

РОЛЬ МУЛЬТИВИДОВЫХ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК В БИОКОРРОЗИИ ПОЛИЭТИЛЕНОВ

М.В. Журина, С.В. Мартьянов, А.В. Ганнесен, В.К. Плакунов

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Среди синтетических пластмасс, находящихся широкое и разнообразное применение в медицинских конструкциях, одно из первых мест занимают полиэтилены (ПЭ), входящие в класс полиолефинов. Поэтому их чувствительность к воздействию микроорганизмов и борьба с вызываемыми микроорганизмами повреждениями является актуальной проблемой, требующей детального изучения. Существуют три основных типа полиэтиленов: 1) ПЭ высокого давления (ПЭВД), называемый также ПЭ низкой плотности (ПЭНП), имеет относительно низкую степень кристалличности (50–70 %), т. е. более доступен для биокоррозии; ПЭ низкого давления (ПЭНД), называемый также ПЭ высокой плотности (ПЭВП), имеет высокую степень кристалличности (75–85 %) и менее доступен для биокоррозии; и, наконец, т.н. линейный полиэтилен (ЛПЭ) – вариант ПЭВД, у которого снижено количество разветвлений полимерной цепи, в результате чего он характеризуется повышенной эластичностью и применяется для изготовления пленок. Чувствительность его к биокоррозии примерно соответствует чувствительности стандартного ПЭВД.

Целью нашей работы были создание экспресс-метода определения биокоррозии ПЭ, выявление с его помощью наиболее активных микроорганизмов-деструкторов и сравнение процессов биодеструкции, осуществляемых моновидовыми и мультивидами микробными биопленками. В этих экспериментах использовали образцы нестабилизированной пленки ПЭВД толщиной 150 мкм (ГОСТ 10354–82). Происхождение микроорганизмов и условия культивирования описаны в недавно опубликованной нами работе (Журина и соавт., 2020).

Обычно процесс биокоррозии пластмасс измеряют путем длительной (от 30 сут. до нескольких месяцев) инкубации образцов пластмасс в природных субстратах (почве или водоемах) (Sangale et al., 2012; Esmaeili et al., 2013) с последующим измерением степени деструкции весовыми или инструментальными методами (путем определения смачиваемости поверхности пластмассы, измерения ее молекулярной массы с помощью гель-хроматографии, обнаружения реакционноспособных групп методами инфракрасной спектроскопии с Фурье преобразованием, а также методом ядерного магнитного резонанса и т. д.) (Vimala, Mathew, 2016). Для исследования изменений поверхности пластмассы используются также микроскопические методы, в частности, методы электронной сканирующей микроскопии и атомной силовой микроскопии (Турова и соавт., 2020; Chauhan et al., 2018).

Для ускорения подбора микроорганизмов – активных деструкторов ПЭ нами разработан экспресс-метод, который позволяет получить результаты через 5–7 дней вместо многих недель или месяцев. Метод основан на массированном засеве индивидуальных микроорганизмов или их смесей на твердую питательную среду LB, в которую помещали испытуемые образцы ПЭ. Подробно этот метод описан в недавно опубликованной нами работе (Журина и соавт., 2020).

Через указанный период времени образцы извлекали, удаляли с их поверхности биопленку и измеряли светорассеяние при боковом освещении. С этой целью сконструирована установка, включающая фотодиодный источник света и цифровой микроскоп.

Светорассеяние полученных изображений контрольных и опытных образцов ПЭ измеряли с помощью денситометрической программы (Sorbfil TLC View) для денситометра Сорбфил (ТУ 4436–003–16943778–99, ЗАО НПО “Техноком”, Россия).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного пакета OriginLab 8.6. Поскольку тест на нормальность закона варьирования данных в наших экспериментах дал отрицательный результат, для оценки достоверности различий применяли непараметрический U-критерий Манна–Уитни–Уилкоксона при $p < 0.05$.

В качестве альтернативного метода степень повреждения поверхности полиэтилена определяли стандартным методом с использованием профилометра TR110new (“Time Group Inc.”, Китай). В целом результаты, полученные этими методами, совпали, хотя предлагаемый нами оптический метод более

удобен в применении. Он позволяет не только измерять степень повреждения поверхности ПЭ при кратковременном воздействии микроорганизмов, но может быть использован для ускорения поиска биоцидов, защищающих ПЭ от биокоррозии.

В результате предварительно проведенных исследований описанных в литературе активных деструкторов ПЭ (испытано более 30 моновидовых биопленок грамположительных, грамотрицательных бактерий, и аскомицетов), а также ряда их мультивидовых биопленок, наиболее эффективным сообществом оказалось сочетание грамположительных бактерий *Micrococcus thailandicus* НВ, *Kocuria rhizophila* 4А-2G с аскомицетом *Yarrowia lipolytica* 367–3.

В экспериментах использовали два вида сред: неразбавленная среда LB и эта же среда, разбавленная дистиллированной водой в 10 раз с целью уменьшения возможного репрессирующего действия питательных субстратов, входящих в среду LB, на биосинтез ферментов, участвующих в биодеградации ПЭ. Однако, оказалось, что разбавление среды уменьшает эффект деструкции поверхности ПЭ. Это косвенно указывает на конститутивную природу деградирующих ПЭ ферментов. По современным представлениям, основную роль в деградации ПЭ играют ферменты, участвующие в метаболизме длинноцепочечных парафинов: алкангидроксилазные многокомпонентные системы, включающие монооксигеназы, специфичные для алканов с разной длиной углеродной цепи. Эти ферменты могут содержать в активном центре цитохромы P450 (CYP52, CYP153, CYP116B5) или флавины, как например, AlmA (у термофильных бактерий, LadA), атомы меди (pBMO), а также атомы меди в сочетании с флавинами (диоксигеназы) или негемовое железо (AlkB) и другие кофакторы (Турова и соавт., 2016; Moreno, Rojo, 2019). Все использованные нами в данных экспериментах микроорганизмы способны утилизировать парафины и, следовательно, должны синтезировать указанные ферменты.

Таким образом, доказана высокая эффективность использования разработанного нами экспресс-метода измерения деструкции ПЭ и выявлены сообщества микроорганизмов, эффективные в процессах биокоррозии ПЭ.

Работа выполнена за счет средств проекта РФФИ мк-18-29-05048 и частично за счет средств Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

ЛИТЕРАТУРА

- Журина М.В., Ганнесен А.В., Мартыанов С.В., Плакунов В.К. Экспресс-метод определения взаимосвязи биокоррозии полиэтилена биопленками *Chromobacterium violaceum* с их способностью формировать внеклеточный полимерный матрикс // Микробиология. 2020. Т. 89. № 1. С. 52–58.
- Турова Т.П., Соколова Д.Ш., Семенова Е.М., Шумкова Е.С., Коршунова А.В., Бабич Т.Л., Полтараус А.Б., Назина Т.Н. Детекция генов деградации n-алканов alkB и ladA у термофильных углеводородокисляющих бактерий родов *Aeribacillus* и *Geobacillus* // Микробиология. 2016. Т. 85. № 6. С. 676–692.
- Турова Т.П., Соколова Д.Ш., Назина Т.Н., Груздев Д.С., Лаптев А.Б. Филогенетическое разнообразие микробных сообществ с поверхности полиэтиленерефталатных материалов при экспозиции в водных средах // Микробиология. 2020. Т. 89. № 1. С. 99–110.
- Chauhan D., Agrawal G., Deshmukh S., Royb S.S., Priyadarshini R. Biofilm formation by *Exiguobacterium* sp. DR11 and DR14 alter polystyrene surface properties and initiate biodegradation // RSC Adv. 2018, 8, 37590. doi: 10.1039/c8ra06448b.
- Esmaili A., Pourbabaee AA, Alikhani HA, Shabani F, Esmaili E. Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by mixed culture of *Lysinibacillus xylanilyticus* and *Aspergillus niger* in soil // PLoS One. 2013 Sep. 23; 8(9):e71720. doi: 10.1371/journal.pone.0071720.
- Moreno R., Rojo F. Enzymes for aerobic degradation of alkanes in bacteria / In: F. Rojo (ed.). *Aerobic utilization of hydrocarbons, oils, and lipids, Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. 2019. Springer Nature Switzerland AG. P. 118–142.
- Sangale M.K., Shahnawaz M., Ade A.B. A review on biodegradation of polythene: the microbial approach // J. Bioremed. Biodeg. 2012, 3:10. doi: 10.4172/2155–6199.1000164.
- Vimala P.P., Mathew L. Biodegradation of polyethylene using *Bacillus subtilis* / Procedia Technology. 2016. V. 24. P. 232–239. doi: 10.1016/j.protcy.2016.05.031.