

6. Федорова Ю.С., Кузнецов П.В., Сухих А.С., Карелина О.А., Герасимова Р.Н. Сравнительная оценка антибактериальной активности фитопрепаратов из некоторых видов растений рода *Hedysarum* (Сем. Fabaceae). // Фармацевтические науки. – 2011, №3. – С. 210-

7. Бондаренко В.М., Грачева Н.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериозы кишечника у взрослых // КМК Scientific Press. М. - 2003. - 220 с.

\*\*\*

Макалада өсімдік экстрактылары (салсоколлин, экидифит, атеролид, саусалин, гроссгемин, арглабин нативный, пиностробин) мен эфир майларының (аяфрол, эферол) микроорганизмдерінің биологиялық құрамына әсерін зерттеудің нәтижелері көрсетілген. Бұл препараттардың тіршілік қабілеттілігі мен биологиялық белсенділігі әртүрлі концентрацияда (0,000032-ден 0,02 г/мл дейін) *Lactobacillus fermentum*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* және *Klebsiella ozaenae* зерттелді.

\*\*\*

The results of investigation of the effect of plant extracts (salsokollin, ekdifit, aterolid, saussalin, grossgemin, Arglabin native, pinostrobin) and essential oils (ayafrol and eferol) on the biological properties of microorganisms presents this article. These drugs were studied at different concentrations (from 0,000032 to 0,02 g / ml) on the index of viability and biological activity of *Lactobacillus fermentum*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* and *Klebsiella ozaenae*.

**Л.И. Антоновская, Н.А. Белясова, И.П. Рокало**  
**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ**  
**СТЕПЕНИ БАКТЕРИОСТОЙКОСТИ МАТЕРИАЛОВ**

(Белорусский государственный технологический университет, e-mail: [biocidmethod@mail.ru](mailto:biocidmethod@mail.ru))

**Введение.** Исходя из литературных данных [1], одной из серьезных проблем, с которыми сталкиваются различные отрасли промышленности, является проблема биоповреждения материалов и изделий. Понятно, что биокоррозия сокращает срок службы изделий и приводит к нарушению режимов технологических процессов, однако серьезность этой проблемы состоит не только в порче или разрушении материалов и изделий, но в том, что биоповреждения материалов зачастую могут приводить к угрозе здоровья и жизни людей, поскольку бактерии и грибы, повреждающие материал, могут быть причиной аварий, а также источником кожных, аллергических и других заболеваний.

Для решения этой проблемы в состав материалов вводят биоцидные вещества или наносят защитные покрытия с антимикробными свойствами, эффективность которых должна быть адекватно оценена.

Используемые на сегодняшний день методы оценки степени бактериостойкости материалов обладают рядом существенных недостатков, ограничивающих их применение. Среди широко используемых методов выделяют качественные, основанные на визуальной оценке степени бактериостойкости материалов и количественные, основанные, либо на определении выживаемости клеток в присутствии биозащищенного материала, либо на определении диаметра зон ингибирования роста бактерий.

Целью нашей работы являлась разработка совершенно новых подходов для количественной оценки степени бактериостойкости материалов, основанных на использовании метаболических особенностей бактерий.

**Объекты и методы исследований.** Объектами исследования служили синтезированные в ГНУ «Институт общей и неорганической химии» НАН Беларуси коррозионностойкие полимерные композиции (КПК), предназначенные для использования в качестве биозащитных покрытий изделий и конструкций из металла, эксплуатируемых в условиях повышенного содержания микроорганизмов, в частности для защиты оборудования нефтяного комплекса. Из литературных данных [2, 3] известно, что наиболее активными микроорганизмами, повреждающими материалы и изделия в данной отрасли промышленности, являются сульфатредуцирующие бактерии (СРБ). Следовательно, в качестве тест-культур при оценке бактериостойкости КПК использовали выделенные нами из образцов промывных вод нефтеперерабатывающего комплекса сульфатредуцирующие бактерии *Desulfovibrio* LSL-1, которые осуществляют специфический способ запасания энергии – «сульфатное» дыхание, сопровождающееся диссимиляционным восстановлением сульфатов с образованием сероводорода и сульфидов.

Кроме КПК в качестве объектов исследования в данной работе использовали созданные в лаборатории химии тонких пленок НИИ «Физико-химических проблем БГУ» керамические фильтры (КФ), поверхность пор которых модифицирована наночастицами серебра. Необходимость биозащиты этих материалов возникла в связи с тем, что при длительной их эксплуатации на поверхности образуются заметные невооруженным глазом скопления микроорганизмов (биообрастания), которые значительно ухудшают гидродинамическую проницаемость фильтров. Как показали наши предыдущие

исследования [4], наиболее часто в составе биобрастаний фильтрующих элементов встречаются представители рода *Pseudomonas*. Поэтому, в качестве тест-культур при оценке бактериостойкости КФ использовали выделенные нами из состава биобрастаний облигатно аэробные бактерии *Pseudomonas aeruginosa* P-C.

В качестве арбитражного для оценки бактериостойкости исследуемых материалов использовали разработанный нами ранее и аттестованный в Белорусском государственном институте метрологии (БелГИМ) адсорбционно-титриметрический метод [5], который заключается в определении количества молочной кислоты, образующейся в культуральной жидкости за счет жизнедеятельности адсорбированных на поверхности материала жизнеспособных клеток молочнокислых бактерий. Концентрацию накопившейся молочной кислоты определяли кислотно-основным титрованием. Для дифференцировки испытуемых образцов материалов на биозащищенные и незащищенные использовали относительный параметр степени бактериостойкости ( $DS$ ). Материал признается бактериостойким, если  $DS \geq 0.45$ .

Для сравнения результатов оценки степени бактериостойкости образцов КПК по отношению к сульфатредуцирующим бактериям использовали качественный метод, положенный в основу ГОСТ 9.085–78 [6], который заключается в совместном инкубировании исследуемых образцов и СРБ в питательной среде, содержащей железо, с последующей визуальной регистрацией образования черных зон сульфида, которые учитываются при оценке бактериостойкости по трехбалльной шкале.

**Результаты и их обсуждение.** Для количественной оценки антибактериальных свойств КПК нами разработан анаэробно-суспензионный метод. Его суть заключается в определении содержания сероводорода в культуральной жидкости после совместного инкубирования сульфатредуцирующих бактерий с исследуемыми образцами КПК в анаэробных условиях. При этом меньшее количество сероводорода в культуральной жидкости является отражением более выраженных антибактериальных свойств исследуемого материала. Регистрацию количества сероводорода проводили фотоколориметрически на основе цветной реакции образования метиленового синего.

Для уменьшения влияния различного рода факторов на показатели, позволяющие судить о степени бактериостойкости анализируемых материалов в анаэробно-суспензионном методе, разработали относительный количественный параметр степени бактериостойкости ( $A_{H_2S}$ , отн. ед.), который показывает во сколько раз уменьшается метаболическая активность СРБ при инкубировании с биозащищенным образцом по сравнению с контролем.

$$A_{H_2S} = 1 - \frac{C_{i\text{а.д.}}}{\bar{C}_K}, \quad (1)$$

где  $C_{i\text{а.д.}}$  – концентрация сероводорода в пробе культуральной жидкости (КЖ) с образцом материала, содержащим биоцидную добавку, мг/дм<sup>3</sup>;  $\bar{C}_K$  – средняя (по результатам трех измерений) концентрация сероводорода в контрольной пробе КЖ, мг/дм<sup>3</sup>.

За результат принимали среднее арифметическое ( $\bar{A}_{H_2S}$ ) трех параллельных определений параметра степени бактериостойкости для каждой из трех проб КЖ с образцом материала, содержащим биоцидную добавку.

Установлено, что для нескольких серий образцов КПК зависимость между параметрами  $\bar{A}_{H_2S}$  и  $DS$  носит линейный характер и с ее помощью найдено пограничное значение параметра  $\bar{A}_{H_2S}$ , которое составило 0.68 (соответствует параметру  $DS=0.45$ ). Образцы КПК, для которых  $\bar{A}_{H_2S} \geq 0.68$  следует считать бактериостойкими.

В табл. 1. Приведены результаты определения антибактериальных свойств нескольких новых образцов КПК с помощью двух методов.

Табл. 1 – Степень бактериостойкости образцов КПК

Образец	КПК <sub>1</sub>	КПК <sub>2</sub>	КПК <sub>3</sub>	КПК <sub>4</sub>	КПК <sub>5</sub>
$\bar{A}_{H_2S}$ , отн.ед.	0.92	0.90	0.91	0.45	0.50
$DS$ , отн.ед.	0.65	0.61	0.63	0.27	0.31

Из представленных в табл. 1 данных следует, что как с помощью параметра  $DS$ , так и с помощью параметра  $\bar{A}_{H_2S}$ , исследованные образцы КПК располагаются в ряду по степени ухудшения их антибактериальных свойств: КПК<sub>1</sub> → КПК<sub>3</sub> → КПК<sub>2</sub> → КПК<sub>5</sub> → КПК<sub>4</sub>.

Иными словами, результаты оценки степени бактериостойкости материалов, полученные с помощью анаэробно-суспензионного метода полностью совпали с результатами, полученными с помощью арбитражного адсорбционно-титриметрического метода.

Поскольку в арбитражном адсорбционно-титриметрическом методе в качестве тест-культуры использовали молочнокислые бактерии, а исследуемые покрытия разработаны для защиты металлических изделий от биологического обрастания и биокоррозии под действием СРБ, сочли целесообразным сравнить полученные результаты с результатами качественного метода, положенного в основу ГОСТ 9.085–78 [4].

На рис. 1 представлены результаты оценки степени бактериостойкости образцов КПК, полученные с помощью ГОСТ 9.085–78.

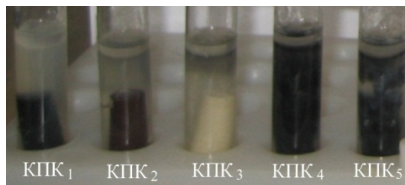


Рис. 1 – Культуральные гели *Desulfovibrio* sp. LSL-1 после совместного инкубирования с образцами КПК

Из рис. 1 видно, что лучшие антибактериальные свойства проявляют образцы КПК<sub>1</sub>, КПК<sub>2</sub>, и КПК<sub>3</sub> (0 баллов по ГОСТ 9.085–78), а образцы КПК<sub>4</sub> и КПК<sub>5</sub> вообще не способны ингибировать развитие бактерий (II балла по ГОСТ 9.085–78).

Эти данные подтверждают полученные с помощью разработанного метода результаты: действительно, антибактериальные свойства образцов КПК<sub>4</sub> и КПК<sub>5</sub> оцениваются параметром  $\bar{A}_{H,S}$ , не достигающим значения 0,68, и их нельзя считать бактериостойкими.

Таким образом, можно заключить, что разработанный анаэробно-суспензионный метод дает более адекватную оценку антибактериальным свойствам материалов, чем стандартный качественный метод по ГОСТ 9.085–78.

Для оценки антибактериальных свойств КФ нами был разработан количественный метод, основанный на оценке респираторной активности облигатно-аэробных бактерий. В основу метода положено инкубирование бактерий *P. aeruginosa* Р-С в питательной среде с биозащищенным материалом и определения дыхательной активности клеток. Контролем служила суспензия бактерий в среде без материала. Регистрацию кислорода в культуральной жидкости осуществляли с использованием кислородомера АЖА-101МА. Получали графические зависимости концентрации растворенного кислорода в культуральной жидкости с биозащищенным материалом и без него от длительности инкубирования. Для каждой кривой задавали аппроксимацию полиномом степени, соответствующей уровню достоверности аппроксимации  $R^2 \geq 0,995$ . В качестве показателя антибактериальной активности использовали коэффициент эффективности ингибирования дыхания клеток  $EI$ , который рассчитывали по формуле:

$$EI = \frac{EI'}{EI'_{\min}} \quad (2)$$

где  $EI'$  – коэффициент эффективности ингибирования дыхания клеток для опытного образца;  $EI'_{\min}$  – коэффициент эффективности ингибирования дыхания клеток для контрольного образца.

$$EI' = \frac{\int_0^T c(t) dt}{T} \quad (3)$$

где  $c(t)$  – уравнение зависимости концентрации растворенного кислорода в среде от длительности инкубирования, полученное в результате аппроксимации, мг/дм<sup>3</sup>;  $T$  – длительность инкубирования, мин.

Основывались на допущение, что антибактериальные свойства материалов выражены тем сильнее, чем выше показатель  $EI$ .

Результаты оценки антибактериальных свойств материалов по респираторной активности облигатно аэробных бактерий в сравнении с арбитражным адсорбционно-титриметрическим методом [5] приведены в табл. 2.

Табл. 2 – Степень бактериостойкости образцов КФ

Образец	КФ <sub>31</sub>	КФ <sub>32</sub>	КФ <sub>33</sub>
$EI$ , отн.ед.	1.30	1.21	1.22
Концентрация молочной кислоты, моль/дм <sup>3</sup>	$2.26 \cdot 10^{-3}$	$3.27 \cdot 10^{-3}$	$3.15 \cdot 10^{-3}$

Используя метод оценки антибактериальных свойств материалов по респираторной активности облигатно аэробных бактерий, удалось показать (табл. 2), что образец КФ<sub>31</sub> демонстрирует более выраженные антибактериальные свойства, чем образцы КФ<sub>32</sub> и КФ<sub>33</sub>, что подтверждается результатами, полученными с помощью арбитражного адсорбционно-титриметрического метода.

Поскольку молочнокислые бактерии, используемые в качестве тест-культур в арбитражном адсорбционно-титриметрическом методе не чувствуют в процессе биообразования фильтрующих элементов, провели дополнительные исследования по оценке степени бактериостойкости КФ с помощью описанного в литературе и широко используемого диффузионного метода, который заключается в измерении ширины зон задержки роста тест-культур на агаризованной среде, формирующихся под действием диффундирующих веществ с антибактериальной активностью. В качестве тест-культуры использовали выделенные нами из состава биообразований бактерии *P. aeruginosa* P-C. Результаты представлены на рис. 2.

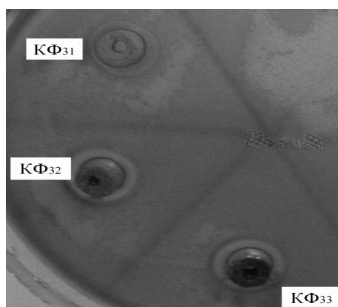


Рис. 2 – Зоны ингибирования роста бактерий *P. aeruginosa* P-C в диффузионном методе

Как видно из рис. 2, все три опытных образца обеспечивают практически одинаковые по ширине зоны ингибирования роста тест-бактерий. Это можно объяснить невысокой чувствительностью метода, не позволяющей дифференцировать близкие по антибактериальной активности материалы.

**Заключение.** Таким образом, для оценки степени бактериостойкости материалов и изделий разработано два количественных метода, позволяющих по степени ингибирования метаболической активности тест-бактерий под действием биоцидных добавок в составе исследуемых материалов, судить об их эффективности. Разработанные методы позволяют получать объективные количественные показатели и различать схожие по антибактериальным свойствам образцы биозащищенных материалов, характеризуются хорошей воспроизводимостью, небольшими трудозатратами и доступностью используемых средств.

1. Sanchez-Silva M., Rosowsky D. Biodeterioration of construction materials: State of the art and future challenges // Journal of Materials in Civil Engineering. – 2008. – Vol. 20, № 5. – P. 352–365.

2. А.Ф. Андреева [и др.]. Определение скорости коррозии стальных тонкопленочных матриц под воздействием экзополимеров сульфатовосстанавливающих бактерий // Современные проблемы физического материаловедения. – К.: Ин-т пробл. материаловедения НАН Украины. – 2009. – Вып. 18. – С. 121–125.

3. Beech I., Sunner J. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals // Current Opinion in Biotechnology. – 2004. – Vol. 15, № 3. – P. 181–186.

4. Антоновская Л.И., Райский А.П., Белясова Н.А. Выделение и идентификация микроорганизмов из состава биообразований половолоконных ультрафильтрационных мембранных элементов // Материалы Республиканской научной конференции с международным участием «Научные стремления – 2010». Национальная академия наук Беларуси. – 2010. – Ч 2. – С. 449–452.

5. Антоновская, Л.И. Разработка метода определения степени устойчивости материалов и изделий с биоцидными добавками к биообразованиям // Молодежь в науке – 2009: прил. к журн. «Весці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі». – 2010. – Ч. 4. – С. 3–7.

6. Единая система защиты от коррозии и старения. Жидкости смазочно-охлаждающие. Методы испытаний на биостойкость: ГОСТ 9.085–78. – Введ. 01.02.1979. – М.: Издательство стандартов. Государственный комитет СССР по стандартам. Государственный стандарт Союза ССР, 1979. – 10 с.