

УДК 579.22+547.8

## БІОЦИДНА ДІЯ ЧЕТВЕРТИННИХ ТРИАЗОЛОАЗЕПІНІЄВИХ СОЛЕЙ НА КОРОЗІЙНО НЕБЕЗПЕЧНІ МІКРОБНІ УГРУПОВАННЯ

Н.Р. Демченко, І.М. Курмакова, О.П. Третяк

*Біоцидна дія четвертинних триазолоазепінієвих солей на корозійно небезпечні мікробні угруповання. – Н.Р. Демченко, І.М. Курмакова, О.П. Третяк. – Виявлено біоцидну дію четвертинних триазолоазепінієвих солей по відношенню до сульфатвідновлювальних та залізовідновлювальних бактерій. Встановлено певний зв'язок між структурою досліджуваних речовин та антимікробними властивостями: наявність незаміщеного фенацільного фрагменту по першому положенню гетероциклічної системи та пара-толуїдинового фрагменту по третьому положенню системи зумовлює високі біоцидні властивості. Виявлено неконкурентний тип інгібування росту сульфатвідновлювальних бактерій дослідженими речовинами.*

**Ключові слова:** біоциди, сульфатвідновлювальні бактерії, залізовідновлювальні бактерії, четвертинні триазолоазепінієві солі.

**Адреса:** Чернігівський державний педагогічний університет імені Т.Г. Шевченка, вул. Гетьмана Полуботка, 53, Чернігів, 14000, Україна

**E-mail:** [demch@cn.relc.com](mailto:demch@cn.relc.com)

*The biociding effect of quaternary triasoloasepinium salts on the corrosion-risk microbial communities. – N.R. Demchenko, I.M. Kurmakova, O.P. Tretyak. – The biociding effect of quaternary triasoloasepinium salts in relation to sulphate-reducing and ferro-reducing bacteria was found out. Certain connection between the structure of the explored matters and antimicrobial properties was set: the presence of undeputized fenacili fragment according to the first regulation of geterocyclic system and para-toluidinic fragment according to the third regulation of the system stipulates high biociding properties. The noncompetitive type of inhibition of growth of sulphate-reducing bacteria by the explored matters was found out.*

**Key words:** biocides, sulphate-reducing bacteria, ferro-reducing bacteria, triasoloasepinium salts.

**Address:** Chernihiv Shevchenko State Pedagogical University; Hetman Polubotok Street, 53, Chernihiv, 14000, Ukraine

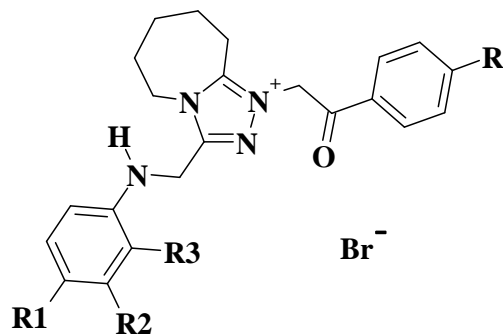
**E-mail:** [demch@cn.relc.com](mailto:demch@cn.relc.com)

Мікробна корозія підземних металевих споруд – одна із глобальних проблем, що досліджується багатьма вченими в різних країнах світу [2]. Відомо, що ґрунтові мікроорганізми прискорюють корозійний процес металевих споруд. Сукупність мікроорганізмів у ґрунті, прилеглому до металу, що кородує, відзначається сталістю якісного складу асоціантів. До таких угруповань завжди входять сульфат-відновлювальні бактерії (СВБ), залізовідновлювальні бактерії (ЗВБ), тіонові, денітрифікувальні та вуглеводнеокиснювальні бактерії [9]. Найсуттєвішим фактором, що впливає на процеси корозії металу в підземному середовищі є сульфатвідновлювальні бактерії [1], які, споживаючи катодний водень, викликають катодну деполяризацію металу. Крім того, наявність сірководню, який є основним метаболітом життєдіяльності СВБ, значно прискорює процеси корозії. Пригнічення процесу біогенної редукції за участю СВБ ефективно досягається застосуванням інгібіторів-біоцидів [2].

В ряду похідних триазолоазепінію знайдені речовини з високими біоцидними властивостями [11]. Метою роботи було продовження пошуку речовин з біоцидною дією по відношенню до сульфатвідновлювальних та залізовідновлювальних бактерій в ряду четвертинних солей триазолоазепінію та встановлення типу інгібування росту СВБ за присутності досліджуваних речовин.

### Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були четвертинні солі триазолоазепінію, які синтезовані на кафедрі хімії Чернігівського державного педагогічного університету імені Т.Г. Шевченка під керівництвом д. фарм. н., проф. Демченка А.М., загальна формула яких представлена на рис. 1.



де R, R1, R2, R3 = H, Cl, Br, CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>.

Рис. 1 Загальна формула четвертинних солей триазолоазепінію

В якості тест-культур використовували угруповання СВБ та ЗВБ, виділені нами зі зразку ґрунту товщиною біля 1 мм, що безпосередньо прилягав до кородуючої металевої поверхні (феросфери) [1]. Для отримання накопичувальної культури СВБ та ЗВБ використовували середовище Постгейта „В” та середовище Калиненка відповідно [12]. Титр бактерій в одержаній культуральній рідині визначали методом граничних десятикратних розведень [13].

Антимікробні властивості четвертинних триазолоазепінієвих солей визначали методом дифузії в агар з використанням паперових дисків, які були просочені 0,1%, 0,2%, 2% етанольними розчинами речовин і розміщені на поверхні агаризованого середовища, інокульованого суспензією корозійноактивних бактерій. Про активність біоцидів свідчили зони пригнічення росту бактерій навколо дисків.

Досліджували тип інгібування росту СВБ в присутності речовин III та IV (табл.1), що мали високу біоцидну дію. Для цього середовище Постгейта „В” в герметично закритих флаконах засівали п'ятидобовою суспензією СВБ з початковим вмістом бактерій 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> кл/мл. Експозиція 48 годин за температури 28°C. Речовини вносили у вигляді етанольного розчину з розрахунку 100 мг/л середовища. Проводили дві серії вимірювань біомаси бактерій: I серія (контроль: без біоцидів) – за початкової концентрації субстрату 16,1·10<sup>-3</sup>М - (норма); 8,05·10<sup>-3</sup>М; 3,22·10<sup>-3</sup>М та 32,2·10<sup>-3</sup> М; II серія – за відповідної концентрації субстрату з додаванням досліджуваних речовин [5,10].

Приріст біомаси СВБ на середовищі Постгейта „В” визначали за вмістом білка методом Лоурі з використанням реактиву Фоліна [8, 14], що дозволило побудувати криві росту культури СВБ та визначити питому швидкість росту бактерій ( $V_{сеп.}$ )

$$V_{сеп.} = \frac{2,3(lg C_1 - lg C_0)}{t_1 - t_0}$$

за формулою [5].

Графічним методом визначали тип інгібування росту бактерій дослідженими сполуками (рис. 1). Розраховували константу Міхаеліса ( $K_m$ ) та конс-

танти інгібування ( $K_i$ ) росту СВБ для досліджуваних речовин за формулою  $K_i = \frac{[I]}{\frac{V_{0,max}}{V_{0,max,I}} - 1}$ , де

[I] – концентрація інгібітору, моль/л;  $V_{0,max}$  та  $V_{0,max,I}$  – максимальна швидкість реакції без та за присутності інгібітору [6, 7].

Експеримент проводився у трикратній повторності. Відносна похибка визначення приросту біомаси не перевищувала 10 %.

## Результати дослідження та їх обговорення

Досліджено антибактеріальну дію четвертинних триазолоазепінієвих солей на сульфатвідновлювальні та залізівідновлювальні бактерії. Всі речовини проявляють біоцидну дію щодо СВБ, яка залежить від природи замісників по першому та третьому положенню гетероциклічної системи (табл. 1). Так, речовина I, яка містить аніліновий фрагмент по третьому положенню системи та пара-хлорфенацильний фрагмент по першому положенню системи при концентрації 0,1% та 0,2% не пригнічує ріст бактерій, а при концентрації 2% в зоні пригнічення спостерігаються окремі колонії. При заміні анілінового фрагменту на паратолуїдинової фрагмент (речовина II) антибактеріальні властивості речовини підсилюються. Більш високі біоцидні властивості спостерігаються у речовин III і IV, які містять по третьому положенню системи пара-анізидіновий та пара-хлораніліновий фрагменти відповідно. Речовини V та VI містять незаміщений фенацильний фрагмент по першому положенню гетероциклічної системи та 3,4-дихлораніліновий фрагмент (речовина V) та паратолуїдинової фрагмент по третьому положенню системи (речовина VI). При цьому речовина VI повністю пригнічує ріст СВБ при концентрації 0,2% та 2%, що узгоджується з [3]. Введення бром-у в пара - положення фенацильного фрагменту та 2-метил-3-хлоранілінового фрагменту в трете

положення гетероциклічної системи (речовина VII) послаблює біоцидні властивості речовини, причому зони пригнічення росту СВБ не залежать від концентрації речовини. Речовини VIII та IX, являючись стереоізомерами (містять пара-бромфенацильний фрагмент та пара-анізидіновий фрагмент) виявляють досить високу біоцидну дію,

яка не залежить від положення замісників (табл. 1). Речовина X містить метильний замісник в пара-положенні фенацильного фрагменту та 3,4-дихлораніліновий фрагмент по третьому положенню системи виявляє біоцидні властивості нижчі, ніж речовина IV.

Таблиця 1. Біоцидна дія четвертинних триазолоазепінієвих солей на культуру СВБ та ЗВБ

Речовина	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Діаметр зон пригнічення, мм						
					СВБ			ЗВБ			
					0,1%	0,2%	2%	0,1%	0,2%	2%	
I	Cl	H	H	H	*	*	**	13,7±0,9	11,0±0,7	19,3±0,7	
II	Cl	CH <sub>3</sub>	H	H	26,0±0,8	32,5±2,0	52,5±2,0	12,3±0,8	24,0±0,6	36,3±0,9	
III	Cl	OCH <sub>3</sub>	H	H	37,3±1,3	48,3±1,7	60,0±2,9	*	15,3±0,3	19,25±0,5	
IV	Cl	Cl	H	H	31,7±1,7	50,7±0,7	71,0±2,1	22,8±0,8	17,8±0,7	34,0±0,7	
V	H	H	Cl	Cl	*	23,3±1,7	40,0±2,9	**	20,7±1,8	18,3±0,9	27,5±1,2
VI	H	CH <sub>3</sub>	H	H	26,7±1,7	***	***	10,7±0,3	11,2±0,5	25,2±0,4	
VII	Br	H	Cl	CH <sub>3</sub>	30,7±1,7	30,7±0,7	35,7±0,7	16,3±0,3	11,3±0,67	20,3±0,67	
VIII	Br	OCH <sub>3</sub>	H	H	34,3±2,3	33,3±1,7	52,7±2,7	**	*	*	16,8±0,3
IX	OCH <sub>3</sub>	Br	H	H	**	17,0±0,6	31,5±1,5	53,3±1,7	*	15,8±0,5	28,0±0,7
X	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	H	28,3±1,7	34,7±0,3	39,3±0,7	29,0±1,24	31,7±1,7	38,5±1,8	

Примітка: \* - ріст бактерій не пригнічений; \*\* - в зоні пригнічення окремі колонії; \*\*\* - ріст бактерій повністю пригнічений.

Таким чином, дослідження четвертинних триазолоазепінієвих солей показало, що структура речовин впливає на біоцидний ефект, максимальний в випадку з незаміщеним фенацильним фрагментом по першому положенню гетероциклічної системи та пара-толуїдиновим фрагментом по третьому положенню системи.

Всі зазначені речовини пригнічують також ріст залізівідновлювальних бактерій. Найбільшу антибактеріальну дію виявили речовини II, IV та X.

Для встановлення типу інгібування росту СВБ досліджували речовини III та IV. Кінетичні криві, які одержані на основі експериментальних даних за допомогою графічного методу Лайнуївера – Берка, наведено на рис.2. Їх аналіз свідчить про неконкурентний тип інгібування росту СВБ досліджуваними речовинами.

Неконкурентний характер інгібування росту СВБ обумовлений взаємодією біоцидів – четвертинних солей триазолоазепінію з ділянками молекули ферменту, які не виконують функцію центру зв'язування субстрату. Це призводить до зміни просторової структури ферменту в результаті чого порушується нормальне зв'язування субстрату. Константа Міхаеліса дорівнює  $8,33 \cdot 10^{-3}$  М, константа інгібування росту СВБ речовинами III та IV дорівнює  $4,16 \cdot 10^{-5}$  моль/л та  $2,92 \cdot 10^{-5}$  моль/л відповідно. Виходячи з того, що константа інгібування є величиною зворотною до величини спорідненості ферменту до інгібітору [4], можна зробити висновок про те, що зміна замісника з пара-анізидінового на пара-хлораніліновий фрагмент впливає на спорідненість до ферменту відповідної речовини. Більшу спорідненість до ферменту виявляє речовина IV.

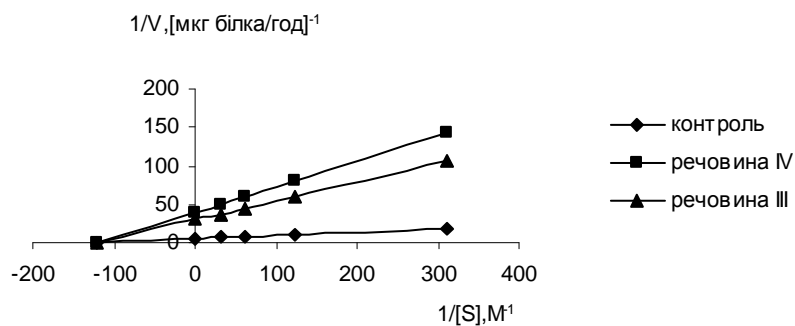


Рис. 2 Кінетичні криві інгібування росту СВБ четвертинними триазолоазепінієвими солями.

Fig. 2 Kinetic curves inhibition of growth of SRB quaternary triasoloazepinium salts.

Таким чином, нами встановлено неконкурентний тип інгібування росту сульфат-відновлювальних бактерій четвертинними триазолоазепінієвими солями та виявлена залежність інгібуючої дії речовин від їх структури. Пара-хлораніліновий фрагмент по третьому положенню гетероциклічної системи забезпечує більшу спорідненість інгібітору до ферменту і, відповідно, високу біоцидну дію щодо СВБ.

#### Висновки

1. Виявлено біоцидні властивості четвертинних триазолоазепінієвих солей по відношенню до сульфатвідновлювальних та залізвідновлювальних бактерій, які залежать від природи замісників по

першому та третьому положенню гетероциклічної системи.

2. Найбільшу біоцидну дію має бромід 1-(2-оксо-2-фенілетил)-3-(4-толуїдінометил)-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-[1,2,4]триазоло[4,5-а]азепінію-1.

3. Встановлено неконкурентний тип інгібування росту сульфатвідновлювальних бактерій четвертинними солями триазолоазепінію.

4. Розраховані кінетичні характеристики: константа Міхаеліса ( $8,33 \cdot 10^{-3}$  М) та константи інгібування росту СВБ четвертинними солями триазолоазепінію з пара-хлорфенацильним фрагментом по першому положенню гетероциклічної системи та з пара-анізидіновим і пара-хлораніліновим фрагментом по третьому положенню системи, які дорівнюють  $4,16 \cdot 10^{-5}$  моль/л та  $2,92 \cdot 10^{-5}$  моль/л відповідно.

1. Андреюк Е.И., Антоновская Н.С., Пиляшенко - Новохатний А.И., Козлова И.А. Ферросфера – зона взаимодействия микроорганизмов и металла в подземной среде // Актуальные проблемы биологических повреждений и защиты материалов, изделий, сооружений. – М.: Наука, 1989. – С. 155-165.
2. Андреюк Е.И., Козлова И.А., Коптева Ж.П. та ін. Микробна корозія підземних споруд. – Київ: Наук. думка, 2005. – 259 с.
3. Демченко А.М., Назаренко К.Г., Макей А.П. и др. Синтез, противокоррозионная и биоцидная активность производных триазолоазепина // Журнал прикладной химии. – 2004. – Т. 77. Вып. 5. – С. 794-797.
4. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. – М.: Мир, 1982. – 816 с.
5. Иерусалимский Н.Д. Основы физиологии микробов. – М.: Изд-во АН СССР, 1963. – 146 с.
6. Курский М.Д., Костерин С.А., Рыбальченко В.К. Биохимическая кинетика. – Київ: Вища шк., 1977. – 264 с.
7. Ленинджер А. Основы биохимии: В 3-х т.: Пер. с англ. – М.: Мир, 1985. – Т. 1. – 367 с.
8. Методы общей бактериологии: Пер. с англ. / Под ред. Ф. Герхардта и др. – М.: Мир, 1984. – Т.2. – 472 с.

9. Пиляшенко-Новохатний А.И. Возможный розподіл функцій між складовими корозійно небезпечної сукупності мікроорганізмів в загальному процесі мікробно індукованої корозії. // Фізико-хімічна механіка матеріалів. – Львів, 2000. – Спец. вип. № 1. – Т. 2. – С. 564-567.
10. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток: Пер. с англ. – М.: Мир, 1978. – 331 с.
11. Приходьмо С., Курмакова І., Демченко Н., Третяк О. Мікробно індукована корозія сталі в присутності похідних триазолоазепіну. // Фізико-хімічна механіка матеріалів. – Львів, 2006. – Спец. вип. № 5. – Т. 2. – С. 919-923.
12. Романенко В.И., Кузнецов С.И. Экология микроорганизмов пресных водоемов. – Л.: Наука, 1974. – 196 с.
13. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во МГУ, 1983. – 215 с.
14. Lowry O.H., Rosebrough H.J., Farr A.L., Randall K.C. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – 193, № 1. – P. 265-275.

Отримано: 20 січня 2007 р.

Прийнято до друку: 1 лютого 2007 р.