

УДК 665.6.76\=74

## РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТОВ, УГНЕТАЮЩИХ РАЗВИТИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В СОЖ, С ЦЕЛЬЮ УВЕЛИЧЕНИЯ СРОКА ЕЕ ЭКСПЛУАТАЦИИ

А. М. ЗВОНКО<sup>1+</sup>, Н. А. БЕЛЯСОВА<sup>1</sup>, Н. В. ГРИЦ<sup>1</sup>, Н. Н. КОСТЮК<sup>2</sup>, Т. А. ДИК<sup>2</sup><sup>1</sup> Белорусский государственный технологический университет, ул. Свердлова 13а, 220630 г. Минск, Беларусь.<sup>2</sup> Белорусский государственный университет, пр. Ф. Скорины 4, 220080 г. Минск, Беларусь.

*Синтезированы препараты, обладающие высокой бактерицидной активностью по отношению к микроорганизмам, контаминирующим СОЖ. На основании модельных экспериментов предложены мероприятия по предотвращению чрезмерного развития бактериальной микрофлоры в СОЖ в заводских условиях.*

### Введение и постановка задачи

Одной из причин, приводящих к ухудшению свойств СОЖ, является развитие в ней в процессе эксплуатации большого числа микроорганизмов, использующих для роста органические компоненты СОЖ, что приводит к изменению ее химического состава и загрязнению продуктами микробного метаболизма [1]. В связи с этим очевидна необходимость разработки мероприятий по предупреждению (подавлению) чрезмерной обсемененности СОЖ микроорганизмами-загрязнителями.

### Объекты и методы исследований

В работе использовали 10 бактериальных штаммов, выделенных из СОЖ Минского подшипникового завода как доминирующие микроорганизмы-загрязнители и отнесенные по совокупности морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств [2, 3] к родам *Alcaligenes* (штаммы №2, 5), *Pseudomonas* (№11, 15), *Bacillus* (№6, 14), *Citrobacter* (№3, 16), *Arthrobacter* (№70), *Nocardia* (№100) [1].

Посев микроорганизмов производили на агаризованную полноценную питательную среду на основе рыбного гидролизата.

Для полуколичественной оценки степени угнетения роста бактерий антибактериальными препаратами последние вносили в агаризованную питательную среду в конечных концентрациях 0,01 и 0,05 мас.%. Предварительно выращенные на исходной чашке-матрице бактериальные колонии переносили на чашки с антибактериальными препаратами методом реплик [4]. Для количественно-

го учета микроорганизмов в других вариантах опытов осуществляли высеивание из разведений в физиологическом растворе и учитывали число колоний, сформировавшихся за 2 сут.

В работе использовали 8 синтезированных антибактериальных препаратов различной природы, которые будут описаны в экспериментальной части.

### Результаты и их обсуждение

В качестве антимикробных добавок для СОЖ использовались синтезированные и испытанные органические соединения фунгицидов и бактерицидов различной природы. На основании ранее полученных нами данных по фунгицидной и бактерицидной активности оригинальных органических веществ, относящихся к классам дибромидов эпоксикетонов,  $\alpha$ -бромзамещенных производных ненасыщенных эпоксикетонов и халконов, а также ионогенных липофильных соединений, был осуществлен синтез отдельных представителей веществ названных классов и проведено их предварительное исследование.

Дибромиды эпоксикетонов синтезированы на основе циннамоилок-сиранов, которые в свою очередь получены конденсацией по Кляйзену-Шмидту из ацетилоксиранов и ароматических альдегидов. Стадии конденсации и бромирования протекают с высоким выходом, поэтому наработка веществ в препаративных количествах для испытаний может быть осуществлена в лабораторных условиях.

$\alpha$ -Бромциннамоилоксираны являются наиболее эффективными фунгицидами и бактерицидами.

+ Автор, с которым следует вести переписку.

Таблица 1. Эффективность синтезированных препаратов

№ штамма	№ Препарата					
	1		2		3	
	концентрация, мас. %					
	0,01	0,05	0,01	0,05	0,01	0,05
2	+++	+	+++	+	+++	+
3	-	-	-	-	-	-
5	+++	-	+++	-	+++	-
6	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-
16	-	-	+++	-	+++	-
70	-	-	-	-	+	-
100	-	-	-	-	-	+

Примечание. «-» – полное угнетение роста; «+» – значительное по сравнению с контролем угнетение; «+++» – угнетение незначительное

однако их синтез сложен и предполагает использование в качестве исходных соответствующих дибромидов эпоксикетонных, что увеличивает число стадий. Кроме того, реакция дегидробромирования, которая является последней и ключевой, протекает не столь однозначно и приводит к образованию смеси цис- и транс-изомеров. Тем не менее, для лабораторных исследований наработка указанных веществ не представляет затруднений.

Существенным ограничением возможностей использования отдельных представителей вышеописанных соединений является их чрезвычайно низкая растворимость (только в виде эмульсий) в смазочно-охлаждающих жидкостях. Поэтому мы сосредоточили внимание на поиске бактерицидных соединений ионогенного строения, которые были бы хорошо растворимы в воде. В качестве таковых представляют интерес тетраалкиламмониевые соли определенного строения. Их синтез был осуществлен, исходя из алкил-, гетариламинов и алкилгалогенидов. Одностадийность (двухстадийность) процесса получения соединений такого типа, простота их выделения, наряду с эффективностью как бактерицидов, позволяет сделать выбор в их пользу и использовать для более углубленного микробиологического изучения с последующим применением.

Предварительная (полуколичественная) проверка 3-х синтезированных препаратов (додецилтриметиламмоний бромид – № 1, додецилтриэтилтриметиламмоний бромид – № 2 и цетилпиридиний хлорид – № 3) на способность к угнетению развития 10 штаммов, выделенных из СОЖ как доминирующих по численности клеток в популяции, показала их высокую эффективность (табл. 1).

Таким образом, синтезированные препараты эффективны, по крайней мере, по отношению к отдельным из доминирующих в СОЖ микроорганизмам-загрязнителям.

Задачей следующего этапа явилось детальное исследование эффективности препаратов по отношению к естественной микрофлоре в СОЖ и поиск новых препаратов.

Таблица 2. Эффективность действия препаратов на микроорганизмы заводской и «чистой» СОЖ

Длительность инкубирования, сут	Число клеток в 1 мл СОЖ					
	заводская СОЖ, 10 <sup>6</sup>			«чистая» СОЖ, 10 <sup>2</sup>		
	контрольный образец	№ 1	№ 4	контрольный образец	№ 1	№ 4
-	1,0	0,9	1,1	0,2	0,5	0,1
2	91,0	89,0	94	25,0	нет	6,0
6	1,9	6,0	1,8	30,0	нет	2,0

Положительные результаты, полученные на чистых доминирующих в СОЖ культурах микроорганизмов, позволили приступить к исследованию эффективности их действия при внесении непосредственно в СОЖ. Исследования проводили в 2-х вариантах: 1) при использовании СОЖ после обычной эксплуатации на заводе; 2) при использовании СОЖ, приготовленной в лаборатории из составляющих ее ингредиентов, которая не имела контакта с заводскими коммуникациями (условно – СОЖ «чистая»).

Определение численности микроорганизмов производили сразу перед началом эксперимента, и через 2 и 6 сут. Использовали препараты № 1 (додецилтриметиламмоний бромид) и № 4 (8-окси-хинолин) в конечной концентрации 0,05%. Результаты представлены в табл. 2.

Из данных табл. 2 можно заключить, что при использовании заводской СОЖ, содержащей около 10<sup>6</sup> клеток в 1 мл, антимикробное действие препарата № 1 выражено значительно слабее, чем можно было предположить, исходя из результатов табл. 1. Так, через 6 сут заводская СОЖ с препаратом № 1 содержала лишь в 3 раза меньше микроорганизмов по сравнению с контролем.

В приготовленной в лаборатории СОЖ, содержащей значительно меньшее исходное количество микроорганизмов, антимикробное действие препаратов выражено значительно сильнее. Так, при 100-кратном увеличении численности микроорганизмов в контрольном образце, в «чистой» СОЖ с препаратом № 1 как через 2, так и через 6 сут. микроорганизмы не выявлялись (отсутствовали полностью).

Полученные результаты, а также предполагаемый механизм антимикробного действия синтезированных препаратов (повреждение клеточной мембраны в процессе размножения микробов) позволяют предположить, что положительный эффект от использования разработанных препаратов может быть достигнут, когда СОЖ изначально существенно не инфицирована. Обеспечение таких условий, т. е. проведение мероприятий по однократной или периодической очистке магистралей и емкостей СОЖ на заводе и использование разработанных препаратов позволит стабилизировать ситуацию и увеличить сроки эксплуатации СОЖ, предотвращая микробное разложение.

Для получения дополнительных доказательств в пользу высказанных предположений был спланирован следующий эксперимент. В сте-

Таблица 3. Эффективность действия препаратов в зависимости от исходной концентрации микроорганизмов

Длительность инкубирования, сут	Число клеток в 1 мл СОЖ					
	смесь 1,10 <sup>6</sup>			смесь 2,10 <sup>4</sup>		
	контрольный образец	№ 1	№ 4	контрольный образец	№ 1	№ 4
–	1,0	2,0	1,3	1,9	1,00	1,6
2	100,0	21,0	44,0	60000,0	0,32	5,9
6	350,0	8,1	24,0	82000,0	0,17	4,6

рильную питательную среду вносили смесь чистых культур доминирующих в СОЖ штаммов (№ 2–5, 16, 100) в одинаковых пропорциях до конечной концентрации  $\approx 1 \cdot 10^6$  кл/мл (смесь 1). Эту смесь также разводили стократно стерильной питательной средой до достижения концентрации микроорганизмов  $\approx 1 \cdot 10^4$  кл/мл (смесь 2), что приближенно моделирует последствия очистных мероприятий на заводе. Полученные результаты представлены в табл. 3.

В условиях питательной среды препарат № 1 эффективен даже при исходной концентрации клеток около  $10^6$  в 1 мл. При снижении исходной концентрации клеток до  $10^4$  в 1 мл (смесь 2) он не только ингибирует увеличение численности микроорганизмов, но и приводит к ее снижению.

При исследовании бактерицидной активности препаратов были выявлены эффективные соединения в ряду четвертичных аммониевых солей. Для выяснения влияния указанных соединений на стабильность эмульсии СОЖ при хранении в статическом режиме и при перемешивании образец СОЖ при комнатной температуре (23–27 °С) оставляли в покое или перемешивали несколько суток. Установлено, что тетраалкиламмониевые соли в разной степени влияют на стабильность эмульсии СОЖ. Этот эффект связан, вероятно, с различной ионогенной природой использованного в СОЖ поверхностно-активного вещества-диспергатора и бактерицидного препарата.

Для проверки этой гипотезы и выяснения причины дестабилизации эмульсии, а также с целью дальнейшего поиска приемлемых бактерицидов было решено провести испытания других органических соединений как неионогенной, так и ионогенной природы, обладающих бактерицидными свойствами. В качестве таковых для испытаний выбраны 8-оксихинолин (№ 4), алкилдиметиламина N-окись (№ 8), алкилтриметиламмоний хлорид, тетраэтиламмоний хлорид (№ 6), смесь 2- и 4-изомеров гидроксibenзиловых спиртов (№ 7) и комплексная соль 8-оксихинолина и 5-сульфосалицилата натрия (№ 5).

Среди перечисленных соединений три имеют неионогенную природу, три являются четвертичными аммониевыми солями, но отличаются длиной и характером углеводородных радикалов и одно соединение относится к гетероциклическому ряду и имеет солевую природу.

Неионогенные соединения, обладающие бактерицидным действием, были выбраны с целью

Таблица 4. Результаты испытаний препаратов на эксплуатируемой в течение недели СОЖ

Состояние	Число клеток в 1 мл, 10 <sup>4</sup>				
	контрольный образец	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8
СОЖ исходная	9,9	9,9	9,9	9,9	9,9
–//– через 2 сут	47	9,8	40,0	42,0	0,4
Стабильность	+	+	+/-	-	+/-

Примечание. «+» – эмульсия, гомогенная постоянно; «–» – наблюдается расслоение; «+/-» – незначительное расслоение в статическом состоянии (в покое)

выяснения влияния посторонних электролитов на стабильность СОЖ. Среди четвертичных аммониевых солей для испытаний использованы тетраэтиламмоний хлористый – четвертичная аммониевая соль, не имеющая длинного гидрофобного алкильного радикала; алкилтриметиламмоний хлористый – наиболее близкий аналог к ранее испытанным бактерицидам, но отличающийся природой аниона; бензилдиметилалкиламмоний хлористый – четвертичная аммониевая соль, содержащая в своем составе один ароматический (фенильную группу) заместитель; гидроксibenзиловые спирты являются водо- и маслорастворимыми бактерицидами неионогенного характера; комплексная соль 8-оксихинолина и 5-сульфосалицилата натрия предлагается в качестве бактерицидного препарата (по патенту США), хорошо растворима в воде и содержит в своем составе два компонента, проявляющих бактерицидные свойства.

Результаты испытаний показали, что среди перечисленных препаратов имеются такие, которые совершенно не влияют на стабильность эмульсии СОЖ и являются бактерицидными по отношению к ее микрофлоре. Результаты одного из экспериментов приведены в табл. 4.

Таким образом, нами синтезированы и испытаны на бактерицидную активность ряд новых препаратов при разных режимах испытаний. Оценено их влияние на стабильность эмульсии СОЖ. Некоторые из испытанных препаратов пригодны для промышленного использования.

### Заключение

Для увеличения сроков службы СОЖ (в условиях Минского подшипникового завода) необходимо проведение следующих мероприятий, направленных на предотвращение чрезмерного разветвления микробной микрофлоры.

1. Механическая очистка емкостей и коммуникаций от загрязнения.
2. Химическая обработка емкостей и коммуникаций горячим дезинфицирующим раствором.
3. Для приготовления СОЖ использование горячей воды с последующим прогревом до температуры не ниже 60 °С.
4. Перед подачей СОЖ обязательно проведение мероприятий по очистке и дезинфекции рабо-

чих мест (станков).

5. В качестве препаратов рекомендуется использование разработанных и испытанных в ходе выполнения данной работы препаратов, т. к. применяемые заводом препараты неэффективны.

6. На начальном периоде необходим текущий контроль обсемененности СОЖ в питающих емкостях и в зависимости от состояния СОЖ проведение профилактических мероприятий.

Литература

1. Гриц Н. В., Белясова Н. А., Костюк Н. Н., Дик Т. А. Микробная обсемененность СОЖ как одна из причин преждевременного ухудшения ее эксплуатационных свойств // Материалы, технологии, инструменты (1997), № 3, 107-109
2. Bergey's. Manual of determinative bacteriology // Eds. R. E. Buchanan, N. E. Gibbous. Baltimore. The Williams and Wilkins Co. (1984)
3. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхарда и др. Москва. Мир. 1-3 (1984)
4. Lederberg J., Lederberg E. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants // J. Bacteriol, 63 (1952), 399-406

Zvonok A. M., Belyasova N. A., Grits N. V., Kostyuk N. N., Dik T. A.

Designing preparations depressing development of microorganism in coolant to extend its service life.

Substances with high bactericide efficiency in relation to microorganisms contaminating coolant have been synthesized some recommendations to prevent an rapid development of bacterial microflora in coolant in production conditions have been worked out on the basis of model experiments.

Поступила в редакцию 13.11.98.

© А. М. Звонок, Н. А. Белясова, Н. В. Гриц, Н. Н. Костюк, Т. А. Дик, 1999.