контролю.

Отже, загалом для вуглеводнеокислювальних бактерій питома ліполітична активність була в 2–3 рази вищою, ніж активність каталази. Відомо, що ВОБ здатні синтезувати позаклітинні гідролітичні та окисно-відновлювальні ферменти. Одним із механізмів біопшкодження захисних матеріалів є синтез бактеріями гідролаз, які руйнують естрені зв'язки, переносять атоми водню від $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ -груп із утворенням $\text{C}=\text{C}$ -груп, тобто відбувається перетворення насичених зв'язків у ненасичені. Останні сполуки можуть бути агресивними до матеріалів.

Щодо ферментативної активності культур СВБ *Desulfovibrio* sp. 10, *D. desulfuricans* DSM 642 та *D. Vulgaris* DSM 644, то у контрольному варіанті без внесення полімерів вона була високою. Активність каталази складала 0,66...1,40 $\mu\text{m}/\text{mg}$ білка, активність ліпази 25,66...39,2 – $\mu\text{m}/\text{mg}$ білка відповідно (рис. 2).

Для культури *Desulfovibrio* sp. 10 відмічено, що за внесення у поживне середовище гуми та ППЕ ферментна активність зменшувалась майже у 2,8 рази та не змінювалась у варіанті з ЕВА. Питома активність ліпази для культури *Desulfovibrio* sp. 10 за внесення гуми зменшувалась у 1,9 рази, за внесення ППЕ залишалась на рівні із контрольною, а за ЕВА – підвищувалась на 34,5 μm . Для культури *D. desulfuricans* DSM 642 каталазна активність у варіантах із гумою підвищувалась в 1,43 рази, а з ППЕ та ЕВА зменшувалась у 2,29 та 1,34 рази відповідно. Для культури *D. Desulfuricans* DSM 642 за внесення гуми та ППЕ активність ліпази підвищувалась на 16,07 та 21,9 μm ., а за внесення ЕВА, навпаки, зменшувалась на 8,55 μm . Для культури *D. Vulgaris* DSM 644 питома каталазна активність за присутності досліджуваних матеріалів, навпаки, збільшувалась у 1,3–2,2 рази щодо контролю. Ліполітична активність

D. vulgaris 644 за присутності гуми зменшувалась незначно, а за присутності ЕВА і ППЕ зростала у 1,9–2,8 рази відповідно.

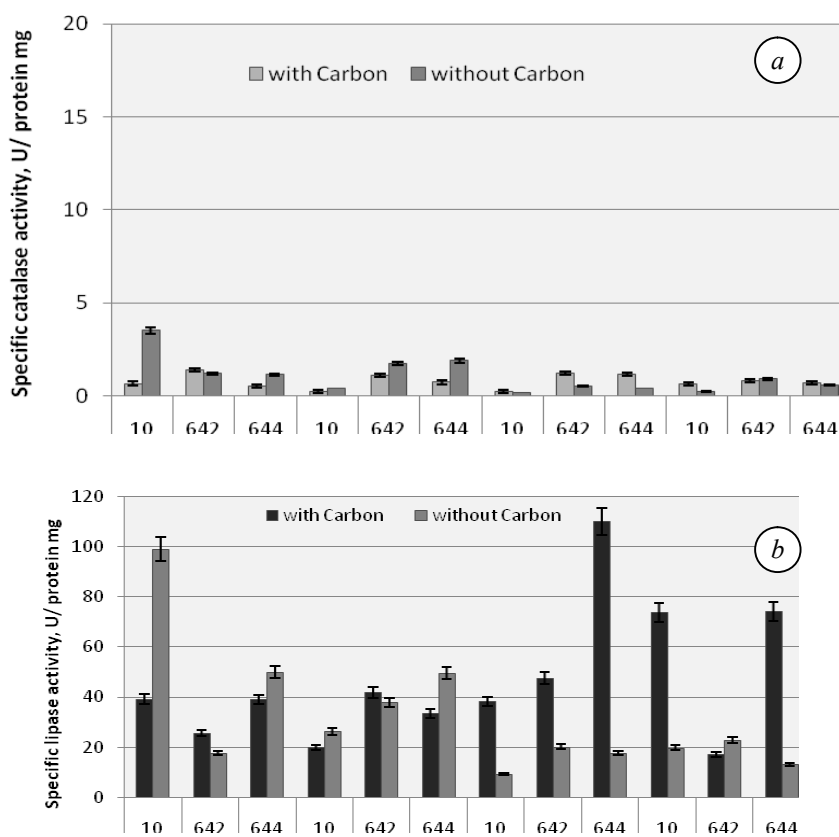


Рис. 2. Ферментативна активність сульфатвідновлювальних бактерій за присутності полімерних і гумотехнічних матеріалів. Примітка: *a* – каталазна активність; *b* – ліпазна активність. 10 – *Desulfovibrio* sp. 10; 642 – *desulfuricans* DSM 642; 644 – *D. vulgaris* DSM 644.

Fig. 2. Enzyme activity of the sulfate-reducing bacteria under the presence of polymeric and rubber materials. Notes: *a* – catalase activity; *b* – lipase activity; 10 – *Desulfovibriosp.* 10; 642 – *D. Desulfuricans* DSM 642; 644 – *D. vulgaris* DSM 644.

Тобто ферментна активність культур сульфатвідновлювальних бактерій за внесення різних полімерів є видоспецифічною ознакою. Подібно до ВОБ питома ліполітична активність СВБ була також вищою, ніж каталітична. Ліпазна активність більш показова в оцінці біостійкості полімерних сполук за дії сульфатвідновлювальних бактерій. Гума та ППЕ найліпше розкладалися за дії *D. desulfuricans* DSM 642, а ЕВА за впливу *Desulfovibrio* sp. 10.

Отже, досліджувані матеріали можуть слугувати джерелом живлення для вуглеводнеокиснювальних бактерій та сульфатвідновлювальних бактерій, за винятком культури *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 109, яка не росла за присутності ППЕ, ЕВА та гуми. Ці матеріали не є біостійкими щодо штамів *Bacillus subtilis* 138 і *Rhodococcus erythropolis* 102 та усіх СВБ.

ВИСНОВКИ

Дослідження показали, що полімерні та гумотехнічні матеріали (пінополіетилен, етиленвінілацетат, гума) не біостійкі по відношенню до вуглеводнеокиснювальних та сульфатвідновлювальних бактерій.

Внесення у середовище матеріалів по-різному впливало на ферментативну активність бактерій. Більш високі показники каталазної та ліполітичної активностей бактерій відмічено за присутності етиленвінілацетату та гуми.

Активність вивчених ферментів можна використати для відбору активних культур бактерій-деструкторів матеріалів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Мікробна корозія підземних споруд / К.І. Андреюк, І.П. Козлова, Ж.П. Коптева, А.І. Піляшенко-Новохатний, В.В. Заніна, Л.М. Пуріш. – Київ: Наук.думка, 2005. – 258 с.
2. Савеня С.Н., Савеня А.А., Ушаков А.П. Методы диагностики стресс-коррозионных повреждений трубной стали // Интернет-вестник ВолгГАСУ. Политематическая серия. – 2007. – 2 (3). С. 1-7.
3. Isolation and characterization of a bacterium that degrades various polyester – based biodegradable plastics / Т. Teeraphatpormchai, Т. Nakajima-Kambe, Y. Shigeno-Akutsu, M. Nakayama et al. // Biotechnol. Lett. – 2003. – 25, N 1. – P. 23-28.
4. Postgate J.R. The sulphate-reducing bacteria (2nd ed.) Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1984. – 208 p.
5. Романенко В.И., Кузнецов С.И. Экология микроорганизмов пресных водоемов. – Ленинград: Наука, 1974. – 193 с.
6. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.: учеб. пособие для студ. / Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
7. Апробация количественного метода определения липолитической активности с использованием хромогенного субстрата / В.Л. Айзенберг, В.И. Карпель, С.А. Сырчин, С.А. Седина, А.П. Капичон // Мікробіол. журн. – 1995. – 57, № 5. – С. 84-89.
8. Метод определения активности каталазы / М.А. Королук, Л.И. Иванова, И.Г. Майоров, В.Е. Токарев // Лабораторное дело. – 1988, № 1. – С. 16-18.
9. Практикум по биохимии / Под ред. С.Е. Северина, Т.А. Соловьевой. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1989. – 509 с.
10. Влияние липолитической и каталазной активности гетеротрофных бактерий на физико-химические свойства покрытия Поликен 980-25 / Ж.П. Коптева, В.В. Занина, М.О. Борещкая, А.Е. Коптева, И.П. Козлова // Мікробіол. журн. – 2013. – Т. 75. № 1. – С. 41-47.