

БИОПОВРЕЖДЕНИЕ ПОЛИЭФИРНЫХ МАТЕРИАЛОВ КУЛЬТУРАМИ МИКРОБОВ - ПРОДУЦЕНТОВ ЛИПАЗ

Л.А. ПИВАЗЯН, Л.С. ХАЧАТРЯН, Н.С. ХАЧАТУРЯН, С.А. ДАВТЯН,
А.Е. АРУТЮНЯН, С.М. ПЕТРОСЯН, Э.К. АФРИКЯН

*Республиканский Центр депонирования микробов
и Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян*

Выделенные из микрофлоры полимерных материалов 49 штаммов испытаны на способность расти на полиэфирах и продуцировать липазы. По спектру биоповреждающего действия и интенсивности использования полиэфиров отобраны наиболее агрессивные культуры грибов и бактерий. Установлено, что они выделены из материалов с высоким содержанием полиэфиров и обладают высокой липазной активностью.

Պոլիմերային նյութերի միկրոֆլորայից մեկուսացված տարբեր մանրէների 49 շտամների մոտ փորձարկվել է պոլիէթերների վրա աճելու և լիպազներ արտազատելու ունակությունը: Ընտրվել են սնկերի և բակտերիաների առավել ագրեսիվ կոկտորաները ըստ պոլիէթերների յուրացման ինտենսիվության և կենսաքայքայող ազդեցության սպեկտրի: Պարզվել է, որ նրանք մեկուսացվել են պոլիէթերների բարձր պարունակությամբ նյութերից և օժտված են բարձր լիպազային ակտիվությամբ:

49 strains of different microorganisms isolated from microflora of polymeric materials have been tested for growth on polyesters and lipolytic activity. The more aggressive cultures of fungi and bacteria have been selected by spectrum of polyesters intensive utilization and biodeterioration activity. These strains have been isolated from materials with high content of polyesters and possessed with high lipase activity

Биоповреждение - полиэфиры - липазы - микроорганизмы-биоразрушители

Общими для полиэфиров является то, что их химические превращения при различных видах внешнего воздействия сопровождаются развитием процессов окислительной деструкции, приводящих к разрыву эфирных связей в полимерах [3]. При воздействии микроорганизмов характер развития этих процессов принципиально не изменяется, разрушение полиэфиров носит аналогичный характер и происходит преимущественно путем разрыва эфирных связей [6,7]. Было показано [12], что чем больше расстояние между эфирными связями полиэфиров, тем легче они повреждаются грибом *Penicillium sp.* Наличие же боковых цепей снижает биостойкость. Биоразрушению полиэфиров посвящены также исследования [1,10,13], в которых сделано предположение о возможном разрушении их ферментативным расщеплением эфирной связи. Мартене [9], Оширо с соавторами [11] в разрушении эндосульфана определили два направления: окисление сульфидной группы и гидролиз эфирных связей. Имп отмечено, что большинство изученных грибов разрушают эндосульфан окислением сульфидной группы, а гидролиз эфирных связей более характерен для бактерий.

Целью нашей работы было изучение бактериальной флоры полиэфиров и отбор активных штаммов, повреждающих эти материалы, в качестве тест-культур для оценки их биостойкости.

Материал и методика. Объектом исследований служили бактериальные культуры, выделенные с полимерных материалов разной структуры и композиционного состава.

Способность расти на средах с полимерными материалами в качестве единственного источника углерода определяли по ранее описанной методике [5].

Липазную активность микроорганизмов определяли по Асатиани [2].

Результаты и обсуждение. В основу работ по отбору бактериальных культур для оценки биостойкости полиэфиров положены данные по изучению липазной активности бактерий, специфичных или адаптированных к полиэфирам разного композиционного состава.

Исследуемые образцы полимеров состояли полностью из полиэфирной основы, либо представляли собой композиционные материалы, включающие полиэфиры в качестве компонента.

Из бактериальной флоры, представленной 49 штаммами кокков, спорообразующих и неспорообразующих палочковидных бактерий, 26 оказались активными продуцентами липаз, причем наиболее активными были кокковидные формы.

Параллельно с изучением липазной активности были проведены исследования по установлению адаптированности культур бактерий к тем полиэфирам, с которых они были выделены. В связи с этим проверялась их способность сохраняться на материале-хозяине и использовать его в качестве единственного источника углерода.

Исследования показали, что из 27 штаммов, выделенных с 4-х наименований полиэфиров, только 4 штамма были способны сохраняться на полимере-хозяине и использовать его в качестве единственного источника углерода.

По липазной активности, а также по адаптированности к полиэфирам был отобран 21 штамм бактерий и проверена их способность использовать широкий спектр полиэфиров, имеющих разнообразный качественный и количественный состав как по основе, так и по компонентам и покрытиям.

Данные, представленные в табл. 1, показывают, что по отношению ко всему спектру исследуемых полиэфиров среди отобранных штаммов оказались как агрессивные, так и неагрессивные. На среде с сахарозой почти все отобранные штаммы росли с одинаковой интенсивностью, образуя равные концентрации двуокиси углерода.

Интересно, что не все штаммы, обладающие липазной активностью, и не все штаммы, адаптированные к материалу-хозяину, использовали весь изучаемый спектр полиэфиров в качестве единственного источника углерода. Видимо, это объясняется тем, что липазы весьма специфичны в отношении длины и формы углеводородных цепей и расположения эфирной связи [8,12], что было характерно для изучаемых материалов.

Наиболее агрессивными как по спектру действия, так и по интенсивности использования полиэфиров оказались штаммы, которые были выделены с материалов с высоким содержанием полиэфирной основы, в частности с поропласта полиуретанового, которые обладали липазной активностью. Таковыми оказались *Micrococcus* sp. шт. 9017, *Bacillus subtilis* шт. 4669, *B. cereus* шт. 4668.

Таблица 1. Образование двуокиси углерода при росте культур бактерий на полиэфирных материалах* (мл/мг $\times 10^{-3}$ субстрата, инкубация 10 сут в среде Чапека-Докса, 28°)

Полиэфиры Штаммы бактерий**	A	B	C	D	E	F	G
<i>Micrococcus</i> sp. шт. 9017	91	0	7	0	6	40	0
- " шт. 9018	0	35	3	1	0	0	6
- " шт. 9020	0	0	5	0	3	10	3
<i>Bacillus cereus</i> шт. 4668	0	6	0	7	0	6	1
<i>B. subtilis</i> шт. 4586	0	36	0	0	0	0	0
- " шт. 4669	28	10	4	5	0	24	5
- " шт. 4670	35	0	6	0	0	0	0
<i>Acinetobacter</i> sp. шт. 9025	0	0	0	0	0	22	0
- " шт. 9026	77	0	3	0	0	0	0
- " шт. 9028	0	0	5	1	0	0	0
- " шт. 9029	91	0	0	1	0	22	0
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> шт. 9030	0	0	0	0	0	128	8

Примечание: * А - ПЭТФ ОА-65 ТУ-68, В - ПЭТФ для металлизации ТУ 6 05-1108-76, С - полимерно-тканевый материал "Перпен", D - Герметик 51-Г-20, Е - порошлат полиуретановый ПП-9-3-35-0,8А Десмофен 2200, F - Рипор 2Н 33У03 54005, G - пленка клееная многослойная марки ЗЛАРК ТУ 6-19--051 33Ф 79.

**Номера штаммов даны по Коллекции культур Республиканского Центра депонирования микробов.

Не все полиэфиры использовались отобранными штаммами с одинаковой интенсивностью. Так, полиэфирные пленки СА 65 ТУ 68 и ТУ 6-05-1108-76, содержащие в качестве химической основы 100% полиэтилентерефталата, в разной степени подвержены гидролитическому расщеплению по эфирным связям. Это связано с тем, что в качестве компонентов один содержит алюминий, а другой - двуокись титана, которая обладает выраженным бактерицидным действием. В отличие от указанных, пленка полиэтилентерефталатная, не содержащая примесей и других ингредиентов, является легко доступным источником углеродного питания для бактерий.

При росте же этих культур на композиционных материалах, таких как Герметик 51-Г-20, выделение двуокиси углерода незначительное, т.к. Герметик содержит только 6,3% полиэфира.

Интенсивность развития процессов биоповреждений полиэфиров существенно меняется как от особенностей химического состава, так и от времени инкубации на средах с полиэфирами.

Подтверждением этого явилось изучение динамики биоповреждений исследуемых полиэфиров на примере некоторых агрессивных штаммов в течение 10 суток. Сравнительные результаты этих опытов по грибам и бактериям представлены на рисунках 1, 2.

В качестве сравнения представлены данные по культуре *Aspergillus terreus* шт. 8348 (рис. 3). В опубликованных ранее работах нами было показано, что этот штамм обладает высокой липазной активностью и широким спектром

повреждаемых полиэфиров. Результаты анализа ПЭТФ для металлизации методом ИК-спектроскопии подтвердили, что выделение двуокиси углерода происходит в результате ферментативного расщепления эфирных связей [4].

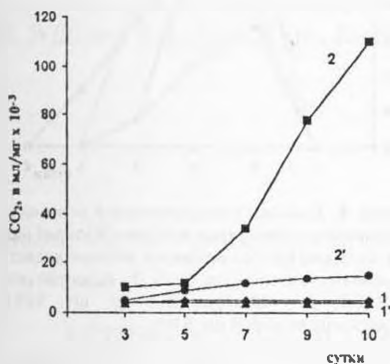


Рис. 1. Динамика накопления двуокиси углерода при росте *Micrococcus* sp. шт. 9018 на полиэфирах и сахарозе (CO_2 в мл/мл $\times 10^{-3}$ субстрата). 1 - на среде с сахарозой; 1' - та же среда через год; 2 - на среде с ПЭТФ металлизированным (100% ПЭТФ, покрытие - алюминий); 2' - та же среда через год.

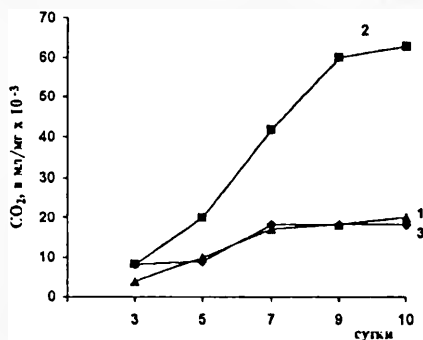


Рис. 2. Динамика накопления двуокиси углерода при росте *Micrococcus* sp. шт. 9017 на полиэфирах и сахарозе (CO_2 в мл/мл $\times 10^{-3}$ субстрата). 1 - на среде с сахарозой; 2 - на среде с ПЭТФ металлизированным (100% ПЭТФ, покрытие - алюминий); 3 - среда с ПЭТФ для металлизации (100% ПЭТФ, покрытие - 0,1% двуокиси титана).

Для бактерий рода *Micrococcus*, несмотря на высокую липазную активность, характерно использование ограниченного числа видов полиэфиров. Их спектр ограничивается одним или двумя типами полиэфиров. Интенсивность роста на этих материалах достаточно высокая, значительно превышающая таковую на среде с сахарозой. По использованию полиэфирных материалов в качестве источника углерода результаты не только сравнимы с *A.terreus* шт.8348 (рис.3), но и значительно превышают их. *Micrococcus* sp. шт.9018 плохо растет на среде с сахарозой, но на полиэфирах выделяет значительные количества углерода (рис.1). Хотя он и не обладает высокой липазной активностью, но использует в качестве источника углерода полиэтилентерфталат. Интенсивность выделения двуокиси углерода на этом материале возрастает на десятки суток инкубации. Следует отметить, что штамм в течение года сохраняет свою специфическую агрессивность к указанному материалу, выделение двуокиси углерода значительно снижается как с сахарозой, так и с материалом.

Micrococcus sp. шт. 9017, проявлявший слабую активность по отношению к сахарозе и высокую - к материалам ПЭТФ металлизированному, через год при хранении на агрессивной среде с сахарозой и без полимера полностью стал инертен к указанным источникам углерода (рис. 2).

Изучение липолитической активности отобранных штаммов как грибов, так и бактерий, показало, что у большинства липазная активность начинает проявляться уже в первые сутки инкубации и держится на хорошем уровне на протяжении 3-4 суток (рис. 4).

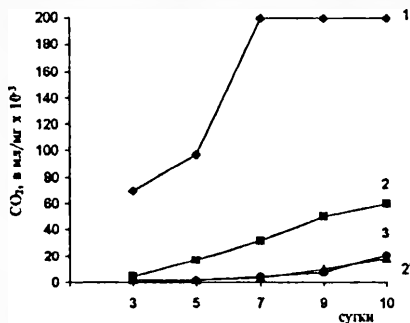


Рис. 3. Динамика накопления двуокиси углерода при росте *Aspergillus terreus* шт. 8348 на полиэфирах и сахарозе (CO_2 в $\text{мг/мг} \times 10^{-3}$ субстрата). 1 - на среде с сахарозой; 2 - на среде с ПЭТФ металлизированным (100% ПЭТФ, покрытие - алюминий); 2' - та же среда через год; 3 - среда с ПЭТФ для металлизации (100% ПЭТФ, покрытие - 0,1% двуокиси титана).

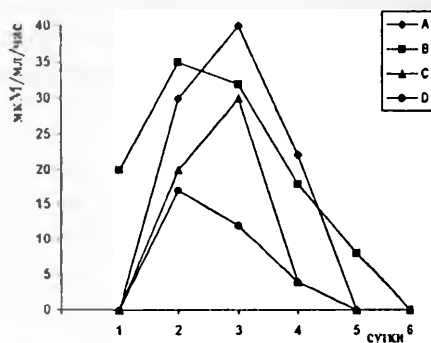


Рис. 4. Динамика липолитической активности агрессивных к полиэфирам грибов и бактерий (при 28° в мкМ/мл/час отщепленных жирных кислот). А - *Fusarium oxysporum* шт. 8385, В - *Aspergillus ustus* шт. 8184, С - *Micrococcus* sp. шт. 9021, Д - *Paecilomyces variotii* шт. 8183.

На основе всестороннего изучения культур-биодegradантов и испытанных классов полимеров созданы Базы данных микробных культур и полимерных материалов. Разработаны методические подходы создания автоматизированного моделирующего и прогнозирующего комплекса в системе взаимодействия "полимер-биодegradант". Он будет включать организацию Базы данных синтетических полимеров на основе их свойств, разработку Базы данных микроорганизмов-биоразрушителей и пакета программ для машинной имитации взаимодействия микроорганизмов с полимерами.

Обобщая результаты работы по отбору бактерий для оценки биостойкости полиэфиров, можно заключить, что наиболее агрессивными как по спектру действия, так и по интенсивности использования полимерного материала оказались штаммы бактерий, которые были выделены с материалов с высоким содержанием полиэфирной основы и обладали вместе с тем липазной активностью. Отбор следует вести на штаммовом уровне и из числа агрессивных к наиболее стойким полиэфирам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев Е.И. и др. Микробная коррозия и ее возбудители, Киев, Наукова Думка, 284с., 1980.
2. Асатиани В.С. Ферментные методы анализа. 739 с., М., 1969.
3. Коварская В.М., Блюменфельд А.Б., Левантовская И.И. Термическая стабильность гетероцепных полимеров. М., 254с., 1977.
4. Пивазян Л.А., Петросян Р.А., Саакян К.А. Сб.: Микробное повреждение материалов. 180с., Изд-во Академии Наук Арм.ССР, Ереван, 1985.
5. Сафарян З.С., Пивазян Л.А. АС СССР N1300942, 1985.
6. Barry Sh., Bravery A., Coleman L.I. Int. Biodetn. Bull., 13, 12, 51-57, 1977.
7. Graham P.R. Environ. Health. Perspect., 3, 1, 3-12, 1973.
8. Kurane R., Suzuki T., Fukuoka S. Appl. Microbiol. and Biotechnol., 20, 6, 378.

379, 1984.

9. Martens R. Appl. and Environ. Microbiol., 31, 6, 833-858, 1976.
10. Marthur S.P. J. Environ. Qual., 3, 1, 207-209, 1974.
11. Oshiro T., Hirata T., Izumi Y. Appl. Microbiol. and Biotechnol., 44, 1-2, 249-253, 1995.
12. Pathirana R.A., Seal K.J. Int. Biodetn. Bull., 20, 4, 229-235, 1984.
13. Williams G.R., Dale R. Int. Biodetn. Bull., 19, 1, 37-38, 1983.

Поступила 25.XI.1998

Биолог. Журн. Армении, 1-2 (51), 1998

УДК 582.287.238.581.19.

АНТИФУНГАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ БАЗИДИАЛЬНЫХ МАКРОМИЦЕТОВ В СОВМЕСТНОЙ КУЛЬТУРЕ

С. М. БАДАЛЯН, Дж. Г. АБРАМЯН, С. А. ГЕВОРКЯН

Ереванский государственный университет, кафедра ботаники, 375049

Приводятся результаты исследования антифунгальной активности (АФА) 22 видов базидиальных макромицетов к 10 видам микромицетов из 6 родов (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Stemphylium* и *Hormiscium*). В 220 вариантах совместного роста высокую АФА проявили макромицеты группы ксилотрофов (*P. ostreatus*, *F. velutipes*, *P. tigrinus* и др.). Среди тест-микромицетов наибольшей антагонистической активностью отличались виды *Aspergillus niger* и *Aspergillus flavus*.

Տրված են 22 տեսակի բազիդիալ մակրոմիցետների հակասնկային ակտիվության (ՀԱԱ) ուսումնասիրության արդյունքները 6 ցեղերի (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Stemphylium*, *Hormiscium*) 10 տեսակների միկրոմիցետների նկատմամբ: Համատեղ աճի 220 տարբերակներում բարձր ՀԱԱ են ցուցաբերել կսիլոտրոֆների էկոլոգիական խմբին պատկանող մակրոմիցետները (*P. ostreatus*, *F. velutipes*, *P. tigrinus* և այլն): Տեստ-միկրոմիցետներից մեծ անադոնիստական ակտիվությամբ օժտված են *A. niger* և *A. flavus* տեսակները:

The results of antifungal activity (AFA) of 22 species of macromycetes against micromycetes of 10 species from 6 genera (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Stemphylium* and *Hormiscium*) are presented. In 220 variants of combined growth the high AFA activity produce the macromycetes from the xylophag ecological group (*P. ostreatus*, *F. velutipes*, *P. tigrinus*). Among test-micromycetes the species of *A. niger* and *A. flavus* are differed with high antagonistic activity.

Антифунгальная активность - макромицеты - микромицеты.

После открытия пенициллина многие исследования были направлены на выявление новых источников биологически активных соединений (БАС) среди грибных организмов. Высшие грибы (*Basidiomycotina*) позже были включены в разные программы скрининга природных источников БАС.

Исследования активности базидиальных макромицетов к микроскопическим грибам, в частности, патогенным для человека и животных, проводились разрозненно [10]. Установлено, что антифунгальные