

БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА МАТЕРИАЛОВ: СТАНДАРТНЫЕ И НОВЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Л. И. Антоновская¹, С. В. Шевеленко¹, Н. А. Белясова¹,
Т. С. Мишкевич², В. И. Дубкова²

¹Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь,
e-mail: n195404@gmail.com

²Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: dubkova@igic bas-net.by

Одной из серьезных проблем, с которыми сталкивается нефтедобывающая и нефтеперерабатывающая промышленность, является биообрастание и повреждение материалов и оборудования. Из литературных данных известно, что наиболее активными микроорганизмами, повреждающими материал и изделия в данной отрасли промышленности, являются сульфатредуцирующие бактерии (СРБ), как правило, это представители родов *Desulfovibrio*, *Desulfomonas* и *Desulfotomaculum*. Кроме того, в составе биообрастаний встречаются представители родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Thiobacillus*, *Corynebacterium* и др. [1].

Для решения этой проблемы на протяжении многих лет отечественными и зарубежными исследователями активно ведется разработка новых рецептур составов биозащитных покрытий для широкого спектра материалов. Одним из основных критериев, по которым судят о доброкачественности защитного покрытия, служит показатель его антимикробной активности. Соответственно, для создания эффективных защитных покрытий необходимо располагать адекватными методами оценки их антимикробных свойств.

Анализ отечественных, международных стандартов и стандартов других стран показал, что методы определения антимикробных свойств материалов и изделий [2–6] обладают рядом существенных недостатков. Они довольно трудоемки, имеют высокую погрешность и низкую воспроизводимость, их невозможно использовать для оценки широкого круга материалов, например пористых материалов с развитой поверхностью. Некоторые стандартные методы не позволяют получить количественные показатели оценки антимикробных свойств материалов и изделий и таким образом не дают объективной оценки защищенности материалов от биообрастаний.

Цель исследования – разработать новые методы, позволяющие количественно оценить степень устойчивости биозащищенных материалов, в том числе пористых с развитой поверхностью, к биообрастаниям.

Объекты исследования – синтезированные в Институте общей и неорганической химии НАН Беларуси коррозионностойкие полимерные композиции, 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.

Для оценки устойчивости исследуемых покрытий к воздействию сульфатредуцирующих бактерий, которые преобладают в составе обрастаний материалов и оборудования в нефтедобыче, нами разработан анаэробно-суспензионный метод. В качестве тест-культур использовали выделенные из образцов активного ила Минской очистной станции аэрации сульфатредуцирующие бактерии *Desulfovibrio* LSL-1, которые осуществляют специфический способ запасаения энергии – «сульфатное» дыхание, сопровождающееся диссимиляционным восстановлением сульфатов с образованием сероводорода и сульфидов. Суть метода заключается в определении содержания сероводорода в культуральной жидкости после совместного инкубирования сульфатредуцирующих бактерий с исследуемым образцом коррозионностойкой полимерной композиции в анаэробных условиях. Регистрацию количества сероводорода проводили фотометрически на основе цветной реакции образования метиленового синего. Схема анаэробно-суспензионного метода представлена на рис. 1.

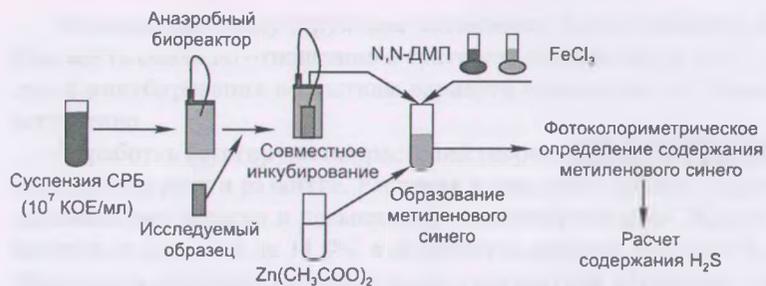


Рис. 1. Схема анаэробно-суспензионного метода

Результаты определения антибактериальных свойств образцов коррозионностойких полимерных композиций с помощью анаэробно-суспензионного метода приведены в табл.

Как видно из табл., наилучшими антибактериальными свойствами обладают образцы № 1, 2. В их присутствии бактерии не осуществляют сульфатредукцию и сероводород не образуется. Остальные образцы коррозионностойких полимерных композиций

можно расположить в ряд по ухудшению антибактериальных свойств по отношению к анаэробным бактериям: № 3→№ 4→№ 5→№ 6.

Показатели метаболической активности *Desulfovibrio* LSL-1 в присутствии образцов коррозионностойких полимерных композиций

Образец	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6
D_{670} , нм	0,002	0,005	0,068	0,075	0,098	0,113
$m(H_2S)$, мкг	~0	~0	5,0	6,0	7,8	8,0
$C(H_2S)$, мг/л	~0	~0	16,67	20,00	26,00	26,67

Примечание. Длительность совместного инкубирования составляла трое суток.

Для подтверждения достоверности полученных результатов воспользовались стандартным качественным методом по ГОСТ 9.085–1978 [6]. Метод заключается в совместном инкубировании исследуемых образцов коррозионностойких полимерных композиций с сульфатредуцирующими бактериями в питательной среде, содержащей железо, с последующей визуальной регистрацией образования черных зон сульфида, которые и учитываются при оценке бактериостойкости по трехбалльной шкале. Из рис. 2 следует, что сульфиды железа не образуются в культуральных жидкостях с образцами коррозионностойких полимерных композиций 1 и 2, что, согласно ГОСТ 9.085–1978, свидетельствует об их полной бактериостойкости (0 баллов). Культуральные жидкости *Desulfovibrio* LSL-1 с образцами коррозионностойких полимерных композиций 3, 4, 5 и 6 приобрели насыщенный черный цвет, что характеризует их полную небактериостойкость (II балла).

Таким образом, полученные с помощью разработанного метода данные об антибактериальных свойствах исследуемых образцов подтверждены результатами стандартного метода. При этом выявлены преимущества нового анаэробно-суспензионного метода: он дает возможность обнаружить различия в степени биозащищенности у материалов, которые в стандартном методе оцениваются одинаково низким баллом – II.

Как уже было отмечено ранее, в составе биообрастаний материалов и изделий в нефтедобывающей и нефтеперерабатывающей промышленности встречаются не только сульфатредукторы (анаэробные бактерии), но и аэробные микроорганизмы. Для оценки антибактериальных свойств образцов коррозионностойких полимерных композиций по отношению к облигатно-аэробным бактериям *Pseudomonas fluorescens* В 22 разработали метод оценки дыхательной активности клеток. Метод основан на совместном инкубировании культуры бактерий в экспоненциальной фазе роста с опытными образцами коррозионностойких полимерных композиций в течение суток с последующей регистрацией дыхательной активности сохранивших жизнеспособность бактерий. Динамическое измерение остаточного содержания растворенного молекулярного кислорода в культуральных жидкостях псевдомонад проводили амперометрическим методом.

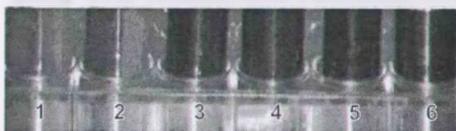


Рис. 2. Культурные *Desulfovibrio* LSL-1 после совместного инкубирования с образцами коррозионностойких полимерных композиций (№ 1–6)

На рис. 3 отображены зависимости содержания кислорода в культуральных жидкостях *P. fluorescens* В 22 от длительности процесса дыхания. Можно видеть, что в культуральной жидкости *P. fluorescens* В 22 без образца коррозионностойкой полимерной композиции – контроле (к) и в культуральных жидкостях с образцами коррозионностойких полимерных композиций № 3, 4, 5 и 6 происходит заметное снижение концентрации раство-

ренного кислорода за 10 мин измерения. Это свидетельствует о высоком содержании в культуральных жидкостях сохранивших жизнеспособность бактерий и, соответственно, низкой антимикробной активности исследуемых образцов. В то же время в культуральных жидкостях с образцами коррозионностойких полимерных композиций № 1 и 2 содержание молекулярного кислорода за 10 мин измерения практически не изменилось.

Из зависимостей на рис. 3 следует, что приблизительно к 13-й мин интенсивность дыхания бактерий снижается и остаточная концентрация кислорода в культуральных жидкостях с образцами коррозионностойких полимерных композиций № 3, 4, 5 и 6 постепенно уравнивается, т. е. нивелируется разница между дыхательной активностью бактерий после инкубирования с разными образцами коррозионностойких полимерных композиций. Чтобы повысить разрешающую способность метода, в качестве основного показателя антимикробных свойств образцов использовали скорость потребления кислорода K , мг/л·мин:

$$K = \frac{\Delta C}{\Delta t},$$

где ΔC – изменение концентрации кислорода за время Δt , мг/л; Δt – время измерения, мин. За Δt приняли 13 мин, так как именно за это время достигается наиболее заметная разница между остаточной концентрацией кислорода в анализируемых пробах.

Дыхательная активность *P. fluorescens* В 22, сохранивших жизнеспособность после совместного инкубирования с образцами коррозионностойких полимерных композиций, характеризуется величинами скорости потребления кислорода: образец № 1 – 0,02 мг/л · мин, № 2 – 0,03; № 3 – 0,08; № 4 – 0,11; № 5 – 0,013; образец № 6 – 0,15 мг/л · мин.

Таким образом, разработанные методы (анаэробно-суспензионный, метод определения скорости потребления кислорода) показали схожие результаты: наилучшими антимикробными свойствами обладают образцы коррозионностойких полимерных композиций № 1 и 2. Остальные исследуемые образцы можно расположить в ряд по ухудшению антибактериальных свойств: № 3 → № 4 → № 5 → № 6. Оба метода обеспечивают получение количественных характеристик антибактериальных свойств материалов и позволяют дифференцировать все испытанные образцы по степени их биозащищенности. Адекватность результатов подтверждена стандартным методом по ГОСТ 9.085–1978.

Литература

1. Михайлова Л. К., Казарин В. В., Семенов С. А. Диагностика микробиологических загрязнений в нефтепродуктах // Тр. Общества независимых исследователей авиационных происшествий. – 2007. – Вып. 19. – С. 240–243.
2. Противомикробные изделия – Тест на противомикробную активность и эффективность: Японский промышленный стандарт JIS Z 28001. – Введ. 20.12.2000. – Токио: Японская ассоциация стандартов, 2001. – 15 с.
3. Пластмассы. Оценка воздействия микроорганизмов: ISO 846: 1997. – Введ. 15.06.1997 / Технический комитет ИСО/ТК 61 «Пластмассы», 1997. – 42 с.
4. Единая система защиты от коррозии и старения. Материалы полимерные и их компоненты. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов: ГОСТ 9.049–91. – Введ. 01.07.1992. – М.: Госстандарт, 1992. – 13 с.
5. Покрытия лакокрасочные. Метод лабораторных испытаний на устойчивость к воздействию плесневых грибов: ГОСТ 9.050–1975 – Введ. 01.07.1976. – М.: Госстандарт, 1976. – 8 с.
6. Единая система защиты от коррозии и старения. Жидкости смазочно-охлаждающие. Методы испытаний на биостойкость: ГОСТ 9.085–1978. – Введ. 01.02.1979. – М.: Госстандарт, 1979. – 10 с.

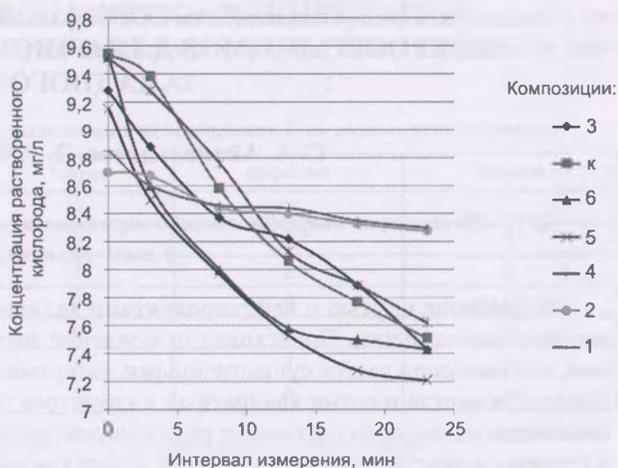


Рис. 3. Динамика изменения содержания молекулярного кислорода в культуральных жидкостях