

УДК 579.66:615.282:579.017.7

Л. И. АНТОНОВСКАЯ<sup>1</sup>, Н. А. БЕЛЯСОВА<sup>1</sup>, А. И. РАЙЛКИН<sup>2</sup>

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ  
МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ  
АНТИФУНГАЛЬНЫХ СВОЙСТВ БИОЦИДОВ**

<sup>1</sup>Белорусский государственный технологический университет, Минск, e-mail: biocidmethod@mail.ru,

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

(Поступила в редакцию 20.02.2015)

**Введение.** Ведущая роль в процессах биоповреждения материалов различной химической природы, эксплуатируемых в условиях повышенной температуры и влажности, принадлежит мицелиальным грибам. Это обусловлено прежде всего быстрым ростом их мицелия, а также мощностью и лабильностью их ферментативного аппарата [1]. Наиболее эффективным способом защиты материалов от повреждения грибами является химический (использование биоцидных препаратов – фунгицидов). При создании подобного рода препаратов необходимо располагать рядом надежных методов, позволяющих объективно оценить эффективность фунгицидов. Широко используемые в мировой практике методы оценки антифунгальных свойств биоцидных препаратов обладают рядом существенных недостатков, к которым можно отнести длительность испытаний, низкую степень воспроизводимости результатов и др.

Цель исследования – разработка новых методов оценки эффективности фунгицидов.

**Материалы и методы исследования.** Образцами для исследования служили синтезированные в ГНУ «Институт химии новых материалов НАН Беларуси» биоцидные препараты на основе полигексаметиленгуанидин гидрохлорида и бифенильной четвертичной аммониевой соли (условное обозначение – ПГБ-1–ПГБ-4).

В качестве тест-культуры использовали мицелиальные грибы *Phlebiopsis gigantea* из коллекции кафедры лесозащиты и древесиноведения Белорусского государственного технологического университета.

Оценку антифунгальных свойств биоцидных препаратов осуществляли с помощью метода, положенного в основу ГОСТ 9.803-88 [2], а также с помощью нового метода по дегидрогеназной активности мицелиальных грибов.

Параметры, характеризующие антифунгальные свойства препаратов, сопоставляли на основании значений коэффициента корреляции, который рассчитывали по формуле

$$K = \frac{\sum(X - \bar{X})(Y - \bar{Y})}{\sqrt{\sum(X - \bar{X})^2 \sum(Y - \bar{Y})^2}},$$

где  $X$  и  $Y$  – значения параметров оценки антифунгальных свойств препаратов, полученные с помощью разных методов;  $\bar{X}$  и  $\bar{Y}$  – средние (по результатам трех измерений) значения параметров оценки антифунгальных свойств препаратов, полученные с помощью разных методов.

**Результаты и их обсуждение.** В основу разрабатываемого метода оценки антифунгальных свойств препаратов положено изменение метаболической, а именно дегидрогеназной активности

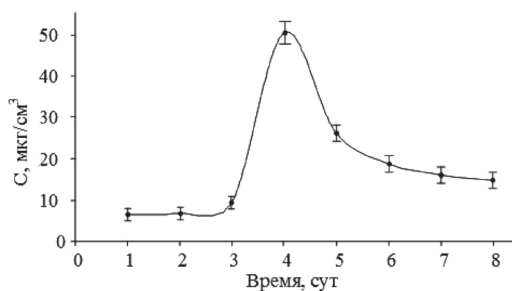


Рис. 1. Зависимость концентрации формазана от длительности инкубирования тест-культуры *P. gigantea*

При разработке нового метода оценки антифунгальных свойств препаратов необходимо было подобрать условия проведения эксперимента: во-первых, найти способ извлечения формазана из клеток; во-вторых, определить время инкубирования тест-культуры, при котором активность дегидрогеназ грибов максимальна.

Уже на первых этапах исследований, связанных с подбором способа извлечения формазана из клеток, возникли некоторые трудности: выяснилось, что такие часто используемые методы разрушения клеток, как кислотный и щелочной лизис, непригодны для извлечения формазана из клеток мицелиальных грибов. Тогда нами был опробован еще один, менее распространенный, способ разрушения клеток – ультразвуковая дезинтеграция. Суспензию мицелия грибов *P. gigantea* подвергали воздействию ультразвуком (22 кГц) в течение 1–5 мин. Для определения эффективности лизиса экстрагировали формазан толуолом и определяли экстинкцию раствора при длине волны 490 нм. Оказалось, что разрушение клеток грибов происходит в процессе ультразвуковой обработки в течение 1 мин.

Экспериментально установлена также длительность инкубирования тест-культуры, при которой дегидрогеназы грибов проявляли максимальную активность. Для этого в течение 8 сут с шагом 24 ч определяли концентрацию формазана в пробах. Параллельно определяли биомассу грибов: культуральную жидкость фильтровали через высушенный до постоянной массы фильтр и по разности массы высушенного фильтра и массы культуры гриба и без нее определяли массу мицелия. Результаты эксперимента представлены на рис. 1, 2.

Как видно из представленной зависимости (см. рис. 1), максимальная дегидрогеназная активность грибов *P. gigantea* наблюдается на 4-е сутки, после чего концентрация формазана резко снижается. Данный скачок приходится на время перехода логарифмической фазы роста грибов в стационарную (рис. 2). Таким образом, испытания антифунгальных свойств препаратов в дальнейшем проводили на 4-е сутки, что соответствует моменту времени, когда тест-культура достигает стационарной фазы роста.

Схема разработанного метода представлена на рис. 3.

Описание нового метода: мицелий предварительно выращенной на плотной питательной среде (сусло-агаре) тест-культуры (*P. gigantea*) смывали физиологическим раствором в стерильный

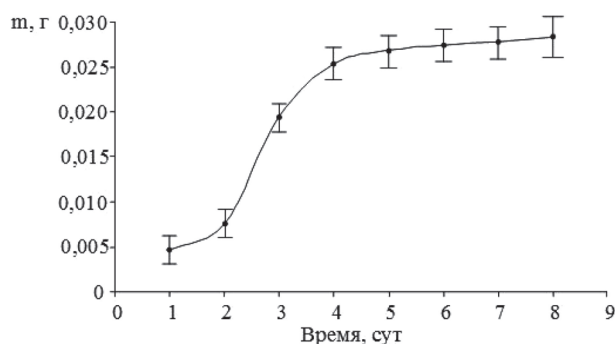


Рис. 2. Зависимость клеточной массы тест-культуры *P. gigantea* от длительности инкубирования

стакан и диспергировали на блендере до образования однородной суспензии. Полученную таким образом суспензию грибов инкубировали в сусло-бульоне при температуре 26 °С на шейкере-инкубаторе в течение 4 сут. Затем выросший мицелий отфильтровывали, отмывали физиологическим раствором и переносили с фильтра в стакан, куда предварительно были внесены следующие растворы: 1,1 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 М глюкоза (субстрат для дегидрирования), 0,1 М  $\text{MgSO}_4$ , 0,5 % трифенилтетразолий хлорид, а также раствор фунгицида в исследуемой

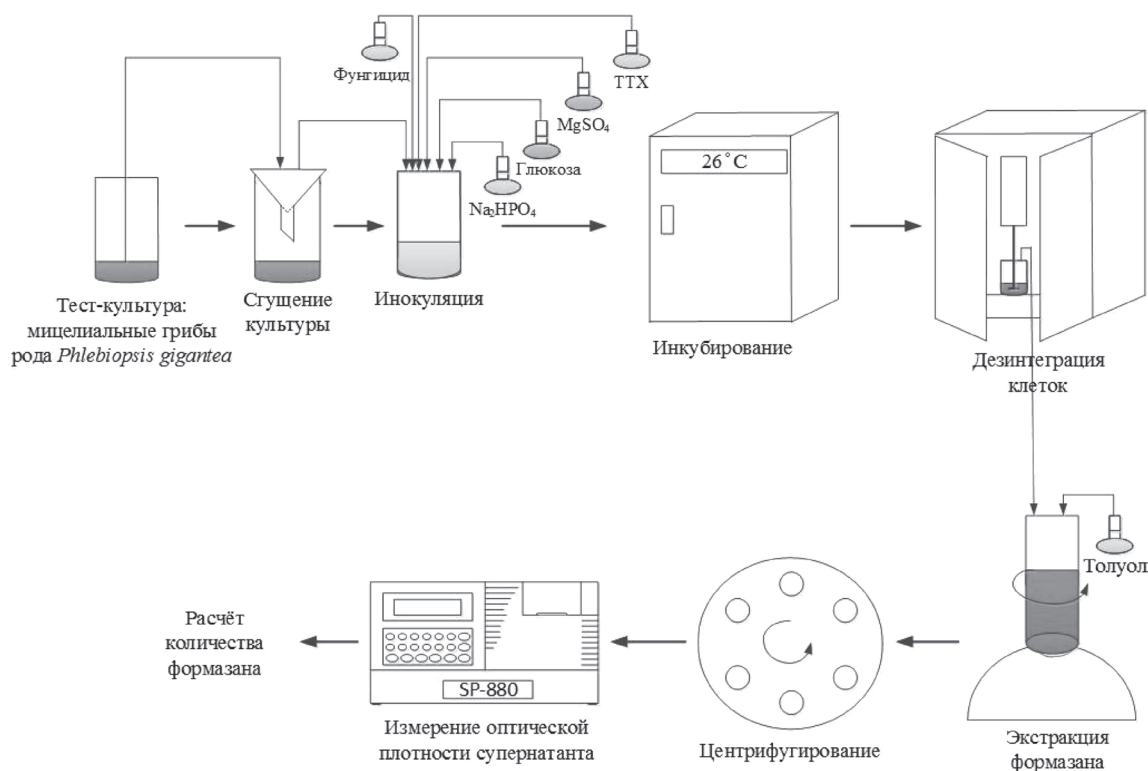


Рис. 3. Схема нового метода оценки антифунгальных свойств препаратов по изменению дегидрогеназной активности мицелиальных грибов

концентрации. Смесь инкубировали в термостате при температуре 26 °С в течение 2 ч до появления розовой окраски формазана. Для извлечения формазана клетки разрушали ультразвуковой обработкой в течение 1 мин при частоте 22 кГц и максимальной мощности 400 Вт. Реакционную смесь переносили в центрифужную пробирку и экстрагировали формазан толуолом. На полное извлечение формазана указывало обесцвечивание реакционной смеси. На спектрофотометре в кюветках с расстоянием между рабочими гранями 10 мм при длине волны 490 нм измеряли оптическую плотность супернатанта. Количество образованного клетками формазана определяли по градуировочному графику, который строили заранее, используя растворы различной концентрации.

Для оценки степени воспроизводимости результатов испытаний, полученных с помощью разработанного метода, определяли количество образованного клетками грибов формазана после совместного инкубирования тест-культуры с одним и тем же образцом биоцидного препарата ПГБ-1 в условиях промежуточной прецизионности. В качестве контроля использовали тест-культуру, не обработанную биоцидом. Результаты испытаний представлены в табл. 1.

Таблица 1. Количество образованного клетками грибов формазана в условиях промежуточной прецизионности

Образец	$\bar{C} \pm d$ , мкг/см <sup>3</sup>				
	Эксперимент 1	Эксперимент 2	Эксперимент 3	Эксперимент 4	Эксперимент 5
С биоцидным препаратом ПГБ-1	11,7 ± 1,0	12,4 ± 1,1	15,6 ± 1,3	14,1 ± 1,2	13,2 ± 1,2
Контроль (без ПГБ-1)	41,4 ± 2,1	44,5 ± 2,4	51,9 ± 3,5	49,1 ± 3,3	47,5 ± 2,8

Как видно из представленных результатов (табл. 1), концентрация формазана в разных экспериментах колебалась в довольно широком диапазоне: в пробах с биоцидным препаратом – от 11,7 до 15,6 мкг/см<sup>3</sup>, в контрольных пробах – от 41,4 до 51,9 мкг/см<sup>3</sup>.

Для уменьшения различного рода факторов, влияющих на результаты оценки антифунгальных свойств препаратов по дегидрогеназной активности мицелиальных грибов, а также для уменьшения погрешности измерений, полученных в разное время, разработали относительный количествен-

ный параметр ( $DA$ ), который показывает, во сколько раз изменяется дегидрогеназная активность грибов после совместного инкубирования с биоцидным препаратом по сравнению с контролем. Данный показатель вычисляли по формуле

$$DA = \frac{C_{\text{опыт}}}{\bar{C}_{\text{контроль}}},$$

где  $C_{\text{опыт}}$  – концентрация формазана в пробе, обработанной фунгицидом, мкг/см<sup>3</sup>;  $\bar{C}_{\text{контроль}}$  – средняя концентрация формазана в контроле по результатам трех измерений, мкг/см<sup>3</sup>.

За результат принимали среднее арифметическое  $DA$  трех параллельных измерений параметра  $DA$ .

Результаты оценки антифунгальных свойств препарата ПГБ-1, полученные с помощью разработанного параметра  $DA$ , представлены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. Относительный количественный параметр  $DA$ , характеризующий антифунгальные свойства препарата ПГБ-1 в условиях промежуточной прецизионности

Биоцидный препарат	$\overline{DA} \pm d$				
	Эксперимент 1	Эксперимент 2	Эксперимент 3	Эксперимент 4	Эксперимент 5
ПГБ-1	0,28 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,30 ± 0,04	0,29 ± 0,03	0,28 ± 0,04

Как видно из табл. 2, относительный количественный параметр  $\overline{DA}$  колеблется в узком диапазоне: от 0,28 до 0,30.

Таким образом, разработка относительного количественного параметра позволила значительно увеличить точность измерений, полученных в разное время (в условиях промежуточной прецизионности).

Для подтверждения правомочности использования нового метода оценки антифунгальных свойств препаратов проведено сопоставление результатов, полученных с помощью метода регистрации дегидрогеназной активности мицелиальных грибов, с результатами стандартного метода, положенного в основу ГОСТ 9.803-88 (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Показатели антифунгальных свойств препаратов, полученные с помощью двух методов

Биоцидный препарат	$\overline{DA} \pm d$ (разработанный метод)	Биомасса, $\bar{m} \pm d$ (ГОСТ 9.803-88)	Коэффициент корреляции ( $K$ )
ПГБ-1	0,28 ± 0,02	0,0553 ± 0,0233	0,9942
ПГБ-2	0,09 ± 0,01	0,0170 ± 0,0066	0,9957
ПГБ-3	0,43 ± 0,03	0,0813 ± 0,0311	0,9974
ПГБ-4	0,81 ± 0,03	0,1266 ± 0,0547	0,9961

П р и м е ч а н и е. Длительность испытания образцов биоцидных препаратов с помощью метода, положенного в основу ГОСТ 9.803-88, составила 14 сут;  $d$  – доверительный интервал.

Из представленных в табл. 3 данных видно, что количество накопленной биомассы тест-культуры и значения относительного количественного параметра оценки антифунгальной активности препаратов ( $DA$ ) коррелируют между собой (коэффициенты корреляции данных результатов во всех случаях приближались к 1,0000), что является подтверждением правомочности использования метода регистрации дегидрогеназной активности мицелиальных грибов для оценки антифунгальных свойств препаратов.

**Заключение.** Разработан новый метод количественной оценки антифунгальных свойств препаратов, позволяющий по степени ингибирования дегидрогеназной активности мицелиальных грибов судить об эффективности фунгицидов. По сравнению с широко используемым стандартным (ГОСТ 9.803-88) методом новый метод обладает рядом преимуществ: позволяет получить количественные показатели оценки антифунгальных свойств препаратов в более короткие сроки, имеет более высокую степень воспроизводимости результатов.

## Литература

1. *Шановалов И. В.* Биоповреждение строительных материалов плесневыми грибами: автореф. дис. ... канд. техн. наук: 05.23.05. Белгород: Белгород. гос. технол. ун-т, 2003.
2. *Sterflinger K.* // Fungal Biol. Rev. 2010. N 24. P. 47–55.
3. *Rojas J. et al.* // Inter. Biodeterioration and Biodegradation. 2009. Vol. 63, N 2. P. 169–175.
4. Единая система защиты от коррозии и старения. Фунгициды. Метод определения эффективности: ГОСТ 9.803-88. Введ. 01.01.90. М.: Гос. комитет СССР по стандартизации, 1989.

*L. ANTANOUSKAYA, N. BELYASOVA, A. RAILKIN*

### **THE USE OF DEHYDROGENASE ACTIVITY OF MICROMYCETES FOR QUANTIFICATION EVALUATION OF ANTIFUNGAL PROPERTIES OF BIOCIDES**

#### **Summary**

There was elaborated a new quantitative method for evaluating the antifungal properties of the agents, which are based on a determination of dehydrogenase activity of filamentous fungi. Comparative quantitative parameter (*DA*) was proposed to reduce measurement errors that were obtained under intermediate precision. There was established a high correlation degree of test results of antifungal properties of drugs based on PHMG obtained with the new and standard methods.