

УДК 579.6.083.1.088.1:615.28

С. В. Шевеленко, магистрант (БГТУ);

А. А. Кучко, студент (БГТУ); Н. А. Белясова, доцент (БГТУ)

СОПОСТАВИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ УЧАСТВУЮЩИХ В БИООБРАСТАНИИ АЭРОБНЫХ И АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ БИОЦИДОВ

В данной работе рассмотрена достаточно актуальная для современного мира проблема биообрастания, ее причины и способы решения. Один из наиболее распространенных подходов для решения поставленной проблемы – это введение в состав материалов объектов, подверженных разрушающему действию микроорганизмов, биоцидных добавок. Исследование антибактериальных свойств таких полимерных материалов осуществляли, используя разработанные в нашей лаборатории количественные методы, основанные на метаболических особенностях аэробных и анаэробных микроорганизмов, а также стандартизированные качественный и количественный методы. В качестве тест-культур взяли облигатно анаэробные сульфатредуцирующие бактерии, которые осуществляют единственный способ запасаения энергии – сульфатное дыхание, и облигатно аэробные бактерии *Pseudomonas fluorescens*. Экспериментальные данные позволили сделать вывод, что применение количественных методов дает более объективную оценку бактериостойкости биозащищенных материалов, чем качественных. Кроме того, в ряде случаев целесообразно использование именно количественных методов, основанных на метаболической активности микроорганизмов. Также на основании корреляции результатов двух разработанных метаболических методов было сделано предположение о сходной чувствительности к биоцидам аэробных и анаэробных бактерий.

There have been considered a very vital problem of biofouling: it's causes and modes of solution. One of the most spread approach to settle this problem is injection of the biocide additives. Researches of antibacterial properties of the polymeric materials with biocides were carried out using special metabolic features of the aerobic and anaerobic microorganisms. As the test cultures in the study obligate anaerobic sulphate-reducing bacteria, which have a unique mode of the energy reserving is sulfate respiration, and obligate aerobic bacteria genus *Pseudomonas* were used. On the basis of the experimental facts was concluded that application of the quantitative methods is more objective than qualitative once. Moreover, in some cases the usage only metabolic methods can give an appropriate results. Besides the supposition about identical susceptibility to the biocides of the aerobic and anaerobic bacteria were made, because of the similar dates of the two metabolic qualitative methods.

Введение. Биообрастание представляет собой достаточно сложный процесс, который происходит при участии не какой-то одной определенной группы микроорганизмов, а в результате жизнедеятельности различных их групп, популяций [1]. Так, в аэробных условиях источником биообрастания сначала являются аэробные бактерии, которые образуют биопленки на поверхности объекта и создают матрикс, облегчающий прикрепление и развитие других популяций микроорганизмов, в частности, анаэробных бактерий. Популяции анаэробов используют органику, накопленную аэробными бактериями, в условиях исчерпания молекулярного кислорода и обычно завершают процессы биообрастания материалов. Накопление продуктов жизнедеятельности сложных ассоциаций, входящих в состав биообрастаний, или непосредственное участие микроорганизмов в электрохимических реакциях на поверхности субстрата приводит к биокоррозии – явлению, обуславливающему огромные экономические потери практически во всех отраслях

промышленности: электроэнергетике (повреждение бронированных кабелей связи), топливной, легкой, деревообрабатывающей промышленности, производстве строительных материалов, металлообработке. Учетные потери только по 14 наиболее развитым странам Европы и Северной Америки достигают не менее 2% от стоимости произведенной совокупной продукции, что составляет десятки миллиардов долларов ежегодно [2].

Основными участниками аэробной биокоррозии являются бактерии рода *Pseudomonas*, а 80% анаэробных разрушений обуславливают сульфатредуцирующие бактерии [3].

Одним из способов решения данной проблемы является создание биозащищенных материалов, содержащих биоцидные вещества [4]. При этом важно иметь уверенность, что такие материалы в одинаковой мере устойчивы к воздействию как аэробных, так и анаэробных бактерий.

Целью исследования стало испытание чувствительности наиболее распространенных

анаэробных и аэробных участников биообращения к биоцидным препаратам в составе материалов.

Основная часть. В качестве тест-систем использовали образцы полимерных биозащитных материалов, синтезированных в Институте общей и неорганической химии (ИОНХ). В состав образцов был включен биоцидный компонент, содержание которого уменьшается в ряду 1→2→3→4→5→6.

На сегодняшний день существует только один стандартизированный количественный метод оценки устойчивости материалов к воздействию бактерий [5]. Его суть заключается в инкубировании аэробных бактерий на поверхности образца биозащитного материала в течение определенного времени с последующим смывом и определением числа сохранившихся жизнеспособных клеток.

Однако, реализация этого метода с опытными образцами показала, что данные материалы обладают очень развитой пористой поверхностью и хорошими адсорбционными свойствами, в результате, сохранившие жизнеспособность клетки остаются адсорбированными на поверхности образца и не образуют колонии при высеве. Таким образом, возникает существенная погрешность в определении концентрации выживших клеток, что делает данный метод непригодным для указанных целей.

В то же время, известны подходы к определению степени биозащитности материалов, основанные на сопоставлении метаболической активности прикрепленных к поверхности образца бактерий. Эти методы обладают преимуществами при анализе антимикробных свойств пористых материалов с развитой поверхностью.

Для оценки метаболической активности анаэробных бактерий разработан количественный анаэробно-суспензионный метод оценки устойчивости материалов к анаэробной биокоррозии [6]. В качестве тест-культур в нем используются облигатно анаэробные сульфатредуцирующие бактерии, осуществляющие специфический способ запасания энергии –

сульфатное дыхание, при котором происходит диссимиляционное восстановление соединений серы с образованием сероводорода и сульфидов [7]. Суть этого метода заключается в определении содержания сероводорода в культуральной жидкости после совместного инкубирования сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) с образцом в среде, не содержащей ионов железа, в специальном анаэробном биореакторе. Регистрацию количества сероводорода проводят фотокolorиметрически на основе цветной реакции образования метиленового синего (рис. 1).

Результаты анализа антимикробных свойств образцов материала с помощью анаэробно-суспензионного метода приведены в табл. 1.

Таблица 1
**Метаболическая активность СРБ
в присутствии образцов биозащитного материала**

Образец	D_{670} , нм	$m(\text{H}_2\text{S})$, мкг	$C(\text{H}_2\text{S})$, мг/л
1	0,002	~ 0	~ 0
2	0,005	~ 0	~ 0
3	0,068	5,0	16,67
4	0,075	6,0	20,00
5	0,098	7,8	26,00
6	0,113	8,0	26,67

Можно заметить, что наилучшими антибактериальными свойствами обладают образцы под номерами 1 и 2. В их присутствии бактерии не осуществляют сульфатредукцию и сероводород не образуется. Остальные образцы можно расположить в ряд по ухудшению антибактериальных свойств по отношению к анаэробным бактериям:

3→4→5→6.

Для проверки правильности полученных результатов воспользовались стандартным качественным методом [8], основанным на инкубировании СРБ в питательной среде, содержащей железо, с последующей визуальной регистрацией образования черных зон сульфида, которые и учитываются при оценке бактериостойкости по трехбалльной шкале (рис. 2).

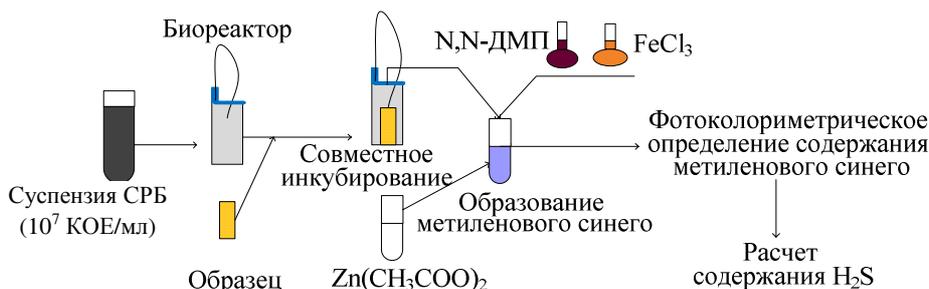


Рис. 1. Схема анаэробно-суспензионного метода определения антибактериальных свойств биозащитных материалов

Из представленных на рис. 2 фотографий следует, что сульфиды железа не образуются в культурах СРБ только при совместном инкубировании с образцами 1 и 2, что, согласно методу [8], свидетельствует об их полной бактериостойкости.

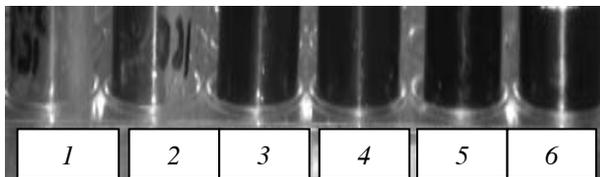


Рис. 2. Культуры СРБ после совместного инкубирования с образцами биозащитного материала

Культура СРБ с образцами 3–6 приобрела насыщенный черный цвет накопления сульфидов железа и характеризуется полной небактериостойкостью.

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 биозащитности у материалов, которые в стандартном методе оцениваются одинаково низким баллом – III.

Для оценки антибактериальных свойств образцов биозащитного материала по отношению к аэробным бактериям *Pseudomonas fluorescens* апробировали разрабатываемый нами метод оценки дыхательной активности клеток [9].

Для этого провели совместное инкубирование культуры бактерий, находящейся в лог-фазе роста, с опытными образцами в течение суток. Затем создали благоприятные условия для интенсификации дыхательного процесса, помес-

тив данную суспензию с образцом в свежий питательный бульон с последующим динамическим измерением в нем остаточного содержания растворенного молекулярного кислорода (рис. 3). В основу принципа измерения положен амперометрический метод анализа [10]. На представленном ниже рис. 4 отображены графики зависимости содержания кислорода в культуральных жидкостях от длительности процесса дыхания.

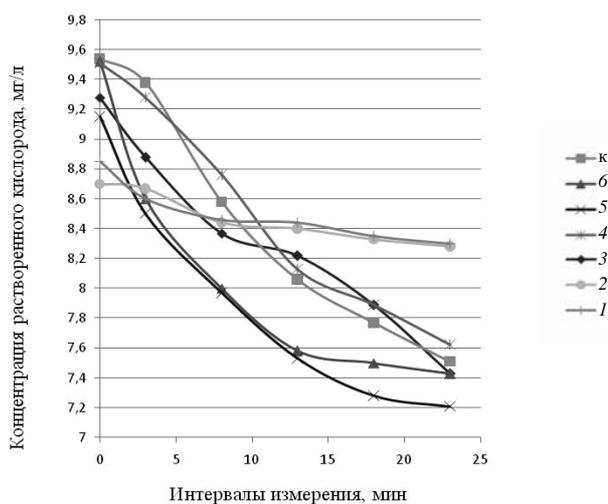


Рис. 4. Динамика изменения содержания кислорода в культуральной жидкости

Можно видеть, что в контроле (к) и четырех опытных пробах (номера 3, 4, 5, 6) происходит заметное снижение концентрации растворенного кислорода за 10 мин измерения. Это свидетельствует о высоком содержании в культуральной жидкости сохранивших жизнеспособность бактерий и, соответственно, низкой антибактериальной устойчивости исследуемых образцов. Наоборот, в пробах с образцами 1 и 2 содержание кислорода практически не изменилось.

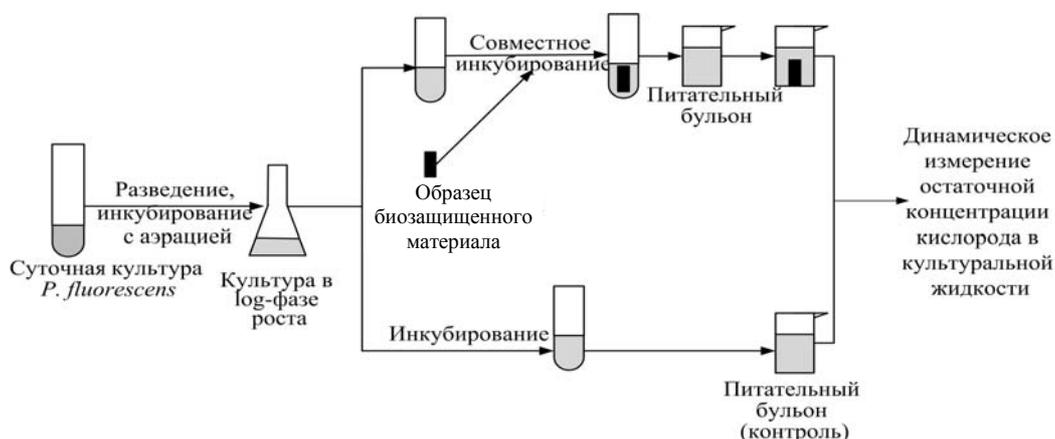


Рис. 3. Схема метода определения дыхательной активности бактерии

Из зависимости на рис. 5 следует, что с определенного момента измерения, приблизительно с 13 мин, интенсивность дыхания бактерий снижается и остаточная концентрация кислорода в культуральных жидкостях с образцами 3–6 постепенно уравнивается, т. е. нивелируется разница между антибактериальными свойствами образцов. Чтобы повысить разрешающую способность метода, в качестве основного показателя антимикробных свойств образцов использовали скорость потребления кислорода K , мг/л · мин:

$$K = \Delta C / \Delta t, \quad (1)$$

где ΔC – изменение концентрации кислорода за время Δt , мг/л; Δt – время измерения, мин.

За Δt приняли 13 мин, т. к. именно за это время достигается наиболее заметная разница между остаточной концентрацией кислорода в анализируемых пробах.

Результаты анализа дыхательной активности облигатно аэробных бактерий *Pseudomonas fluorescens* и сопоставительная оценка антибактериальных свойств образцов биозащитного материала по данным двух разработанных методов приведены в табл. 2.

Таблица 2

Показатели метаболической активности анаэробных и аэробных бактерий под действием биоцидов в составе образцов биозащитного материала

Образец	Скорость потребления кислорода K , мг/л · мин	$C(H_2S)$, мг/л
1	0,023	~ 0
2	0,032	~ 0
3	0,082	16,67
4	0,106	20,00
5	0,125	26,00
6	0,149	26,67

Таким образом все три реализованных метода показали схожие результаты: наиболее бактериостойкими являются образцы 1 и 2; прослеживается зависимость между концентрацией биоцида в составе материала и его устойчивостью к биообрастанию: чем больше концентрация биоцида, тем большей бактериостойкостью характеризуется материал.

Заключение. Использованные в данной работе количественные методы, основанные на измерении метаболической активности аэробных и анаэробных бактерий, показали себя как более объективные по сравнению со стандартными методами для оценки устойчивости к биообрастанию образцов биозащитных материалов. Результаты анаэробно-суспензионного метода и метода определения дыхательной активности аэробных бактерий рода *P. fluores-*

сens коррелируют между собой, что дает основание судить о сходной чувствительности к биоцидным добавкам наиболее распространенных аэробных и анаэробных бактерий, участвующих в биообрастании.

Литература

1. Микробная коррозия и ее возбудители / Е. И. Андреюк [и др.]; под ред. Е. И. Андреюк. – Киев: Наук. думка, 1980. – 288 с.
2. Вауллина, В. А. Мышьякорганические биоциды / В. А. Вауллина, В. И. Гаврилов // Вестник Казанского технол. ун-та. – 1998. – № 1 – С. 28–38.
3. Айткильдеева, С. А. Бактерии, восстанавливающие нитраты, арсенаты, трехвалентное железо и сульфаты: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / С. А. Айткильдеева; Акад. наук Казахской ССР Институт микробиологии и вирусологии. – Алма-Ата, 1984. – 26 с.
4. Биоповреждения: учеб. пособие для биол. спец. вузов / В. Д. Ильичев [и др.]; под ред. В. Д. Ильичева. – М.: Высш. шк., 1987. – 352 с.
5. 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.
6. Антоновская, Л. И. Оценка устойчивости биозащитных материалов к анаэробной биокоррозии / Л. И. Антоновская, Л. В. Барановицкая, Н. А. Белясова // Актуальные проблемы микробиологии и биотехнологии: материалы Национал. науч. конф., 5–6 окт. 2009 г. – Кишинев, Молдова, 2009. – С. 135.
7. Нетрусов, А. И. Микробиология: учеб. для студ. учеб. заведений / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. – М.: Академия, 2006. – 352 с.
8. ГОСТ 9.085-78. Единая система защиты от коррозии и старения. Жидкости смазочно-охлаждающие. Методы испытаний на биостойкость. – Введ. 01.02.1979. – М., Госстандарт, 1979. – 10 с.
9. Шевеленко, С. В. Оценка антибактериальных свойств биоцидных препаратов по метаболической активности *Pseudomonas fluorescens* / С. В. Шевеленко, Н. А. Белясова // Новейшие достижения в области импортозамещения в химической промышленности и производстве строительных материалов: материалы Междунар. науч.-техн. конф., 25–27 ноября 2009 г.: в 2 ч. / Белорус. гос. технол. ун-т; редкол.: И. М. Жарский [и др.]. – Ч. 2. – С. 18–21.
10. Кузнецов, Б. А. Электрохимический метод измерения метаболической активности и количества клеток / Б. А. Кузнецов, М. Е. Хлупова, С. В. Шлеев // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42, № 5. – С. 429–434.

Поступила 26.03.2010